

Válasz Prof. Dr. Németh Norbert kérdéseire

Nagyon köszönöm, hogy Professzor Úr színvonalas munkának ítélte kutatásaimat és támogatja nyilvános vita kitűzését, az MTA doktora cím odaítélését. Köszönöm mindenre kiterjedő, alapos bírálatát és, hogy pontosnak és dicséretesen részletesnek tarja a módszertani leírást.

Kérdéseire adott válaszaimban hivatkozom a szakirodalom neves kutatóinak munkáira is.

1. A kísérletes munkában szereplő különböző állatfajok és az ember vonatkozásában az eredmények extrapolálhatósága hogyan fogalmazható meg? Ismert-e, lehet-e faji, nemi és korbelti különbséggel számolni a vizsgált paraméterek tekintetében?

Válasz:

Kísérletes sebészeti modellen dolgozva mindig fontos alapkérdés, melyet Német Professzor Úr is feltett, hogy milyen ezeknek az állatmodelleknek extrapolálhatósága a humán medicina felé. A kérdés megválaszolásában először is Bertók Lóránd professzort, az MTA doktorát és az MTA osztályközi Állatkísérletes Tudományos Bizottságának korábbi elnökének örökérvényű mondatát idézem: „Az életjelenségek végső soron, megbízhatóan csak élő szervezetekben tanulmányozhatók, ezért az élettudományok nem nélkülözhetik az állatkísérleteket.” Közismert továbbá, hogy az emberi egészséggel és betegségekkel kapcsolatos kutatások esetén sem nélkülözhetők az állatkísérletek. Az egyik legfontosabb és legnagyobb kihívást jelentő szakasról, a modellekről és azok megfelelő használatáról Russell és Burch már az 1960-as években írt a „A humánus kísérleti technika alapelvei” című alapműben (*WMS Russell, RL Burch. The principles of humane experimental technique. 1959, London, UK*).

William Russel zoológus és Rex Burch mikrobiológus korán hangsúlyozta a nagy hűségű (high fidelity) modellek (melyek az emberi tulajdonságok általános nagyfokú hasonlóságát reprodukálják) és a nagyfokú diszkriminációval (high discrimination) rendelkező modellek (melyek egy adott emberi tulajdonságban való nagyfokú megkülönböztetés) közötti különbségeket. Azzal érveltek, hogy egy nagyfokban diszkriminatív, de szerény hűségű modell hasznosabb, mint egy nagy hűségű, de rosszul diszkrimináló modell (*Balls M: The wisdom of Russell and Burch. 3. Fidelity and discrimination. Altern Lab Anim 2013;41:12-3.*). Ez főként a gyógyszeripari kutatásokban fontos, ahol például egy specifikus receptor, enzimútvonat vagy egy adott farmakológiai/toxikológiai mechanizmus a patkányban, kutyában vagy makákóban nem közelíti meg eléggé az emberi viszonyokat, és ekkor az állatmodellre való támaszkodás félrevezető és potenciálisan veszélyes lehet.

Tekintettel arra, hogy az általános élettani, biokémiai tulajdonságok emlősök esetében nagyobb valószínűséggel hasonlítanak az emberéhez, mint más élőlények (pl. más gerinces osztályok, fejlábúak stb) esetén, ezért az emlősök mindig a legjobb kiindulási modellek az alapvető orvosbiológiai kutatásokban. Természetesen annak ismeretében kell megtalálni a legmegfelelőbb állatfajt, hogy valójában egyetlen állatfaj sem képes minden szempontból helyettesíteni az embert, de egy-egy kérdésre megfelelő és elfogadható választ kaphatunk.

Jelen értekezésben különböző fajok (patkány, egér, kutya, sertés) esetén vizsgáltuk a bélátültetés módszertanát különböző ischaemia/reperfúziós (I/R), illetve autotranszplantációs modellekben. Az eredmények későbbi extrapolálhatóságának sine qua non-ja a jó modellválasztás. A modellek kiválasztásakor fontos szempont volt:

(1) az állatok elérhetősége, beszerzési és ezzel összefüggő pénzügyi szempontok. A kísérleteink elején még keverék kutyákat alkalmaztunk, melyek aneszteziológia, sebészeti szempontokból vagy méretük alapján megfelelőek voltak, de az “Az állatok védelméről és

kíméletéről” szóló 1998. XXVIII. törvény hatálybalépése után át kellett térnünk más fajokra. Ezért későbbi kísérleteinkben már a fő modellállat a patkány volt, de egéren és sertésen is dolgoztunk.

(2) Alapvető fontosságú az anatómiai hasonlóság és a műtéttechnikai megvalósíthatóság kérdése. Az általunk használt fajoknál a béltraktus vaszkularizációja, a bélfal makroszkópos felépítése is nagy hasonlóságot mutatott ezeknél a fajoknál egymáshoz képest, és a humán viszonyokat tekintve is. A dolgozat 2.6. ábráján mutattuk be a bélfal szerkezetének sematikus ábráját és megadtuk a bélfal egyes rétegvastagságának normál értékeit a különböző fajokban. Ezt összevetettük az irodalmi adatokkal, a pécsi kutatóhely korábbi eredményeivel, illetve saját kontrollvizsgálataink is alátámasztották a szövettani vizsgálatok későbbi extrapolálhatóságát. Természetesen a mért változásokat mindig az adott faj kontroll és áloperált értékeivel vetettük össze.

