

Dr. Boros Mihály MTA doktora
Tanszékvezető egyetemi tanár
SZTE ÁOK Sebészeti Műtéttani Intézet

Válasz Boros Mihály professzor úr részére a „Celluláris stressz hatása a szervkárosodásra. Szervtranszplantációs és pulmonológiai vonatkozások.„ doktori értekezés bírálatára.

Hálásan köszönöm Professzor úrnak, hogy elvállalta doktori értekezésem bírálatát. Köszönöm rendkívüli alaposágát a munka bírálatában, kiegészítéseit, a munka erősségeinek és gyengeségeinek pontos összegzését.

Formai megjegyzések

Köszönöm, a nagyon alaposan átvizsgálást követő formai megjegyzéseit, valamint azt, hogy felhívta figyelmemet a helyenként nem teljesen precíz, vagy nem egyértelmű megfogalmazásból adódó olvasási és értelmezési nehézségekre. Egyetértek a bírálóval, hogy rövidítési jegyzék, valamennyi ábra eredetiből történő újraserkesztése és rajzolása egységesebb képet, könnyebb olvashatóságot biztosított volna.

Tartalmi megjegyzések

A 7. oldalon szereplő XOR enzim működéséről összegzett kiegészítéssel egyetértek. A 3. táblázatban szereplő felsorolás első három pontja klinikai gyakoriságot takar, valóban pl. gyakorisági megfontolás lehetett volna a sorrend.

Az NO I/R-ben betöltött szerepéről szóló részben kiegészítésre szorul a bíráló által felvetett rész:

„amennyiben az oxidatív stressz felerősödik, NO helyett potens vazokonstriktor végtermék (peroxinitrit és az eikozanoidok közül az izoprosztán) keletkezik”, illetve hogy az „NO az oxidatív stressz hatására peroxynitritté és izoprosztánná alakul”.

ROS képződése több lépcsős, melynek egyik első lépése a mitokondriális belső membránon végbemenő elektron transzport, melynek során molekuláris oxigénnel kapcsolatba lépve pl. hidrogén peroxide, hidroxil gyökök és hidroxil ionok képződhetnek. Ezek a környezetben jelenlévő NO-al reakcióba lépve peroxinitritté alakulhatnak, így a rendelkezésre álló NO szintjét csökkentik. A sejtek lipidkomponensei, különösen a telítetlen zsírsavak, érzékenyek az oxidációs hatásokra és peroxidálódva izoprosztánná alakulnak. (Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. Eur J Med Chem. 2015 Jun 5;97:55-74.) A második megjegyzés helyesbítve „ NO az oxidatív stressz hatására peroxinitritté alakul, illetve ezzel párhuzamosan az oxidatív stressz hatására képződő hidrogén-peroxid, hidroxil gyökök és ionok zsírsavakkal reakcióba lépve izoprosztán képződését segítik elő”.

Az inhalációs szerek bronchiális depozícióját leginkább egyénre szabottan, az adott beteg hörgőfájának 3 dimenzionális rekonstrukcióján kellene modellezni. Ilyen modellek a KTIA_AIK_12-1-2012-0019 „Aerosolok kiülepedésének elméleti és kísérleti vizsgálata gyakori légúti megbetegedések esetén (asztma, COPD) ” kutatás során el is készültek, de ezen mérési eredményekből még nem áll rendelkezésre nemzetközi közlemény. A számítógépes

modellezés során (sztochasztikus tüdőmodell) egy évek óta használt módszerről van szó, mely esetében már alkalmazott inhalátorok esetében vizsgáltuk a korábbi in-vivo adatok és a modell egyezését. Ennek továbbvitele során még egy közleményünk jelent meg, illetve a projekt kiterjesztését és az adott beteg mellkasi CT felvételéből összeállított és 3 dimenzióban nyomtatott hörgőfa modelljén tervezzük a méréseket folytatni. (Farkas Á, Jókay Á, Balásházy I, Fűri P, Müller V, Tomisa G, Horváth A. Numerical simulation of emitted particle characteristics and airway deposition distribution of Symbicort® Turbuhaler® dry powder fixed combination aerosol drug. Eur J Pharm Sci. 2016 Oct 10;93:371-9.)

