

Válasz Prof. Dr. Hunyady Béla Opponensi Bíráói Véleményére

Először is szeretném megköszönni Professzor Úrnak MTA doktori értekezésem bírálatát, pozitív, dicsérő szavait, építő jellegű kritikáit és tartalmas kérdéseit. Az alábbiakban válaszolok észrevételeire illetve kérdéseire

1) Részletes értékelés 1

Köszönöm észrevételét, miszerint **helyesebb lett volna** a pankreatitisz etiológiai tényezői között megemlíteni az **autoimmun pankreatitist** is. A bíráló véleményével **maximálisan egyet értek**. A doktori mű irodalmi áttekintés fejezetében azért kerülhette el figyelmemet, mert elsősorban az akut pankreatitiszre illetve a toxikus anyagok hatásaira koncentráltam.

2) Formai megjegyzések 1

Barry Argenttel közösen több előadást is tartottunk egymás fotóit, ábráit egymástól elkérve, felhasználva. A forrást minden esetben megjelöltük. A fotó ebben az esetben is az **Ő engedélyével került felhasználásra** (a szerző által kiállított igazolást a melléklet tartalmazza). A kép forrását az ábra alatti ábramagyarázatban is megjelöltem, **azonban kritikusan - a bírálóval teljesen egyetértve - meg kell jegyeznem, hogy, helyesebb lett volna** MTA doktori értekezésemben **saját fotót felhasználni** (mint ahogy a 4. ábrán is saját fotót használtam fel).

3) Formai megjegyzések 2

Köszönöm **rövidítésekkel** kapcsolatos észrevételét, mellyel **teljes mértékben egyetértek**. Az angol elnevezésekkel kapcsolatos javaslat is kiváló ötlet, hiszen ez segíthet a rövidítések értelmezésében. CCCP = carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone.

4) Kérdések 1

Köszönöm kérdését. Nagyon fontos területet érint. A **jó kutatási munkának** alapja a **pontos, precíz**, minimális szórást mutató módszer alkalmazása. A sejtek életképességét, stimulálhatóságát és az alapvető kémiai reakciókra adott válaszaikat az idő függvényében összehasonlítottuk. **6-48 órával az izolálás után a sejtek egyformán reagálnak a kémiai változásokra** illetve a stimulálásra vagy gátlásra. Minden kísérlet elején és végén megcsináltuk a **Hepes/HCO₃⁻ - CO₂ tesztet**: a kísérlet elején a HEPES oldatot HCO₃⁻ - CO₂ –ot tartalmazó oldatra cseréljük át, melynek hatására gyors acidózis alakul ki a sejtben. Ezt követően a sejtek pH-ja az iontranszporterek aktív működésének következtében regenerálódik. Abban az esetben, ha a sejt károsodott, akkor pH változás nem figyelhető meg. Ez a teszt alapján eldönthető, hogy **a kísérlet elején a sejtek egészségesek-e**. A kísérletek végén a teszt fordítottját csináljuk: a HCO₃⁻ - CO₂ –ot tartalmazó oldatot HEPES oldatra cseréljük vissza, melynek hatására a sejt pH-ja gyorsan megemelkedik, majd ezt követően a sejtek pH-ja az iontranszporterek aktív működésének következtében regenerálódik. Abban az esetben, **ha a sejt károsodott, akkor pH változás nem vagy alig figyelhető meg**.

A sejtek membrán integritásának károsodása is jól kiszűrhető a kísérletek értékelésekor. Minden kísérlet esetén rögzítjük az adatokat. BCECF festék esetén a pH független 440nm-es hullámhosszon a festék egyenletesen ürül ki a sejtől. **Membrán károsodás esetén a festék kiürülés drámaian felgyorsul**, ami már kihat a mérési eredményre is. Ezt a folyamatot legjobban a 31. ábra A és C részábrája mutatja, ahol jól látható, hogy az epesav hatására bekövetkező sejtmembrán károsodás következtében a sejt azonnal elveszti a festéket, mely esetben a 495/440-es hányados hirtelen megemelkedik.