(3) Élettani paraméterek közül az artériás vérgáz értékek vizsgálatakor a nemzetközi irodalmi adatokkal összehasonlítva diszkutáltuk eredményeinket (*Aiken et al. J Clin Diag Res 2013;7:2038-41.; Berend K. N Engl J Med 2018;378:1419-28.*). Ezek összehangban voltak mind patkány (*Svorc et al. Physiol Res 2018;67:721-8.*), mind kutya esetén is (*de Morais. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2008;38:439-42.*), illetve jól összehasonlíthatók voltak egymással és a humán klinikai adatokkal mind meleg I/R-s (*Kougias et al. J Vasc Surg 2007;46:467-74; Brillantino et al. Eur J Trauma Emerg Surg 2018;44:265-72.*), mind vékonybél transzplantáció esetén is (*Nikoupour et al. Turk J Gastroenterol 2022;33:793-802.*).

(4) Klasszikusnak mondható kísérleti állatmodelljeink alacsony technológiájú, de magas hűségű szimulátoroknak tekinthetők, melyek követik és reagálnak a külső beavatkozó tevékenységére (*Berner-Juhos et al. Sebészet tankönyv és tudománytörténet, Szerk: Sándor József, Semmelweis Kiadó, Budapest, 2023;pp.628*). Például az a. mesenterica superior lezorítása után a különböző táplálkozású állatok közül a rágcsálók (patkány, egér), a ragadozó (kutya) és a mindenevő (sertés) esetén is nagyon hasonló makroszkópos, mikroszkópos és biokémiai változásokat detektáltunk a bélben és a vérben egyaránt. A vizsgált paraméterek tekintetében tehát faji eltéréseket nem találtunk.

Nemi eltérések régóta ismertek az I/R-al vagy oxidatív stresszel foglalkozó kutatók számára (*Brunelli et al. Current drug targets 2014;15:811-5.*). Tény, hogy minden ma élő emlős faj (így az ember) esetén a hímek élettartama rövidebb, mint a női egyedeké (*Bereczkei T. Evolúciós pszichológia. Osiris Kiadó, 2003, pp.238*). Ennek oka multifaktoriális, de a hormonális tényezők mellett a szabad gyökök generálta oxidatív stressz okozta betegségekkel és öregedési folyamatokkal is összefüggésben áll (*Pipoly et al. Nature 2015;527:91-94.*). Tekintettel arra, hogy ivarérett állatokat használtunk kísérleteinkben ezért a női nemi hormonok befolyásoló hatását kizárandó mindig hím állatokkal dolgoztunk. Miközben ismert, hogy a hormonális hatások is változnak az életkorral, azaz az oxidatív stresszt és a mitokondriális diszfunkciót befolyásoló hatásuk is eltérő. Mindez az ösztrogén antioxidáns hatásával magyarázható, ami alacsonyabb ROS termelést és a mitokondriális funkciók védelmét jelenti (*Allegra et al. Antioxidants 2023;12:1255*). Kutatócsoportunk életkorbeli különbségeket nem vizsgált, állatmodelljeink döntően fiatalabb egyedekből álltak. Általánosságban elmondható, hogy a kísérleti állatok esetén gyakrabban választanak hímeket, mivel a nőtények esetében feltételezik az eredmények nagyobb változékonyságát (*Beery et al. Neurosci Biobehav Rev., 2011;35:565-72*). Miközben egy napjainkban készült nagyobb tanulmány több mint kétszáz tulajdonságot vizsgált több ezer hím és nőtény egéren, és arra a következtetésre jutott, hogy sem a hímek, sem a nőtények összességében nem voltak variábilisabbak a másik nemnél (*Zajitschek et al. Elife 2020;9:e63170*).

Összességében kísérletes állatmodelljeink anatómiai-élettani szempontból és sebésztechnikailag jól megfeleltek a humán klinikai viszonyoknak. A kapott biokémiai, a szövettani és a molekuláris biológiai eredmények jól extrapolálhatók a humán kórállapotok felé.

2. A bemutatott kísérletek vonatkozásában számos helyen meglepően alacsony esetszámú csoportokat is kialakítottak (n=2, 3 vagy 4: 41.,48.,51.,53. és 56. oldalak). Miért került beállításra ez az elemszám? A kísérleteknél milyen módszerrel végezték a szükséges elemszám becslést?

Válasz:

n=3 állatból álló csoportok használatának oka:

A 4.1.2. Vékonybél meleg I/R modellt (41. oldal, 4.1. ábra) és a 4.5.2.1. Meleg I/R + iv PACAP38 kísérleteket (51. oldal, 4.12. ábra) Wistar patkányokon végeztük, ahol a kísérleti csoportok egyedszáma n=10 volt, mely statisztikailag jól értékelhető elemszámot jelent. Három állatból állt az áloperált csoport. Esetszámbecslést külön nem végeztünk. A kísérletek során azt a legkisebb állatszámot kívántuk felhasználni, amelyből statisztikailag releváns eredményt kaphatunk és tudományos következtetés vonható le. Tapasztalati úton tudtuk, hogy az áloperált állatok esetén is várható változás az általunk mért paraméterek tekintetében, de ezekben nincs jelentős szórás és kevesebb állatot is elég bevonnunk a mérésekbe. Az állatszám ilyen célú csökkentése alapvetően a 3R (Replacement, Refinement, Reduction) elvével is összhangban áll, melyet az Európai Unió 2010/63/EU irányelvében és a tagországok állatvédelmi törvényeiben is követendőnek adnak meg.

n=2 állatból álló csoport használatának oka:

A 4.4.2. Vékonybél ischaemiás poszt-kondicionálási műtéteket sertésmodellen végeztük, ahol az áloperált csoport és a kísérleti egyedek csoportjai is 2-2 állatból álltak (48. oldal). A béltraktus hossza lehetővé tette, hogy egy-egy műtéti fázisban több mintavételt is végezzünk 1-1 állatból, ami statisztikailag értékelhetőnek bizonyult. Az állatszám csökkentés mellett finansiális szempontokat is figyelembe kellett vennünk a nagyállatok felhasználása során.

n=3, n=4 és n=5 állatból álló csoportok használatának oka:

4.5.2.3. Meleg és hideg I/R-s PACAP^{+/+} vad típusú és PACAP^{-/-} génihiányos egereken (53., 54. és 56. oldal) végzett kísérletben használt alacsonyabb állatszámokkal nemcsak az áloperált csoportban kellett dolgoznunk, hanem a költséges vad típusú és génihiányos egereken is. Ezekben a kísérleti csoportokban is igyekeztünk több bélmintát venni a műtéti fázisokban, hogy eredményeinket relevánsan össze tudjuk hasonlítani.

Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy Wistar patkányok esetén az alacsonyabb állatszámokat főként az áloperált csoportokban alkalmaztuk. Míg (nagyfehér és a magyar lapály keresztezésével előállított) sertés valamint, PACAP^{+/+} vad típusú és PACAP^{-/-} génihiányos egerek vonatkozásában a kísérleti csoportok állatszámát is alacsonyabban kellett tartanunk. Ezek háttérben részben finansiális tényezők álltak, részben pedig a 3R elvből a Reduction-csökkentés elvének megvalósulását szolgálta.

3. A jelölt a dolgozatban Euro Collins és University of Wisconsin oldatban végzett statikus hideg perfúziót és konzerválást alkalmazott különböző fajok vékonybélén és megállapította, hogy a hideg konzerválás is okoz károsodásokat a szöveti szerkezetben. Mi a véleménye a normotermiás gépi perfúziós (normothermic machine perfusion: NMP) módszerről, melyet több szerv esetén is ígéretes megoldásnak írtak le? Van-e a NMP-nak, illetve az eljárásban művér alkalmazásának lehetősége és jelentősége vékonybél átültetés esetén?

Válasz:

Köszönöm ezt a rendkívül aktuális kérdést, mely az egyik „hot topic”-ja ma a transzplantációs kutatásoknak. A várólistákon lévő betegek növekvő halálozása és morbiditása miatt világszerte fokozódó szervigény jelentkezik, miközben a szervtranszplantációhoz való hozzáférés korlátozott. Ezért egyrészt gyakrabban kerül sor a kiterjesztett kritériumú donorok (extended criteria donors: ECD) használatára, másrészt a marginális szervek gépi perfúziója jelenthet megoldást a szervek allokációja során (*Badawy et al. J Invest Surg 2020;33:553-64.*).

Valójában egy régi technikának az újra gondolásáról van szó. Folkert O. Belzer, a UW oldat kidolgozója az 1960-as években már létrehozott egy vese számára alkalmas perfúziós készüléket, melyet sorozatos állatkísérletek után humán célokra is használtak. 1974 karácsonyán a San Franciscoból Leidenbe tartó repülőúton az első osztályon utazó perfúziós készülék hozta a vesét, ami 37 órás folyamatos hideg perfúziós konzerválás után került beültetésre a 42 éves holland férfiba, akiben 17 évig működött (*Tilney NL. Transplant. Yale University Press, London, 2003, pp.140.*). Ekkor még a gépi perfúzió számos hátránnyal járt a graftok számára, amit főként a szerv vaszkulaturájának károsodásában nyilvánult meg.

A 2010 után indult újra a májgraftok gépi perfúziójának kutatása és sikeres klinikai alkalmazása (*Eshmunov et al. Nat Biotechnol 2020;38:189-98.; Nasralla et al. Nature 2018;557:50-6.*) Általánosságban megállapították, hogy a hagyományos statikus hideg konzerválással szemben a normotermikus gépi perfúzió (Normothermic Machine Perfusion: NMP) csökkentheti a prezervációs károsodásokat, javíthatja a transzplantátum életképességét (*Shen et al. Front Bioeng Biotechnol. 2023;11:1072937.*).

A kérdésben szereplő művér alkalmazása részben valósul meg. Napjainkban három féle gépi perfúzió ismert a klinikai gyakorlatban. Az ex vivo NMP során a máj perfúziója oxigéndús vörösvértest-alapú perfúziós oldattal normál hőmérsékleten (35,5-37,5 °C) utánozza a fiziológias körülményeket. A perfuzátum tápanyagokkal, például aminosavakkal, vitaminokkal, szerves sókkal és glükózzal dúsítható, és a portális vénán és a májartérián keresztül különböző nyomásszintekkel pumpálják. A máj szubnormotermikus (20-25 °C) és hipotermikus (2-10 °C) gépi perfúziójához vörösvérsejtmentes, fizikailag oldott oxigénnel ellátott perfuzátumra van szükség, amelyet szintén a fő májereken (v. portae, a. hepatica propria) keresztül lehet bejuttatni.

A vékonybéltranszplantáció egyik világviszonylatban kiemelkedő sebésze, Kareem Abu-Elmagd és munkacsoportja a Cleveland-i Klinikáról 2017-ben számolt be először arról, hogy 10 sertés kivett vékonybélét átöblítették UW-oldattal, és 6-12 órán keresztül, 37 °C-os, 10-15 %-os HCT-értékű mosott sertés vörösvérsejt alapú kolloid oldattal perfundálták (*Transplantation 2017;101: S114.*). A perfúziós kör pulzáló szivattyúból, hőcserélőből, oxigenizátorból és szervmedencéből állt. Az átlagos artériás nyomás 80-100 Hgmm, az áramlás 0,010-0,014 liter/perc/kg volt. A lumenális tápláláshoz peptid alapú elemi tápoldatot használtak. Konklúzióként leírják, hogy az intestinális normotermikus ex-vivo perfúzió technikailag megvalósítható, de további kísérleti és jövőbeli klinikai vizsgálatokat javasolnak.