A szisztémás lupus eritematosus betegeket vizsgáló rész valóban nem lett elég részletesen felvezetve a bevezetésben.

Anyagok és módszerek

Az altatáshoz a legtöbb kísérletben Na-pentobarbital-t (Nembutal) használtunk, stiláris hiba, hogy kétféle írásmóddal szerepelt a munkában. Mivel csak egy kísérletnél alkalmaztunk inaktint, így ennek a ténynek a rögzítését ennél a résznél éreztem helyénvalóbbnak. Ebben a vizsgálatban fontos volt a rágcsló tartós és egyenletes altatása. Az inaktin további fontos tulajdonsága, hogy minimális a kardiovaszkuláris és a renális működést befolyásoló hatása, mely a több órás, renális keringést vizsgáló kísérlethez döntő fontosságú volt.

A leukocita infiltráció mértékét egy 0-4 skálán határoztuk meg. Az első alkalommal történt publikáció előtt a mintákat két egymástól független vizsgáló, a minták hovatartozását nem ismerve, a kiértékelést ismételve végezte el. A meggyőző, egybehangzó eredmények birtokában használtuk és közöltük a fenti kiértékelést, amelyet az első alkalommal és az azt követően publikált munkákban is elfogadtak a bírálók. Sok szövettani értékelésnél használatos önkényesen megválasztott skála, a mi esetünkben 0-100 % között, 25 %-os lépcsőkben határoztuk meg a sejtes infiltrációt, illetve külön csoportot jelentett a nulla érték. Szövettani eltérések jellemzésére sok esetben használnak néhány értékű skálát, mely több tényező esetén kompozit pontszámmal a károsodások komplex meghatározására alkalmas (pl. a vesegráft kilökődésének szövettani jelei esetén a Banff klasszifikációban is 0-3 terjedő pontszámokat alkalmaznak l. 39. oldal, 307. referencia). Az általunk használt sejtes infiltrációt mutató pontszám esetében nem történt más módszerrel validálás.

Az SLE csoportok pulmonális manifesztációk szerinti definiálása valóban nincs megfelelően részletezve.

SLE esetében a pulmonális panasszal rendelkező azon esetekben soroltuk a betegeket a pulmonális érintettséggel rendelkező csoportba, ahol a klinikai kép és elvégzett vizsgálatok alapján a tüdőeltérések háttérben legnagyobb valószínűséggel az alapbetegség állhatott. Évek óta speciális ambulancián nézzük e betegeket (kooperációban Dr. Kiss Emese, Dr. Polgár Anna, Dr. Bazsó Anna és a többi ott dolgozó immunológussal), így a vizsgálatot végzők (Vincze Krisztina és Müller Veronika) nagy tapasztalattal rendelkeznek ennek a speciális betegcsoportnak a pulmonológiai vizsgálatával és az eredmények értékelésével. (Vincze K, Odler B, Müller V. [Pulmonary manifestations in systemic lupus erythematosus]. Orv Hetil. 2016 Jul;157(29):1154-60. doi: 10.1556/650.2016.30482.). Önmagában enyhe légzésfunkciós eltérést SLE pulmonális manifesztációnak megfelelő tünetek és egyéb eltérések nélkül nem soroltunk a pulmonális eltéréssel járó SLE csoportba.

Köszönöm a statisztikai próbákra vonatkozó kérdést. A valamennyi vizsgálat esetében átlag±SEM került feltüntetésre. Kruskal-Wallis próbát a 3 csoportot magába foglaló tanulmányok esetén, nem parametrikus változóknál alkalmaztunk (pl. D-vitamin szerepét vizsgáló tanulmány), parametrikus változóknál ANOVA-val végeztük a számításokat. Pearson tesztet két mennyiség kapcsolatának vizsgálatára, lineáris regresszió megítélésére használtuk.

Eredmények és megbeszélésük

A bírálónak igaza van, a megadott helyeken hiányzik a numerikus információ. Tekintve, hogy a munka nem tartalmaz minden elemet, mely a közleményekben szerepel így a lényegi elemek kiemelésére helyeztem a hangsúlyt.

