

Válasz

Prof. Dr. Csernus Valér, tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA Doktora bírálatára

Hálásan köszönöm Csernus Professzor Úrnak, hogy elvállalta dolgozatom bírálatát. Nagyra értékelem fáradságos munkáját, részletes opponensi véleményét és azt, hogy a végzett munkát és az értekezést értékesnek ítélte, és a mű elfogadását javasolta.

Nagy örömömre szolgált, hogy Tisztelt Bírálom az értekezés témáját és módszereit korszerűnek, kivitelezését, stílusát és nyelvezetét igényesnek, szerkezetét pedig logikusan felépítettnek találta. Egyetértek Professzor Úr azon véleményével, hogy a módszertani leírás az értekezésnek az optimálisnál valamennyivel nagyobb részét foglalja. A 109 oldalas dolgozat 15 oldalas fejezetében azonban így is csak a legfontosabb vizsgálati módszereket soroltam fel, és azokat is igyekeztem a lehető legrövidebb módon leírni. Ez arányaiban talán nem túlzó, de igazat adok Bíráló Úrnak abban, hogy az eredmények összefoglalása ehhez képest nagyon rövid.

Az értekezéssel kapcsolatos megjegyzéseire és kérdéseire az alábbi válaszokat adom:

Egyetértek Opponens Úrral abban, hogy az immortalizálással nyert sejtvonalak felhasználhatósága korlátozott és az élettanihoz legközelebb álló adatok primer sejt kultúrákkal nyerhetők. Ezért használtam *in vitro* vizsgálataim túlnyomó többségében primer sejteket és ezért fejlesztettük ki *in vitro* rekonstruált vér-agy gát modellünket is primer endothelsejtek felhasználásával, mégha ennek munka- és költségigénye lényegesen magasabb is volt.

Az erek belhámsejtjei különlegeseek, mivel osztódóképességüket megtartják mind a szervezetben, mind tenyésztési körülmények között. Így a köldökzsinór vénából nyert endothelsejtek (HUVEC), a világszerte legismertebb és leggyakrabban használt humán endothelsejtek (>5700 PubMed cikk), tenyésztése is a szaporodásukon alapszik. Ezekben a tenyésztésekben nincsenek pericyták a speciális izolálási módszer miatt [Siow 2012 *Methods Mol Biol* 806:265-274]. Tenyésztési körülmények között 42 populáció kétszereződésig megtartják mind endothel sajátosságait, mind osztódóképességüket, mielőtt a barrier és más biológiai tulajdonságaik romlani kezdenének és sejtöregedés állna be a telomer rövidülés miatt [Carracedo és mtsai 2012 *Mech Ageing Dev*, in press DOI: 10.1016/j.mad.2012.09.002.]. Ezt a jelenséget agyi mikroér endothelsejtek esetében is leírták, a sejtek szaporodása megtartott endothel sajátosságok mellett 6 sejtosztáson, passzáláson keresztül lehetséges [Dehouck és mtsai 1991 *J Neurochem* 54:1798-1801].

Teljes mértékben egyetértek Bírálómmal abban, hogy a pericyták összejt tulajdonságokkal rendelkeznek és a felnőttkori szöveti helyreállító folyamatokban szerepük lehet. Igazolták, hogy a pericyták multipotens összejteket és progenitor sejteket, nevezetesen mesenchymális összejteket, fehér adipocytá progenitor sejteket, izom összejteket, sőt még

neuronális őssejteket is képezhetnek speciális körülmények között [Armulik és mtsai 2011 Dev Cell 21:193-215]. Pár hete közölték azt a megfigyelést, hogy a károsodott agyszöveten belül a pericyta eredetű sejtek neuronális újraprogramozása alkalmas lehet a degenerálódott idegsejtek helyettesítésére is [Karow és mtsai 2012 Cell Stem Cell 11:471-476]. Agyi mikroér pericytákról is kimutatták, hogy különleges tenyésztési körülmények között őssejtté válhatnak, amelyekből mesenchymális így újabb pericyta, vagy neuronális, azaz glia és idegsejtek keletkezhetnek [Dore-Duffy és mtsai 2006 J Cereb Blood Flow Metab 26:613-624]. Azonban a szakirodalomban tenyésztett, érett pericytákból endothelsejt képződést nem találtam, és ilyet én magam sem tapasztaltam az eddigi, 22 éves endothelsejt tenyésztési gyakorlatomban. Az ellenkező irányban azonban átalakulhatnak a sejtek, az endotheliális–mesenchymális tranzíció során endothelsejtekből myofibroblastok és fibroticus hegyszövet keletkezhet patológiás körülmények között [Piera-Velazquez és mtsai 2011 Am J Pathol 179:1074-1080]. Gliasejt tenyésztet esetén nem találtam utalást pericyta kontaminációra a szakirodalomban. Itt jegyezném meg, hogy a neurovaszkuláris egység tenyésztett sejtjei nagyon jellegzetesek, morfológiájuk és markereik révén könnyen elkülöníthetők.

