

## Válasz Dr. Nyitrai Miklós professzor úr bírálataira

Köszönöm az értekezésre fordított részletes figyelmét, a dolgozat erényeinek elismerését, hogy meglátta a jól felépített hosszú távú koncepciót kutatásaink háttérében, és hogy kérdéseivel segített ismét átgondolni az évekkel korábbi munkát. A szemléltetésbeli és a magyarázatbeli hiányosságokat igyekszem az előadásban és a kérdésekre adott válaszok során pótolni.

### A kérdésekre adott válaszaim:

A referenciákat, amennyibe az értekezésben is szerepelnek, csak névvel és évszámmal említem. Egyébként megadom az azonosításukhoz szükséges adatokat.

- 1. Mennyire jó a roncsolt izom létrehozására kifejlesztett notexin alapú módszer? Kérdésemet úgy értem, hogy az így kialakuló roncsolás mennyiben felel meg a mechanikai sérüléseknek, vagy az izombetegségek során kialakuló sérüléseknek? Voltak esetleg olyan kísérletek, ahol a roncsolást alternatív módszerrel (pl. fagyasztással) végezték?**

A notexin alapú módszer azért vált kedveltté a vázizmot kísérletesen tanulmányozók körében, mert olyan jellegű izomroncsolást/nekrózist idézett elő, ami után a kötőszövet, a főbb erek és idegvégződések viszonylag épen maradtak és egyenletes izomregeneráció következett be (Harris 2003). Tapasztalatom szerint a notexin tartalmú kígyóméreg csak a patkány soleus izomban idéz elő teljes izomdegradációt, s ott lehet a teljes izomregeneráció modellje. Előnye, hogy a regeneráció során végbemenő izomdifferenciálódást tiszta formában lehet tanulmányozni, de ez egyben a hátránya is, ha a hétköznapi izomsérülésekhez és az izombetegségekhez hasonlítjuk, mert az utóbbiak ritkán járnak teljes mértékű izompusztulással. A részlegesen megmaradó, sérült kifejtett rostok egyenetlenebbé tehetik a regeneráció beindulását. A teljes nekrosis viszont, mivel hosszabb ideig tart, késlelteti a regeneráció beindulását. Például a bupivacainnal kiváltott soleus regeneráció esetén, ahol a rostok nekrosis nem teljes, a miotubulus állapot és a beidegzés 2-3 nappal előbb alakul ki, mint a notexin regeneráció esetén (Zádor et al. 1996, Murgia et al. 2000, Plant et al. 2006). Ennek ellenére, valószínűleg sokan etikai megfontolásokból használják a bupivacaint (mely anesztetikum is), amikor a notexin még alkalmasabb is lehetne az izomroncsolásra. Igen, végeztem olyan kísérletet, ahol fagyasztással roncsolt soleust vizsgáltunk, a nekrosis ilyenkor jóval kevésbé volt kiterjedt, mint a notexin hatására. A fagyasztásos roncsolást azért kellett alkalmazni, mert érdekelte az egyik cikk bírálóját, hogy a TNF-alfa szint hogyan változik a notexintől eltérő más roncsolási módot követően. A TNF-alfa mRNS szint a fagyasztásos roncsolás után is nagymértékben emelkedett, ami arra utalt, hogy a gyulladást előkészítő citokin szintnövekedése kisebb mértékű izomsérüléskor is jelentős. A részleges izomroncsolást követő izomregenerációk valószínűleg jobban megfelelnek a mechanikai sérülések utáni izomreparációknak. A notexin nekrozist követő izomregenerációt, fejlődési modellként szokták alkalmazni. De lehet a notexint dózisének csökkentésével részleges izomroncsolásra is felhasználni a soleusban, ahogy

az első kísérletek során tették (Harris et al 1975), a kigyómarás hatásának vizsgálatára. A gyors típusú EDL izom részleges nekrozisához még a dózis csökkentésére sincs szükség, ott ugyanis a nekrozis még a kísérleti állat pusztulását előidéző dózis hatására sem lesz teljes.