Abraham és munkacsoportja a New York-i Duke Egyetemről közölt összefoglalójában még 2022-ben is azt írta, hogy az NMP-t egy technikailag megvalósítható módszer teljes hosszúságú vékonybél allograft konzerválása során. A májperfúzióval összehasonlítva azonban úgy tűnik, hogy a bél esetén a termelődő laktát eliminálása, az ezzel összefüggő elektrolit- és sav-bázis egyensúly fenntartása, valamint a vaszkuláris áramlás biztosítása folyamatos vasodilatátor terápiát igényel (*Transplantation Direct 2022;8:e1390.*). Hasonló eredményekről számolt be Hamed is 2021-ben a Cambridge-i Egyetemről (*BJS Open 2021;zrab009*).

Összegezve a normotermiás gépi perfúziós technika egy a májtranszplantációban klinikai körülmények között már alkalmazott eljárás. Vékonybélgraftok esetében a NMP kezelés még kísérletes fázisban van, mert számos kérdés (laktát eliminálása, az elektrolit- és sav-bázis egyensúly kezelése, folyamatos dialízistámogatás és vasodilatátor terápia) megoldásra vár. Azaz a vékonybél graftok tárolásának jelenlegi standard konzerválási módja a statikus prezerváció.

4. A dolgozat 4. fejezetében, 8 modell esetében a bél szerkezeti károsodásait H&E festett metszeteken kvalitatív módon a Park-féle hisztológiai klasszifikáció kritériumrendszerének felhasználásával adták meg. Miért nem a Szerző által is említett, széles körben elterjedt Chiu-féle pontrendszert használták?

Válasz:

A bélfal I/R hatására bekövetkező szerkezeti károsodásának meghatározásához az 1970-es évektől több különböző osztályozási sémát dolgoztak ki. 2000-ben Quaedackers összefoglaló közleményében 15 ilyen említ, és összeveti a leggyakrabban használt Chiu-féle, Parks-féle, Park-féle és Sonnino-féle szövettani klasszifikációs rendszerek megbízhatóságát és reprezentativitását, valamint célul tűzte ki, hogy meghatározzanak egy lehetséges szabványos szövettani osztályozási rendszert (*Chiu et al. Arch Surg 1970;101:478-83.; Parks et al. Gastroenterol 1982;82:9-15.; Park et al. Crit Care Med 1992;20:135-9.; Sonnino et al. Transplant Proc 1992;24:1201-2.*). Megállapították, hogy ezek közül a Chiu-féle és a Park-féle a legjobb, de további vizsgálatokat irányoztak elő (*Quaedackers et al. Transplant Proc 2000;32:1307-10.*).

2010-ben Oltean és kollégája tanulmányában további kritikákat fogalmazott meg a Chiu/Park-féle pontozási rendszerrel kapcsolatban (*Oltean et al. Intensive Care Med 2010;36:1095.*). A módosított rendszer szerintük az eredeti pontszámhoz képest jelentősen túlbecsüli a morfológiai változásokat. Valójában több esetben összevonhatók az egyes fokozatok: pl. az 1-3 közötti tartományát az eredeti Chiu/Park 1-es osztályzat öleli fel; a 3-5-ös osztályzat a Chiu/Park 2-esnek felel meg; a 6-8-as fokozatai megfelelnek a 4-esnek. Vagyis az egyes fokozatok nem különíthetők el tisztán, nem ítélték meg pontosan például a subepiteliális tér megemelkedése és annak mértéke. Munkacsoportunknak is hasonló tapasztalatai voltak a szövettani változások kiértékelésekor, ami abban nyilvánult meg, hogy míg a Park-féle rendszer grade 5 stádiumában csak a villusokra koncentrált, a kriptakárosodás megítélése kisebb hangsúlyt kap. Eredményeink szerint a I/R hatására a legjelentősebb változás a mucosa, azon belül a villusok hossza és a kripták mélysége területén tapasztalható. Az infarktus és annak kiterjedése (Park 6, 7, 8 stádium) nehezen megítélhető. Illetve a bélszerkezet szétesése sokkal jobban megadható az egyes rétegek és a teljes bélfal tekintetében. Ennek alapján valamennyi kísérletünkben a 2.2. táblázatban ismertetett Park-féle 5 fokozatú osztályozást alkalmaztuk.

Napjainkban a szövettani metszetek előállítása általában már automatizáltan történik, miközben a minta kiértékelése jelentős humán erőforrást igényel és a patológus-hisztológus objektív-szubjektív véleményét tartalmazza. Többek között ezért is végeztük el Scion Image software segítségével minden modellünkben a kvantitatív kiértékelést is. Természetesen ez utóbbit is még kutatócsoportunk nagy gyakorlattal rendelkező tagjai végezték. Feltehetően hamarosan a kiértékelés is automatizálódik és a Mestersége Intelligencia (MI) végzi majd. Valójában a jövő már itt van a bél szöveti diagnosztikájában is (*Diaconu et al. Diagnostics 2023;13:735.; Hou et al. Sci Rep 2022;12:3279.*).

Összefoglalóan elmondható, hogy az általunk konzekvensen alkalmazott Park-féle klasszifikáció 0-5-ig terjedő skáláján a vékonybél mucosa rétegre fókuszál, főként a bélbolyhokban és kriptákban bekövetkező károsodásokat értékeli. Az I/R vonatkozásában ez a legsérülékenyebb bélréteg, míg a submucosus területek vagy az izomrétegek károsodása nehezen ítélték meg a H&E festett metszeteken (még a Chiu-féle osztályozással is).

5. Mi tudható a PACAP jótékony hatásáról más ischaemia-reperfúziós folyamatokban és általában a szöveti regenerációban?

Válasz:

A PACAP egy multifunkcionális peptid, melynek elsőként idegrendszeri hatásait, neurotranszmitter, neuroprotektív, neurotrofikus és neuromodulátor szerepét mutatták ki. Az elmúlt 35 évben egyre több eredmény igazolta általános antiapoptotikus, vazodilatátor, antioxidáns, antiinflammatorikus, citoprotektív, anyagcserét és az endokrin rendszert befolyásoló kedvező hatásait a perifériás szervek szinte mindegyikében (*Vaudry et al. Pharmacol rev 2009;61:283-357.*; *Szabó et al. Cardiol Hung 2018;48:129-35.*; *Köves et al. Front Endocrinol 2020;11:88.*).

