

Válasz Prof. Dr. Benyó Zoltán kérdéseire

Hálásan köszönöm Professzor Úr bírálatának bevezető gondolatait és kutatási eredményeim jelentőségének kiemelését ezen a területen.

1. Érthető, hogy a szerző miért zárja ki az immunológiai problémákat a kísérletes ischaemiás/reperfúziós modelljeinek vizsgálatakor. De mi indokolta, hogy a vékonybél keringés idegi szabályozásának kérdései szinte teljesen kizárásra kerüljenek? Hiszen klasszikus adatok bizonyítják ezek jelentőségét és saját kísérletei is bizonyítják, hogy a graft eltávolításával összefüggő denerváció csökkenti az endogén PACAP szinteket a vékonybélben.

Válasz:

A vékonybél transzplantáció minden formája (izolált, máj+bél, multiorgan) esetén a graft teljes extrinsic beidegzése átvágásra kerül, azaz az a. és v. mesenterica superior perivascularis kötőszövetében futó vegetatív idegágakat denerváljuk. Ez minden szerv kivételkor így történik, perifériás idegrekonstrukciót nem végzünk. Ez egyben a szerv és ereinek felsőbb idegi szabályozásának megszűnését jelenti, azaz a transzplantált szervek teljes egészében automáciával működnek.

A bél ekkor sem marad teljesen magára. Ezt már 1902-ben Bayliss és Starling elsőként ismerte fel és írta le a humorális szabályozási mechanizmust, ahol altatott kutya denervált duodenumába híg sósavoldatot juttatott és ekkor a pankréász alkalikus nedvet választott ki. Az anyagot szekretin-nek nevezték el, mely az első hormon (hírvivő) elnevezést kapta (*Bayliss et al. J Physiol (Lond) 1902;28:325-53*) és mára a humorális szabályozás egy új tudományterületté vált.

A bélműködés idegi szabályozásának kérdése mellett szintén nagyon izgalmas kutatási terület a bél keringésének idegi szabályozása. Sok mindennel foglalkoztunk, sok aspektusból próbáltuk körbejárni a problémakört, de konkrétan ilyen kutatásokat csak érintőlegesen végeztünk azzal, hogy a PACAP, mint neuropeptid bekerült vizsgálataink fókuszába. Kimutattuk, hogy antioxidáns és sejtvédő tulajdonsága mellett endogén mennyisége csökken bél meleg I/R hatására, vagy a transzplantált (denervált) bélben.

Köszönöm a javaslatot, hogy ezt a területet érdemes lenne tovább vizsgálni, és néhány közlemény is leírta már, hogy a PACAP a paraszimpatikus idegrendszer egyik fontos neurotranszmittere az emésztőtraktusban, azok ereiben simaizom-relaxáns, hatást okoz (Köves et al. Front Endocrinol 2020;11:88.). Például ez a vazodilatátor hatás segíthetne a bél konzerváló oldattal való perfúziója után, vagy a reperfúzió korai szakában a vasculatúra minél jobb hemodinamikai támogatásában.

2. Lehetett-e szerepe a mesenterialis zsírszövetnek a meleg ischaemiás/reperfúziós kísérletes eredményeinek kialakításában?

Válasz:

A mesenterialis zsírszövetre úgy tekintünk, mint egy peritoneumkettőzetben lévő, a bélhez futó erek és nyirokcsomók közötti teret kitöltő zsírszövetre. Fő szerepét zsírraktárként adják meg a tankönyvek ma is (mesenterium: görög eredetű szó, jelentése bélfodor).

A legújabb vizsgálatok szerint a mesenterialis zsírszövet (mesenteric adipose tissue: MAT) kritikus szerepet játszik a bél élettani ökoszisztémájában. Ma már az is a kutatások tárgya, hogy a vékony- és vastagbél melletti mesenterialis zsírszövetek között is vannak különbségek

(small mesenteric adipose tissue: SMAT, large mesenteric adipose tissue: LMAT). Például a SMAT nemcsak kisebb adipocitákkal rendelkezik, hanem több zsírhoz kapcsolódó nyirokcsomót is tartalmaz, mint a LMAT. B-sejt markerek bőségesen kifejeződnek a SMAT-ban, míg a fejlődéssel kapcsolatos gének magasan fejeződnek ki a LMAT-ban. Az LMAT adiposederált őssejtjei magasabb adipogén potenciált és alacsonyabb proliferációs rátát mutattak, mint az SMAT őssejtjei. Ezen kívül az SMAT és az LMAT eltérő szerepet játszik az immunszabályozásban, és ezt követően befolyásolja a mikrobióta komponenseit (*Zhang et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2022;322:310-26.*).

