

Válasz Prof. Dr. Lázár György kérdéseire

Mindenekelőtt hálással köszönöm Professzor Úr pozitív állásfoglalását doktori értekezésem tartalmi és formai követelményeit illetően az MTA doktora fokozat megszerzése érdekében. Köszönöm elismerő szavait nemzetközi folyóiratokban megjelent közleményeinkkel kapcsolatban, hogy mind a kísérletes, mind a humán kutatásainkat kiemelt fontosságúnak tartja.

Feltett kérdéseire válaszolva a szakirodalom jeles kutatóinak munkáira is hivatkozom.

1. Az ischaemiás bélkárosodások korai felismerése lényeges kérdés a klinikai gyakorlatban az eddigi vizsgálatok eredményei, ill. kutatási tapasztalatai alapján, hogy alkalmazná a vér sav-bázis eltolódásait a korai diagnosztikában?

Válasz:

Az akut mesenterialis ischaemia (AMI) korai diagnózisa és azonnali terápiája a sikeres kimenetel és a mortalitás csökkentésének sarokkövei. A betegek több mint 90%-ánál a leukocitaszám kórosan emelkedett, 88%-ban fordul elő kóros leletként a metabolikus acidózis emelkedett laktátszinttel (*Bala et al. World J Emerg Surg 2017;12:38.*).

A kórállapotból adódóan a legtöbb vizsgált biomarker már csak akkor jelenik meg, amikor az AMI késői stádiumba került, mint például a tejsavas acidózis. Az L-laktát a glikolízis minden sejt által ananerob körülmények szintetizált terméke. 2013-as meta-analízis szerint az L-laktát mérésének szenzitivitása 96%, de specificitása jóval alacsonyabb, csak 40% (*Cudnik et al. Acad Emerg Med 2013;20:1087-100.*). Ezzel szemben a D-laktát, az L-laktát sztereoizomerje, mely a gyomor-bélrendszerben történő bakteriális erjedés terméke és AMI, fokozott bélpermeabilitás vagy bakteriális transzlokáció esetén szintje emelkedik a vérben. Egy 2017-ben végzett holland meta-analízis kimutatta, hogy a D-laktátra vonatkozó összevont szenzitivitás és specificitás 71,7% és 74,2%, ami már lényegesen jobb és az AMI potenciális diagnosztikai eszközeként jelenleg is vizsgálják (*Treskes et al. Intern Emerg Med 2017;12:821-36.*).

Emellett az intenzív kutatások révén teoretikusan már vannak az AMI diagnózisát segítő nagy specificitású biomarkerek, úgy mint a bélrendszeri zsírsavkötő fehérje (intestinal fatty acid binding protein: I-FABP), az α -glutathion-S-transzferáz (α -GST), a D-dimer, az L- és D-laktát, a citrullin, az ischaemia-módosította albumin, és a prokalcitonin (PCT). Elvi hatásosságuk mellett azonban klinikai alkalmazásuk a kis és egyben heterogén betegpopuláción való tesztelés miatt egyelőre korlátozott (*Memet et al. Ann Transl Med 2019;7:394*).

Tekintettel arra, hogy az AMI a mucosa felől halad a serosa felé, egy nyálkahártyából származó marker lenne a leghasznosabb a korai diagnózis felállításához. Azonban a bélrendszerben nincs specifikus, más szövetektől és szervektől eltérő szövet, így továbbra is kihívást jelent az ideális biomarker megtalálása. 2018-ban végzett kutatásban azt találták, hogy a mikroRNS-21 szabályozhatja a bélhámsejtek közötti tight-junction permeabilitását. PCR-al kimutatható expressziója figyelhető meg a sérumban állatkísérletek során (de humán colitis ulcerosa esetén is hasonló eredmények vannak) (*Zhang et al. Kaohsiung J Med Sci 2018;34:556-63.*).