**2. Milyen közelítéssel, milyen megfontolások mentén lehet a megfigyeléseket az emberi izomszövetben lezajló folyamatokra is vonatkoztatni? Vannak esetleg olyan kísérleti eredmények, amelyek a megfeleltetés mértékére vonatkozóan támpontot adhatnak?**

Mértékadó munkák az izomregenerációs modelleket a degeneratív-regeneratív ciklusok ismétlődésével járó izombetegségek regenerációs szakaszával állítják párhuzamba. Ilyen betegség a Duchenne típusú izomdisztrófia (X-kapcsolt), a legtöbb végtagövi (limb-girdle) izomdisztrófia és némely inflamatorikus disztrófia (dermotomyositis, polymyositis) (Ciciliot and Schiaffino 2010, Curr Pharmaceut Design 16:906-14). Az izomregeneráció algoritmusát is *in vivo* modellek segítségével sikerült feltárni (Allbrook 1981, Muscle Nerve 4:234-245). Az emberi folyamatokra vonatkoztatáskor azonban figyelembe kell venni az alkalmazott állatmodellt, az elroncsolt izom minőségét, az izomroncsolás előidézésének módját és mértékét. A kísérleti egerek, patkányok izmai a rosttípusuk alapján is jelentősen eltérnek az emberétől (Schiaffino and Reggiani 211). Ezt szem előtt tartva, de használják a notexin regenerációt egérben a Duchenne-es regeneráció modellezésére (Head et al. 2014, Exp Physiol 99:664-674). A notexin indukált regeneráció klinikumhoz közelítő szándékkal történő alkalmazása volt, amikor az X kromoszómához kapcsoltan öröklött izomdisztrófiás kutyák izomregenerációs képességét vizsgálták (Wilson et al. 1994, Neuropathol Appl Neurobiol.20(4):359-67; Wilson et al. 1994, Neuromuscul Disord 4(1):25-37; Sewry et al. 1992 Neuromuscul Disord 2(5-6):331-42; Dux et al. 1993 Neuromuscul Disor.3(1):23-9). Egy regenerációs modellben tisztán előidézhetők és vizsgálhatók olyan események, amelyek jelentőségét egy betegségben nehéz értelmezni a megfigyelésre támaszkodva. Ilyen volt a gyors és lassú miozin izoformák átkapcsolása a notexin indukált izomregeneráció során (Whalen et al. 1990), amelyre számos klinikai kutatás is hivatkozik. Az értekezésemben szereplő eredmények is kapcsolódnak a klinikai kutatásokhoz. Az egyik példán szeretném bemutatni a megfeleltetés mértékét és azt is, hogy a notexin regeneráció kutatása nem csak a degeneratív-regeneratív jellegű izombetegségek patogenezisének felderítéséhez járulhat hozzá.

Több mint tíz éve azért kezdtünk el foglalkozni a SERCA1 neonatalis formájával, mert a transzkript szintje dinamikusan nőtt és csökkent az izomregenerációban (Zádor et al. 1996). Külön antitestet készítettünk, amellyel kimutattuk, hogy a regenerálódó soleus a 3-7 napon csak a SERCA1b izoformát fejezi ki, s a SERCA1a-t nem (Zádor et al. 2007). A SERCA1b antitesttel igazolhattuk, hogy az mRNS hiába emelkedik, a fehérje nem transzlálódik a denervált illetve a passzívan nyújtott felnőtt izomban, azaz a SERCA1b kifejeződés poszttranszkripció szinten gátlódik. Kórtani kapcsolatok is felmerültek: leírták, hogy a SERCA1b mRNS szintje emelkedett a nem degeneratív-regeneratív jellegű myotonikus izomdisztrófiák (MD) mind a két típusában (Vihola et al. 2013, Neuropathol

Appl Neurobiol 39: 390-405). Így felvetődött, hogy a SERCA1 protein izoformák kifejeződését is érdemes lenne ott megvizsgálni. Kimutattuk, hogy a SERCA1b fehérje az MD 2-es típusában is kifejeződik (Kósa et al. 2015), míg az 1-es típusban ez nem jellemző (Guglielmi et al. 2016, Neuromusc Disord 26:378-85). Ez nem várt eredmény volt, mert egyik típusú MD-ben sem írtak le valódi izomregenerálódást, aminek addig úgy látszott, hogy a SERCA1b markere. Kevéssel utánunk egy japán kutató csoport is hasonló eredményre jutott, akik a SERCA1b antitestet az általunk leírt módon készítették (Zhao et al. 2015, BBA 1852(10Pt):2042-7). Ez a csoport olyan kísérletet is végzett, amely szerint a neonatalis SERCA1b kisebb kapacitással képes feltölteni az SR-t kalciummal, mint a felnőtt SERCA1a izoforma, mivel érzékenyebb az intraluminális kalcium szint emelkedésére. Ezzel hozzájárultak az MD patogenezisének magyarázatához (Santoro et al. 2014 Neuropathol Appl Neurobiol 40:464-476). Ugyanez a munkacsoport korábban még azt javasolta, hogy splicingot befolyásoló protein kináz C gátló farmakont lehetne az MD terápiája érdekében bevezetni, mert azt feltételezték, hogy a SERCA1 izoformák szintje MD-ben a splicing által regulálódik (Zhao et al. 2012, BBRC. 423:212-7). Úgy gondolom, ez egy hasznos hozzájárulás volt, különösen ahhoz képest, hogy a SERCA1b kifejeződés, a patkányéval és egérével ellentétben, alig mutatható ki a neonatalis humán izmokból (Kósa et al. 2015).

