

Válasz Prof. Dr. Cseh Sándor, az MTA Doktora opponensi véleményére

Öszintén szeretném megköszönni, hogy Professzor Úr vállalta dolgozatom bírálatát, mely nem szűken értelmezett kutatási területéhez illeszkedik, ennek ellenére igen gyorsan és messzemenő alapossggal járt el.

Részletes válaszaimat az alábbiakban adom meg az észrevételekre, a bírálat tagolását követve.

A témaválasztás, annak aktualitása

Ahogy Tisztelt Opponensem írja, ténylegesen az első tíz posztdoktori évet felölelő, lipidekre és vér-biokémiai paraméterekre épül a meglehetősen szerteágazó kutatási összefoglalás. A lipidek kutatása nem könnyű terület, meglehetősen sokan és sok aspektusból foglalkoznak ezen táplálóanyag csoporttal, megítélésem szerint éppen annak igen nagy változatossága miatt. Ezt tükrözi a dolgozatban szereplő, és a 11. fejezetben bemutatott eredmény-sokaság is: a strukturális, a tároló és a vér lipidekkel is foglalkoztam. A vizsgálatok logikai csoportosítása kapcsán megtisztelő az az opponensi véleményalkotás, hogy a négyes tagolás logikus és követhető. Tisztelt Opponensem szerint a legértékesebb fejezet aktualitását és sikerét tekintve a második témakör, mely a membránok, mint az anyagcsere ütemadói elméletre épül. (Husvéth Professzor Úr is e fejezetet értékelte leginkább.) El kell ismernem, ez a vizsgálati terület „serendipity”, valójában a madár miokardiális lipidek vizsgálata vezetett a sikeres első filogenetikus alapú összevetéshez 2006-ban, mely a későbbi madár és emlős allometrikus elemzéseket elindította (2010-től). A tároló lipidek elemzése inkább analitikailag volt kihívás, és ahogy Tisztelt Opponensem is említi, manuális munkáigénye mellett annak korlátait is sikerült feltárni. Végső soron tehát a disszertáció egy tízéves szakasz eredményeinek olyan összerendezett interpretációja, melynek esetében minden vizsgálati területhez legalább két, idegen nyelvű, elsőszerzős, impakt faktoros cikket tudtam rendelni. (Ezen túlmenően természetesen történtek olyan közelítések is, elsődlegesen élelmi lipidek területén, melyeket ebbe a logikai rendbe nem lehet beilleszteni.)

A dolgozat szerkezete

Tisztelt Opponensem hasonló véleményt fogalmaz meg Husvéth Professzor Úréhoz, mely szerint a sokféle és bőséges adat-interpretáció nagy, néha túl nagy táblázatok eredményez, melyek közölhetők ugyan, de nehezen átláthatók. Igyekeztem a tipográfia maximális lehetőségeit kihasználni, de mind a zsírsavak, mind a klinikai-kémia olyan területek, ahol bőséges a mért adat, néha talán túlzott is azok maradéktalan bemutatásának szándéka. Örömmel fogadtam ugyanakkor, hogy Tisztelt Opponensem indokoltnak tartja az adatok prezentációjának mértékét. Nem tagadhatom, hogy a 4. fejezet, nevezetesen az Irodalmi átteintés nem a legszerencsésebb közelítés. Hal-madár-emlős, triglicerid-foszfolid, valamint számos szövet, közöttük vér analízise került bemutatásra az eredményekben. Sajnálatos módon nem éreztem lehetségesnek mindezen területek taxatív irodalmi áttekintését, ennek megfelelően egy részletes, ám lipid-orientált áttekintést készítettem, ami a specificitás bizonyos mértékű visszaszorulását eredményezte. Elismerve ezt, tisztelettel kérem Opponensemét ezen forma elfogadására, mely így is 300 körüli irodalmi hivatkozáshoz vezetett. Örömmel fogadtam azon észrevételt, mely szerint a 44 táblázat és a 34 ábra jól áttekinthető. Sajnos a tömör nyelvezet szerzői sajátosság vagy hiba, melyet az okoz, hogy a terjedelmi korlátoknak sokszor igen nehéz megfelelni, ahogy ez a disszertációra igaz. Azt, hogy Tisztelt Opponensem mindezek ellenére jól követhetőnek, átláthatónak, összességében érthetőnek ítéli a dolgozatot, külön köszönöm.