5) Kérdések 2

Köszönöm kérdését. Az epitél sejtek esetén nagyon fontos **a sejtek közötti szoros kapcsolat** kialakulása, hiszen ez tudja csak biztosítani az egymástól eltérő folyadékterek kialakítását. Különböző humán sejtvonalak esetében (melyeket transzmembránon lehet növesztetni) a membrán két oldalán levő potenciál különbség (**transzepithelialis potenciál**) illetve **membrán rezisztencia** vizsgálatával jól követhető a sejtek közötti kapcsolat kialakulása, illetve károsodása. Primer duktuszok esetében ez nehézkes, hiszen csak mikroelektroda lumenbe helyezésével tudnánk a potenciálokat megmérni. Ez a módszer

laboratóriumunkban még nincs beállítva. A **sejtek közötti szoros kapcsolat mérése azonban kémiai módszerrel** is történhet. Az egyes ionok (pl. Na^+ vagy HCO_3^-) lumenális vagy bazolaterális cseréje során jól látható, hogy szeparált-e a két egymástól elkülönülő folyadéktér. Ezt a tesztet időszakosan (nem minden duktusz esetén) el szoktuk végezni. **Kísérleteink során epitelsejtek közötti adhézión problémát nem észleltünk.**

6) Kérdések 3

Köszönöm megjegyzését illetve kérdését. Jelenleg is vitatott, hogy biliáris pankreatitiszben a **nyomásfokozódás** vagy az **epesavak pankreász duktuszokba történő beáramlása** játszik szerepet az akut gyulladás kialakulásában. Valószínűleg a két folyamat együttesen, egymást követően következnek be. A jelenleg legjobban elfogadott hipotézis szerint a Vater papilla elzáródásakor **először nyomásfokozódás alakul ki** a pankreász vezetékben. A pankreász duktuszok - a Vater papilla irányából követve - szőlőfürtszerűen az acinusokban végződnek. Nyomásfokozódás esetén **acinus károsodás** figyelhető meg, melynek hatására a nyomás lecsökken a pankreász vezetékben és **ezt követően az epe már könnyedén bejut(hat) a pankreász duktális rendszerébe.** Egyértelmű kísérleti adatok bizonyítják, hogy a biliáris pankreatitisz első 24-48 óráját követően az epe bejuthat a hasnyálmirigy vezetékbe (Lerch MM et al, Gastroenterology, 1992, Lerch MM et al., Gastroenterology, 1993). Az egyesavak ebben az esetben először kis koncentrációban jutnak el a duktuszokig, melynek hatására fokozott folyadék- és HCO_3^- szekréció alakul ki. Véleményem szerint: (i) **a megnövekedett lumenális nyomás késlelteti vagy megakadályozza az egyesavak diffúzióját az acinus sejtek felé,** (ii) továbbá **a megnövekedett nyomás segíthet eltávolítani a kisebb epeköveket a papilla nyílásából,** lehetővé téve a hasnyálmirigy nedv elfolyását. Ha viszont az egyesavak koncentrációja tovább emelkedik, akkor a duktális epitél sejtek nagy mértékben károsodnak, a sejtek szekréciós mechanizmusai gátlódnak, és a duktális sejtek a továbbiakban nem képesek védekező funkciójukat betölteni. A sejtek közötti szoros kapcsolat is károsodhat, aminek hatására az egyesavak már nemcsak a lumenális, de a bazolaterális membrán felől is nagy koncentrációban érhetik el a duktális sejteket. Ennek hatására szekréciós stop alakul ki, ami jelentősen súlyosbíthatja a pankreatitisz lefolyását. Természetesen, **ha a kezdeti nyomásfokozódás súlyos acinus sejt károsodást okoz, akkor a duktuszon belüli nyomás jelentős mértékben lecsökkenhet, melynek következtében a megnövekedett folyadékszékreció hatástalan lesz.**

7) Kérdések 4

Köszönöm kérdését. Kísérleteink alapján két fontos terápiás lehetőséget is azonosítottunk.