A korai diagnózisban a sav-bázis diagnosztika önmagában nem alkalmazható. Akut hasi fájdalommal jelentkező betegnél, ahol emelkedett a leukocitaszám, a képkotók tágult beleket vagy ascitest írnak le, gáz van a bélfalban intramuralisan (Pneumatosis intestinalis, Park Grade1-től; kísérletünkben 2 óra Gr2, 3 óra Gr4, 6 óra Gr5 volt), gáz van a portomesenterialis vénákban vagy szabad hasi levegő formájában a hasüregben, akkor noha ezek önmagukban nem patognomikusak az AMI-ra nézve, de mindig gondolni kell az AMI lehetőségére az akut has differenciáldiagnosztikájában. Legjobb továbbra is a CT-angiográfia (szenzitivitása 94%, specificitása 95%) és a korai diagnosztikus laparoszkópia és/vagy laparotomia (Woo et al. Am Surg 2007;73:1006-8.)

2. Milyen változtatásokat javasolna a jelenlegi konzerváló oldatok összetételében az I/R károsodások csökkentése érdekében?

Válasz:

A konzerváló oldatokkal kapcsolatos intenzívebb kutatások az 1960-as, 70-es években kezdődtek. Az első oldat kifejlesztése 1969-ben Geoffrey Collins nevéhez fűződik, melyet az Eurotransplant szervezet módosított és 1980-tól Euro-Collins néven terjedt el, és több mint 20 évig alkalmazták a szervkonzerválásban (*Collins et al. Lancet 1969;2:1219-22.; Dreikorn et al. Eur Urol 1980;6:221-4.*). Majd az 1980-as években bevezetett két oldat, az intracelluláris ionösszetételű University of Wisconsin (UW) oldat (ViaSpan[®], Belzer UW[®] vagy KPS-1: Kidney Perfusion Solution-1[®]) (*Wahlberg et al. Cryobiology 1986;23:477-82.*) és az extracelluláris ionösszetételű hisztidin-triptofán-ketoglutarát (HTK) oldat (Custodiol[®]: Bretschneider-szerinti, Perfadex[®]) vannak forgalomban (*Gubernatis et al. Langenbecks Arch Chir 1990;2:66-70.*). Ezek az oldatok azok, amelyek ma is biztosítják a hasi szervek vaszkulaturájának és parenchymájának minél jobb megőrzését az átültetés utára is.

Mindkét oldat ionösszetétele, antioxidáns tartalma, metabolikusan inert anyagokkal fenntartott ozmotikus állandósága és membránstabilizáló összetevői alapján jó kiindulási alapként szolgálhatnak. Fontos lenne a sejtek aerob metabolizmusának további fenntartása, mellyel megelőzhető a szabadgyök-képződés és a metabolikus acidózis sejtszintű elindulása. Kutatási javaslatom lenne a UW vagy HTK oldatoknak fizikailag oldott oxigénnel való dúsítása, melyet a korábban említett gépi perfúziós anomáliák miatt statikus perfúzióval végeznének el. Továbbá szükségesnek látom a képződött laktát eliminálására alkalmas módszer kidolgozását.

3. Hogyan látja az ischaemiás kondicionálás módszerek alkalmazhatóságát a klinikumban és különösen a távoli IPC-t? Terveznek-e a RIPC-vel (Remote Ischaemic Preconditioning) kapcsolatos kísérletes vizsgálatokat?

Válasz:

Az ischaemiás kondicionálási módszerek mindegyikét elsőként szívizom kísérletekben publikálták. A kondicionálási metodikák evolúcióját tekintve elsőként 1986-ban Murry írta le a klasszikus ischaemiás prekondicionálás (IPC) korai kedvező hatásait myocardiumban (*Murry et al. Circulation 1986;74:1124-36.*). Az IPC az adaptív toleranciát két fázisban hozza létre, amely a kezdeti ischaemiás inzultustól néhány percen belül kialakul és kb. 2-3 órán át tart. A következő felismerést 1994-ben Yellon és munkatársai publikálták, amikor észlelték az IPC bifázisos jellegét, azaz késői IPC-nek vagy Second Window Of Protection (SWOP)-nak is nevezik a védelem második hullámát, mely hatása kb. 12-24 óra után jelentkezik és 3-4 napig tart (*Yellon et al. Circ Res 1994;75:586-90.*). A távoli IPC hatást (RIPC) kezdetben csak lokálisan, a myocardiumon belül detektálták (*Przyklenk et al. Circulation 1993;87:893-9.*) és ezt követően mutatták ki interorganikus módon (*Gho et al. Circulation 1996;94:2193-200*). A távoli ischaemiás prekondicionálás gyakorlati szempontból még több előnyös hatással rendelkezik. Lényege, hogy rövid, távoli ischaemiás inzultusokat alkalmaznak a célszervi ischaemia indukciója után, de még a célszervi reperfüzió előtt (*Schmidt et al. Am J Physiol 2007;292:H1883*).

