

Válasz prof. dr. Illés Zsolt bírálatára

Mindenek előtt hálásan köszönöm dr. Illés Zsolt professzor úrnak disszertációm gondos bírálatát, támogató véleményét és továbbgondolásra ösztönző kérdéseit, megjegyzéseit. Köszönöm, hogy munkánkat színvonalasnak, klinikai szempontból is jelentősnek tartja. A felvetett kérdésekre az alábbiakban szeretnék válaszolni.

1. Az asztrociták occludin expressziója a differenciálódástól függően változik. Megváltozik-e az expresszió asztrocita aktiválást követően?

2. Vizsgálta-e a junkcionális fehérjék expresszióját olyan patológiás körülmények között, ahol asztrocitózis következtében az asztrociták nemcsak az erek körül fordulnak elő. Lehetséges-e, hogy az ér körüli és parenchimás asztrocita e tekintetben különbözik?

A professzor úr választ vár arra a kérdésre, hogy megváltozik-e az occludin expresszió aktivált asztrocitákban, illetve vizsgáltuk-e asztrocitákban a junkcionális fehérjék expresszióját olyan patológiás körülmények között, ahol asztrocitózis következtében az asztrociták nemcsak az erek körül fordulnak elő. Mi a munkánk során nem vizsgáltuk az occludin expresszióját a fent említett körülmények között. Ismereteim szerint aktivált asztrocitákban nem vizsgálták még az occludin expresszióját, azonban bizonyos betegségekben megfigyelhető egyes junkcionális fehérjék expressziója e sejtekben. Így Alzheimer kórban és vaszkuláris demenciában az occludin mellett megjelenhet a claudin-2 és claudin-11 is (Romanitan és mtsai., 2010). Legfrissebb kutatások szerint a junkcionális fehérjék expressziója asztrocitákban Alzheimer kór esetén egy jellegzetes mintázatot mutat (Spulber és mtsai., 2012). Ezen túlmenően kimutatták, hogy a ZO-1 asztrocitákban kolokalizálódik a ZONAB (zonula occludens 1 (ZO-1)–associated nucleic acid binding protein) fehérjével a gap junctionok közelében, ennek esetleges patológiai jelentősége nem ismert (Penes és mtsai., 2005).

Fiziológias körülmények között közel minden asztrocita kapcsolatba kerül erekkel (Bushong és mtsai., 2002). Az asztrociták különböző szubpopulációiban patológiás körülmények között (asztrocitózis) előforduló differenciált junkcionális fehérje expresszióról nincs tudomásom, de lehetségesnek tartom.

Romanitan MO, Popescu BO, Spulber S, Băjenaru O, Popescu LM, Winblad B, Bogdanovic N. Altered expression of claudin family proteins in Alzheimer's disease and vascular dementia brains. J Cell Mol Med. 2010 May;14(5):1088-100.

Spulber S, Bogdanovic N, Romanitan MO, Băjenaru OA, Popescu BO. Claudin expression profile separates Alzheimer's disease cases from normal aging and from vascular dementia cases. J Neurol Sci. 2012 Nov 15;322(1-2):184-6.

Penes MC, Li X, Nagy JI. Expression of zonula occludens-1 (ZO-1) and the transcription factor ZO-1-associated nucleic acid-binding protein (ZONAB)-MsY3 in glial cells and colocalization at oligodendrocyte and astrocyte gap junctions in mouse brain. Eur J Neurosci. 2005 Jul;22(2):404-18.

Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. J Neurosci. 2002 Jan 1;22(1):183-92.

3. Vizsgálta-e EGF receptor expresszióját asztrocitákon?

Az EGF receptorok asztrocitákban történő expressziójával kapcsolatos kérdésre szeretném elmondani, hogy vizsgálataink célja az asztrocitákban csak az esetleges junkcionális fehérje expresszióra és az oxidatív stressz hatásának vizsgálatára terjedt ki, az EGF receptorok expresszióját nem vizsgáltuk. Kétségtelen, hogy az EGF receptorok aktiválása képes asztrocita aktivációt indukálni (Liu és Neufeld, 2007), így valóban érdemes lenne megvizsgálni, hogy ezen receptoroknak van-e esetleg szerepe a junkcionális fehérjék expressziójának szabályozásában asztrocitákban.