A PACAP kimutatását-azonosítását tekintve egy viszonylag későn felfedezett molekula, 1989-ben írta le Miyata és Arimura (*Miyata A et al. Biochem Biophys Res Commun 1989;164:567-74.*) és azóta számos vizsgálat igazolta, hogy evolúciós szempontból jól konzervált molekuláról van szó, melynek genetikai megjelenését több mint 700 millió évesre teszik (*Sherwood et al. Endocrine Reviews 2000;21:619-70.*). Első, birkákból való kimutatása óta több mint 16 gerinces fajnál igazolták jelenlétét (ember, patkány, sertés, egér, csirke, gyík, béka, lazac, stb). A PACAP aminosav sorrendjében vannak ugyan különbségek az egyes fajok között, de egészen alacsonyrendű gerinctelenekben is megtalálható és a humán PACAP-pal rendkívül nagy, általában 85% feletti a szekvenciahomológia. Antiapoptotikus és citoprotektív hatása univerzálisnak mondható szinte minden fajnál (*Reglődi et al. J Mol Neurosci 2012;48:482-92.*; *Reglődi et al. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide – PACAP, Springer: Switzerland; 2016. pp. 815-32.*).

A kérdésre válaszolva az első tanulmányok is globális és fokális agyi ischaemia során írták le neuroprotektív hatását (*Vaudry et al. Peptides 2005;26:2518-24.*; *Reglődi D. MTA Doktori értekezés 2009;pp.6-10,108,123.*). A 2000-es évek elejétől számos közlemény számol be in vitro sejttényészeteken, pl. cardiomyocytá (*Róth et al. Ann N Y Acad Sci. 2009;1163:512-6.*; *Gasz et al. Peptides 2006;27:87-94.*), endothelsejtek (*Rácz et al. Gen Comp Endocrinol 2007;153:115-23.*) vagy magas turnoverű bélhámsejtek (INT 407) (*Illés et al. Neuropeptides 2017;65:106-13.*) esetén igazolt védő hatásáról, illetve állatmodellekben végzett I/R-s károsodással szembeni antioxidáns és citoprotektív hatásáról (*Reglődi et al. J Headache Pain 2018;19:19*). Kísérleteinkhez hasonló patkánymodellben vizsgálták például a vese I/R-s károsodását 15, 30, 45, 60 és 75 percig tartó a. renális okklúzió után, mely korai elhalálozást és multifokális akut tubuláris atrófiát okozott. Kimutatták, hogy azoknál az állatoknál, melyek iv. 100 µg PACAP38-at kaptak az ischaemia előtt, csökkent a mortalitási ráta és az állatok enyhébb morfológiai változásokkal túlélték a vizsgálatokat (*Szakály et al. J Mol Neurosci 2008;36:89-96.*). De retina (*Rácz et al. Regul Pept 2006;137:20-6.*), a kornea ROS indukálta oxidatív károsodásakor (*Maugeri et al. Appl Sci 2022;12:3435.*), máj (*Ji et al. Hepatology 2013;57:1225-37.*), vagy vese ischaemiás állapotaiban (*Horváth et al. J Mol Neurosci 2010;42:411-8.*). A kardiovaszkuláris rendszer ischaemiás károsodásával szembeni prompt hatásait is kimutatták. Ezek a vizsgálatok a PACAP pozitív kronotrop, inotrop és dromotrop hatásait, valamint potens vazodilatátor szerepét igazolták (*Ascuitto et al. Cardiovasc Res 1996;Spec No:E153-9.*; *Clason et al. J Mol Neurosci 2016;59:309-16*; *Vamos et al. J Mol Neurosci 2014;54:535-42.*).

Összességében a PACAP I/R-s állapotokban létrejövő antioxidáns és általános citoprotektív hatásai elsősorban a G-proteinhez kapcsolt receptorokon, a specifikus PAC1 és a VPAC1/2 receptorokon keresztül létrejövő jelátviteli utakon, részben intracelluláris transzportja révén valósul meg. Egy evolúciós szempontból jól konzervált, ősi peptid, mely általánosságban javítja az ischaemiás toleranciát, de mindig figyelembe kell venni az I/R iránti érzékenység tekintetében a faji, szervi, nemi, vagy korcsoportbeli különbségeket is.

6. A PACAP dózisát, adagolási módját mi alapján határozták meg? A felszívódás dinamikája, a lokális és a szisztémás hatások miként értékelhetőek?

Válasz:

1998-ben Hannibal és munkatársai mérték meg elsőként az endogén PACAP38, PACAP27 és PACAP-szerű peptidok szintjét a gastrointestinalis traktusban. A PACAP38 immunreaktivitása volt a legmagasabb és azt is a vékonybélben, a jejunum és terminális ileum területén mérték, kb. 9 pmol/gramm nedves szövet a koncentrációja (*Hannibal et al. Cell Tissue Res 1998;291:65-79.*). Ezek ismeretében és a pécsi PACAP munkacsoport korábbi eredményei alapján kalkuláltuk az exogén PACAP38 dózisát (*Szakály et al. J Mol Neurosci 2008;36:89-96.*). A Meleg I/R + iv PACAP38-al kezelt patkánykísérletben a 3 órás reperfüzió alatt iv. infúziós pumpával 1 ml/h sebességgel fizioológias sóoldatban oldott PACAP38 infúziót (20 nmol/ttkg bolusban, majd 160 pmol/ml/óra) adtuk. A Hideg konzerválás UW és UW+ PACAP38 oldatban patkányokon kísérletben 30 µg PACAP38-at tettünk 30 ml UW-ba, vagy 100 µg PACAP38 100 ml UW oldatba, azaz minden esetben 1 µg/ml koncentrációt alkalmaztunk.