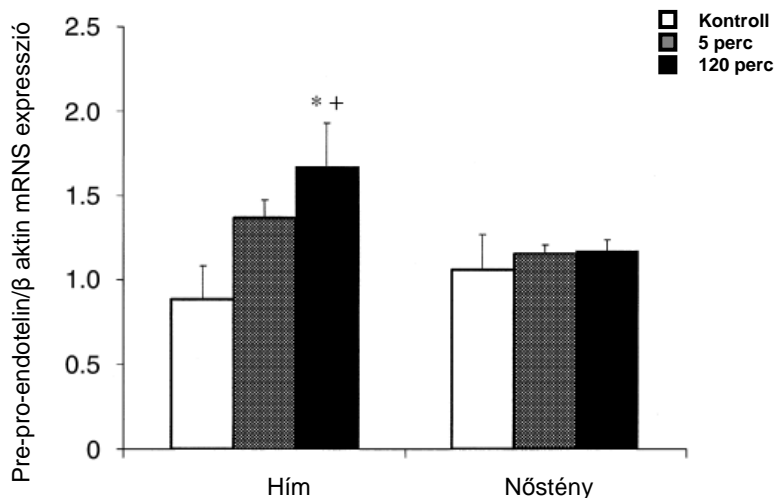
Elfogadom a bíráló kritikáját, hogy az eredmények tárgyalása során csak a statisztikai próbák által igazolt eltérések tekinthetők valóban jelentősnek. Néhány esetben mégis hangsúlyozni kellett, hogy a mérések során tapasztaltunk olyan trendeket, melyeknek jelentősége lehet további vizsgálatok, vagy nagyobb esetszámot magukba foglaló tanulmányok esetén, és felhívhatják a figyelmet a munkák végzése során tapasztalt azon megfigyelésekre, melyek miatt a vizsgálatok továbbvitele érdekes lehet.

A bíráló által megadott ábra és táblázati hiányosság valóban fennáll. Az 51. oldali ábra szövege a helyes, a 61. oldali táblázat esetén a § jel téves, helyesen # (vagyis a megfelelő hím csoporttal összevetve mutat szignifikáns eltérést).

Az alábbi szakaszban az eredeti kérdéseket átemelve a következőket válaszolom:

„Az 5.1/1 ábra D panelen feltüntetésre kerülő kezelés (LU135252) hatóanyaga, a terápia leírása (az LU 135252 orálisan adható) és dózisa is hiányzik a Módszerek fejezetből. Itt említi az is, hogy az LU135252-t „nem szelektív endotelin A és B receptor antagonistaként” alkalmazták. Kérdésem, hogy mennyiben gátolja ez a szer a B receptorokat? Ugyancsak itt szerepel, hogy a hím és nőstény állatokban eltérő mértékű szöveti ET-1 generálást detektáltak (erre nem találtam pontos adatot, de az 52. oldal említi az előmolekula jelentősebb expresszióját hím állatokban). Kérdésem, hogy mindez hogyan függhet össze a peptid szöveti szintjével és a szisztémás vazokonstriktiót reflektáló hemodinamikai paraméterekkel (hiszen a MAP változás magasabb volt nőstényekben) – azaz a nemi differencia, az endotelin képződés és az ET-A receptor aktiváció szisztémás és lokális (renális flow - érkonstriktió) keringési következményeinek pontosítása, tisztázása szükséges.”

Az 5.1/1 ábrán szereplő LU13552 orálisan adható nem szelektív endotelin antagonist. Az állatok 7 napig kapták a készítményt a vizsgálat előtt ivóvízben, 30 mg/kg/nap dózisban. A szelektivitás tekintetében az LU135252 ET-A receptor kötődése $K_i=1,4$ nM, míg az ET-B receptor kötődése $K_i=184$ nM, vagyis mintegy 100-szoros szelektívebb affinitást mutat humán ET-A receptorokhoz az ET-B-vel összevetve (Rohmeiss P, Birck R, Braun C, Munter K, van der Woude FJ, Kirchengast M. Pharmacology of the Endothelin_A Receptor Antagonist: LU 13525. Cardiovascular Drug Reviews. 1998; 16: 391-412.). Az 50 perces vese iszkémia után mért pre-pro endotelin mRNS expressziót a következő ábra mutatja:



* $p < 0.05$ vs. nőstény, + $p < 0,05$ vs. kontroll

Ezek alapján feltételeztük, hogy a hím állatokban az iszkémia/reperfúzió (I/R) hatására jelentősen nő az endothelin szintézis, mely elhúzódó érösszehúzó hatásánál fogva elnyújtott renális vazokonstriktiót okoz. A vizsgálatok során a renális változások könnyebben magyarázhatóak, mint a szisztémás vérnyomás tekintetében észlelt jelentősen magasabb artériás középnyomás (MAP) nőstényekben. E tekintetben további vizsgálatokat nem végeztünk, így csak feltételezéseink lehetnek. Felmerül, hogy az I/R során a nőstényekben prezervált vesekeringés olyan mediátorokkal áraszthatja el a szisztémás keringést, mely a vérnyomás emelkedéséhez vezethetett.

„A 67-68. oldalon bemutatott endothel-protektívnek szánt kezelési forma (desferoxamin - TEMPOL) nem befolyásolta a vese isograftok működését és az össz-NO szintáz aktivitást (azaz feltételezhetően ugyanannyi NO képződött, mint a kezeletlen csoportban), ugyanakkor látványosan csökkentette az nNOS és eNOS expressziót. Mi állhat e jelenség hátterében? Miért tekinthető egy oldat „endothel-protektívnek” ha szignifikánsan csökkenti az eNOS expressziót?”

A TEMPOL kezeléssel nem tudtunk valódi endotelprotektív hatást elérni. Numerikusan valóban csökkent a kezelés mellett az eNOS és nNOS expresszió, de az enzimek aktivitásában nem mutatkozott különbség. Feltételezésünk szerint a kezelés mellett észlelt alacsonyabb NOS expresszió egyik magyarázata, hogy ezen enzim effektívebb működést mutathat, igazolva az aktivitás mérése kapcsán észlelt azonos szintet mindkét csoportban.

„A SE Pulmonológiai Klinikáján végzett felmérés eredményeivel kapcsolatban megjegyezném, hogy ha jól értelmezem, a napi gyakorlatban végzett CIA (kemoterápia-indukált anémia) kezelés nem felel meg a nemzetközi és hazai irányelveknek (83. oldal teteje). Mi e meglepő eredmény oka? Hogyan terveznek ezen változtatni?”

A vizsgálat célja a CIA kezelés megfelelőségének vizsgálata volt Magyarországon. Olvasva az eredményeket látható, hogy nem teljesen protokoll-követően történt a kezelés, melyre

eddig nemzetközi szinten is kevés adat áll rendelkezésre. Ennek alapján a nemzetközi gyakorlat protokoll követése sem egyértelmű. Az eredmények ismeretében a Klinikánk gyakorlatban sokkal nagyobb figyelmet kapott ez a terület, bár ki kell emelni, hogy a hazai finanszírozási protokoll bevezetése jelentősen szűkítette a kezelés lehetőségét a nemzetközi irányelvben meghatározottakhoz képest.

„Az inhalációs terápia összehasonlításánál (88. oldal): a beclomethasone-formeterol, fluticasone-salmeterol és budesonide-formoterol adása különböző eszközökkel történt (az első pMDI, míg a másik kettő DPI inhalátorokkal). Számomra nem egyértelmű annak eldöntése, hogy a kezelések hatékonyságában fennálló különbségek a belélegzett partikulumok légúti depozíciójában fennálló eltérésekből, vagy a gyógyszerek hatékonyságában meglévő különbségekből erednek. Kérem ennek tisztázását (azaz a jobb asztma kontroll az ICS-LABA kezeléseknél a jobb légúti depozíciónak, vagy magának a gyógyszernek a jobb hatékonyságának tulajdonítható-e).”