Liu B, Neufeld AH. Activation of epidermal growth factor receptors in astrocytes: from development to neural injury. J Neurosci Res. 2007 Dec;85(16):3523-9

4. Érdemes lenne a junkcionális fehérjéket asztrocitózissal járó in vivo modellekben és e modellekből izolált asztrocitákon is megvizsgálni (pl. cuprizon-mediált demyelinizáció).

A junkcionális fehérjék vizsgálata asztrocitózissal járó in vivo modellekben és ezen modellekből izolált asztrocitákon érdekes felvetés, amely által közelebb kerülhetnénk annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy mi a funkciója junkcionális fehérjéknek egy olyan sejt típusban, amelyik nem rendelkezik szoros kapcsolatokkal.

5. A glutamát receptorok mRNS expressziója mellett a protein expresszió is kimutatható agyi endotélsejteken?

Mi nem vizsgáltuk a glutamát receptor fehérjék expresszióját, de vizsgálataink egyértelműen azt mutatták, hogy funkcionális NMDA receptorok vannak az agyi endotélsejteken. Más kutatók vizsgáltak és mutattak ki közvetlenül is glutamát receptor fehérje expressziót agyi endotélsejteken. Így Reijerkerk és munkatársai (2010) NR1 receptorok expresszióját mutatták ki immunfluoreszcens módszerekkel, de kimutatták AMPA (GluR1) (András és mtsai., 2007), kainát receptorok (GluR5-7) (Newcomb és mtsai., 2008), illetve metabotróp glutamát receptorok jelenlétét is (Collard és mtsai., 2002).

Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SM, Leyen T, Lakeman K, van Het Hof B, Vivien D, de Vries HE. The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier. J Neurochem. 2010 Apr;113(2):447-53.

András IE, Deli MA, Veszeka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. J Cereb Blood Flow Metab. 2007 Aug;27(8):1431-43.

Newcombe J, Uddin A, Dove R, Patel B, Turski L, Nishizawa Y, Smith T. Glutamate receptor expression in multiple sclerosis lesions. Brain Pathol. 2008 Jan;18(1):52-61.

Collard CD, Park KA, Montalto MC, Alapati S, Buras JA, Stahl GL, Colgan SP. Neutrophil-derived glutamate regulates vascular endothelial barrier function. J Biol Chem. 2002 Apr 26;277(17):14801-11.

6. Vizsgálta-e a glutamát receptor expresszióját nem agyi endotélsejteken? Azaz a glutamát receptor expresszió csak az agyi endotélre jellemző, vagy valamennyi endotél rendelkezik e receptorokkal?

Kísérleteink kezdetén vizsgáltunk patkány aorta endotélsejteken NMDA receptor indukálta foszforilációt, de nem kaptunk jelet. Azonban az irodalomban ismertek olyan eredmények, amelyek azt igazolják, hogy NMDA receptorok expresszálódhatnak nem agyi endotélsejteken is: így tüdő artéria endotélsejteken (Nassar és mtsai., 2011), aortában és carotis endotélsejteken (Chen és mtsai., 2005) is kimutatták jelenlétüket.

Nassar T, Bdeir K, Yarovoi S, Fanne RA, Murciano JC, Idell S, Allen TC, Cines DB, Higazi AA. tPA regulates pulmonary vascular activity through NMDA receptors. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2011 Sep;301(3):L307-14.

Chen H, Fitzgerald R, Brown AT, Qureshi I, Breckenridge J, Kazi R, Wang Y, Wu Y, Zhang X, Mukunyadzi P, Eidt J, Moursi MM. Identification of a homocysteine receptor in the peripheral endothelium and its role in proliferation. J Vasc Surg. 2005 May;41(5):853-60.

7. Az egyes NMDA receptor szubunitok eltérő funkcionális következményekkel járnak neuronokon. Vajon az agyi endotél is heterogén a szubunitok tekintetében, mely funkcionális heterogenitást is eredményezhet?