A mesenterialis zsírszövet és a belek közötti többszintű kapcsolat miatt a MAT nemcsak strukturális platformot biztosít a belek homeosztázisának fenntartásához, hanem „diplomáciai közvetítőként” is működik a különböző bélbetegségeknél (*Coffey et al. Lancet Gastroenterol Hepatol 2016;1:238-47.*). A MAT például szerepet játszik a bélpermeabilitás szabályozásában. Részleges eltávolításakor károsodnak a bél barrier funkciói és elősegíti a baktériumok transzlokációját a májba, és nem-alkoholos eredetű zsírmájat okoz (*Wu et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2018;315:659-670.*). A tanulmányok még számos olyan kérdést vetnek fel, amelyek további vizsgálatokat tesznek szükségessé. Például mi a különbség a SMAT és az LMAT között kóros állapotokban, pl. elhízásban és IBD-ben? Mi az eredete a SMAT és az LMAT különbségének?

A mesenterialis zsírszövetből nyert őssejtek egy további terápiás lehetőséget vetnek fel, melyet sikerrel alkalmaztak már állatkísérletekben. A humán zsírszövetből származó sztromasejtek javították a túlélést és a mesenterialis perfúziót, valamint mérsékeltek a bél ischaemiával és reperfúziós sérüléssel járó nyálkahártya-károsodást (*Jensen et al. Shock 2016;46:75-82.*).

Összefoglalva jelentős különbségek vannak a sejt morfológia, a génexpressziós profilok, a sejt komponensek, a biológiai jellemzők, valamint az immun- és mikrobiótaszabályozó szerepek között a regionális MAT-ok között, ami alapján a mesenterialis zsírszövet fontos szerepet kaphat a vékonybél különböző patológiás állapotaiban és kezelésükben.

3. Voltak-e megfigyelések azzal kapcsolatban, hogy változik a fokozatosan növekvő ischaemia hatására a plexus myentericus (Auerbach) és plexus submucosus (Meissner) morfológiai képe?

Válasz:

Kutatásunkban ilyen jellegű vizsgálatokat nem végeztünk.

Ismert, hogy a béltraktus beidegzése kettős. Intrinsic: a vékonybél falának submucosa részén egy felületesebb plexus submucosus (Meissner-féle, 1857) idegfonat, míg az izomfal két rétege között egy jóval szabályosabb elrendezésű myentericus (Auerbach-féle, 1864) idegfonat húzódik és összesen kb. 400-600 millió neuron alkotja a hálózatot. Az enterális idegrendszer ezeken a reflexívein biztosítja az autonóm bélműködést a bél falban az itt lévő kemo- és mechanoreceptorok pedig a béltartalom mindenkori jellege szerint célszerűen szabályozzák a simaizomzat összehúzódását, a peristaltika jellegét és ütemét. Extrinsic: ebbe az autonómiába beleszól a vegetatív idegrendszernek mind a paraszimpatikus (n. X), mind a szimpatikus része, csak módosító tényezőként, a saját alapritmust gátló vagy gyorsító, az összehúzódást fokozó vagy csökkentő módon avatkozik be.

1995-ben végzett kísérletekben kimutatták, hogy paradox módon az ischaemia kezdetén néhány percig fokozódik a patkányok bélcsatornájának motoros tevékenysége (*Udassin et al. Dig Dis Sci 1995;40:1035-8.*). Valójában már az ischaemia 15. perce után a kontrakciók jelentősen csökkentek és a tüske potenciálok is teljesen eltűntek, a lassú hullámok azonban megmaradtak (*Chou et al. Fed Proc 1982;41:2090-5.*). Majd 1997-ben japán kutató mutatta ki patkány- és nyúlmodellben, hogy a mesenterialis ischaemia a bél fali plexusok károsodását is

