

Válaszok Dr. Boros Mihály bírálataira

Általános megjegyzések

Köszönöm Dr. Boros Mihálynak az alapos és minden részletre kiterjedő bírálatát. Ahogy a Bíráló is többször hangsúlyozza, észrevételeit abból a szemszögből készítette, hogy a doktori munka önálló tudományos mű, ezért egységes egésznek kell alkotnia. A dolgozat megírása során is erre törekedtem, ezért az eredeti forrásul szolgáló 24 közleményből csak azokat az eredményeket foglaltam össze, amelyek egy egységes gondolatmenetre felfűzhetőek voltak. Ahogy a dolgozat előszavában és a tézisfüzetben is szereplő ábrán látható, ezen gondolatmenet a mitokondriumok oxidatív-nitrozatív stresszre adott válaszainak vizsgálatából indult ki, majd több elágazás után egy lokális értéktől készítmény kifejlesztéséig jutott - külön örülök, hogy a Bíráló is kiemelte a gondolatmenet egységességét.

Válaszok a részletes bírálatra

I. Formai rész

1. Ahogy a Bíráló is kiemeli, sajnos néhány esetben angol szakkifejezések szerepelnek a dolgozatban. Ezek jellemzően olyan szókapcsolatok, amelyek magyarul igen ritkán használatosak, ezért a hazai tudományos szaknyelvben is inkább angolul használjuk. Minthogy a Doktori Értekezés egyik célja a hazai szaknyelv bővítése, szabatos használata, ezért egyetértek a Bírálóval abban, hogy ezen kifejezéseket szerencsésebb lett volna magyarra átültetni még akkor is, ha magyarázatként vagy rövidítésként az angol kifejezés említésére is szükség lett volna. Például 'peroxynitrite decomposition catalyst' helyett 'peroxinitrit bomlás katalizátor' szerepelt volna.
2. Többszöri kritikai olvasás után is maradtak elütések a dolgozatban, ezért elnézést kérek, remélem azonban hogy ezek nem zavarják az olvasást, megértést.
3. A 16. ábrán, ahogy a Bíráló is kiemeli, valóban a H panelen ábrázoltam a proton gradiens megszüntetését követően észlelt reakciót és az I panelen a IV. komplex gátlás eredményét. A 28. ábra magyarázata helyesen az alábbi:
"Nitrozatív-oxidatív stressz által befolyásolt fehérjék saját mérések alapján. A proteomikai méréseink segítségével azonosított mitokondriális fehérjék, amelyek funkcióját megváltoztatja a nitroziláció. Nyilak mutatják a nitroziláció hatására létrejövő hatások irányát a mitokondriális légzési lánc és nitrát körforgás sematikus ábrázolása mellett. Fontos kiemelni, hogy vélhetően nemcsak ez az 5 fehérje érintett a változásokban, hanem ezek voltak azok, amelyeket elektroforézissel és tömegspektrométerrel megbízhatóan tudtunk kimutatni."
4. A 44. oldalon található táblázatba a kelleténél több információt igyekeztem besűríteni, amely ezért nehezen értelmezhető és szerkeszthető, célszerű lett volna ezt megbontani és akkor könnyebben tudtam volna szerkesztési hibák nélkül bemutatni az adatokat.
5. A Bíráló által laborzsargonként azonosított kifejezések, pl. „blottolás”, „knockoutokkal azonosítás” vagy „blockbuster molekula” tudatosan maradtak angol vagy félig angol

helyesírással, mivel ezek a hazai szaknyelvben is elfogadottá váltak, illetve magyar megfelelőjük nem egyértelmű vagy túlzottan körülményes lett volna, amely végső soron az olvashatóság rovására ment volna.

6. Az idézett körmondatok valóban túlzottan bonyolultak lettek megfogalmazva, ezeket szerencsésebb lett volna rövidebb tételekre bontani.

II. Tartalmi rész

Örülök, hogy a Bíráló kiemelte a dolgozat egységességét, önálló műként való értelmezhetőségét az azt megalapozó tudományos cikkektől függetlenül. Törekedtem az adatok egységesített bemutatására, több esetben eltértem az eredeti közleményekben való diszkusszió vezérfonalától amikor későbbi mérések alapján az értelmezés módosult, pontosodott, vagy éppen az ellenkezőjére fordult. Mindezen törekvések mellett maradhattak kisebb értelmezési, tartalmi hibák a dolgozatban, amelyekre az alábbiakban válaszolok.