Az agyi endotélsejtek glutamát receptor expressziójának heterogenitásával kapcsolatban legjobb tudomásom szerint még nem állnak rendelkezésre irodalmi adatok.

8. Egyéb glutamát receptorok is kimutathatóak az agyi endotélén (kainát, AMPA)?

Az NMDA receptorok mellett az agyi endotélsejtek képesek más glutamát receptorok expressziójára is. Kísérleteink során mi is igazolni tudtuk a GluR1-4 (AMPA receptorok) és mGluR1-6 (metabotróp glutamát receptorok) mRNS-ének jelenlétét, de mivel primereinket úgy terveztük, hogy egy primerpár több mRNS-t is felismerjen, azt nem tudtuk megállapítani, hogy pontosan melyik alegység expresszálódik. Ami a metabotróp receptorokat illeti, kimutatták, hogy úgy az I-es, mind a II-es és III-as típusú metabotróp glutamát receptorok aktiválása agyi endotélsejtekben véd az anoxia hatásai ellen (Lin és Maiese, 2001). Azonban e receptorok szerepe agyi endotélben még nem tekinthető tisztázottnak, mert egy másik kísérletsorozatban kimutatták, hogy az mGluR I-es és III-as receptorok aktiválása növeli a barrier permeabilitását (Collard és mtsai., 2002), illetve az mGluR5 aktiválásról kimutatták, hogy kulcsszerepet játszik a nitratív stressz kialakulásában (Mayo és mtsai., 2012). A GluR-1 jelenlétét western-blot segítségével is kimutatták, ezen receptorok az occludin foszforilációját képesek szabályozni, azonban szemben az NMDA receptorokkal, nem befolyásolják a glutamát által indukált permeabilitás fokozódást (András és mtsai., 2007).

Lin SH, Maiese K. The metabotropic glutamate receptor system protects against ischemic free radical programmed cell death in rat brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001 Mar;21(3):262-75.

Collard CD, Park KA, Montalto MC, Alapati S, Buras JA, Stahl GL, Colgan SP. Neutrophil-derived glutamate regulates vascular endothelial barrier function. *J Biol Chem.* 2002 Apr 26;277(17):14801-11.

Mayo JN, Beard RS Jr, Price TO, Chen CH, Erickson MA, Ercal N, Banks WA, Bearden SE. Nitrate stress in cerebral endothelium is mediated by mGluR5 in hyperhomocysteinemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 May;32(5):825-34.

András IE, Deli MA, Veszelka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 Aug;27(8):1431-43.

9. A glutamát receptorok és transzporterek megváltozott expressziója jellemzi a neurodegeneratív kórképeket (pl. Alzheimer-kór, amyotrophiás lateralsclerosis, Parkinson-kór). Van-e adat arra, hogy az endoteliális glutamát transzporter és receptor expresszió is változik-e e betegségekben.

Az endoteliális glutamát transzporterekkel és receptorokkal kapcsolatos vizsgálatokról neurodegeneratív kórképekben nem áll rendelkezésemre információ. Azonban ezek a kórképek gyakran járnak együtt oxidatív stresszel, és az oxidatív stressz fokozza az agyi endotélben az NMDA receptorok expresszióját (Betzen és mtsai., 2009), így elképzelhető, hogy e kórképekhez társulhat megváltozott endoteliális glutamát receptor vagy transzporter expresszió. Kétségtelen, hogy a glutamát receptorok mellett a glutamát transzporterek is fontos terápiás célpontok lehetnek, hozzájárulhatnak az agyi glutamát homeosztázis helyreállításához (Teichberg és mtsai., 2009, Lin és mtsai., 2012).

Betzen C, White R, Zehendner CM, Pietrowski E, Bender B, Luhmann HJ, Kuhlmann CR. Oxidative stress upregulates the NMDA receptor on cerebrovascularendothelium. *Free Radic Biol Med.* 2009 Oct 15;47(8):1212-20.

