

Tisztelt Professor Úr!

Tisztelettel megköszönöm, hogy a téma kiváló ismerőjeként elvállalta MTA doktori értekezésem bírálatát, hogy munkámat alaposan, mélyrehatóan tanulmányozta és véleményezte. Bírálatában megfogalmazott kérdések és a kritikai megjegyzések lehetőséget adtak számomra, hogy a munkámat más nézőpontból is lássam és jövőbeli kutatási tudományos terveimet velük kiegészítsem. Köszönöm, hogy összesítve munkámat nyilvános védésre alkalmasnak találta. Kérdéseire sorrendjük szerint válaszolok.

1. Miért hagyta ki a vizelet kalcium vizsgálatát? Akár a reggeli kalcium/kreatinin hányadosét, akár a 24 órás vizelet kalcium ürítését?

A vizelet kalcium vizsgálat nagyon fontos részét képezi a kivizsgálásnak, azonban a vizsgálatunk döntő többségénél szérum kalciumszint meghatározás történt. A terhességi és laktációs prospektív tanulmányban, a protokoll része volt a vizelet kalciumszint meghatározás. Ebben a vizsgálatban előre egyeztetett időpontban érkeztek a résztvevők és az első vizeletet így tervezhető módon tudtak leadni. A keresztmetszeti tanulmányaimban a vizeletvizsgálat nem volt része a protokollnak. Az esetek többségében a betegek besorolása random módon a vizsgálat napján változó időpontban történt és nem tartottuk célszerűnek nem első vizeletminták feldolgozását.

2. Nem gondolta-e megvizsgálni a vér és/vagy vizelet Ca-44/42 izotóp arány változását, mivel sokan ezt egy nagyon érzékeny kalciumanyagcsere markernek tartják?

Ca-44/42 izotóp arány vizsgálatra nem gondoltunk, mivel nem állt rendelkezésre a módszer.

3. Mi a véleménye az osteocalcin szénhidrát anyagcserére kifejtett hatásáról? Lehet ez még a gyakorlatban felhasználható?

In vitro és állatkísérletek szerint hatással lehet az osteocalcin a szénhidrát anyagcserére. Számos klinikai vizsgálat, beleértve egy 2008-as magyar tanulmányt [Buday B et al. Orv Hetil 2008;149:2453-2461.], kapcsolatot talált az osteocalcin és a szénhidrát anyagcsere között. Azonban további vizsgálatok szükségesek a kapcsolat igazolására.

4. A csontanyagcsere biokémiai markerei ambivalens módon vannak jelen a napi klinikai rutinban. Ennek az egyik oka a beta-crosslaps assay-k jelentős szórása, így nagy, esetenként 35-40%-os változás szükséges ahhoz hogy azt valós változásnak gondoljuk.

Milyen módon lenne csökkenthető az assay-k szórása, hogy a beavatkozási határok meghatározhatóak legyenek?

A IFCC C-BM együttműködésben a kereskedelmi forgalomba szánt reagensek gyártóival tervezi napi rutin számára hozzáférhető nemzetközi referencia készítmények előállítását és közös meghatározási módszerek kifejlesztését a PINP és  $\beta$ -CTx vérből történő mérésére. Ha a módszerek harmonizációja és standardizációja megvalósul, engedélyt kérnek a módosított assay-rendszerek használatára a szabályozó hatóságoktól. Jelenleg a kereskedelmi forgalomban elérhető automatizált módszerek (IDS és Roche) inter- és intra-assay CV %-a 7% alatti, és így a preanalitikai körülmények maximális betartásával a mért markerszintek használhatók a gyakorlatban.

5. Véleménye szerint alkalmasak a BTM-ek a terápia monitorozására?

Az Egyesült Államokbeli National Bone Health Alliance (NBHA), egyetértésben az International Osteoporosis Foundation (IOF) és az International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) jóváhagyta a PINP és a  $\beta$ -CTx vérből történő mérését, mint referencia BTM-eket. A mérési bizonytalanságot optimális preanalitikai körülmények biztosításával csökkenthető.

Osteoporosis indikációra az anti-reszorptív terápia monitorizálása során baseline-tól egy 20%-os ( $>10 \mu\text{g/L}$ ) PINP vagy egy 30%-os ( $>0,100 \mu\text{g/L}$ )  $\beta$ -CTx-szint csökkenés igazolhatja a terápia hatékonyságát. A terápiás cél abszolút értékben PINP esetében  $<35 \mu\text{g/L}$  és a  $\beta$ -CTx esetében  $<0,280 \mu\text{g/L}$  szintek elérése. Anabolikus szerek használata mellett PINP markerszint meghatározás javasolt a hatásosság igazolására, és a  $>10 \mu\text{g/L}$  emelkedés terápiás választ jelenthet, a legtöbb esetben a PINP emelkedés  $>100\%$  a baseline értékhez képest [<https://www.aacc.org/science-and-research/scientific-shorts/2021/are-bone-turnover-markers-useful-in-osteoporosis-management>].