Az *in vitro* vér-agy gát barrier funkciója egyértelműen rosszabb volt minden olyan kísérletben, ahol az endothel egysejtrétegbe beékelődött pericyta sejteket lehetett azonosítani. Erre az a kézenfekvő magyarázat, hogy az endothelsejtek a tenyésztet szennyező, kifejtett, elkötelezett pericyta sejtekkel nem tudnak szoros zárókapcsolatot kialakítani, ezért a tenyésztet elektromos rezisztenciája csökken, míg a markerek permeabilitása nő. Frissen izolált agyi mikroerekben mintegy 20%-ra tehető az agyi pericyták - azaz az NG2 illetve PDGFβR marker pozitív sejtek - aránya [Dore-Duffy és mtsai 2011 Microvasc Res 82:18-27]. A primer agyi endothelsejt tenyésztetek puromicin-kezelése, amit munkatársaimmal szegedi és párizsi kísérletek során tökéletesítettünk, jelentősen fokozta az egysejtrétegek tisztaságát, növelte a transzendotheliális elektromos rezisztenciát és csökkentette a P_e permeabilitási együtthatót [Perrière és mtsai 2005 J Neurochem 93:279-289]. Az endothelsejt tisztítási módszerünk gyorsan nemzetközi elfogadottságot nyert, a dolgozat publikálása óta 89 független citáció hivatkozott a technikára és azóta szerte a világon bevonult az *in vitro* vér-agy gát laboratóriumok standard módszerei közé. Az értekezés 46. oldalán a Tisztelt Bírálóm által említett eredményeink [Perrière és mtsai 2005 J Neurochem 93:279-289; Perrière és mtsai 2007 Brain Res 1150:1-13] azt mutatják, hogy a puromicinnel tisztított endothelsejt egysejtrétegek vér-agy gát tulajdonságai jelentősen javulnak, hiszen nőtt a P-glikoprotein efflux pumpa expressziója és aktivitása, a jó rezisztencia- és alacsony P_e -értékek további erősödése volt megfigyelhető a szakirodalomban már közölt egyéb módszerekkel (hidrokortizon-kezelés, astroglia ko-kultúra, cAMP-kezelés), valamint immunfestéssel igazolható volt a szoros zárókapcsolat-fehérjék (klaudin-5, klaudin-3, okkludin, ZO-1) és a transzporterek (P-glikoprotein, Bcrp, Oatp-2) jelenléte. Értelmezésem szerint ezek a megfigyelések is a tisztított primer agyi endothelsejt tenyésztet előnyeire utalnak.

Nagyon örülök, hogy Professzor Úr érdekesnek és folytatandónak tartja a prion- és amiloid-peptidekkel folytatott kísérleteinket. Szeretném megerősíteni, hogy tovább tanulmányozzuk a vér-agy gát szerepét ezen neurodegeneratív kórképek patomechanizmusában. Így vizsgálatokat végzünk az amiloid-peptidek szerepéről Penke Botond Akadémikus Úr munkacsoportjával szoros együttműködésben és további *in vitro*

és *in vivo* eredményeink vannak prion-deficiens egereken japán kollaborációs partnereinkkel együtt.

A pentozán hatása kapcsán Tisztelt Bírálóm arra a dilemmára kért magyarázatot, amire az értekezés 93. oldalán, az eredmények összefoglalásakor utaltam:

“A perifériásan beadott pentozán nem jut át a vér-agy gáton, így a prion betegségekben megfigyelt hatása az agyi endothelsejteken keresztül valósulhat meg.”