1. Köszönöm a felvetést, hogy a farmakológiai prekondicionálásról mint az ischaemiás prekondicionálás alternatívájáról bővebben kellett volna megemlíteni, pl. az adenosin, nikotinamid-nitrát említése szükséges lett volna.
2. A nitro tirozin szint a keringő leukocitákban valószínűleg folyamatosan emelkedik a terhesség előrehaladtával, ezt a különböző időpontokban vett minták elemzése alapján becsülhetjük. Amíg a nitro tirozin esetében az emelkedés mértéke mindössze egy enyhe trend formájában volt kimutatható, addig a PAR festés mértéke mindhárom csoportban folyamatosan emelkedett, amelyet az idő függvényében korreláltatott PAR festés erőssége adatok ANOVA analízise mutatta. A cukorbetegség esetében az emelkedés szignifikánsan jelentősebb volt, mint az egészségesekben, sőt, azon betegek akik később inzulin kezelésre szorultak, már a korai vizsgálat alkalmával is a legmagasabb PAR értékeket mutatták. Az egészen pontos adatokat nem ismerhetjük, mivel a mintavétel a terhesség gondozás kontroll periódusaiban, tehát meghatározott hetekben történik. Ezen adatok részletes bemutatását a dolgozatból kihagytam a könnyebb olvashatóság kedvéért, de egy korábbi közleményben részletesen bemutatásra kerültek (2009 Diabetologia, 1-2. ábrák).
3. A korai közleményekben az akkori tudományos konszenzus szerint a fehérje nitrációt mint káros hatást elemeztük, noha az élettani hatásai is már részben ismertek voltak. Ahogy saját későbbi munkáinkban is kimutattuk, a tirozin-nitráció mindenképpen élettani folyamat, amely mind a sejttestben, mind a mitokondriumokban jelen van. Mivel egyetlen aminosav-oldallánc specifikus reakciójáról van szó, ezért filozófiailag is feltételezhető, hogy ez nem random károsodás eredménye, hanem szabályozott folyamat.
4. Ahogy a Bíráló által is említett hivatkozásban szerepel, a fehérje nitráció nem random, irreverzibilis folyamat, hanem szabályozott és visszafordítható reakció, legalábbis bizonyos peptidek és fehérjék esetében. Például a sokszor csak gyökfogóként jellemzett glutation az élő szervezetben reverzibilis nitráción megy keresztül, ennek révén az NO molekula hatékony tároló és szállító molekulája is egyben.

5. Az anyai vér leukocytái, ill. anyai és magzati szövetek esetén, vagyis a méhlepényen, a köldök artérián és vénán anti-nitrotirozin antitesteket alkalmaztunk a nitrotirozin kimutatására. A magzatokból származó szövetek reakcióit kizárólag a köldökzsinór esetében tudtuk vizsgálni, mivel etikai engedélyt csak olyan szövet kinyerésére kértünk és kaptunk, amely máskülönben megsemmisítésre került volna. Természetesen az eredmények fényében érdemes lenne további mérésekkel, esetleg a mostanra már kisgyermekkorba lépő alanyok visszahívásával és utánkövetésével további adatokkal kiegészíteni a vizsgálatot, erre kollégám, Dr. Horváth Eszter immár saját munkacsoportja keretében is több alkalommal adott be kutatási pályázatot.
6. A statisztikai elemzések részleteit tudatosan nem említettem meg a doglogzatban, mivel annak összefoglaló jellege miatt az olvashatóságot rontotta volna. Természetesen minden egyes mérés esetében a pontos statisztikai próba leírása, a p értékek intervalluma szerepel az eredeti közleményekben. A doktori dolgozatban viszont minden olyan megfogalmazás, amely változást fejez ki, pl. emelkedik, erősen festődik, stb., vagy összehasonlításokra utal, pl. kevésbé magas, kizárólag statisztikailag igazolt különbségekre vonatkozik. Az ábrákon viszon szerepeltettem az általánosan elfogadott statisztikai jelzéseket, azaz * jelöli a $p < 0.05$ értéket, ** jelöli a $p < 0.01$ értéket. A 17. ábrán valóban félrevezető lehet, hogy a nyilvánvalóan különböző méretű oszlopok esetén csak egy helyen szerepel a szignifikanciára utaló csillag. A többi különbség, noha azok is szignifikánsak voltak, nem kapott jelölést, mivel ezek várható, ismert különbségek voltak, pl. a kontroll esetében a jól ismert gátlószer 3-AB hatása amelyet csak a mértékek összehasonlítása miatt tüntettünk fel. Azonban ahogy a Bíráló is megjegyzi, szerencsésebb lett volna a szignifikanciákat teljeskörűen ábrázolni. A szövegben a PARP + 3-AB csoport félreérthetően van megfogalmazva, azért jelöltem "részlegesen gátlhatóknak", mert a kontroll PARP aktivitást csak mintegy felére tudta csökkenteni ahogy az a 17. ábra első két oszlopán is bemutatásra került.
7. A bőr mikrokeringését Lézer Doppler módszerrel mértük mind patkányokon, mind emberi alkaron. GSNO hatására az egészséges és a diabeteszes állatokban is azonos mértékben változott a véráramlás, és hasonló értékeket mértünk egészséges önkénteseken is. A Lézer Doppler módszer elsősorban a felszíni szövetek mikrocirkulációját tudja jól mérni, saját korábbi méréseink alapján ez lágyyszövetekben kb. 1 mm mélységet jelent, tehát a teljes bőr rétegeit, az alatta fekvő zsírszövet vagy izomréteg nélkül. A bőr mikrokeringése nem igazán reprezentálja a diabeteszes láb mélyebb szöveti struktúráinak keringését elsősorban azért, mert a diabéteszes láb szindróma egy komplex, több jelentős tényezőből összeálló klinikai fogalom. Megvan benne a cukorbetegség szövődményeiért felelős mindhárom fő tényező, azaz a mikroangiopátia, a makroangiopátia és a neuropátia. Ezen patomechanizmusok egymáshoz képesti aránya, jelentősége az érintett szövet esetében, illetve a betegség lefolyását tekintve is változó, ezért egy homogén állatmodellen nyert eredményeket érdemben szabad kiterjeszteni a humán esetekre. A jelen vizsgálatok célja, azaz egy lokálisan ható NO donor készítmény létrehozása viszont több támadásponton is hatékony lehet. Mind a saját vizsgálatok, mind irodalmi adatok szerint is a mikrocirkulációt jelentősen lehet növelni NO donorok segítségével még cukorbeteg