Teichberg VI, Cohen-Kashi-Malina K, Cooper I, Zlotnik A. Homeostasis of glutamate in brain fluids: an accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies. *Neuroscience.* 2009 Jan 12;158(1):301-8.

Lin CL, Kong Q, Cuny GD, Glicksman MA. Glutamate transporter EAAT2: a new target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Future Med Chem.* 2012 Sep;4(13):1689-700.

10. Amennyiben a ZO-2 a jelátvitelben is szerepet játszik, van-e adat arra, hogy mi az *upstream* útvonala?

A ZO-2 szignalizációról viszonylag keveset ismerünk még. Tudjuk, hogy a ZO-2 elsősorban izoláltan előforduló sejtekben található meg a magban, egyes stresszfactorok is képesek megnövelni a magi ZO-2 mennyiségét, de az ezekhez kapcsolódó szignáltranszdukciós utak nem ismertek. Az újonnan szintetizált ZO-2 egy része a magba exportálódik, majd innen kerül a sejtmembránba a rajta levő export szignáloknak köszönhetően. Egy új PKC izoforma, a PKC-epsilon, képes a ZO-2 nukleáris export szignáljának a foszforilálására (S369), aminek következtében a ZO-2 a magban felszaporodik (Chamorro és mtsai., 2009).

Chamorro D, Alarcón L, Ponce A, Tapia R, González-Aguilar H, Robles-Flores M, Mejía-Castillo T, Segovia J, Bandala Y, Juaristi E, González-Mariscal L. Phosphorylation of zona occludens-2 by protein kinase C epsilon regulates its nuclear exportation. *Mol Biol Cell*. 2009 Sep;20(18):4120-9.

11. A ZO-2 funkcionális kísérletekben alkalmazott-e csendesítést is?

Mi a kísérleteink során nem alkalmaztunk ZO-2 géncsendesítést. Ilyen jellegű kísérleteket Lorenza Gonzalez-Mariscal laboratóriumában végeztek. MDCK (kutya vese epitél) sejtekben kimutatták, hogy a ZO-2 csendesítése rontja a barrier tulajdonságokat, késlelteti a de novo szoros kapcsolat képződést, tágítja a paracelluláris rést, és befolyásolja az E-cadherin lokalizációját (Hernandez és mtsai., 2007). A ZO-2 fontos szerepére utal, hogy a ZO-2 "knock out" egerek nem életképesek (Xu és mtsai., 2009).

Hernandez S, Chavez Munguia B, Gonzalez-Mariscal L. ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture. *Exp Cell Res*. 2007 May 1;313(8):1533-47

Xu J, Kausalya PJ, Phua DC, Ali SM, Hossain Z, Hunziker W. Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. *Mol Cell Biol*. 2008 Mar;28(5):1669-78.

12. A professzor úr felveti, hogy tekintettel arra, hogy a klinikai gyakorlatban a TNF-alfa és annak receptora elleni antitestek, illetve az IL-1R inhibitorok autoimmun gyulladásos kórképek kezelésében rutinszerűen alkalmazottak, érdemes lenne e kórképek modelljeiben megvizsgálni, hogy a fenti kezelések milyen hatással vannak az endotél funkciókra, a funkcionális fehérjék expressziójára.

A TNF-alfa és IL-1béta sokrétű hatással rendelkezik az agyi endotélsejtekre, így növelik például egyes adhézións molekulák expresszióját, vagy befolyásolhatják a barrier funkciókat. TNFR1 és TNFR2 expresszálódik agyi endotélsejtekben, és kimutatták, hogy már 1 ng/ml TNF-alfa megnövelheti a paracelluláris anyagáramlást, aminek hátterében a ZO-1 és VE-cadherin redisztribúciója, és egy fokozott kaszpáz aktivitás áll (Lopez-Ramirez és mtsai., 2012). Ugyanakkor a claudin-5 promótere TNF-alfa szabályozás alatt áll - a TNF-alfa csökkenti a promóter aktivitását - ami a claudin-5 szint csökkenéséhez vezet (Aslam és mtsai., 2012). Ily módon várható, hogy egy anti-TNF kezelés pozitívan befolyásolja autoimmun gyulladásos kórképekben az endotél funkciókat és a permeabilitást.