okozzák (*Matsumoto. J Nihon Univ Sch Dent 1997;39:17-24.*). A legújabb vizsgálatok szerint Poles és munkacsoportja kimutatta, hogy az akut oxigénhiány a bélcsatorna teljes hosszában megváltoztatja a simaizom kontrakciókat kísérő mioelektromos jelek frekvencia- és amplitúdó értékeit. A reoxigenizáció során a bélfal izomzat kontrakcióit kísérő frekvenciaértékek az alapaktivitáshoz közeli értékeket mutattak, de a kontrakciók amplitúdó értékei az alapaktivitáshoz képest csökkentek, azaz a hipoxia okozta funkcionális változások csak részben reverzibilisek (*Poles M. PhD Doktori értekezés, SZTE, 2015, pp.13-15.*). A Boros professzor vezette kutatócsoport újabb eredménye volt, hogy az ischaemiás és reperfüziós inzultusok során alkalmazott metán belélegeztetés nemcsak a bélnyálkahártyát, hanem a bélfal izomzatát és az entericus neuronokat is megvédte az oxidatív és nitrozatív stressz következményeitől (*Boros et al. Crit Care Med 2012;40:1269-78.*).

Sebészeti szempontból a bélfal idegellátásának a posztoperatív ileus (POI), passzázsavarok miatt van/lehet jelentősége. A hasi műtétek után szinte minden esetben előfordul valamilyen mértékű posztoperatív motilitászavar. Elektív hasi műtétek után a betegek akár 25%-ánál is kialakulhat, míg elhúzódó POI a vastagbélműtétek után 5-30%-ban fordul elő (*Holte et al. Br J Surg 2000;87:1480-93.; Buchanan et al. StatPearls Publishing, 2023;PMID:32809615*).

A POI patogenezisében elsősorban a bélfal gyulladással és a fokozott szimpatikus aktivitással és károsodott paraszimpatikus aktivitással reprezentált autonóm idegrendszeri zavarok szerepelnek (*Bauer et al. Neurogastroenterol Motil 2004;16:54-60.*). Ennek hátterében is állhat ischaemiás eredet, illetve ezzel összefüggően a bélfal izom- és idegsérülései (*Ay et al. J Korean Surg Soc 2011;81:242-9.*). Egérmodellben neuroanatómiai bizonyítékok vannak a bélfalban a vagus gyulladásgátló reflex létezésére. Egy óránál hosszabb ideig tartó vékonybélműtét, vékonybél-anasztomózis, vékonybél-adheziólízis, vékonybél-manipulációval kapcsolatos helyi ischaemia a bélfal finom gyulladását eredményezi, ahol a POI során szenzoros és motoros vagus neuronok aktiválódnak. Állatkísérletben lipidekben gazdag enterális táplálék adása enyhítette a POI-t a vagusideg aktiválásával, a pro-inflammatorikus citokinszekréció csillapításával (*Lubbers et al. Ann Surg 2009;249:481-7.*).

4. Mi lehet a magyarázata annak, hogy amikor a vékonybél hideg I/R modelljében a konzerváló UW oldathoz exogen PACAP38-at adtak, akkor erre a bélben nem csak a PACAP38 aktivitása növekedett, de a PACAP27 immunreaktivitása is?

Válasz:

A reperfüzió végén mind a kontroll, mind a PACAP-nélküli UW oldatban konzervált belekhez képest mért szignifikánsan emelkedett értékek során figyelembe kell venni, hogy PACAP38 immunreaktivitásához képest a PACAP27 immunreaktivitása kisebb, mintegy tizedannyi volt az azonos tárolási idők esetén (PACAP38 K: 57,3±3,5; 5.13: 65,2±3,4; 5.15.: 55,6±4,2; 5.16.: 48,9±3,2 fmol/mg) (PACAP27 K: 4,2±0,2; 3,5±0,3; 5.15.: 3±0,2; 5.16.: 2,6±0,15 fmol/mg).