A PACAP széles körben igazolt citoprotektív hatása miatt felmerült a kérdés a molekula prognosztikai v. diagnosztikai markerként, illetve terápiás célokra való alkalmazhatósága tekintetében. Jelenleg a molekula kémia tulajdonságai még nem teszik lehetővé direkt klinikai alkalmazhatóságát. A legtöbb természetes peptidhez hasonlóan a PACAP is gyorsan lebomlik a perifériás keringésben. Intravénás adása után a dipeptidil-peptidáz IV (DPPIV) révén féléletideje a humán plazmában 2-10 perc. Ezért jelenleg is intenzív kutatások folynak a molekula célzott kémiai módosítása és/vagy konjugációs makromolekuláris forma létrehozása terén, hogy javítani lehessen farmakokinetikai és farmakológiai tulajdonságait.

A PACAP olyan sejtek esetén fejt ki hatását, ahol specifikus receptora van. Emlősök minden szervében leírták a peptidcsalád valamely receptorát. Humán vizsgálatok kimutatták, hogy a VPAC1-receptor szinte minden szövetben megtalálható, míg a VPAC2-receptor erekben és simaizomban fordul elő. Kanadai és francia kutatók kimutatták, hogy a PACAP nemcsak receptor által közvetített módon, hanem endocitózissal és macropinocitózissal is képes belépni sejtbe és a sejtmagban lévő receptorhoz kötődni. A bejutott PACAP38 molekula nem bomlik le teljesen, hanem egy része ki is tud jutni a sejtből (*Doan et al. Biochim Biophys Acta 2012;1823:940-9.; Heinzlmann et al. Orv Hetil 2023;164:1300-10.*).

Legújabb eredmények szerint az a. cerebri media okklúziót követően kialakult agyi károsodás esetén az intranasalis adott PACAP neuroprotektív hatású volt. Az intraperitonealis adásnak nem volt hatása, de az intravénás 30%-kal, az intranasalis pedig 60%-kal csökkentette az infarktus mértékét (*Cherail et al. Front Endocrinol 2021;11:585082*). Az intranasalis adagolás hatékonyságának oka, hogy a vérben lévő DPPIV bontó hatása megkerülhető.

Összességében az állatmodellekben végzett számos sikeres kutatás ellenére a humán viszonyok között alkalmazható, hatékony PACAP-terápia bevezetése reménykeltő, de még várat magára.

7. A villus/cripta arány meghatározása egzakt értéket ad a bélfal hisztológiai kiértékelése során. A bélfal károsodás megelőzésére vagy kivédésére alkalmazott metodikák (pl. prekondicionálás, poszt kondicionálás, PACAP, stb) közül melyik adta a leginkább megfelelő védelmet, ha ezt a paramétert nézzük?

Válasz:

A villus/kripta (V/K) hányados kontrollértékének vonatkozásában voltak faji eltérések. Patkány: 2,55; kutya: 1,86; sertés: 3,5; egér 3,4; PACAP KO egér 3,48 volt. Ezt úgy számítottuk ki, hogy a teljes mukóza vastagságából kivontuk a kripták mélységét, ezzel megkaptuk a villusok magasságát μm -ben (lásd 2.6. ábra). Majd a villusok μm -ben mért magasságát elosztottuk a kripták μm -ben mért mélységével.

A bélfal szerkezetében bekövetkező károsodások első áldozata a villusok, melyet minden osztályozási rendszer elsőként és alapvetően vizsgál. Így a Park-féle klasszifikáció is megerősíti, azaz a villusok károsodása már az 1. fokozatban is kimutatható. A 2. stádiumban jelenik meg enyhe kriptakárosodás, mely a 3. fokozatú károsodásban teljeseedik ki. Ezek alapján elsőként mindig a kontrollhoz mért villuskárosodást kell nézni. Például valamennyi kísérleti csoportból a 6. órás meleg I/R-s csoportban (pl. 4.1., 5.4, 5.22, 4.3 csoport) jelentkezett a legnagyobb károsodás. Ebből is legrosszabb a 4.1. csoportban bizonyult, ahol a kontrollhoz képest csak 20%-ban marad meg a villusok magassága, míg a kriptamélység 70%-ban megőrződött a kontrollhoz viszonyítva, így kaptuk a V/K arányt 0,05-re. A kezeletlen csoportok közül a legjobb eredményeket az 1. órás UW-ban (pl. 5.9 és 4.7 csoport) tárolt graftok V/K aránya adta.

Ha csak a V/K arányt, mint paramétert tekintjük, akkor a legjobb eredményeket a meleg I/R-s csoportoknál az 1 órás meleg I/R-s csoportban az iv. PACAP-ot kapó graftok voltak (5.5. csoport). A hidegen tárolt bélminták esetén a PACAP38-nak a UW-oldathoz adása jelentette a bél számára (5.13., 5.14 csoportok). Mindezeket a vad típusú PACAP⁺⁺ állatokban kapott meleg és hideg I/R-ös eredmények is megerősítették (5.17, 5.23, 5.24 csoportok). A V/K arány alakulására második legjobb hatással az ischaemiás poszt kondicionálás bizonyult, mind az 1 órás UW konzerválás (4.10), mind az 1 órás meleg ischaemia után (4.4). A V/K arányt tekintve a legkisebb védő hatást a kezelések közül az IPC fejtette ki kísérleti elrendezéseinkben.