1) A pankreász duktuszok bikarbonátban gazdag folyadékszekréciójának helyreállítása

Ismert, hogy pankreatitiszben a pankreász duktuszok folyadék és bikarbonátszekréciója károsodott. Apikális **CFTR Cl- csatorna, anion cserélő transzporter vagy kálium csatorna stimuláló** vegyület beindíthatná a bikarbonát szekréciót, ezzel segítene az intrapankreatikusan aktiválódott enzimek pankreászból történő kimosásában. Munkacsoportunk az elmúlt években egy új, **kálium csatorna stimuláló vegyületet (NS11021)** karakterizált, **melyről** kimutattuk, hogy szerepet játszhat a kis dózisú epesavak indukálta duktális védekezésben. A közlemény 2011. januárjában jelent meg a Gut c. folyóiratban (Venglovecz et al., Gut, 2011).

2) Energia helyreállítás

Véleményem szerint a **legígéretesebb** lehetőség a sejt energetikájának helyreállításában van, ez ugyanis mind az acinusokban mind pedig a duktális sejtekben végbemenő toxikus reakciók megállítását eredményezhetné.

A pankreatitisz akut szakaszában fontos változás a mitokondriumok károsodása és a következményes, súlyos fokú energia (ATP) csökkenés. Ebben az állapotban a sejt funkciói (beleértve az iontranszporterek működését is) leállnak. A sejt úgynevezett „**klinikai halál**” állapotába kerül. Criddle D. és mtsai kimutatták (a tézis 44-46 közleményei), hogy patch pipetta segítségével **a sejtbe visszajuttatott ATP kivédi a toxikus kalcium szignál illetve sejthalál kialakulását**. Azaz, amennyiben a betegek pankreász sejtjeibe sikerülne ATP molekulát bejuttatni, a sejt túlélhetné az akut szakot, a pankreász „restitutio ad integrum” gyógyulhatna. A fő problémát az okozza, hogy az ATP-t a hidrolázok gyorsan elbontják, továbbá a molekula félélet ideje nagyon rövid, mindössze 1-2 perc. További nehézséget okoz, hogy a molekula hidrofób, ezért nem képes átjutni a sejtmembránon. Az elmúlt évben nagy energiát fordítottunk arra, hogy az **ATP-t liposzómába becsomagolva** bejuttassuk a pankreász epitél sejtjeibe. A Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerészeti Karával közösen sikerült egy olyan liposzómát kifejleszteni, melybe az ATP-t becsomagolva energiát tudunk bejuttatni a sejtbe. Ezen elő kísérleteinket felhasználva nemzetközi pályázatot nyújtottunk be az European Research Council-hoz, ahol a pályázatról júliusban várható döntés.

Humán klinikai adatok még nem állnak rendelkezésünkre.

Legvégül ismét szeretném megköszönni Professzor Úr értékes bírálatát, kritikai észrevételeit, hasznos kérdéseit. Köszönöm, hogy a nyilvános védés kitűzését javasolta. Egyúttal **kérem Professzor Urat válaszaim elfogadására.**

Tisztelettel és Köszönettel:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Hegyi Péter', with a long horizontal stroke extending to the left.

Hegyi Péter
doktorjelölt

2011-03-22

MELLÉKLET



**Institute for Cell and Molecular
Biosciences**

Newcastle University
Faculty of Medical Sciences
Framlington Place
Newcastle upon Tyne
NE2 4HH United Kingdom

14th March 2011

Hungarian Academy of Sciences

Dear Sirs,

Dr. Peter Hegyi
DSc. Thesis

This letter is to confirm that (i) figure 3 in Dr Hegyi's DSc. thesis is from my own work and (ii) that I approved the use of the figure by Dr Hegyi.

Yours sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "B.E. Argent".

Professor B.E. Argent
Deputy Director
Institute for Cell & Molecular Biosciences

tel: +44 (0) 191 222 3492
fax: +44 (0) 191 222 7424

<http://www.ncl.ac.uk/camb/>

The University of Newcastle upon Tyne trading as Newcastle University



THE QUEEN'S
ANNIVERSARY PRIZES
FOR HIGHER AND FURTHER EDUCATION

2005