

Válasz Prof. Dr. Jakab Ferenc Opponensi Bíráói Véleményére

Először is szeretném megköszönni Professzor Úrnak MTA doktori értekezésem bírálatát, pozitív, dicsérő szavait, építő jellegű kritikáit és értékes javaslatait. Az alábbiakban válaszolok a 2. és 3. pontban megfogalmazott kritikai megjegyzésekre illetve kérdésekre.

1) 2. Kritikai megjegyzések, kérdések 1-3

Az elírások és az ábrára történő rossz utalás valóban megtörtént, mely minden bizonnyal figyelmetlenségem következménye. Köszönöm, hogy felhívta figyelmemet az elírásokra. Az elírásokat kijavítottam.

2) 2. Kritikai megjegyzések, kérdések 4

A 61. oldalon a „kísérletek egymásba esnek” megfogalmazás valóban pongyola. Szerencsésebb lett volna azt írni, hogy „a kísérletek kiértékelése során kapott pH görbék szinte teljesen fedik egymást”.

3) 2. Kritikai megjegyzések, kérdések 5

Köszönöm észrevételét. Az „emésztést követően” valóban lényegesen pontosabb megfogalmazás lett volna az „étkezést követően” helyett.

4) 2. Kritikai megjegyzések, kérdések 6

Köszönöm kritikai megjegyzését. **Papp Miklós** és **Varga Gábor** 1990-ben megjelent egyik munkájukban szintén vizsgálták a neurokinin receptorok pankreász szekrécióra kifejtett hatását, mely közleményt (Int J Tissue React. 1990;12(5):299-307) mindenképpen be kellett volna idézni doktori értekezésemben. A methodikai részben Szűcs Ákos 2006-ban megjelent közleménye (Cell Physiol Biochem. 2006;18(4-5):253-64) valamint az „általános” illetve „epesav-indukálta pankreatitisz” részben **Pap Ákos** több munkájának beidézése lényegesen jobb lett volna. Ezt magammal szemben is kifejezetten súlyos gondatlanságnak tekintem,

hiszen egyik fő célom az általuk megkezdett komoly kutatási szemlélet folytatása, a kutatásaik révén elért nemzetközi elismertség megtartása és továbbfejlesztése.

5) 3. Kérdések 1

Köszönöm kérdését. A **proteáz aktiváló receptor-2 (PAR-2)** bikarbonát szekrécióban betöltött szerepe rendkívül fontos. Kevés, egymásnak ellentmondásos közlemény foglalkozik ezzel a kérdéssel, humán adatok pedig szinte egyáltalán nem állnak rendelkezésre.

Munkacsoportunk 7 éve foglalkozik a tripszin illetve PAR-2 szerepével. Eredményeink egy része a „Jelen kísérletek, jövőbeni tervek” c. fejezetben került leírásra.

A PAR-2 **élettani** szerepe nem teljesen tisztázott, ezért annak szerepére nem tértem ki a bikarbonát szekréció regulációja fejezetben. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a PAR-2 az acinusokhoz közeli kis ductusok lumenális oldalán expresszálódik. Aktivizálódásuk mai ismereteink szerint csak kórélettani állapotban következik be, hiszen élettani körülmények között nincs aktív tripszin a pankréaszban. Az acinus sejtek tripszinogént, a tripszin inaktív formáját termelik, melyek a PAR-2-re nincsenek hatással. Fontos megjegyezni, hogy az acinusok tripszin inhibitort (SPINK1) is termelnek, amelyek az esetlegesen autoaktivizálódott tripszinhez azonnal kötődnek és annak aktiváló képességét megszüntetik.

Kórélettani szempontból a PAR-2 rendkívül fontos szerepet játszik a krónikus pankreatitisz kialakulásában. Az intrapankreatikusan aktiválódott tripszin – ami bekövetkezhet mind az acinusban mind pedig a vezeték lumenében – aktiválja a PAR-2-t, ami intracelluláris Ca^{2+} szignált vált ki a ductális sejtekben. A PAR-2 aktiváció gátolja a CFTR Cl^- csatornát illetve az anion kicserélő csatornát, ami csökkent bikarbonát szekrécióhoz vezet. Ez a mechanizmus a lumenben csökkenti a pH-t, ami pedig fokozza a tripszinogén autoaktivációját. Ez az „**ördögi tripszin kör**” egy folyamatos szekréció gátlást és tripszin aktivációt tart fenn, ami fontos szerepet tölthet be a krónikus pankreatitisz kialakulásában.

Legújabb közleményünk, mely ezen új folyamatot először tárja fel a szakirodalomban, a *Gastroenterology* c. folyóiratban revízió alatt van.

6) 3. Kérdések 2

Wang XY és mtsai. fontos megfigyelést tettek, miszerint a fő pankréász vezeték körül **Cajal-féle intersticiális (pacemaker) sejtek** lokalizálódnak. Ezek a sejtek a pankréász vezeték ritmikus kontrakciókhoz vezethetnek, ami élettanilag segíti a pankréász nedv

kiürülését a pankreász vezeték rendszeréből. Ezek a sejtek **indirekt módon** befolyásolhatják a pankreász vezetéksejtek bikarbonát szekrécióját. Aktivizálódásuk nagy valószínűséggel csökkenti a nyomást a pankreász vezetékben, ami közvetett módon stimulálhatja a vezetéksejtek ion- és folyadék szekrécióját, míg csökkent működésük lassítani fogja a folyadék kiürülését, ami a lumenen belüli nyomás fokozódáshoz és csökkent szekrécióhoz vezethet.