8. Az 5.6. fejezetben ismertetett kísérletes ischaemia-reperfüziós modellben a differenciál pásztázó kalorimetriás (DSC) vizsgálatok eredményeit bemutató fejezet adatai felvetik azt a kérdést, hogy vajon miért csökkenhetett a kalorimetriás entalpia három órás meleg ischaemia után a teljes bél vonatkozásában. Hat órás meleg ischaemiában ez nőtt, hat órás hideg ischaemiában csökkent (5.53. és 5.56. ábra; 5.4. és 5.5. táblázat). Hogyan oldható fel ez az ellentmondás?

Válasz:

A kalorimetriás entalpia 3 órás meleg ischaemia után csökkent, 6 órás meleg ischaemiában ez nőtt, míg 6 órás hideg ischaemiában csökkent. Nincs ellentmondás a leírt változás tekintetében. Ennek magyarázata a következő. DSC mérés során a befektetett energia a hőmérséklet változtatása mellett szerkezeti változásokra fordítódik (denaturáció). Három órás meleg ischaemia során még van ép szövet- kevesebb a szöveti destrukció, így nagyobb az az elnyelt energia, ami a fehérjék denaturációjára fordítódik. Ezzel szemben a 6 órás meleg ischaemiát követően közel teljes szöveti destrukció észlelhető, így a befektetett energia már nem szerkezetátalakulásra fordítódik (hanem csak az átalakult új szerkezet hőmérsékletének növelésére). Hat órás hideg ischaemia során a szöveti struktúra lazább lehet, így a szerkezet átalakulásokra kevesebb

energia kell, így csökkent az entalpia. Termoanalitikai eredmények így visszaigazolták a hisztológiai eredményeket, mely szerint a bélben 3 óra meleg ischaemia után hasonló a strukturális károsodás mértéke, mint 6 órás hideg konzerválás után.

Összességében ezek a kalorimetriás eredmények számos kísérleti és klinikai megfigyeléssel korreláltak az irodalomban, nevezetesen, hogy a meleg ischaemia mértékének és időtartamának növekedésével morfológiailag kimutathatóbb sérülés következik be a teljes bélfalban, főként a nyálkahártya területén. A meleg csoportokhoz hasonlóan a hideg ischaemia hatásai is megfigyelhetőek voltak az összetett szerkezetből adódó termikus karakterek a teljes bélfal esetében (Kalogeris et al. Compr Physiol 2017;7:113-70; Strand-Amundsen et al. World J Gastroenterol 2018;24:2009-23.). A vizsgálatból levont legfontosabb következtetésünk az volt, hogy bár a hagyományos szövettani módszerek a bélfalsérülés súlyosságának értékelésére alkalmas és széles körben elterjedt módszerek, de a DSC mérések határozottan megerősítették, hogy a vékonybél ischaemiás szerkezeti károsodásai minden rétegben konzekvensen kimutathatók.

9. A különböző betegségekben, tumorokban a DSC vizsgálat közös nevezője miként fogalmazható meg? Tehető-e ajánlás erre a vizsgálatra vonatkozóan? Az akut fázis proteinek, a fibrinogén vagy más markerek tekintetében mennyivel mond többet ez a vizsgálat összevetve így a „klasszikus” laboratóriumi paraméterek analízisével?

Válasz:

Az emberi vérplazma proteomja egy összetett folyadék, amely több mint 3000 egyedi fehérjét és peptidet tartalmaz, amelyek mennyisége pikogrammtól több tíz milligrammig terjed milliliterenként (Garbett et al. Biophys J 2008;94:1377-83.; Anderson et al. Mol Cell Proteomics 2007;1:845-67.). A vérminták közismert rutinlaboratóriumi mérései (mint az említett akut fázis fehérjék, fibrinogén, más markerek) esetén döntően mennyiségi mérések történnek. Az orvosi diagnosztikában elterjedt szérum/plazma-elektroforézis és számos immunkémiai vizsgálat a plazma/szérum specifikus fehérjéinek koncentrációját adja meg. Az elektroforézis és a tömegspektrometria a fehérjék mérete és töltése alapján választja szét a plazmát.

A plazmafehérjék tömegének 90%-át 10 fehérje teszi ki. Mennyiségi sorrendben ezek az albumin, IgG, fibrinogén, transferrin, IgA, α 2-macroglobulin, α 1-antitripszin, komplement C3, IgM és haptoglobin. További 12 fehérje a plazmatömeg további 9 %-át teszi ki, ezek közül a három leggyakoribb az A1 és B apolipoprotein, valamint az α 1-sav glikoprotein, így a plazma tömegének 99%-át 22-féle fehérje alkotja, ami nagy kihívássá teszi a fennmaradó 1% frakcionálását és mennyiségi meghatározását. A plazma kis molekulatömegű régiója, amelyet peptidomnak neveznek a diagnosztikai információk potenciális forrása lehet. A kutatóknak nehézséget jelent egyelőre az a tény, hogy a peptidom számos összetevője, a potenciális biomarkerek is komplexet alkotnak a nagyobb mennyiségben előforduló plazmafehérjékkel, melyet összességében interaktomnak definiálnak (Garbett et al. Semin Nephrol 2007;27:621-6.).

Több közlemény megerősítette és munkacsoportunk is leírta, hogy a plazmát alkotó fehérjék DSC vizsgálata valójában nem a human plazma proteom mennyiségi változásait detektálja, hanem itt elsősorban molekuláris kölcsönhatások jelenlétét, ezek erős vagy gyenge voltát, vagy éppen felszakadását, a kovalens kötések módosulásait lehet detektálni (Garbett et al. PLoS One 2014;9:e84710.; Garbett et al. Semin Nephrol 2007;27:621-6.; Todinova et al. Anal Chem 2011;83:7992-8.; Fekecs et al. J Therm Anal Calorim 2012;108:149-52.).