- 3. Esetenként a szerző megállapítja, hogy a vizsgált mRNS vagy fehérje szintje a regeneráció során nem érte el a roncsolódás előtti szintet. Ilyen pl. a 10. ábrán a myoD szintje. Itt ugyanakkor azt látjuk, hogy ez a megállapítás csak a vizsgálati periódus végén igaz, nem derül ki, hogy mi lett volna az utolsó, 28. nap után. Lehetséges az, hogy egy hosszabb periódus leteltével ezek a szintek beállnak a normális, roncsolódás előtti értékre?**

Igen, lehetséges hosszabb periódus elteltével is vizsgálni, de ilyet nem a molekulaszintekre, hanem a rosttípusra vonatkozóan végeztünk (Zádor et al. 1998). Öt hónap elteltével a regenerálódó izomban a rosttípus eloszlás nem volt különböző a 28 napos regenerált izométól, és ami különösen érdekes, a hasonló korú normál izométól sem. A patkány soleus ugyanis 8-9 hónapos korra ugyanúgy kb. 98%-ban lassú típusú rostokat mutat, mint a három hónapos kortól kezdődő négyhetes regeneráció elteltével. A molekulaszinteket azért nem vizsgáltuk 28 napnál hosszabb idő után, mert a folyamatok bemutatásához túl sok mérési pontot kellett volna felvennünk és úgy láttuk, hogy az így kapott információ egy olyan fejlődési periódusról, amelyben már lényegében nincs izom fenotípus változás, nem érte volna meg a fáradságot. A legtöbbször, ahogy a myoD protein esetében is, a szignifikáns csökkenés vagy emelkedés után az utolsó mintavételi időpontban (többnyire a 28. napon) mért érték nem tért el szignifikánsan a normál izométól.

- 4. Mi lehet annak a magyarázata, hogy ha a soleust szelektíven denerválták, a lassú miozin izoforma nehézlánca nem volt kimutatható az izomban? Milyen izoformák voltak ekkor dominánsak?**

A denerváció megszünteti a lassú beidegzést, ami alapvető a soleus izomban a lassú miozin kifejeződés fenntartásához. A szakirodalomban szinte kizárólag a teljes végtag denerválását szokták alkalmazni, amelynek nyilvánvaló mellékhatása a végtag bénulása is. A soleus saját idegének átvágása viszont nem járt végtagbénulással, sőt, az izom passzív mozgását is eredményezte a végtag többi izma által. Ezzel a kísérlettel azt kívántuk alátámasztani, hogy valóban a végtagi denerváció, azaz a lassú beidegzés hiánya csökkenti le a lassú miozin kifejeződést a soleusban, s a végtag bénulásnak ebben nincs meghatározó szerepe. Érdekes, hogy a lassú miozin a szelektív denervált soleusban még gyorsabban csökkent, mint a végtag denerváltban, valószínűleg a passzív mozgás következtében. Azaz a passzívan mozgatott izom gyorsabban adaptálódott, mint a bénult, mert hamarabb és teljesebb mértékben cserélődött le rostjaiban a lassú miozin I-es a miozin 2a-ra és a miozin 2x-re, mint a bénult, végtag denervált izomban. Általánosan elfogadott, hogy a lassú-gyors izoforma váltás hátterében a génszabályozás szintjén az NFAT hatás lecsengése és a myoD dominánsá válása játszhat szerepet. Mint külső körülmény, a szelektív denervációban passzív mozgás élénkítette a vérellátást és az anyagcserét is, ami felgyorsíthatta az izoforma váltást szabályozó izomrostbéli folyamatokat. A lassú miozin szelektív lebontásában bizonyára a proteozómához kapcsolt és/vagy az autofágiás folyamatok viszik véghez az izoforma váltás során, mint az izom atrófiában is (Schiaffino and Reggiani 2011, Schiaffino et al. 2013). Ennek a részletei a patkány soleusban azonban még nem ismertek.