A kérdés valódi eldöntéséhez az egyes készítményeket összehasonlító klinikai vizsgálatokra lenne szükség, melyek azonban nem állnak rendelkezésre. Különböző való élet vizsgálatokból lehet a budesonide-formoterol és a fluticasone-salmeterol eltérő klinikai hatásosságára következtetni (Larsson K, Janson C, Lisspers K, Jørgensen L, Stratelis G, Telg G, Ställberg B, Johansson G. Combination of budesonide/formoterol more effective than fluticasone/salmeterol in preventing exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease: the PATHOS study. J Intern Med. 2013 Jun;273(6):584-94.). Mivel mindkét készítmény farmakológiai, részecske-eloszlási és inhalációs eszközbeli eltérést is mutat, így nem lehet pontosan megmondani, hogy melyik tényező szerepe a legfontosabb a jobb klinikai hatás elérésében budesonide-formoterol esetén, amint azt Larsson és munkatársai igazoltak. Az általunk leírt, pMDI-al elért jobb asztma kontrollt nagyobb esetszámú olasz való-élet megfigyelés során is megerősítették (Allegra L, Cremonesi G, Girbino G, Ingrassia E, Marsico S, Nicolini G, Terzano C; PRISMA (PRospective Study on asthma control) Study Group. Real-life prospective study on asthma control in Italy: cross-sectional phase results. Respir Med. 2012 Feb;106(2):205-14.).

Igazoltuk, hogy a budesonide-formoterol és a fluticasone-salmeterol esetén a korábbi vizsgálatokban leírt tüdődepozíciónak megfelelő értéket adnak a számítógépes modell számításai. Ezek alapján feltételezzük, hogy a gyártó által megadott részecskeeloszlás és a beteg által létrehozott belélegzési áramlási mintázat alkalmas lehet adott gyógyszerformuláció-eszköz együttes jellemzőinek számítógépes szimulációs alkalmazására. A vizsgálatunk és több klinikai vizsgálat is igazolta, hogy a kis részecskeméret alkalmas a kislégutakba megfelelő mennyiségű gyógyszer bejuttatására, így nagyobb hörgőfelszínen mutatható ki klinikailag is releváns hatás. Természetesen ezen esetekben az adott készítmények farmakológiai különbözősége is fontos szerepet játszhat.

„A 91. oldalon bemutatott ábrákon a láthatósági problémákon túl nem világos, hogy milyen modell alapján történt a depozíció meghatározása. Ez a dolgozat korábbi részeiben sem kerül taglalásra. A 5.3/8. ábrán a PIF adatok hiányoznak Foster-re, miért? Az ábra bal paneljain bimodális eloszlás látszik a kiüledett tömeg tekintetében Foster adását követően, ami a két átlag (vagy medián) megadásában is megjelenik. Ennek az érdekes eredménynek az említése és későbbi diszkussziója is hiányzik.”

Az ábra felbontása valóban nem elég jó. A Foster pMDI esetében PIF és irodalmi depozíciós adat nem áll rendelkezésre. A Foster pMDI esetében a sztochasztikus tüdőmodell számításai szerint valóban két különálló csoport jelent meg valamennyi hörgőkompartimentben. Ennek a

pontos háttere nem ismert, és további vizsgálatokat igényel. A Foster Nexthaler (DPI) vizsgálatok eredménye szerint ilyen eltérés e formulációval nem volt igazolható (Jókay Á, Farkas Á, Furi P, Horváth A, Tomisa G, Balásházy I. Computer modeling of airway deposition distribution of Foster(®) NEXThaler(®) and Seretide(®) Diskus(®) dry powder combination drugs. Eur J Pharm Sci. 2016 Jun 10;88:210-8.).

„A 93. oldalon bemutatott 5.3/10. ábrán talán érdemes lett volna az egyes betegcsoportokhoz tartozó pontok különböző szimbólumokkal való megkülönböztetése (Kontroll, Asztma, COPD, ACOS). Így a csoportokban fennálló különbségek jobban kidomborodhattak volna. Nem világos, hogy a kapcsolódó 5.3/11. ábrán miért jelenik meg jóval kevesebb pont. Asztma kontroll teszt és állapotfelmérő teszt feltehetőleg minden betegben elvégzésre került, és az előző ábra alapján a D vitamin szintek is rendelkezésre állnak.”

Az egyes csoportok eltérő szimbólummal történő jelölése valóban tovább javíthatta volna a betegcsoportok közötti különbségek megjelenítését. Az 5.3/11. ábrán kevesebb a pont, mivel itt az asztmás-ACOS-os és a COPD-ACOS-os betegcsoportok adatai jelennek csak meg, mivel a betegség-specifikus kérdőívek vagy asztmára, vagy COPD-re vonatkoznak, és a másik betegcsoportra nincsenek validálva.

