

**Válasz Dr. Dinnyés András professzor úrnak, az MTA doktorának opponensi
véleményére**

Nagyon köszönöm Dr. Dinnyés András professzor úrnak, hogy elbírálta értekezésemet, és köszönöm a dolgozatról alkotott elismerő véleményét.

Kérdéseire a válaszaim a következők:

1. Minden jel arra mutat, hogy a szervezetbe szisztémásan bejuttatott őssejteknek csak igen kis része (maximum 1-2%-a) képes beépülni a különböző szervekbe, terápiás hatásukat elsősorban az általuk termelt „*trofikus*” – az endogén őssejtek osztódását segítő, anti-apoptotikus, és angiogenezist fokozó – faktorok révén fejtik ki, és ez nem csak a mesenchymalis őssejtekre (MSC) igaz (Caplan and Correa, Cell Stem Cell 2011; 9:11-15; Millard and Fisk, 2013; 35:173-182). Hasonló jelenséget figyeltek meg több más szöveti őssejt esetében is (Wagers 2012; Cell stem Cell 10:362-369). A keringésbe kerülő őssejtek jó része ugyanis – a vérképző őssejtek kivételével – nem, vagy legalábbis nehezen talál el a „*nich*”-ébe, azaz igen rossz a „*homing*”-ja. Gyakran csapdába esnek a szűk kapillárisokat tartalmazó szervekben, mint a tüdő, vagy a máj és a lép. Ráadásul a sérült szövetekben általában a kapillárisok is károsodnak, tovább nehezítve az őssejtek útját. Utóbbi akkor is probléma, ha lokálisan – közvetlenül az érintett területre - juttatjuk be a sejteket. Nem megfelelő mikrokörnyezetben, azaz a saját „*nich*”-ükön kívül pedig az őssejtek néhány nap alatt elpusztulnak (Karp and Teo, 2009, 4:206-216). Hatásukat tehát rövid idő alatt és esetenként nagy távolságra kell kifejteniük. Ugyanakkor az MSC-k esetében megfigyelhető bizonyos minimális preferencia a „*homing*” során, egy adott szervből származó és *in vitro* kultúrában felszaporított őssejt valamivel nagyobb eséllyel jut el abba a szervbe, ahonnan származik, mint más eredetű társai. A szívből (Gaebel et al, PLoS ONE 2011; 6(2): e15652), vagy a tüdőből (Badri et al, Am J Respir Cell Mol Biol, 2011; 45:809-816) izolált MSC-k például nagyobb arányban érik el az infarktusos szívet, illetve a károsodott tüdőt, mint csontvelői eredetű társaik, és terápiás hatásuk is kifejezettebb azokénál. Természetesen azt nehéz lenne eldönteni, hogy ezekben az esetekben a parakrin hatás(ok) elsősorban az endogén őssejteket, vagy inkább a „*nich*”-üket érintik-e, hiszen a szöveti őssejt és „*niche*”-e rendkívül szoros funkcionális egységet alkot (Rojas-Rios and González-Reyes, Stem Cells 2013, doi:10.1002/stem.1621).

A pluripotens őssejtek (ESC és iPS) esetében alapvetően más a helyzet. A felnőtt szervezetben valószínűleg nincs olyan mikrokörnyezet, ami megfelelő életfeltételeket biztosítana számukra. „*Nich*”-re pedig szükségük van, ezt bizonyítja, hogy az embrionális őssejtek „*feeder*” sejt mentes kultúráiban epithelialis – mesenchymalis tranzíció révén maguk az őssejtek hoznak létre egy „*feeder*”- jellegű sejtréteget, amely „*niche*”-ként funkcionál (Bendall et al, Nature 2007; 448:1015–1021). Ha pluripotens őssejteket felnőtt szervezetbe oltunk, akkor java részük igen gyorsan elpusztul, az esetleg túlélő sejtek pedig – létrehozva saját „*niche*”-üket (ld. előbb) valószínűleg tumort (teratomát) képeznek. A szöveti őssejtekre és azok mikrokörnyezetére, illetve a regenerációs folyamatokra tudomásom szerint nincs érdemi hatásuk.

2. A génterápiás eljárások – és általában bármely, a hagyományos csontvelő-transzplantáción túlmutató sejterápiás eljárás – jövője több tényezőtől függ (Blasimme and Rial-Sebbag, Stem Cell and Dev 2013; 22 (Supp 1):14-19; Li et al, Regen Med 2014; doi:10.2217/RME.13.80).

A jelenlegi szabályozási környezet egyáltalán nem kedvez az ilyen terápiás protokollok kidolgozásának és szélesebb körű elterjedésének. Az FDA és az EMA különböző bizottságai jórészt a hagyományos gyógyszerek kifejlesztése során kidolgozott és bevált követelményeket próbálják érvényesíteni a kérelmezők felé, figyelmen kívül hagyva azt, hogy itt élő sejtekkel történő kezelésekről van szó. Éppen ezért sok, elsősorban a készítmények standardizálásra vonatkozó elvárás túlzott, rendkívül drága és időnként valószínűleg felesleges. Ennek egyik oka a megfelelő szakemberek hiánya. Őssejtekhez és genetikához értő tagjai természetesen vannak ezeknek a bizottságoknak, ők azonban általában kutatók, akik nem járatosak a klinikumban.