Már a kutatások elején megfogalmazódott, hogy -az általunk is alkalmazott IPC protokollok nem kivitelezhetők a klinikai gyakorlatban (pl. akut mesenterialis vagy myocardialis ischaemia előtt nem lehet használni, mert nem ételszerű). De az itt kapott eredmények fontos információkat adhatnak a gyógyszeresen védő, „kondicionáló hatás” kiváltásában (*Szijártó A. MTA Doktori értekezés 2015; pp. 8, 25-26.*). Ezzel szemben a hideg konzerválás után, de még a reperfüzió előtt alkalmazott IPC alkalmazható és kivitelezhető módszer lehet a betegellátásban (*Robertson et al. Transplant Int 2016;29:1147-54.*).

Az állatkísérletekkel kapott pozitív eredményeket követően az ischaemiás postkondicionálás (IPO) hatásosságát több mint 150 nagy klinikai metaanalízis vizsgálta, főként kardiológiai és szívsebészeti kórképeknél (coronária-, billentyűműtétek stb.) (*Lou et al. Oncotarget 2018;9:8089-99.*). Percután coronária angioplasztika során a ballon ciklusos felfújása és leengedésekor alkalmazva az IPO-t, 6 hónappal később a betegeknek szignifikánsan csökkent az infarktus területe, a kreatin-kináz és a troponin I felszabadulás, 1 évvel később 7%-kal magasabb volt a balkamra ejekciós frakciója a nem-IPO csoporthoz képest (*Thibault et al. Circulation 2008;117:1037-44.*). Emellett az IPO védő hatása igazolódott hasi aorta aneurysma elektív műtéteket követően (*Ali et al. Circulation 2007;116:98-105*) vagy akut ischaemiás stroke után (*Hougaard et al. Stroke 2014;45:159-67.*). Humán máj és veseátültetésekkor végzett IPC és IPO-nak is publikálták egyértelmű protektív hatását a betegek korai és késő graftfunkciói tekintetében (*Selzner et al. Transplant Rev 2012;26:115-24.*), de több tanulmány is volt, ami nem mutatott ki szignifikáns előnyöket.

A RIPC, amely a végtagok I/R-s ciklusaival idézhető elő, elsősorban szív- és érrendszeri védelmet nyújt a későbbi I/R-s károsodással szemben. Korai állatkísérletek megbízhatóan bizonyítják, hogy a RIPC csökkentette az infarktus méretét, és segítette a myocardium szöveti védelmében. Ezek a jótékony hatású adaptációs folyamatok azonban a nagy klinikai vizsgálatokban ellentmondásos eredményeket hoztak. Megállapították, hogy a kardioprotektív markerek, mint például a troponinkoncentráció és az infarktus mérete, valamint a funkcionális klinikai eredmények (pl. kardiovaszkuláris okok miatti halálozás, szívinfarktus vagy sztrók előfordulása, kórházi tartózkodás időtartama) nem javultak azoknál az egyéneknél, akik a műtét előtt RIPC-ben részesültek (*Hausenloy et al. New Eng J Med 2015;373:1408-17.; Meybohm et al. New Eng J Med 2015;373:1397-1407.; Rahman et al. Circulation 2010;122:553-9.*). De az érrendszer vonatkozásban is volt metaanalízis, ami nem mutatta ki az érműtét előtt alkalmazott RIPC előnyeit (*Stather et al. J Vasc Surg 2019;70:1353-63.*). Ezekben a vizsgálatokban azonban jellemzően közvetlenül a műtét előtt végezték a RIPC-t, és így lehet, hogy a RIPC-t követő kardiovaszkuláris védelem optimális időzítése nem volt megfelelő. A pozitív klinikai eredmények hiányának másik lehetséges magyarázata a műtét során alkalmazott altatószer volt. A legtöbb beteg propofolt kapott, amelyről kimutatták, hogy megszünteti a RIPC védő hatását (*Behmenburg et al. Anesthesia & Analgesia 2018;126:1377-80.; Kottenberg et al. Acta Anaesth Scand 2012;56:30-8.*). A propofol elnyomja a β -adrenoreceptorok válaszkészségét és megszakíthatja a neurogén útvonalat a védelem első ablakában. Ezek a negatív eredmények együttesen rávilágítanak arra, hogy több kontrollált humán vizsgálatra van szükség a mögöttes mechanizmusok és a RIPC hatékonyságát befolyásoló tényezők megállapítása érdekében.