7) 3. Kérdések 3-4

A pankreász duktuszok izolálásának leírása valóban rövid a dolgozatban. Tekintettel arra, hogy a módszer 25 éve ismert, annak leírására nem fordítottam elég hangsúlyt. Forrásként, megjelöltem **Prof. Barry Argent, korábbi mentorom** 1986-os közleményét, mely a módszer részleteit tartalmazza.

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).

A 3. ábrán a bal oldali kép **40x**, míg a jobb oldali kép **100x** nagyítással készült.

8) 3. Kérdések 5

A kísérletekhez a tartó és perfúziós **mikropipettát** üvegből, egy speciális, vertikális microforge segítségével (Harward Apparatus, De Fonbrune Microforge Pipette Puller) saját magunk készítettük. A technika nagy gyakorlatot igényel, legjobb tudomásom szerint a pankreatológiában jelenleg csak Prof. Shmuel Muallem használja ezt a technikát.

A technika lényege, hogy az előre megvásárolt **üveg kapilláris** (méretek: tartó pipetta esetén a külső átmérő: 0,228 cm, belső átmérő: 0,19 cm, míg a perfúziós pipetta esetén a külső átmérő 0,119 cm, belső átmérő: 0,91 cm) végére egy **felforrósított platina szállal** hurkot készítünk, majd a pipettát függőleges helyzetbe állítjuk. A hurokra különböző **súlyokat** (0,5 - 5 g között) akasztunk. Ezt követően az üveg kapilláris oldalát különböző hőmérsékleten egy felforrósított platina szállal melegítjük. A **melegítés és a súly hatására az**

üveg, a melegítés helyén elvékonyodik, majd a kapilláris megnyúlik. A súlyokat és hőmérsékleteket folyamatosan váltogatva készítjük el a két pipettát. A folyamat nagyon időigényes: egy pipetta elkészítése, gyakorlattól függően, 1-2 órát vesz igénybe. A **tartó pipetta** vég-átmérője (ahova a duktuszt végét felszívjuk): 50 μm , míg a szűkületnél kb. 25 μm . A **perfúziós pipetta** vég-átmérője 5 μm , míg a szűkületnél kb. 10 μm (lásd 4. ábra). A két pipettát egymásba vezetve behelyeztük a pipetta tartóba. A tartó pipetta végét egy 2 ml-es fecskendőhöz rögzítettük gumicső segítségével. A duktuszt (a **fecskendő** segítségével) **enyhe szívással** a tartó pipettába szívtuk fel, majd a fecskendő végén levő csappal lezártuk a levegő áramlását, aminek következtében **vákuum** alakult ki. A pontos nyomás értéket nem ismerjük, hiszen ezt nem mértük meg. A vákuum nagyon stabil volt, kicsúszás szinte egyáltalán nem következett be. A legnagyobb problémát a mikroszkóp alatti előkészületeknél a **tartó pipetta törése illetve a perfúziós pipetta eldugulása** jelentette. Napi 2-3 sikeres kísérlet már kiválónak mondható. A sikeres kísérletek számát százalékban nehéz lenne kifejezni, hiszen ezt nem számítottuk ki, illetve a kihívást sokszor az idő jelentette. A már megkezdett kísérleteket azonban 90-95%-ban sikerült befejezni.

Az **ép, élő** duktuszok mikroszkóp alatt jól elkülöníthetők mind a halott epitelsejteket tartalmazó duktuszoktól mind pedig a kisebb vénáktól. A duktuszok két vége az inkubátorban leforr és a **duktusz. a lumenbe történő szekréció következtében felhízik**. Ez a vénák és halott epitél sejtek esetében nem következik be. A kísérlet kezdetekor a fluoreszcens festék megtartása a legjobb bizonyíték. **Halott epitelsejtek esetén**, a membránkárosodás miatt, a sejtek a festéket nem tudják megtartani, így **a festék azonnal kiürül a sejtéből**. Ezt a folyamatot legjobban a 31. ábra A és C részábrája mutatja, ahol jól látható, hogy az epesav hatására bekövetkező sejthalál következtében a sejt azonnal elveszti a festéket. A festék nélküli sejteken mérés nem végezhető.

9) 3. Kérdések 6

Külön köszönöm Professzor Úr terápiás lehetőséget érintő kérdését, hiszen kutatásaink végső célja, hogy az **élettani és kórélettani** megfigyelések mellett **új terápiás** lehetőségeket ismerjünk fel, illetve dolgozzunk ki.

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 tudtunk 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. Köszönöm, hogy a nyilvános védés kitűzését javasolta. Egyúttal **kérem Professzor Urat válaszaim elfogadására.**

Tisztelettel és Köszönettel:



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,

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