6. 28. oldal: Ahogy írja, valóban, egy nem régen közölt I. fázisú tanulmány szerint statisztikailag jelentős növekedést mutattak ki az ágyéki gerinc és teljes csípő csontásványianyag denzitásában szklerosztin monoklonális antitest-kezelésben részesült egészséges egyéneknél - ezt követően a II. fázisú vizsgálatok is elkezdődtek. Nem említi azonban, hogy III. fázisú vizsgálatok is történtek, sőt, befejeződtek és az anti-sclerostin antitest, romosozumab (Evenity) néven forgalomba is került osteoporotikus betegek kezelésére.

Köszönöm szépen, valóban nem került említésre a III. fázisú vizsgálat és a készítmény forgalomba hozatala.

7. A D vitaminnal kapcsolatos randomizált kontrollált tanulmányok és a Mendeli randomizációs elven végzett vizsgálatok eredményei változóak, ellentmondásosak, szükség van korszerű adatokra. Ezért is jó, hogy Bhattoa doktor ezekkel kapcsolatban új adatokat gyűjtött. A D-vitaminhiányos állapot gyakoriságának, évszaki változásainak és csontanyagcsere paraméterekkel való kapcsolatának vizsgálatát menopauza utáni 319 nőben 2002. január és december között, 229 férfin pedig 2009 szeptembere és 2010. szeptembere között végezte. Mivel ezek az időpontok a teljes évet felölelik, melynek során a napsugárzás változik, azaz a D vitamin képződés is, ez a szezonális nem zavart be az adatok értékelésébe?

Mind a vizsgált nők és a vizsgált férfiak esetében a szezonális jelentős hatással volt a mért 25OHD vitamin szintekre. Ezért is fontosnak gondoltam egy egész év alatt az összes évszakban mért 25OHD vitaminszintek alapján megadni a D vitamin elégtelenség prevalenciáját.

8. A tanulmányokban hol  $50 \text{ nmol/l}$ , hol  $75 \text{ nmol/l}$  határértéket vettek a normális alsó határának. Miért nem volt ez egységes?

A posztmenopauzális nők tanulmányban (2004-ben) használtunk a 2001-ben Lips és mtsai által javasolt  $50 \text{ nmol/L}$  határértéket, a későbbi tanulmányoknál a 2005-ben Dawson-Hughes és mtsai által javasolt  $75 \text{ nmol/L}$  határértéket használtunk. Az Institute of Medicine (IOM) továbbra is az  $50 \text{ nmol/L}$  határértéket ajánlja, ellentéttel számos más

szakmai társaság (pl. Endocrine Society, Magyarországi konszenzusajánlás) által ajánlott 75 nmol/L határértékkel.

9. 90. oldal: „Statisztikailag jelentős különbség volt a tavaszi és nyári, valamint őszi FN BMD értékekben ( $p < 0,05$ ).” Ez hogy értendő? Évszaki hullámozása volt a combnyak denzitásának?

A posztmenopauzális nők keresztmetszeti tanulmányban, ahol összesen 319 nő résztvett, a tavaszi ( $n=100$ ) hónapokban bevont betegek FN BMD átlag értéke szignifikánsan alacsonyabb volt a nyáron ( $n=80$ ), valamint ősszel ( $n=79$ ) bevont résztvevők FN BMD átlag értékeitől. Nem ugyanazok egyének vizsgálata történt a különböző évszakokban. A jelenséget több közleményben is leírták [Aitken JM et al. *Nature* 1973;241:59–60., Krolner B. *Calcif Tissue Int* 1983;35:145–147., Dawson-Hughes B et al. *Ann Intern Med* 1991;115:505–512., Rico H et al. *Calcif Tissue Int* 1994;54:385–388., Rosen CJ et al. *Bone Miner* 1994;25:83–92., Storm D et al. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3817–3825., Rapuri PB et al. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:2024–2032.], azonban vannak akik nem tudtak a saját tanulmányaikban reprodukálni ezt a jelenséget [Overgaard K et al. *Bone* 1988;9:285–288., Vanderschueren D et al. *Calcif Tissue Int* 1991;49:84–89., Tsai KS et al. *Bone* 1997;20:371–374.]. Bár többen statisztikailag szignifikánsnak írták le az ingadozást, fontos a módszer (DXA) mérési bizonytalanságával együtt értékelni a változások szignifikanciáját.