A RIPC-sal kapcsolatos egyik első tanulmány kimutatta, hogy egy távoli szervben, például a vékonybélben vagy a vesében végzett rövid ischaemia és az azt követő reperfúzió is képes megvédeni a szívizmot az elhúzódó coronária occlúzió okozott visszafordíthatatlan károsodástól. Az a. mesenterica superior I/R-s ciklusai mind hipotermia, mind normotermia során védelmet eredményezett, míg a vese ischaemia általi védelem csak hipotermiás körülmények között volt nyilvánvaló. A rövid mesenterikus artériás okklúzió általi védelem mechanizmusa egy neurogén útvonalat érintett, amelynek aktiválásához a mesenterialis artéria reperfúziójára volt szükség (*Gho et al. Circulation 1996;94:2193-200.*). Tekintettel arra, ilyen témájú kutatásaink idején (1) a RIPC védelmi útvonalának fő célszervére a szívizom volt, illetve (2) a különböző vizsgálatok azt mutatták, hogy főként neurogén útvonalak játszanak szerepet a hatásmechanizmusban (*Jones et al. Circulation 2009;120:S1-9*) (mely egy denervált transzplantált bélnél klinikailag nem releváns), ezért a 2000-es évek elején RIPC-sal vagy perkondicionálással kapcsolatos kísérleteket munkacsoportunk nem végzett

Majd a 2015-ös vizsgálatok igazolták, hogy a neurogén útvonalak mellett a szisztémás gyulladásgátló válasz és a szisztémásan felszabaduló humorális mediátorok is szerepet

játszanak a RIPC szisztémás stimuláló hatásmechanizmusában (*Pickard et al. Basic Res Cardiol 2015;110:453*). Az első vizsgálatok után több mint 20 év telt el a RIPC metodika bélen történő állatkísérletes alkalmazásáig. Lázár professzor úr említette közlemény alapján valóban egy ígéretes módszerről lehet szó, melyet érdemes a továbbiakban kutatócsoportunknak is megvizsgálni (*Hummitzsch et al. J Transl Med 2019;17:136*).

Összességében egyrészt elmondható, hogy az aktuális klinikai tanulmányok azt jelzik, hogy a távoli szervek ischaemiája kardioprotektív hatású lehet. Így elképzelhető, hogy a hasi anginában vagy talán még az időszakos sántításban szenvedő betegeknél hosszabb időablak áll rendelkezésre a trombolitikus terápiára az ischaemiás szívizom megmentése érdekében (Jansen et al. Cochrane Database Syst Rev 2020;8:CD009638.).

Másrészt tudjuk, hogy -az elmúlt több, mint 35 év kísérletes és klinikai vizsgálatai és az állatkísérletek biztató eredményei után -általában- az ischaemiás vagy gyógyszeres kondicionálási vizsgálatok szerényebb klinikai sikert hoztak (Lang et al. J Physiol 2022;600:3053-67.). Ezeket a negatív tapasztalatokat ma az irodalomban annak tulajdonítják, hogy míg az állatkísérleteket fiatal, egészséges egyedeken végzik és a védelmi mechanizmusok jól aktiválhatók, addig a betegek idős kora és az alapterbetegséggel járó társbetegségek (magas vérnyomás, cukorbetegség, gyógyszerhatások stb.), valamint a szövődmények jelenléte miatt a humán eredmények szerényebbek. A követéses vizsgálatok számos olyan tényezőt azonosítottak, amelyek potenciálisan befolyásolhatják a humán kondicionálási metodikák hatékonyságát, mint például az életkor, a fittség, a gyakoriság, a beteg állapota és a gyógyszerekkel való kölcsönhatások. Így az ezekben rejlő klinikai lehetőségek kiaknázásához olyan humán kísérleti modellre lesz szükség, amelyben a zavaró tényezők hatékonyabban kontrollálhatók és a mögöttes mechanizmusok tovább tisztázhatók. Az említett anomáliák ellenére a közlemények továbbra is kulcsfontosságú preklinikai előrelépésként értékelik és translációs jelentőségűnek ítélik meg a kondicionálási kutatásokat (Heusch. J Am Coll Cardiol 2015;65:177-95.).