Az IL-1bétáról kimutatták, hogy egy PKC-theta-függő ZO-1 foszforiláció révén ronthatja a barrier tulajdonságokat (Rigor és mtsai., 2012), illetve egy génexpressziós analízis során kimutatták, hogy IL-1béta hatására csökken a claudin-5 és occludin expressziója endotélsejtekben, így ebben az esetben is várható, hogy az IL-1R blokkolás pozitív hatásokkal fog rendelkezni (Williams és mtsai., 2008).

Lopez-Ramirez MA, Fischer R, Torres-Badillo CC, Davies HA, Logan K, Pfizenmaier K, Male DK, Sharrack B, Romero IA. Role of caspases in cytokine-induced barrier breakdown in human brain endothelial cells. *J Immunol*. 2012 Sep 15;189(6):3130-9.

Aslam M, Ahmad N, Srivastava R, Hemmer B. TNF-alpha induced NFkB signaling and p65 (RelA) overexpression repress Cldn5 promoter in mousebrain endothelial cells. *Cytokine*. 2012 Feb;57(2):269-75.

Rigor RR, Beard RS Jr, Litovka OP, Yuan SY. Interleukin-1 β -induced barrier dysfunction is signaled through PKC- θ in human brain microvascular endothelium. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012 May 15;302(10):C1513-22.

Williams MR, Kataoka N, Sakurai Y, Powers CM, Eskin SG, McIntire LV. Gene expression of endothelial cells due to interleukin-1 beta stimulation and neutrophil transmigration. *Endothelium*. 2008 Jan-Feb;15(1):73-165.

13. Végzett-e olyan kísérletet, vagy van-e adat arra vonatkozóan, hogy az endotél diszfunkció milyen hatással van az asztrocitákra, illetve a neuronális stressz milyen hatással van az endotélre (junkcionális fehérjék, TLR, NMDA receptor expresszió?)

Kísérleteink során nem vizsgáltuk azt, hogy az endoteliális diszfunkció milyen hatással van az asztrocitákra, azonban a kérdéssel egyre szélesebb körben foglalkoznak. Sőt, egyes elképzelések szerint az endoteliális diszfunkció akár okként is szerepelhet olyan megbetegedésekben, mint az Alzheimer kór vagy epilepszia. Az endoteliális diszfunkció során bekövetkezett permeabilitás növekedés eredményeképpen számos toxikus anyag juthat be a központi idegrendszerbe, mint az albumin, trombin, plazmin vagy immunglobulinok. Ennek következtében az asztrociták megduzzadnak, illetve aktiválódhatnak, fokozódhat citokin termelésük, amelynek súlyos következményei lehetnek (Zlokovic, 2011, Friedman, 2011, Berezowski és mtsai., 2012). Az agyhoz hasonlóan a retinában is kimutatták, hogy az áteresztővé vált kapillárisok a gliasejtek morfológiai változásához vezetnek (Rez-Prag és mtsai., 2011). Arról, hogy a neuronális stressz miként befolyásolja az endotéliumban a junkcionális fehérjék, NMDA receptorok és TLR-ek expresszióját, kevesebb konkrét adat áll rendelkezésre. A neuronok egyrészt felszabaduló neurotranszmitterek, például glutamát révén befolyásolhatják a junkcionális fehérjék expresszióját (András és mtsai., 2007). Ugyanakkor a neuronok különböző stimulusok hatására olyan citokineket is képes felszabadítani, mint a TNF-alfa (Park és Bowers, 2010), és ezek szintén befolyásolhatják a junkcionális fehérjék expresszióját. Az endoteliális NMDA receptorok és TLR-ek expressziójának neuronok által történő szabályozásáról a legjobb tudomásom szerint nem rendelkezőnk információval.

Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2011 Nov 3;12(12):723-38.