Részletes bírálat és hozzá kapcsolódó kérdések a négy fő témakör sorrendjében

A 6.1.1. fejezetre vonatkozóan Tisztelt Opponensem kérdezi (1. kérdés), milyen szerepe, esetleges zsírsavszelektív abszorpciós tulajdonsága lehet a madarakban a chorioallantois membránnak (CAM), illetve lehet-e ennek köze a fészekhagyó madarak kelést követő magas szérum triglicerid koncentrációjához? *Speake és mtsai. (1998)* szerint a szikanyag zsírsavprofilja leginkább a tojó vérplazmájának VLDL frakciójához hasonlít, lipidfrakciótól függetlenül palmitinsav, olajsav és linolsav dominanciát mutat. Míg az arachidonsav és a dokozahexaénsav csak a foszfolipidekre jellemző jelentősebb arányban, addig az alfa-linolénsav szinte teljesen hiányzik a szik lipidekből. A chorioallantois membrán fő szerepe a szik lipidek felszívása és lipoproteinként az embrionális vérkeringésbe juttatása. Meglepő módon a CAM külső, szik felőli oldalán nincs lipid hidrolitikus aktivitás, a szik lipidek egyfajta pinocitózissal jutnak az endodermális sejtekbe, majd a bazális oldalon az endoplazmatikus retikulumban és a Golgi apparátusban történő módosítást követően exocitózissal távoznak. A szik lipidek felszívódása nem zsírsavszelektív (hisz tényleges hidrolízis nem történik a CAM transzfer során), annak üteme azonban igen változó az embrionális korban. Tyúk fajban a 13-17. napok között az eredeti lipidtartalomnak közel a fele jut át az embrióba, ezt megelőzően azonban lassú a szik felszívódás. A 17. napot követően a szik felszívódás üteme a CAM-on át egyre gyorsabb. Tekintettel arra, hogy a szik lipidek a CAM-on átjutva embrionális VLDL formában jelennek meg az embrió keringésében, valójában minimális eltérés áll fenn a szik és az embrionális VLDL lipidösszetétele között (az apoprotein rész erősen különbözik!). Végső soron tehát a tojótyúk takarmánya, és annak petesejtbe (tojásba) jutó hányada determinálja a szik, majd pedig az embrionális VLDL zsírsavösszetételét, előbbi faktor azonban ténylegesen erős hatású. Azt kell tehát összegezve hangsúlyozni, hogy a „maternális” takarmányozás igen erősen befolyásolja az utód vérében a lipidek, különösen a VLDL összetételét, de nem ez lesz az a meghatározó tényező, mely hozzájárulhat a fészekhagyó madarakban tapasztalható, kelést követő magas plazma triglicerid értékekhez, az inkább a kelés előtti kifejezetten magas intenzitású lipid abszorpciótól alakul ki.

