

Krenács Tibor - Válaszok Reglődi Dóra professzor asszonynak.

Köszönöm Professzor Asszony alapos bírálatát és kérdéseit!

Válaszaim a kérdések és megjegyzések sorrendjében az alábbiak:

Rövidítéslista. A szövegben igyekeztem, ahol csak lehet elkerülni a felesleges rövidítések használatát és ahol megfelelő magyar változat létezett egy szakzsargonra, azt preferálni. A rövidítéslista hiányát két bíráló is felvetette, ami tanulságos a későbbiekre, nagyobb lélegzetű munkák készítésénél mindenképpen megfogadom.

A **betűelütések és felcserélt betűk**, sajnos nem tűntek fel, a helyesírás ellenőrző programmal sem, nyilván a szerző figyelme a kontextusra koncentrált és ezeket könnyen átugorja. Ismeretlen szövegben magam is távolról kiszúrom a hasonló elírásokat, sajnos a sajátoméban néhány benne maradt, ami talán nem befolyásolta a tartalom értelmezését.

Minden, az értekezésben használt képi anyag, ábra és ábrarészlet saját munka.

1. Mi lehet az oka, hogy az 5-Fluorouracil kezelés után 6 nappal érte el a csúcst a Cx43 expressziója?

Az 5-fluorouracil (5FU) kezelés a vérképző progenitor sejtek döntő többségét elpusztítja. A stromasejtek is bár túlélnek, napok kellenek, amíg a deprivált állapotukból magukhoz térnek és megfelelően támogatják a fokozott vérképzési igényt. Ennek kapcsán már 3 nappal az 5FU kezelés után szignifikánsan emelkedett a Cx43 expresszió (és a gap junction plakkok száma), főleg a stromasejt hálózaton, hiszen ekkora a haemopoetikus sejtek újraképződése még éppen csak elindult. A Cx43 expresszió maximumát a kezelés utáni 6. napon érte el, amikor a csontvelő cellularitása már közelített a kezelés előtti állapothoz, azzal a különbséggel, hogy még mindig jelentősebb számban voltak éretlen blasztos sejtalakok. Nem szabad elfelejteni, hogy az 5FU kezelés után megfelelő utánpótlás híján napokig a periférián is jelentős immun/gyulladásos sejt deficit jelentkezik, aminek teljes pótlása fáziskéséssel valósult meg teljesen ~14 napra, amikor a Cx43 szint jelentősen le is csökkent. Ezért is következtettünk a Cx43 csatornák fontos szerepére a korai vérképzés kapcsán. Más regenerációs folyamatok is a connexin csatornák átmeneti felülregulációjával járnak, aminek elsődleges szerepe a folyamatok koordinációjában lehet. Azonban hámsérüléseknél a gyulladásos sejtekben felülregulálódott a connexin félcsatornák, az inflammasomák aktivitását és a gyulladásos folyamatot is támogatva fokozott szövetkárosodást/hegesedést okozhatnak.

2. Cx45 lehetséges szerepe a stromasejtek közötti kommunikációban.

A hivatkozott Schajnovitz munkacsoport cikke alapján mind a Cx43, mind a Cx45 (Nature Immun. 2011, 12:391-398) gap junction csatornák funkcionálisan összekapcsolják a csontvelői stromasejteket, aminek döntő szerepe van a stromasejtek CXCL12 kemokin termelésében. Ez a kemokin irányítja a CD34+ progenitor/őssejtek vándorlását a csontvelő meghatározott kompartmentjébe például csontvelői őssejt transzplantáció után. Azt is tudjuk, hogy Cx45 a szív ingerképző rendszerének domináns csatornáit képezi, lassú konduktivitású és az átlagosnál is kisebb méretű plakkokat képez (Severs és mtsai, Cardiovasc Res. 2008, 80:9-19). A lassú ingerterjedés a szívben összefüggésbe hozható a pitvari és kamrai myocardium szekvenciális aktiválásával. Vagyis a kétféle típusú connexin csatornák közül a Cx43 sokkal hatékonyabb metabolikus kapcsolatot képes közvetíteni, ezért feltehető, hogy a kétféle csatorna nem egyenrangú funkciót lát el a csontvelői stromasejtekben sem.