Friedman A. Blood-brain barrier dysfunction, status epilepticus, seizures, and epilepsy: a puzzle of a chicken and egg? *Epilepsia*. 2011 Oct;52 Suppl 8:19-20.

Berezowski V, Fukuda AM, Cecchelli R, Badaut J. Endothelial cells and astrocytes: a concerto en duo in ischemic pathophysiology. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:176287.

Raz-Prag D, Galron R, Segev-Amzaleg N, Solomon AS, Shiloh Y, Barzilai A, Frenkel D. A role for vascular deficiency in retinal pathology in a mouse model of ataxia-telangiectasia. *Am J Pathol*. 2011 Sep;179(3):1533-41.

András IE, Deli MA, Veszeka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007 Aug;27(8):1431-43.

Park KM, Bowers WJ. Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cell Signal*. 2010 Jul;22(7):977-83.

14. A TLR szignalizációs útvonalak vizsgálatánál egy sematikus ábra segíthette volna az adatok értelmezését.

Teljes mértékben elfogadom a tisztelt bíráló véleményét, hogy egy sematikus ábra a TLR szignalizáció komplex útvonalairól segítette volna az adatok értelmezését, remélem azonban, hogy e hiányosság nem gátolta nagyon e fejezet érthetőségét.

15. A claudin-5 TLR szabályozása milyen jelátviteli útvonalon keresztül érvényesül?

A claudin-5 TLR-en keresztül történő szabályozásának mechanizmusáról agyi endotélsejtekben sajnos nem áll rendelkezésre információ. Mi a kísérleteink során csak az NFκB és ERK1/2 útvonalakat vizsgáltuk – eredménytelenül. Azonban a TLR receptorok más útvonalakat is aktiválhatnak, mint amilyen a JNK, p38, TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β), vagy PI3K/Akt (Zhu és Mohan, 2010), amelyek szerepet játszhatnak a claudin-5 szabályozásában.

Zhu J, Mohan C. Toll-like receptor signaling pathways--therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:781235. doi: 10.1155/2010/781235.

16. Gyulladáskeltő vagy gyulladásgátló citokinek egyidejű alkalmazása nikotinnal és policiklikus aromás szénhidrogénekkal milyen hatással van az agyi endotélre, okoznak-e e vegyületek változást az endoteliális TLR expresszióban? E vegyületek hatásának vizsgálata a sclerosis multiplex gyulladásos és degeneratív (cuprizon) modelljeiben.

A dohányzás a vaszkuláris megbetegedések mellett kockázati tényezőt jelent olyan megbetegedésekben is, mint a sclerosis multiplex. Ennek fényében valóban érdemes lenne megvizsgálni, hogy gyulladáskeltő citokinek együttes adása nikotinnal és policiklusos aromás szénhidrogénekkal milyen hatással van az agyi endotélsejtekre. Hasonlóképpen gondolatébresztő az a felvetése, hogy e vegyületek együttesen miként befolyásolják a TLR expressziót. A szénhidrogén származékokról már kimutatták, hogy tüdő epitélsejtekben okozhatnak TLR expresszió fokozódást (Wang és mtsai., 2009), azonban a nikotin hatása sejtfüggő lehet: epitélsejtekben és monocitákban az eddigi irodalmi adatok inkább arra utalnak, hogy a nikotin csökkenti a TLR-ek expresszióját (Greene és mtsai., 2010, Cui és mtsai., 2012), de más sejttípusokban, pl. neuroblasztoma sejtvonalban (SH-SY5Y) ez a hatás éppen ellentétes (Cui és mtsai., 2012). Egyetértek a professzor úrral abban, hogy igen érdekes kérdés, hogy e vegyületek hogyan befolyásolják a betegség kimenetelét a sclerosis multiplex gyulladásos és degeneratív modelljeiben.

Wang JH, Kim H, Jang YJ. Cigarette smoke extract enhances rhinovirus-induced toll-like receptor 3 expression and interleukin-8 secretion in A549 cells. *Am J Rhinol Allergy.* 2009 Nov-Dec;23(6):e5-9

Greene CM, Ramsay H, Wells RJ, O'Neill SJ, McElvaney NG. Inhibition of Toll-like receptor 2-mediated interleukin-8 production in Cystic Fibrosis airway epithelial cells via the alpha7-nicotinic acetylcholine receptor. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:423241.