4. A bélfal izomrétegének – hagyományos szövettani vizsgálattal nem detektálható – változásait a bélfal szétválasztott rétegeinek DSC termoanalízise igazolta. Az izomfehérék esetében a hideg ischaemia okozta a legnagyobb szerkezeti változást. Ez az új megfigyelés milyen lehetőségeket biztosít a jövőben az I/R kutatásokban?

Válasz:

A bélfal izomrétegének feladata a béltartalom továbbítása, a perisztaltika fenntartása, mely ischaemia nélkül is le tud állni. Gondoljunk csak a minden sebész által ismert hasi műtétet követő rövidebb-hosszabb ideig tartó posztoperatív paralitikus jellegű passzáz zavarra, és a béltartalom következményes pangására.

Vizsgálatunkban meleg I/R esetén, kb. 3 óra meleg ischaemia után a serosa felől makroszkóposan is láthatóak az izmokat érintő fali bevérzések, az izomkárosodásokat a DSC görbék is pregnánsan jelezték. Az aktin és miozin izomfehérjék destruktív károsodását a denaturációs csúcsaik kontrollhoz képesti „eltolódása és egybeolvadása”, valamint a kalorimetriás entalpia növekedése mutatta. Irodalmi adatok jelzik, hogy a meleg I/R jelentősen megváltoztatja a bélmozgást. Ennek hátterében egyrészt (1) a myentericus plexusban a ganglionsejtek számának csökkenése, (2) az OFR-ek keletkezése, a (3) kalcium-homeosztázis zavara és (4) az aktivált gyulladáshoz vezető válaszreakciók állnak, melyek összességében fontos szerepet játszanak az izomkárosokban (*Bielefeldt et al. Dig Dis Sci 1997;42:878-84*). Ezzel szemben a 4°C-os hideg konzerválás alatt mindvégig megmaradt a kontrollizom mintában kimutatott 2 denaturációs hőmérséklet.

A DSC termoanalízisnél kb. 50 °C-nál detektálható első átmenet a miozinnak, míg az 59 °C-nál lévő az aktinnak tulajdonítható. A hideg konzerválás idejével párhuzamosan a miozin

átmeneti hőmérséklete kissé emelkedett, míg az aktiné enyhén csökkent, feltehetően az izomfehérjék közötti kölcsönhatások átrendeződése miatt láttuk ezt, de mindvégig jól elkülöníthető a két fehérje hozzájárulása, szemben azzal, hogy a meleg ischaemiánál 3 óra után már nem lehet elkülönülten azonosítani a destrukció miatt a fehérjéket.

Ezeket az eredményeinket megerősítették a doktori tézisek leadása után végzett és publikált vizsgálataink, ahol az izom DSC görbék összetevőit matematikai módszerrel történő felbontását követően, a dekonvolúció során 5-6 hozzájáruló görbét tudtunk azonosítani (T_{m1} és T_{m2} miozin fej, T_{m3} miozin rúd, T_{m4} és T_{m5} jellemzik az aktin filamentumot) (Ferencz et al. *J Therm Anal Calorim* 2023;148:831-6.).

Ezek az új megfigyelések egyrészt megerősítik a vékonybél hideg konzerválásának szükségességét mind a mucosa, mind az izomréteg védelme érdekében. Másrészt a normotermiás gépi perfúzió helyett –a már jelzett egyéb anomáliák miatt is- a bél hipotermikus és statikus prezervációja ajánlható ahhoz, hogy a transzplantációt követően az izomfehérjék kontraktilitása megőrződjön és a bélmotilitás helyre tudjon állni.