Ezzel eljutottunk a legégetőbb problémához. A regeneratív medicina, legyen az őssejt terápia, genetikailag módosított sejtekkel végzett beavatkozás, vagy un. „*tissue engineering*”, lassan az orvostudomány egy új, sok szempontból önálló és speciális tudást igénylő ágává válik. Képezni kellene tehát olyan orvosokat, akik megfelelő szakmai felkészültséggel rendelkeznek, így meg tudják ítélni egy-egy tervezett beavatkozás lehetséges hasznát, illetve kockázatát. Itt nem egy-két napos gyorstalpaló tanfolyamokról van szó, hanem ugyanolyan komoly, több éves elméleti és gyakorlati felkészítésről, amit más szakvizsgákhoz is megkövetelnek. Az ilyen klinikusok tudnának segíteni a fennálló szabályozók módosításában úgy, hogy közben a betegek érdekei is maximálisan érvényesüljenek. Egyúttal megfelelő kezekbe kerülne a sejt- és génterápiás készítmények klinikai kipróbálása is, ami nélkül

egyetlen ilyen beavatkozás hatékonysága és biztonságos volta sem igazolható. Visszatérve a kérdés elejére, éppen a genetikailag módosított csontvelői őssejtekkel végzett kezelések szolgálnak intő példával. Egy-egy, számtalan állatkísérletben hatékonynak és biztonságosnak talált genetikai módosításnak is lehetnek tragikus következményei (Watts et al, *Cytotherapy* 2011; 13:1164-1171; Wang et al, *Stem Cell Res* 2013; 12:209-221). Ezért szerintem a jelenlegi génterápiás próbálkozások ígéretesek ugyan, de biztonságosnak még egyáltalán nem mondhatók. Nem ismerjük olyan jól a génműködés szabályozását, hogy biztosan meg tudjuk mondani, milyen következményekkel fog járni egy genetikai beavatkozás.

Végül nem hagyhatjuk figyelmen kívül a történet anyagi részét sem. A terápiás célra szánt készítmények klinikai kipróbálása rengeteg pénzbe kerül. A hagyományos gyógyszerek esetében ezeket a költségeket – a későbbi profit reményében - a nagy gyógyszergyárak állják. A regeneratív medicina területén viszont csak kis, legfeljebb közepes méretű biotechnológiai cégek tevékenykednek, amelyek nem rendelkeznek az ehhez szükséges tőkével. Így a sejt- és génterápiás készítmények klinikai kipróbálása általában az első, esetleg a második fázisban megreked. Ameddig ezt a finanszírozási kérdést nem sikerül megoldani, komoly előrelépés nem várható a területen.

3. A transzdifferentiációs módszerek valóban sokat fejlődtek az elmúlt években, de néhány, a klinikai alkalmazás szempontjából alapvető probléma megoldása továbbra is várat magára (Graf, *Cell Stem Cell* 2011; 9:504-516; Sisakhtnezhad and Matin, *Cell Tissue Res*, 2012; 348:379-396; Equizabal et al, *Semin Reprod Med* 2013; 31:82-94).

A transzdifferentiáció hatékonysága még mindig nem kielégítő, ezért az ezzel a módszerrel előállított sejteket tisztítani kell. A nem, vagy nem megfelelő módon differenciálódott sejteket el kell távolítani a klinikai alkalmazásra szánt készítményekből. Ez - a daganatkezelés kockázata miatt – fokozottan érvényes, ha pluripotens őssejtekből (ESC vagy iPS) indulunk ki. Az MSC-ken és/vagy szomatikus sejteken alapuló preparátumoknál ez a kérdés talán kevésbé lényeges, de semmiképpen sem elhanyagolható.

A következő probléma, hogy az *in vitro* kultúrában történő differenciálódás általában csak részleges. Inkább a megcélzott sejttípus valamilyen korai fejlődési formája, nem pedig a felnőtt szervezetre jellemző, funkcionáló alakja jön létre. Ilyenkor csak abban bízhatunk, hogy *in vivo* környezetben majd befejeződik a sejt érése, ahogy ez például a PDX-1, NeuroD1 és Ngn3 génekkel transzfektált emberi stroma sejtekkel történt cukorbeteg egerekben (Zhao et al, 2008; *PLoS ONE* 3(7): e2666). Kérdés, hogy ez a jelenség mennyire általános?

A következő lépés az *in vitro* előállított sejtek eljuttatása a célszervbe. Utóbbi anatómiai lokalizációjától függ, hogy ez hogyan oldható meg. A sejtek szisztémás (intravénás) adása ilyenkor nem célszerű, mert alig van esély arra, hogy akár csak kis részük élve eljusson „rendeltetési helyére”, a lokális alkalmazás pedig nem minden szerv esetében lehetséges. Ráadásul a már célba érkezett sejteknek funkcionálisan is be kell épülniük a szervezetbe. Hiába juttatunk például egészséges sejteket az infarktusos szívbe, ha ezek nem képesek szorosan együttműködni a beteg saját szívizom rostjaival, akkor csak aritmiát okozunk (Mooney and Vandenburgh, Cell Stem Cell 2008; 2:205-213).

Éppen ezért szerintem a következő években elsősorban arra számíthatunk, hogy MSC-ből és/vagy szomatikus sejtekből kiindulva - transzdifferentiációs módszer(ek)el - sikerül néhány olyan sejtípust, például májsejteket és inzulin-termelő β -sejteket előállítani, amik valamilyen hordozóhoz kötve beültethetők a hasüregbe, és a keringési rendszerhez csatlakoztatva képesek ellátni alapvető biológiai funkciójukat.

Budapest, 2013.12.30.

Tisztelettel és köszönettel:

Uher Ferenc