Cui WY, Zhao S, Polanowska-Grabowska R, Wang J, Wei J, Dash B, Chang SL, Saucerman JJ, Gu J, Li MD.

Identification and Characterization of Poly(I:C)-induced Molecular Responses Attenuated by Nicotine in Mouse Macrophages. *Mol Pharmacol.* 2012 Oct 1. PMID: 22878868

Cui WY, Wang J, Wei J, Cao J, Chang SL, Gu J, Li MD. Modulation of innate immune-related pathways in nicotine-treated SH-SY5Y cells. *Amino Acids.* 2012 Sep;43(3):1157-69.

17. Az értekezésben az intracaroticus mannitol klinikai alkalmazására utal, nem jelöl azonban irodalmat. Hol alkalmazzák ezt az invazív beavatkozást?

A tisztelt bíráló hiányolja, hogy a mannitol klinikai gyakorlatban történő alkalmazásáról nem adtam meg irodalmat. Az irodalmi hivatkozás sajnos kimaradt, ezt ezúton szeretném pótolni: Kroll RA, Neuwelt EA. Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery.* 1998;42(5):1083-99; discussion 1099-100, Guillaume DJ, Doolittle ND, Gahramanov S, Hedrick NA, Delashaw JB, Neuwelt EA. Intra-arterial chemotherapy with osmotic blood-brain barrier disruption for aggressive oligodendroglial tumors: results of a phase I study. *Neurosurgery.* 2010 Jan;66(1):48-58. Az ozmotikus vér-agy gát megnyitást intenzív terápiás körülmények között végzik agyi tumorok terápiájának elősegítésére egy nemzetközi konzorcium keretei között (International Blood-Brain Barrier (BBB) Consortium), amelynek vezető intézménye az Oregon Health Science University.

Kroll RA, Neuwelt EA. Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery*. 1998;42(5):1083-99; discussion 1099-100.

Guillaume DJ, Doolittle ND, Gahramanov S, Hedrick NA, Delashaw JB, Neuwelt EA. Intra-arterial chemotherapy with osmotic blood-brain barrier disruption for aggressive oligodendroglial tumors: results of a phase I study. *Neurosurgery*. 2010 Jan;66(1):48-58;

18. A melanóma sejtekkel végzett kísérleteknél a felülúszó is csökkentette egyes junkcionális fehérjék (claudin-5 és ZO-1) mennyiségét, ez szolubilis faktorokra utal. Vizsgálta-e, hogy milyen faktorok, és milyen mechanizmussal (pl. receptorok) csökkenik az endoteliális fehérjék expresszióját?

A melanóma sejtek transzmigrációjának vizsgálata során a melanóma kondicionált tápfolyadék is csökkentette a claudin-5 és occludin mennyiségét. Ez egyértelműen szolubilis faktorok szerepére utal, azonban ennek molekuláris hátteréről még nem áll rendelkezésünkre sok adat. Mivel a western-blotokon degradációs termékek is láthatóak, elsősorban proteolitikus mechanizmusokra gyanakodtunk. Zimográfiás vizsgálataink arra utalnak, hogy ebben a folyamatban zselatinolitikus szerinproteázok játszanak szerepet. Azonosítottuk is a szeprázt, mint egy olyan proteázt, amelynek gátlása csökkenti a transzmigrációt, de arra kérdésre, hogy a szepráz képes-e közvetlenül bontani a junkcionális fehérjéket, még nem tudjuk a választ.

Végezetül szeretném még egyszer megköszönni Illés professzor úrnak a megjegyzéseit és kérdéseit, és azt, hogy az értekezést színvonalasnak, és klinikai szempontból is érdekesnek találta. Tisztelettel kérem, hogy opponensi véleményére és kérdéseire adott válaszaimat szíveskedjék elfogadni.

Tisztelettel,

Szeged, 2013. január 7.

Krizbai István