A 6.1.2. fejezethez kötődően köszönettel vettem Opponensem észrevételét, mely szerint ténylegesen elsőként publikáltuk a madár miokardium, majd a tüdő, vese és máj esetében a foszfatidok zsírsavainak allometrikus szabályszerűségeit. A 2. kérdés arra vonatkozik, hogy mi okozza a kisebb testméretű madarak szerveiben a foszfolipidek zsírsavainak kifejezetten magas omega-3 zsírsav arányát? Tisztelt Opponensem azt is kérdezi, hogy az ezzel párhuzamosan megfigyelhető magasabb alapanyagcsere intenzitás ok vagy okozat ezen kontextusban, illetve az agy a többi szervvel ellentétben miért nem mutat allometrikus sajátosságokat a foszfolipid zsírsavprofilban? A meglehetősen komplex kérdésre a válasz máig nem eldöntött. *Hulbert és mtsai (2002)* emlős agyban ugyanazon kiegyenlítettséget tapasztalták kis- és nagy testű állatokban, mint mi. Megítélésük szerint az agy fokozott anyagcsere intenzitáshoz volumetrikusan adaptálódik, azaz egységnyi tömegre vetítetten azonos oxigénfogyasztás mellett fokozott igénybevételre megemelkedett térfogattal reagál. A többi, főleg zsigeri szerv (és a harántcsíkt, valamint a szívizom) ugyanakkor nem ilyen módon, hanem a membránösszetétel módosításával, egészen pontosan a fluiditás és az omega-3 zsírsavak fokozott jelenlétével reagál. *Valencak és Ruf (2007)* szerint ez a metabolikus adaptáció emlősökben kifejezetten emeli a szöveti lipidperoxidáció mértékét és rövidíti a várható élettartamot, de nincs összefüggésben az alapanyagcserével. Saját megítésem szerint a fokozott omega-3 zsírsav részarány a membránokban részben genetikailag determinált, ám mindenképpen kauzatív összefüggésben van az alapanyagcsere intenzitásával, melyet az bizonyít, hogy modell membránok összetételének megváltoztatása erősen befolyásolja az ioncsatornák, különösen a Na-pumpa molekuláris aktivitását (*Turner és mtsai, 2005*). *Mitchell és mtsai (2007)* elemzése szerint az általuk is leírt szabályosságok nem köthetők egyes foszfolipid osztályokhoz, sem emlős, sem hüllő fajokban. Madarak esetében nem történt eddig ilyen jellegű elemzés, ezért egzakt választ nem adhatok. Ezzel szemben úgy ítélem meg, hogy az alapanyagcsere szempontjából igen releváns ioncsatornák, mint fő „energiafogyasztók” intrinzik fehérjék, míg az egyes foszfolipid osztályok a membrán kettősrétegben részben szabályszerűen fordulnak elő, azaz nem tűnik reálisnak, hogy egy-egy (vagy egy kiemelt) alosztály összetételi változásának volna messzemenő a hatása.

A 6.1.3. fejezethez, mely a triglicerid molekuláris szerkezetre alapuló faj-azonosítás tisztázására irányult

Tisztelt Opponensem kérdezi, hogy a telített zsírsavak milyen helyzeti preferenciát mutatnak, és ez mennyiben tér el az egyszerűen telítetlen savakétól. Válaszom az, hogy sertés fajban a triglicerid molekulában a centrális helyzetben 95-100%-ban palmitinsav fordul elő, mely faji jellegzetességnek tűnik. Ismertek azonban olyan további lipidek is, melyek hasonló karaktert mutatnak, ezek közül kiemelendő a humán anyatej tejzsírja, valamint az elefánt és a tengeri emlősök szubkután zsírja említendő még (*Brockerhoff és Ackmann, 1967*). Amennyiben a zsírok felszívódását és bélepithelsejben történő re-észterezését vizsgáljuk, fontos megemlíteni, hogy a hasnyál lipáz igen erős 1,3 helyzeti hidrolitikus specificitást mutat, azaz a 2-monogliceridek legnagyobb részben eredeti formájukat megőrizve jutnak el a nyirokkeringésen át a májig. A sertészsír és általában az állati zsiradékok felszívódása meglehetősen jó hatékonyságú, ca. 95%, de maga a sertészsír nem tartalmaz jelentősebb mennyiségű esszenciális zsírsavat. Biológiai értéke különleges esetekben kiemelendő, melyre igen jó példa az anyatejpótló tápszerek előállítására, ahol elsősorban növényi olajokat használnak. *Innis és Nelson (2013)* szerint amennyiben ezen olajokban a trigliceridek átészterezése nem történik meg úgy, hogy *sn-2* pozícióban palmitát dominanciát mutassanak, akkor ez a májban a C16:0 elongációját visszaveti, mely a foszfolipid szintézist, végső soron a lipoprotein szintézist negatívan befolyásolja újszülöttekben. A sertészsír tehát esszenciális zsírsavakban szegény, ennek ellenére kifejezett jeletőségű lehet a humán tejpótló tápszerekben, épp annak speciális molekula-felépítése miatt.