10. 91. oldal: „Az életkor és BMD voltak csak szignifikáns független meghatározói a LS BMD-nek ( $r^2 = 0,148$ ,  $p < 0,001$ ).” A BMD volt a meghatározója a BMD-nek?

Íráshiba történt itt, a mondat helyesen: “Az életkor és **BMI** voltak csak szignifikáns független meghatározói az LS BMD-nek ( $r^2 = 0,148$ ,  $p < 0,001$ )”

11. 101. oldal: „Férfiakban az LS BMD normál T-score ( $> -1,0$ ) esetén ( $n=125$ ) a szérumszklerosztin szintek szignifikánsan magasabbak voltak, hasonlítva az alacsony LS BMD ( $n=69$ ) T-score ( $\leq -1,0$ ) értéket mutató társaikhoz ( $n=69$ ) (67,5 vs. 62,2 pmol/L;  $p=0,027$ ).” Ez hogyan magyarázható, hiszen a magasabb sclerostin szintnek csökkent BMD-vel kellene járnia? Ezért alkalmazunk anti-sclerostin antitestet az osteoporotikus betegek kezelésére.

Tudván, hogy a szklerosztint csaknem kizárólag az oszteociták képezik, és hatásos gátlói a csontépítésnek, a BMD és a szklerosztin szintek között inverz kapcsolat feltételezhető. Leleteink, összhangban legalább két másik közléssel [145,146], és az ellenkezőjét sugallják, vagyis a magasabb BMD emelkedett szklerosztin szintekkel társul.

A jelenség oka nem ismert, Cejka és mtsai [564] szerint a nagyobb csonttömeg több oszteocitát tartalmaz, ezért magasabb a szklerosztin-szint. Továbbá, a veseműködés növekvő életkorral bekövetkező hanyatlása fontos tényező lehet az idős férfiak emelkedett szérumszklerosztin-szintjeinek létrejöttében. A csontszövet anyagcsere-folyamataiban betöltött szerepét ezért talán legjobban a csont mikro környezetében végzett szklerosztin-mérésekkel lehetne megismerni.

12. 105. oldal: „A középkorúakhoz viszonyítva az idősödők OPG szintje szignifikánsan magasabb, a RANKL szintje és RANKL/OPG hányadosa viszont szignifikánsan alacsonyabb volt (16. táblázat).” Nem fordítva kellene ennek lennie? De legalábbis furá, hogy idősökben a RANKL és a RANKL/OPG csökken, mikor ebben a korban nő a csontvesztés. Ha ezek csökkennek, akkor csökkenne a csontbontás is, nem?

Vizsgálati eredményeink igazolták, hogy a szérum OPG szintek növekszenek, a sRANKL/OPG hányados pedig csökken az életkor növekedésével egészséges, 50 évnél idősebb férfiakban. Az OPG szintek és életkor kapcsolatáról bemutatott megállapításaink összhangban vannak több, mint 10 más szerzőével [119-121,122,124,126-131]. A különböző befolyásoló tényezők kapcsolatában egyedüli az OPG és életkor közötti pozitív korreláció, amelyre vonatkozóan napjainkig a különböző tanulmányok szerzői egyetértésre jutottak. Tudván, hogy az OPG messenger ribonukleinsav (mRNS) számos szerv szöveteiben expresszálódik, köztük a tüdőben, vesében és szívben, a keringő OPG-szint számos forrásból jön létre. A csontszövet anyagcsere-folyamataiban betöltött szerepét ezért legjobban a csont mikrokörnyezetében végzett OPG-mérésekkel lehetne megismerni. Bár különbséget találtunk a két életkor szerinti csoport között, az életkor és a sRANKL szint közötti korreláció hiányzott, mely összhangban van 6 munkacsoport által korábban közöltekkel [123-125,127,128,130].

13. A 25-hidroxivitamin D meghatározások standardizációja során 2009-es mintákat mértek 2014-ben, 5 évvel később. Változhatott-e a minták 25OHD tartalma?

Elméletileg évekig eltarthatók a minták -80 °C fokon. Cavalier Professzor [Clin Chem Lab Med. 2021;59:e389-e391.] közleménye szerint – 80 °C fokon 5 éves tárolás során minimális szintváltozás tapasztálható, mely a minták koncentrációjának köszönhető.

Tisztelettel:



Dr. Bhattoa Harjit Pal

Debrecen, 2023.08.24.