Hipotézisünk szerint a különböző betegségekkor a szervezetben keringő vér-összetételének is különböznie kell. Azaz a plazmafehérjék és peptidek fizikai tulajdonságain és interakcióján alapuló vizsgálatok, mint a differenciális pásztázó kalorimetriai mérések fontos előrelépést hozhatnak a plazma proteom és interaktom kutatásában.

Engedje meg tisztelt Professor Úr, hogy reflektáljak a bírálatában leírt „**Formai értékelésként az alábbi összegző gondolatok, észrevételek fogalmazódtak meg**”:

1. A disszertáció szerkesztése és kivitelezése igényes, stílusa egységes. Meg kell azonban említeni, hogy összességében kissé terjedelmes műről van szó. Itt-ott talán túl bőszavú is és nem mindig egy doktori értekezésben megszokott megjegyzések és információk is olvashatóak (pl. élethelyzetek, munkahelyek, vagy bizonyos körülményekre való utalások formájában).

Válasz:

Valóban a tudományos tartalom mellett talán több a személyes hangvételi rész, mint más doktori művekben. Az íráskor úgy gondoltam, hogy a teljességhez ezek is hozzátartoznak, illetve az olvasó így jobban megérti kutatásaink és eredményeink helyét és fontosságát.

2. Az értekezésben keveredik a magyaros és latinos írásmód, sokszor nem következetes módon.

Válasz:

Köszönöm az észrevételt. Törekvésem ellenére valóban maradtak a műben ilyen hibák.

3. A terjedelmes munka ellenére a gépelési hibák száma elhanyagolható.

Válasz:

Köszönöm az észrevételt és valóban a helyesírásellenőrzés többszöri átfuttatása ellenére is maradtak ilyen jellegű hibák.

4. Az irodalmi áttekintés részben több ábránál hiányzik a forrás megjelölése.

Válasz:

A dolgozat Rövidítések jegyzék rész végén, a 8. oldalon az alábbi szöveggel jeleztem a forrásmegjelölést „Az Internet szabad hozzáférésű ábráinak, fotóinak részleges felhasználásával, vagy egyes ábrák magyarra fordított változata közül az alábbiak szerepelnek az értekezésben: ...” és itt felsorolásra kerül a 8 db ábra a referenciák megadásával. A Bírálónak természetesen igaza van, mert az ábráknál nincs erre ismételt hivatkozás és valóban jeleznem, visszautalnom kellett volna erre a forrásmegjelölésre.

5. A klinikai résznél a lokalizáció, a méret, a klinikai kép és a társbetegségekre utaló információk hiányoznak. Érdeemes lett volna ezeket megjeleníteni.

Válasz:

Köszönöm Professor Úr megjegyzését, mely összecseng Lázár Professor Úr kérdésvetéseivel is. Ahogy ezt Lázár Professor Úr bírálatára adott válaszomban is jeleztem, a fő ok amiért csak a legalapvetőbb betegadatokat (nem, kor, diagnózis, vagy operálhatóság, stb.) vettük figyelembe vizsgálatainknál az az volt, hogy először meg kellett mérnünk, hogy van-e egyáltalán eltérés a kontroll és az ismertetett betegcsoportok DSC eredményi között. Az első vizsgálatokat 2008-ban kezdtük, ekkor kértünk engedélyt a melanomás betegek és 2009-ben az emlődaganatos betegek vizsgálataihoz. Azt, hogy ezt a kérdéskört két bíráló is felvetette jelzi számunkra, hogy valóban fontos feladatunk lesz a jövőben az adatok részletesebb feldolgozása a klinikai adatok alaposabb ismeretében és ezek alapján kell értékelni, újraértékelni az eredményeket, illetve az egyes további csoportokban a betegszámokat növelve statisztikailag értékelhető esetszámot feldolgozni. A témában megjelent két első publikációt együttesen eddig már több mint 100 független közleményben idézték, ezért kérem, tekintsen el ettől a hiányosságtól.

6. További megjegyzésként fogalmazható meg, hogy az eredményeknél a szövettani ábrák kevésbé látványosak, lehetnek volna nagyobbak (5.2., 5.6., 5.15., 5.19., 5.24., 5.29., 5.32., 5.34, stb. ábrák).

Válasz:

Köszönöm a Bíráló kritikai megjegyzését, mellyel természetesen teljes mértékben egyetértek. Tény, hogy a nyomtatott formában kisméretűek ezek az ábrák, nehezebben láthatóak a részletek. Mentségül szolgáljon, hogy az olvasók számára digitálisan is elérhető dolgozat pdf file formájában, ahol 400%-ra növelve már képernyőnyi méretű lesz 1-1 kép, miközben még élesen láthatók a részletek. A másik ok, amiért úgy gondoltam, hogy nem növelem az egyes szövettani képek méretét az az volt, hogy a legfontosabb eredményt, amit ezek a képek mutatni akarnak, azaz az egyes rétegek méretét Scion Image kvantitatív módszerrel lemértünk és grafikusán ábrázoltuk (5.3., 5.7., 5.15., 5.20., 5.25., 5.30., 5.33., 5.35. ábrák), sőt a bélfal leginkább vizsgálni kívánt mukozális részét, a villus/kripta (V/K) hányadost is vizsgálatonként igyekeztünk megadni (5.4., 5.8. 5.16., 5.21., 5.26., 5.31. ábrák).

7. Általában az ábrák feliratai, jelölései (szignifikancia) aprók, kevésbé látszik minden megfelelően.

Válasz:

Köszönöm a kritikai észrevételt.

Végezetül kérem válaszaim elfogadását és ismételten szeretném megköszönni Professzor Úr részletekbe menő jóindulatú és további munkámhoz építő jellegű bírálatát, valamint elismerő szavait és támogatását az MTA doktora cím elnyerésére.

Budapest, 2023. 10. 16.



Dr. Ferencz Andrea