Kialakulásáért felelős pontos mechanizmust még nem ismerjük. A PACAP38 és PACAP27 immunreaktivitás-növekedésének több magyarázata is lehet modellünkben:

(1) Ismert, hogy hipoxia következtében az endothelsejtekben csökken az adenilát-cikláz-aktivitás és emiatt alacsonyabb intracelluláris cAMP-szint alakul ki (*Chen et al. Cell Transplant 2019;28:1472-89.*). Ez a megállapítás in vivo vékonybél prezervációs vizsgálatok során is megerősítést nyert. Az említett mechanizmusok közül a celluláris cAMP-jelátvitel játszhatja a fő szerepet az ischaemiás bél integritásának megőrzésében. Számos tanulmány megerősítette, hogy a PACAP38 hatására a cAMP-szint megemelkedik, ami megóvjaa a bélszövetet az I/R okozta károsodástól (*Yan et al. Kidney Int 1997;51:419-25.; Minor et al. Eur Surg Res 1998;30:144-8.; Riera et al. Transplantation 2001;72:1217-23.*).

(2) Lehetséges magyarázat, hogy a PACAP38, PACAP27 és Pacap-szerű peptidek fokozott affinitással kötődnek a PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptorokhoz, melyek megtalálhatók a bél összes rétegében (mucosa, myentericus neuronok, neuroendokrin, érendothel sejtek és simaizomsejtek). A konzerváló oldathoz adott, külsőleg bevitt PACAP38 ezekhez a receptoraihoz hozzákötődve okoz immunreaktivitás-növekedést és fejt ki antioxidáns és protektív hatását a bélben (Tóth et al. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:377-96.). Miközben a denervált, de keringését visszakapott bélszövetben a PACAP27 immunreaktivitás-növekedésének oka a testből a vér útján eljutó PACAP27 bekapcsolódhat a VPAC1, VPAC2 vagy PAC1-receptorokhoz és ez okozta az aktivitásnövekedést.

(3) A leújabb kutatások szerint a PACAP38 vagy PACAP27 sejtmembrán receptor-független módon, endocitózis és macropinocitózis útján is képes belépni sejtbe és a magban lévő receptorhoz kötődni. Kimutatták, hogy a sejtbe belépő és le nem bomló PACAP képes akár ki is lépni, tovább jutni a sejtől (Doan et al. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:940-9.; Heinzlmann et al. *Orv Hetil* 2023;164:1300-10.).

Összességében feltételezzük, hogy a PACAP38 immunreaktivitás-növekedésben egyrészt a receptorokhoz kötődés hatása, másrészt direkt intracelluláris belépés útján való effektus szerepel, azaz a konzerváló oldat-bélsejt, a vér-bélsejt, bélsejt-bélsejt útvonalakon is aktívan transzportálódik. PACAP27 esetén a vér-bélsejt útvonal mind a receptorális úton, mind a transzmembrán hatásmechanizmus révén állhat a peptidmolekula aktivitás-növekedésének hátterében.

5. Ismereteseke Garbaisz 2015-ös adatain kívül (értekezés 139.o.) olyan irodalmi adatok, melyek arra utalnának, hogy az ischaemiás poszt kondicionálás farmakológiai úton való kiváltása a jövőben egy klinikai gyakorlatban is használható eljárássá válhatna?

Válasz:

Az IPO mechanizmusa farmakológiai szerekekkel is kiváltható az olyan receptorok aktiválásával, mint az adenzin, a kalcitonin génnel kapcsolatos peptid (CGRP), α -adrenerg, opioid, ösztrogén és bradikinin receptorok, különböző útvonalak, mint a PKC, TK és MAP-kináz aktiválásával, vagy endogén mediátorokon keresztül, mint a NO és a kalcium. A gyógyszerek kiváltotta hatást farmakológiai poszt kondicionálásnak (fIPO) nevezik (Khan et al. *Pharm Pharmacol* 2020;72:1513-27.).

Szívizom esetén farmakológiai poszt kondicionáló hatással bír az exogén hidrogén-szulfid (Hu et al. *Int Heart J* 2016;57:4.), a delta opioid: deltorphin D (Seewald et al. *Exp Biol Med* 2017;242:986-95.), a tanshinon IIA (Yuan et al. *Exp Ther Med* 2014;8:973-7.), a sevofluran (Xie et al. *Acta Physiol* 2017;221:98-114.), a muramyl dipeptid (Sicard et al. *Cardiovasc Res* 2009;83:277-84.), a genistein (Tissier et al. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:79-87.), az endomorphin-1 (Zhang et al. *Mol Med* 2016;14:3992-8.), a naloxon (Xia et al. *Korean J Physiol Pharmacol* 2014;18:67-72.), és a catestatin (Penna et al. *PLoS One* 2014;9:e102536.).