A 6.1.4. fejezethez kapcsolódóan Tisztelt Opponensem kérdezi, hogy a halak petesejtjeinek és hímivarsejtjeinek lipidösszetételében talált markáns különbségek milyen élettani és szaporodásbiológiai háttérrel rendelkezhetnek?

A dolgozatban az ivarsejtekre vonatkozóan csak a Nílusi tilápia fajt elemeztem, az ivarfüggő eltérések pedig főleg abban jelentkeztek, hogy a petesejtben halolaj kiegészítés során csökkenő triglicerid omega-3 zsírsav részarányt, a foszfolipideknél pedig ellentétes arányváltozást tapasztaltam. A here (nem izolált spermium) esetében a két frakció változásában emelkedő omega-3 (trigliceridek) és a foszfatidokban csökkenő omega-6 zsírsav részarányt tapasztaltam. Megítélésem szerint az eltérések oka az, hogy a spermium motilitását, elsősorban a membránok fluiditását jelentősebben fokozza az omega-3 zsírsavak fokozott jelenléte, mely azonban nyilvánvalóan nem kizárólag kedvező hatású, hiszen ezen zsírsavcsoport lipidperoxidációra különösen érzékeny. Ezzel szemben, távoli utalást téve az első válaszra is, a petesejt lipidek elsősorban magas táplálékanyag-tartalommal és biológiai értékkel rendelkező, de oxidációnak ellenállóbb lipidekből épülnek fel (*Jeong és mtsai, 2002*). Összefoglalva tehát az volt tapasztalható, hogy táplálékeredetű zsírsavak a két eredendően eltérő funkciójú és összetételű sejt lipidjeit eltérő módon befolyásolták. A fenti változásokat *Jafaroghli és mtsai (2014)* kifejezetten javuló fertilitási mutatókkal igazolták, ám vizsgálatukban C-vitamin kiegészítést is alkalmaztak a takarmányban (meggyőződésem szerint antioxidánsként). Végül szeretném őszintén megköszönni Professzor Úrnak, hogy doktori munkámról elismerően nyilatkozott, és külön köszönöm hogy alapos, átfogó kérdéseivel a téma újbóli átgondolására késztetett.

Kaposvár, 2014. október 1.

Dr. Szabó András

Hivatkozások

- Brockerhoff, H., Ackmann, R.G. (1967): Positional distribution of isomers of monoenoic fatty acids in animal glycerolipids. *J. Lipid Res.* 8: 661-666.
- Hulbert, A. J., Rana, T., Couture, P. (2002): The acyl composition of mammalian phospholipids: an allometric analysis. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 132: 515-527.
- Innis, S.M., Nelson, C.M. (2013): Dietary triacylglycerols rich in *sn*-2 palmitate alter post-prandial lipoprotein and unesterified fatty acids in term infants. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 89(4):145-151.
- Jafaroghli, M, Abdi-Benemar, H, Zamiri, M.J., Khalili, B., Farshad, A., Shadparvar, A.A. (2014): Effects of dietary n-3 fatty acids and vitamin C on semen characteristics, lipid composition of sperm and blood metabolites in fat-tailed Moghani rams. *Anim. Reprod. Sci.* 147(1-2):17-24.
- Mitchell, T.W., Ekroos, K., Blanksby, S.J., Hulbert, A.J., Else, P.L. (2007): Differences in membrane acyl phospholipid composition between an endothermic mammal and an ectothermic reptile are not limited to any phospholipid class. *J. Exp. Biol.* 210(19): 3440-3450.
- Speake, B.K., Murray, A.M., Noble, R.C. (1998): Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo. *Prog. Lipid Res.* 37(1): 1-32.
- Turner, N., Hulbert, A.J., Else, P.L. (2005): Sodium pump molecular activity and membrane lipid composition in two disparate ectotherms, and comparison with endotherms. *J. Comp Physiol. B.* 175(2): 77-85.
- Valencak, T.G., Ruf, T. (2007): N-3 polyunsaturated fatty acids impair lifespan but have no role for metabolism. *Aging Cell.* 6(1): 15-25.