Lázár Professzor Úr bírálatában külön vette, a dolgozat másik jól elkülönülő részét, a DSC alkalmazását a humán daganatos és gyulladásos kórképek vizsgálatában. Tekintettel arra, hogy Professzor Úr ezekre a vizsgálatokra vonatkozóan nagyon hasonló kérdéseket tett fel, ezért engedje meg, hogy összevontan válaszoljak.

A kérdés lényege az volt, hogy ezeknél a tanulmányoknál homogén betegcsoportokat vizsgáltunk-e, illetve, hogy miért nem kerültek megadásra a betegek további adatai, a BMI, a társbetegségek, a genetikai eltérések, a tumoros anamnézis, továbbá a műtét után a DSC paraméterek?

Válasz:

A MM, az emlőtumor és a psoriasis vonatkozásában a klinikai beteganyag vérmintáin végzett termoanalitikai mérések komplex kutatások részei voltak. A megvédett PhD dolgozatoknak ezek az eredmények 1-1 fejezetét jelentették (<https://aok.pte.hu/docs/phd/file/dolgozatok>).

A 2008-ban induló vizsgálatainkat a Nicola Garbett és munkacsoportjának tanulmánya indította el, akik 2007-ben publikált közleményükben még 15 egészséges személy és 2 diabeteszes beteg szérum termogramjait (Garbett et al. *Semin Nephrol* 2007a;27:621-6), majd a 2008-ban írt közleményükben 8 endometriumos, 12 amyotrophic lateral sclerosisban szenvedő, 30 üdőtumoros, 4 Lyme-kóros, 2 systemás lupus erythematosus, 5 rheumatoid arthritises és 5 melanomás betegtől vett vérmintáknál írták le, hogy „Ezek az adatok arra utalnak, hogy minden egyes daganattípusnak vagy betegségnek lehet egy jellegzetes termogramja” („These data suggest that each type of cancer or disease may have a characteristic signature thermogram.”)

Vizsgálatainkban egyrészt szeretnénk volna detektálni a kontroll személyek plazma értékeit és ehhez hasonlítani egy -az említett 5 fős amerikai- nagyobb esetszámú, esetünkben 36 fős MM-ás betegcsoportot, illetve később ugyanezt tettük a többi betegségcsoportnál is. Összesen 181 betegen végeztük el a termoanalitikai méréseinket.

Professzor Úrnak igaza van abban, hogy ezeket az eredményeket tovább kell pontosítani és a betegeknek minél több alcsoportját képezni ahhoz, hogy az eredményeket még differenciáltabban tudjuk elemezni. Az itt említett esetszámok további alcsoportokra való szétválasztása önmagukban nem tették volna lehetővé a megfelelő statisztikai kiértékelést. Az elemzéseket magunk a „summázott” DSC görbe dekonvolúciós elemzésével próbáltuk feltárni szinte minden plazma eredményünk vonatkozásában.

Egyetértek azzal a megállapítással, hogy munkacsoportunk eddigi eredményei pilot vizsgálatokat jelentenek a témában és ezeket a vizsgálatokat kollaborációk során tovább kell folytatni. A diagnosztikai célú termoanalitikai kutatások jövőbeli célja lehet egyrészt a

mintavétel egyszerűsítése például a nyálból való meghatározással (Pultrone et al. PLOS ONE 2022;17:e0269600.). Másrészt a hatalmas mennyiségű adatot feldolgozni és összehasonlítani, elemezni képes szuperszámítógépek (gépi tanulás, mesterséges intelligencia) bevonására lesz szükség, melyre DSC vonatkozásában már van is adat (Li et al. Thermochim Acta 2022;708:179123.; Farah et al. Food Control 2021;121:107585.). A legújabb kutatások szerint két új gépi tanulási (maching learning: ML) megközelítést alkalmaztak már a kalorimetriai adatok elemzéséhez. A DeepSC modellt a klaszterezéshez használták, míg a DRN-modell megjósolta az elektronokra és fotonokra alkalmazandó energiakorrekciókat. A jövő feltehetően ezek kombinációja lesz (Simkina P. Instruments 2022:6:47.).

Végezetül ismételten köszönöm Professzor Úr jóindulatú és építő kritikáját, pozitív véleményét, és kérem, hogy válaszaimat fogadja el, támogassa számomra a MTA doktora cím elnyerését.

Budapest, 2023.10.16.



Dr. Ferencz Andrea