Különböző szereket vizsgáltak, amelyek között vannak olyan altatók vagy más gyógyszerek, amelyek kis fokú agyi ischaemiát váltanak ki, vagy IPO jelátvitellel közös hatásmechanizmust mutatnak. Agy esetén fIPO hatást okoz a levosimendan (Hein et al. *BMC Neurol* 2013;13:106.), a resveratrol (Grewal et al. *Can J Physiol Pharmacol* 2019;97:1094-1101.), az adenosine A2 receptor agonista és PTEN inhibitor (Deckert et al. *J Neural Transm Suppl* 1994;43:23-31.), a sevofluran (Shi et al. *Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22:1770-5.), az izofluran (Lee et al. *Anesthesiology* 2008;108:1055-62.), a morfin (Pateliya et al. *Biol Pharm Bull* 2008;31:1755-60.), az alfa-liponsav (Xie et al. *Brain Res* 2012;1482:81-90.), a dexmedetomidine (Yuan et al. *Metab Brain Dis* 2017;32:539-46.), és a CO₂ belélegzés (Fan et al. *J Cerebr Blood F Met* 2014;34:275-83.).

Diabetesben az atorvastatin calcium (*Chen et al. Exp Ther Med 2017;14:25-34.*), vese ischaemia esetén a galectin-1 (*Carlos et al. Sci Rep 2018;8:9568.*), míg máj vonatkozásában a milrinon (*Lin et al. Transplantation 2012;93:265-71.*) fiPO hatását vizsgálták.

Transzplantációs témában érdekes megfigyeléseket publikált Vollmar és munkatársai, ahol leírták, hogy az IPO-hoz hasonló hatásokat okoz a donor immunosuppresszáns gyógyszerrel, a tacrolimussal való előkezelése, mely csökkentheti a graft proinflammatorikus aktivációját és a neutrofil gyulladást, enyhébb reperfúziós sérülést mutatva, valamint gyorsabb morfológiai és funkcionális helyreállást okozva a vékonybél transzplantáció után. A feltételezett mechanizmusok hátterében az IPO-hoz hasonló intracelluláris hatások állnak, mint például a korai NF-kappaB aktiváció gátlása és a HSP72 szintézis fokozása, valamint az IC Ca²⁺-szintek csökkentése (*Vollmar et al. Langenbecks Arch Surg 2011;396:13-29.*). Összehasonlító proteomikai vizsgálat alapján IPO után a fehérjék differenciált expresszióját mutatták ki a bélben, amely funkcionális hatást gyakorolt az energia- és anyagcsere, illetve az antioxidáns és antiapoptotikus folyamatokra egyaránt. Mindezek klinikai jelentősége a rutin műtétek során az, hogy a reperfúziót ne egyszerre, hanem a legelején frakcionáltan, néhány reperfúziós-reokklúziós ciklus alkalmazásával indítsuk és ezzel javítható a posztischaemiás szövet állapota, legyen az meleg vagy hideg ischaemia után. Továbbá leírták, hogy az I/R-károsodással szembeni védelem elvész, ha az IPO-t késleltetve végzik, de IPC és IPO kombinálódásakor potencírozódhatnak egymás hatásai (*Li et al. J Surg Res 2010;164:173-80.*).

5. Metodikai kérdés: hogyan lehetett a DSC vizsgálatoknál a vérminta és a referencia minta tömegét 0,1 mg pontossággal kiegyenlíteni?

Válasz:

A minták tömegének ellenőrzése a 0,01 mg érzékenységgű, az 1907 óta mérleggyártással foglalkozó OHAUS cél által gyártott analitikai mérleggel történt. Először a minta tömegét mértük be, majd utána a referencia tömeget megfelelő méréstartományú EPPENDORF automata pipettával állítottuk be a jelzett pontossággal. A DSC készülék gyártója (SETARAM) 0,5 mg maximális különbség mellett szavatolja, hogy nem kell hőkapacitás korrekciót végezni.

Köszönöm Professzor Úr újabb kutatásokra ösztönző felvetéseit. Kérem, fogadja el válaszaimat, és erősítse meg javaslatát a MTA doktora cím elnyerésére!

Budapest, 2023.10.16.



Dr. Ferencz Andrea