3. Miért a 150 mJ/cm^2 energiasűrűség mellett történt az excimer lézer abláció?

A hivatkozott Berns és mtsai (Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40:826-830) humán cornea bankból vett mintákat kezeltek *in vitro* azzal a céllal, hogy meghatározzák cornea felszínes ablációnál a legkisebb hatékony energiasűrűséget. Hasonlóan, az említett Puliafito és mtsai (1985 Ophthalmology 92(6):741-748) cikkéhez, mely utóbbi célja a 193 nm-es, ill. 248 nm-es ArF lézer hatékonyságát hasonlította össze és előbbi szignifikánsan jobbnak találta. Bernsék már a bevezetőben utalnak rá, hogy a 193 nm-es ArF lézer klinikai alkalmazását az FDA 100 mJ/cm^2 -t meghaladó energiasűrűség mellett engedélyezte. Ráadásul Krueger és mtsai, mely munkára professzor asszony harmadik cikként utal, 200 mJ/cm^2 energiadenzitást javasolnak a nagyobb precizitás és hatékonyság („etching efficiency”) miatt. Ezek közé a határok közé esik az általunk használt 150 mJ/cm^2 érték, amit a szegedi lézerfizikusok Bor Zsolt akadémikus vezetésével ajánlottak és alkalmaztak, amit ők a fentiek miatt természetesnek vettek ide vonatkozó irodalom említése nélkül.

Az említett Berns cikk 5. ábrája és a vonatkozó szöveg is azt mondja, hogy az általuk vizsgált felszínes ablációnál a 40 mJ/cm^2 ugyanolyan elektronmikroszkópos stroma-felszínt adott, mint az általuk kontrollként használt 160 mJ/cm^2 -es, de mélyebb ablációnál utóbbi hatékonyabb.

Egyébként az excimer lézer ablációt csak a stroma korrekciójára használják. Előtte a hámot vagy eltávolítják (PRK eljárás), vagy keratómmal körülmetszik és egy nyelet hagyva felhajtják (LASIK eljárás), majd a megfelelő abláció után visszahajtják. A flap-képzésnek sokkal pontosabb és szinte mellékhatások nélküli módja, amit femtosecundum-os lézerrel (Femto-LASIK) végeznek. Ennek a módszernek a műszeres hátterét Juhász Tibor magyar származású professzor a Michingan-i Egyetemen Ron Kurtzal együtt fejlesztette ki, majd az FDA engedélyhez szükséges humán vizsgálatokat az akkor már kiváló szemész Ratkay Imola, PhD hallgatóm, akinek a munkája a disszertációban is szerepel, végezte el Magyarországon.

4. Cx43, illetve Cx26 aktivitási mintázat albinó és nem albinó állattörzsek cornea sérülésekor.

Ilyen különbségekre vonatkozó irodalmat nem találtam és a témát mi sem vizsgáltuk. Véleményem szerint az, hogy a cornea limbális régiójában felhalmozódó melanocyták pigmentáltak vagy nem, nem okoz különbséget a cornea hám lézerkezelést követő regenerációjában. Egyébként cornea melanocyták connexin expressziójáról nincs adat, de feltételezhető az epidermális melanocytákhoz hasonló Cx43 képzésük, illetve a vestibuláris melanocytákhoz hasonló Cx26 termelésük is. Ezért valószínű az is, hogy cornea hámregeneráció során mindkét connexin izotípusú csatornák szerepe pigmentált bőrű nyulak corneájában is hasonló ahhoz, amit leírtunk.