**5. A myoD fehérje szintje már a regeneráció első napján megemelkedett (72. oldal), amit a szerző azzal magyaráz, hogy a környező izmokból a szatellitasejtek /miogenikus prekurzorok a nekrotizáló izomba vándoroltak. Mi a molekuláris hajtóereje ennek az irányított vándorlásnak?**

Erre vonatkozóan nem végeztünk kísérletet, de a szakirodalomból ismertek azonosított (hepatocita növekedési faktor (HGF), TGF $\beta$ ) és nem azonosított faktorok, amelyek az aktivált szatellita sejtek és primer mioblasztok chemotaxisát irányítják (Bischoff 1997). A nem azonosított faktorok hatása érvényesülhetett a vérlemezék kivonatában, miután a TGF $\beta$  blokkoló antitestet adták hozzá. Az elroncsolt izom sóoldatos kivonata is kemotaktikusnak bizonyult, azt követően is, ha a heparin kötő növekedési faktort affinitás kromatográfiával eltávolították. Ismert, hogy számos regenerációs rendszerben a gyulladásban részt vevő neutrofilok és makrofágok irányítják az aktivált szatellita sejtek/miogenikus prekurzorok, mioblasztok osztódását és vándorlását (Tidball and Villalta 2009 Am J Phys 298:R1173-1187). A rendszerünkben bőven lehettek makrofágok amelyek egy csoportja a szöveti degradáció alatt ill. annak végével átfedő időszakban aktiválják a szatellita sejteket. A munkám transzgenikus részéhez kapcsolódás okán is érdemes említeni az interleukin 4-et mint az aktivált szatellita sejtek vándorlását és miotubulusba olvadását serkentő citokint (Shultze et al. 2005, Lafreniere et al. 2006, Exp Cell Res 312:1127-41; Possidino et al. 2011, Cytokine 55:280-87). Szeretném azonban hangsúlyozni, hogy a vándorlásban betöltött szerepüket rendszerünkben nem támasztotta alá sem a myoD első napon történő szignifikáns emelkedése, sem az

emelkedett számú miogenikus prekursor sejtek hisztokémiai kimutatása. A szatellitasejtek/miogenikus prekursorok vándorlását csupán egy lehetőségként említem a diszkusszióban.

**6. A myostatin transzkript szintje emelkedett, míg a fehérje szintje csökkent a regeneráció során (73. oldal). Ezt a látszólagos ellentmondást a szerző azzal magyarázta, hogy a myostatin tárolódhat inaktív, vagy más fehérjéhez kötött formában is. Van arra módszer, hogy ezt a feltevést alátámassza? Meg lehet mérni a teljes myostatin szintet, beleértve a kötött és inaktív fehérjéket is?**

A myostatin teljes mennyiségét, beleértve az inaktív, extracellulárisan kötött és a keringésben levő szabad myostatin szintjét bizonyára meg lehetne mérni a közös epitópot felismerő antitesttel (habár a korabeli tapasztalataim szerint a kereskedelmi forgalomban levőek változó minőségűek, a legjobbakat az élvonalbeli laboratóriumokból pedig nem tudtuk beszerezni). Lényegében mi is „kötött” myostatint mérhettünk, hiszen a homogenálás utáni első centrifugális üledékben volt kimutatható, ahová más is; a citoszkeletális elemek, a miofilamentumok töredéke és az endo- peri- és epimizium maradványa is ülepszik. Olyan érzékenységgű antitestet nem sikerült beszereznünk, amely a felülúszóba került citoplazmás (az izomsejtekből származó) vagy a keringésbe került myostatint is kimutatta volna. A myostatin érett és proformája elkülöníthető lett volna a molekulatömege alapján az általunk használt C-terminális antitesttel, de a mintánkban mégsem találtuk meg. Ez ellentmond annak a megfigyelésnek, hogy a promyostatin egy kötőpeptidhez kapcsoltnak tárolódik a kötőszövetben és egy furin típusú konvertáz enzim által aktiválódik (Anderson et al. 2008, JBC 283:7027-7035). Felvetődhet, az is, hogy nem a kivonás során asszociálódott-e a myostatin az első centrifugális üledékkel? További kérdés, hogy mely molekulák kötik elsődlegesen a myostatint. Erre számos jelölt is lehet, a receptorán kívül, akár az oldható szérumban a fehérjék között is (Lee and Lee 2013, PNAS 110:E3713-22). Megfigyelték, hogy a myostatin a rostok felszínén lokalizálódik és kimutatták, hogy az intramuszkuláris kötőszövet alkotói közül a dekorin, laminin, fibronectin, fibromodulin kötheti a myostatint, de a biglikán és keratokán nem, sőt a laminin kompetálhat is a myostatinnal a receptorához (aktív rec. IIB) történő kötődésért (áttekintő cikk: Nishimura 2015, Meat Science 109:48-55). A vizsgálatokhoz felszíni plazmon rezonancia analízis módszert alkalmaztak a tisztított molekulák adszorpciójának vizsgálatára. Izomkivonatban történt alkalmazásról nem tudok.