Ezzel arra a kiindulási kérdésre szerettem volna utalni, amit akkor foglaltam össze egy hozzászólásban [Deli és mtsai 1999 Lancet 353:1272], amikor a pentozán szerepe a prion betegségek kezelésében elkezdett foglalkoztatni. Farquhar és munkatársai [1999 Lancet 353:117] azt figyelték meg, hogy átoltható szivacsos agyvelősróvadás (transzmisszibilis spongiform encephalopáthia, TSE) esetén intraperitoneális pentozán poliszulfát kezelés kivédte a betegség megjelenését egerekben, míg az orális bejuttatás hatástalan volt. Ismerve a pentozán nagyon rossz gastrointestinalis felszívódását és azt, hogy praktikusán nem jut keresztül a vér-agy gáton, a levélben azt kérdeztük, hogy vajon mi lehet a pentozán hatásának celluláris célpontja: lépsejtek, lymphocyták, csontvelői makrofág sejtek, vagy a vér-agy gát és a vér-ideg gát endothelsejtjei [Deli és mtsai 1999 Lancet 353:1272]. Az ekkor elkezdett vizsgálatainkkal mutattuk ki agyi endothelsejteken elsőként a prion fehérje expresszióját valamint a prion peptid 106-126 toxicitását és a pentozán védő hatását [Deli és mtsai 2000 Neuroreport 11:3931-3936]. A pentozán vér-agy gát védő hatását később nemcsak PrP106-126, de amiloid peptid és bakteriális LPS kiváltotta toxicitásban is igazoltuk [Deli és mtsai 2010 J Alzheimers Dis 22:777-794; Veszélka és mtsai 2007 Neurochem Int 50:219-228].

A humán prion betegségek különböző sporadikus vagy veleszületett formáinak a kialakulása nagyon összetett folyamat, és a további kezelés esélyeit a betegek diagnóziskor meglévő állapota nagyban befolyásolja. Talán ez is okozta azt, hogy a biztató praeklinikai adatok [Farquhar és mtsai 1999 Lancet 353:117; Doh-ura és mtsai 2004 J Virol 78:4999-5006; Larramendy-Gozalo és mtsai 2007 J Gen Virol 88:1062-1067] után a már kifejlett prion betegség esetén, az eddigi kisebb klinikai vizsgálatok inhomogén betegcsoportjaiban az *intracerebroventrikulárisan* adott pentozán poliszulfát hatása vegyes volt, összességében még nem bizonyult meggyőzőnek [Whittle és mtsai 2006 Acta Neurochir 148:677-679; Rainov és mtsai 2007 Expert Opin Biol Ther 7:713-726; Bone és mtsai 2008 Eur J Neurol 15:458-464; Tsuboi és mtsai 2009 Neuropathology 29:632-636; Terada és mtsai 2010 Acta Neurol Scand 121:127-130; Honda és mtsai 2012 Neuropathology 32:124-132].

Azt gondolom azonban, hogy a neurodegeneratív betegségek során az endothelsejteken keresztül történő folyamatokról az értekezésben 84. oldalán található alábbi állítás minden tekintetben megalapozott:

“Ezekben a betegségekben az endothelsejtek célpontjai a kórfolyamat során termelt, s az agyi erek körül főlhalmozódott pathológiás amyloid típusú fehérjéknek és azok peptid fragmenseinek, ennek következtében a vér-agy gát működése zavart szenved, ami hosszabb távon nemcsak magukat az agyi endothelsejteket, hanem az általuk védett központi idegrendszert is károsítja.”

In vitro vizsgálataink során azt igazoltuk, hogy a luminálisan adott prion és amiloid peptidek az agyi endothelsejtekben morfológiai és funkcionális elváltozását okoznak, és ezeket az elváltozásokat – valamint a vér-agy gát funkció károsodásából eredő esetleges másodlagos agyi sérüléseket – tudja kivédeni illetve megelőzni a pentozán kezelés.

Teljes mértékben elfogadom Bíráló Úr azon véleményét, hogy az értekezés végén hasznos lehetett volna egy ábrával alátámasztott, a jelenleginél sokkal részletes összefoglalás, amelyben a saját vizsgálataim során feltárt, a vér-agy gáttal kapcsolatos biológiai mechanizmusokat részletezem. Sajnos ezt a sokrétű témaválasztás miatt nem tudtam a disszertációra rendelkezésre álló terjedelemben belesűriteni, és ezért az egyes részeredmények ismertetése és rövid megbeszélése után csak röviden foglaltam össze tudományos eredményeimet a zárófejezetben.

Egyetértek Opponensemvel abban, hogy a 44. ábra magyarázata valóban nem egyértelmű és köszönöm, hogy mód nyílt a kísérleti összeállítás leírásának javítására. Az A. részben az elektromos ellenállás változások láthatóak a kísérlet kezdetétől a 16. óráig. A permeabilitási adatokat (44. ábra B és C rész) a 16. órában a rezisztencia mérések után nyertük.

Végezetül még egyszer köszönöm Csernus Professzor Úr megjegyzéseit és kérdéseit, és azt, hogy az értekezés egyes eredményeit újszerűnek tartja. Tisztelettel kérem, hogy opponensi véleményére és kérdéseire adott válaszaimat szíveskedjék elfogadni.

Szeged, 2012. október 19.



Dr. Deli Mária Anna