„A 94. oldalon ismerteti a Szerző a pleuropulmonális érintettséggel járó SLE-s betegek erőteljesebb légzésfunkciós változásait. E pulmonális manifesztációk esetében újra felmerül, hogy az SLE betegek SLEC és SLEpulm alcsoportokra való szétválasztása hogyan történt.”

A kérdés a metodikai részt érintő kérdésnél került kifejtésre.

„A kevert asztma-COPD kórkép, azaz az ACOS kialakulásában szerepet játszó faktorok meghatározásához kapcsolva kérdezem, hogy az ACOS-ban meglévő D-vitamin hiány jelen van-e COPD-ben is, tehát tekinthető-e ACOS-ra specifikus markernek.”

D-vitamin hiány COPD-ben is igazolható, és az asztmások jelentős részében is fennáll. Így nem tekinthető specifikus markernek egy légúti betegségben sem.

A D-vitamin pótlása nem jár jelentős mellékhatásokkal és általában jelentős terápiás költség sem jelentkezik. Asztma esetén Cochrane elemzés igazolta, hogy D vitamin bevitel csökkenti az asztma exacerbációk rizikóját és az egészségügyi szolgáltatás igénybevételét enyhe-középsúlyos esetekben. (Martineau AR, Cates CJ, Urashima M, Jensen M, Griffiths AP, Nurmatov U, Sheikh A, Griffiths CJ. Vitamin D for the management of asthma. Cochrane Database Syst Rev. 2016 Sep 5;9:CD011511.). COPD-ben is számos tanulmány igazolta, hogy a D-vitamin deficiencia/hiány nagyon gyakori. Jelenleg zajló klinikai vizsgálat fogja igazolni, hogy D-vitamin pótlás befolyásolja-e ebben a kórképben az exacerbációk számát, súlyosságát. (Rafiq R, Aleva FE, Schrupf JA, Heijdra YF, Taube C, Daniels JM, Lips P, Bet PM, Hiemstra PS, van der Ven AJ, den Heijer M, de Jongh RT. Prevention of exacerbations in patients with COPD and vitamin D deficiency through vitamin D supplementation (PRECOVID): a study protocol. BMC Pulm Med. 2015 Sep 23;15:106. doi: 10.1186/s12890-015-0101-4.). ACOS esetében a mi vizsgálatunk igazolta először D-vitamin hiány fennállását.

„A 89. oldalon megjelenő 5.3/6. és 5.3/7. ábrákon a szórások nincsenek feltüntetve, ami miatt nehéz a valódi különbségekre következtetni. Ugyanezen ábra kapcsán kérdésként merülhet fel,

hogy vajon a BUD/F és FP/S kezelések valóban összevonhatók-e egy adatsorba annak tudatában, hogy a hatóanyagaik különböznek.”

Köszönöm a pontosítás szükségességét az ábrák kapcsán. Mivel az inhalációs kezelésben az inhalációs eszköz nagyon jelentősen befolyásolja a terápia sikerét, így az eszköz működési elvét vettük alapul a vizsgálati csoportok kialakításánál (pMDI vs. DPI). Külön érdemes hangsúlyozni, hogy évekig csak a megadott két DPI ICS-LABA kombináció állt a betegek rendelkezésére, és a törzskönyvezés után volt csak módunk váltani asztmás betegeknél a pMDI ICS-LABA készítményre. A különböző hatóanyagok esetén valóban nehéz az eszköz és a készítmény adta különbségek vizsgálata, de eddig nem (vagy csak néhány esetben) álltak rendelkezésre azonos hatóanyagú, de különböző eszközből adagolt készítmények. (Müller V, Tamási L, Somfay A, Kovács G, Losonczy Gy. Az eltérő inhalációs eszközből adagolt azonos hatóanyagú készítmények közötti különbségek. Medicina Thoracalis. 2012; 65: 329-335.)

Még egyszer szeretném megköszönni Boros Mihály professzor úr alapos munkáját, építő kritikai megjegyzéseit és kérdéseit.

Budapest, 2016. október 15.

Dr. Müller Veronika Judit