**7. Az izom végeinek és közepének mérésekor a szerző az izmot öt részre osztotta (38. oldal), majd a két véget külön vette, a három középső részt pedig egyben vizsgálta. Technikai oka volt annak, hogy nem három, hanem öt részre osztotta az izmot?**

Az öt részre osztás azért látszott kézenfekvőbbnek, mint például a három részre osztás, mert az alapproblémát (azt, hogy a passzívan nyújtott izom a terminális részekben növekszik-e) korábban vizsgáló cikk (Williams and Goldspink 1973) is öt részre osztotta

az izmokat. Emellett szólt az is, hogy az öt részre osztáskor a terminális 1-es és 5-ös részt két másik részlet (2-es és 4-es) izolálta a középső 3-as részlettől, így a hosszanti eloszlás áttekinthetőbbnek látszott és valóban nagyobb felbontásban lehetett vizsgálni.

**8. Mit jelent az, hogy „a myf-5 és az MRF4 pedig terminális eloszlást mutatott” a dolgozat 40. oldalán?**

Az aktin mRNS-re normalizált myf-5 és az MRF4 mRNS-ek viszonylag terminális eloszlást mutattak, azaz a proximális és disztális izomvégen több volt belőlük, mint a nem nyújtott soleus izom középső részén. Ez valóban nem könnyen érthető, itt is említhettem volna, hogy a középső rész viszonylag nagyobb, három blokkot is magában foglal, míg a terminális rész csak a két végső blokkot. Ennek ellenére, amint a 40. oldalon a 16. ábrán látható, az aktinra normalizált myf-5 és MRF4 is nagyjából ugyanannyi a terminális, mint a centrális blokkokban. A másik két miogenikus faktor, a myoD és a miogenin szintje viszont a terminális blokkokban alacsonyabb, ezért viszonylag egyenletes eloszlásúak. Ezt a különbséget kívántam érzékeltetni, amikor a terminális eloszlás kifejezést alkalmaztam.

**9. MyoD pozitív sejtmagok száma az öt izomból származó metszeten nem mutatott különbséget (40. oldal). Az izom mentén a keresztmetszete nem állandó, és nyilván a tömeg sem egyenletesen oszlik el. Kellott ebben a mérésben normálni a magok számát az adott izomszakasz tömegére?**

Igen, kellett normálni, de ezt nem az izomszakasz tömegére, hanem a keresztmetszeti területére végeztem el. A keresztmetszet területét az átmérő átlagával számított körterülettel közelítettem. A soleus izom lefagyasztása után a végein kissé elvékonyodó henger alakú. Mivel az izomszakaszok egyforma hosszúak voltak és az ínak eltávolítása után a terminális darabok is nagyjából henger formájúak lettek, a fagyasztva metszés utáni keresztmetszeti terület, mint az egyes izomszakaszok esetében változó érték közelítőleg arányos volt az izomszakaszok térfogatának különbségével.

Abban a bízva, hogy válaszaimmal sikerült a kérdések által kiemelt részeket részletesebben értelmezni, köszönöm az értekezés bírálatára fordított fáradságát és a problémakör iránt mutatott érdeklődését.

Szeged, 2016. Május 17.

Tisztelettel:

Zádor Ernő