állapotban is, tehát ezzel elvileg javítható a sebgyógyulási hajlam illetve általában a regenerációs folyamatok. Ezen felül több vizsgálat is kimutatta, hogy a diabéteszes neuropátia tüneteit, a fájdalmat és paresztéziákat igen jól lehet kezelni lokális NO donor készítményekkel. Épp ez utóbbi indikáció lett a további kísérleti fejlesztések mozgatórugója, mivel erre az indikációra nincsen forgalomban lévő specifikus készítmény.

8. A bíráló jogosan veti fel a kérdést, hogy a helyi NO tartalom változása a bevitel fokozódása után és a hiperglikémiás környezetben a fokozódó véráramlással bejutó molekuláris oxigén kapcsán fokozódhat a szuperoxid és a peroxinitrit generálás. Ennek a felvetésnek ellentmond, hogy a méréseink során nem tapasztaltunk emelkedett peroxinitrit szinteket. A fenti gondolatmenet arra támaszkodik, hogy a szabadgyök koncentrációk változását mérjük, azonban sajnos erre nincsen lehetőségünk élő szövetek esetében, sőt, még kémiailag izolált rendszerekben is csak közelítő mérési módszerekkel tudunk következtetni a szabadgyökök és más labilis oxidánsok jelenlétére, koncentrációjára. A jelen kísérletekben mindössze a nitrozatív stressz kumulatív mérőszámaként elfogadott nitrotirozin mértékét állapítottuk meg, amely az egyes sejtek és sejtalkotók között is erős heterogenitást mutatott. Ezen technikai korlátok miatt meg sem kíséreltem diszkutálni a Bíráló által is javasolt gondolatmenet, mivel kumulatív mérésekből nem lehet megbízhatóan visszakövetkeztetni térben és időben is gyorsan változó molekuláris folyamatokra.
9. Ahogy az a 29. ábrán bemutatott összefoglalóban is szerepel, a mitokondriumon kívül a citoplazmában elhelyezkedő GSNO reduktáz enzim elsősorban abban játszik szerepet, hogy a mitokondriumból a citoplazmába diffundáló GSNO lebontását, de-nitrálását katalizálja, ezzel csökkentve az elérhető GSNO szinteket, de egyben más fehérje oldalláncokat nitrálva. Kísérleteink során nem volt lehetőségünk a GSNO reduktáz részletes vizsgálatára, ezért a fenti gondolatmenet mindössze a megjelent közlemények diszkussziójában illetve a dolgozat összefoglaló ábráján szerepel.

Végezetül ismét köszönöm Dr. Boros Mihálynak a bírálói munkáját, a doktori védés szabadelőadásának kidolgozásakor mindenképpen a javaslatai alapján fogom bemutatni az eredményeket.

2013. 06. 07.



Dr. Lacza Zsombor