5. Közvetlen szerepe lehet-e a connexinek felülregulációjának a regenerálódó cornea hám proliferációjában? Ezt a connexin expresszió (és csatornafunkciók) lokális gátlásával, például Cx43 antiszenz oligonukleotiddal történő kezelés kapcsán lehetne megmondani az alkalmazott regenerációs modellünkben. Ilyen gátló kísérleteket metszett bőrsebek regenerációja kapcsán végeztek és az tapasztalták, hogy a regeneráció inkább gyorsult és a sebzés a Cx43 gátolt állatokban kisebb mértékű hegesedéssel járt (Becker és mtsai, Semin Cell Dev Biol. 2016, 50:49–58). Ebben a modellben a kedvező hatást a gyulladásos sejtekben felülregulálódó Cx43 csatornák gátlásával magyarázták, ami kontrollálta a gyulladást. A gyors sebgyógyulás arra is utal, hogy a sejtek pótlására beindult proliferáció nem gátlódott. Kísérleteink alapján mi is azt gondoljuk, hogy mind a Cx43, mind a Cx26 csatornák szerepe a cornea regeneráció során indirekt és a folyamat kompartmentális koordinációjában van elsősorban. Ebben segít, hogy a mitózis során például a Cx43 csatornák internalizálódnak, majd a telofázisban azonnal visszarendeződnek az utódsejtek közötti új membránrégióba, funkcionáló csatornákká (Boassa és mtsai, Traffic 11:1471-1486).

Elképzelhető, hogy a connexinek és csatornák szerepet játszanak a proliferáció kontrolljában is, hiszen a cytoplazmatikus Cx43 fehérje csatorna-független sejtciklus gátló hatása (Dbouk és mtsai, Cell Commun Signal. 2009 Mar 12;7:4), illetve a Cx43 fehérje felülregulációjának proliferációt mérséklő hatása, főként malignus daganatokban ismert (Koffler és mtsai, J Cell Biochem. 2000, 79:347-354).

6. Óriássejtes csonttumorban (GCTB) a Cx43 fehérje szintek és csatornafunkciók szerepének közvetlen igazolása a tumor agresszivitásában és prognózisában.

Ehhez mindenképpen kellene a GCTB *in vivo* állatmodellje, hiszen az agresszivitást az klinikoradiológiai stádium határozza meg, ami a csontbeli és a csonthártyán túli terjedés mértéke alapján állapítható meg, emellett az állatok túlélését is követnünk kellene (prognózis). *In vivo* modellben, aminek létezéséről nem tudok a Cx43 gén tranzienst genetikai gátlásával lehetne követni ezen paraméterek változását. *In vivo*, csirke chorioallantois membrán modell létezik, ahol azonban csupán a molekulárisan manipulált tumor méretének változását, vagy pusztulását lehet követni (Balke és mtsai, BMC Cancer 2011, 11:241). Indirekt bizonyítékként szolgálna, amit tervezünk is, a Cx43 gátolt GCTB primer stromasejtekben vizsgálni az osteoclasogénikus RANKL, illetve ezt kontrolláló osteoprotegerin szinteket és magát az osteoclastogenezist; valamint vér mononukleáris sejtfraakcióból M-CSF és RANKL kombinációval indukált osteoclastogenezis során vizsgálni a genetikailag gátolt Cx43 expresszió hatását.

7. Az emelkedett Cx30 szint emlőcarcinomákban rosszabb túléléssel társul, de a Cx30 normál emlőmirigy myoepitheliális sejteiben és a lúminális hám apikális régiójában is kimutatható. Mi lehet itt a szerepe?

Annak ellenére, hogy egér emlőszövetben már 2005-ben leírták a Cx30 kifejeződést és igazolták, hogy terhes nőstény állatok emlőszövetében különösen laktáció során jelentősen emelkedett a Cx43 mRNS és fehérjeszint (Talhouk és mtsai, Cell Tissue Res. 319:49-59), emberi emlőszövetben (és emlőcarcinomákban) fehérjeszinten mi igazoltuk elsőként a Cx30 jelenlétét és sejttípus asszociációját (Teleki és mtsai, PloS one 9:e112541). Megfigyelésünk, hogy döntően a myoepitheliális sejtekben és között volt lokalizálható megfelel az egerekben talált, laktációval összhangban leírt szerepének, hiszen részt vehet a myoepitheliális sejtek kompartmentális funkcióinak, így tejelválasztás során szinkronizált összehúzódnásának koordinálásban, aminek a tej ürítésében van alapvető szerepe. A lúminális epitheliális sejtek szomszéd nélküli „árva” csatornái félcsatorna funkciókat tölthetnek be. Természetesen mindkét feltételezett funkció további vizsgálatokat kíván.

Még egyszer, köszönöm Reglődi Professzor Asszony munkámra adott alapos bírálatát!

Budapest, 2016. augusztus 29.

Tisztelettel:

Dr. Krenács Tibor