



SEMMELWEIS EGYETEM
Transzlációs Medicina Intézet

egyetemi tanár, igazgató
Dr. Benyó Zoltán

Opponensi vélemény

Dr. Ferencz Andrea „A vékonybél autotranszplantáció kísérletes vizsgálata és különböző klinikai kórállapotok termoanalitikai monitorozása” című MTA doktori értekezéséről

Az akút mesenterialis ischaemia nem szerepel a halálteki statisztikák élén, - de ez a körülmény a szinte elviselhetetlen fájdalomtól szenvedő betegeket nem érdekli. Az orvos is bajban van, akitől a hasi görcsöktől kínzott beteg az azonnali segítséget várja. Túlságosan szegényes ugyanis a gyors diagnosztikai eszköztár: az anamnézisen és tapasztalatain kívül csak a beteg vérmintájának súlyos és egyre fokozódó metabolikus acidózisára támaszkodhat. Mire az ultrahang, vagy CT vizsgálatra sor kerül, sokszor már késő. Ugyanakkor a terápiás lehetőségek is szerények: enterális és parenterális táplálás, bélhosszabbító operáció vagy a vékonybél allotranszplantációs műtéte, amelyhez mindig kevés a donor.

A bélischaemia nagy százalékban halálos betegség. A bélátültetés a szív-, vese, tüdő, májátültetések sikeres elterjedéséhez viszonyítva mintha a szervátültetések „mostohagyereke” lenne. Ezért azok a kísérletek, amelyek a bélischaemia pathomechanizmusának lehető legpontosabb ismeretére, az állapot gyors, egyszerű diagnosztizálására, új therápiás lehetőségek felismerésére és a béltranszplantáció nehézségeinek leküzdésére irányulnak fontosak és több, mint időszerűek. Dr. Ferencz Andrea doktori disszertációja, melyben húsz éve folyó ilyen irányú kísérleteinek legfontosabb eredményeit foglalta össze ezek közé tartozik, különösen ha figyelembe vesszük, hogy hazánkban jelenleg ezen kívül béltranszplantáció témában más állatkísérletes kutatás nem folyik.

A disszertáció két alapvető, a klinikai gyakorlattal kapcsolatos, de egymástól teljesen független kutatási témakört foglal össze. Az **első rész** kísérletes vékonybél autotranszplantációs modellekben vizsgálja az ischaemia, illetve az azt követő reperfúzió (I/R) károsító hatásait és ezek kivédési lehetőségeit. Szerencsés felismerés a szerző részéről, hogy önmagának az ischaemiának a vizsgálata a reperfusios következmények vizsgálata nélkül jelentősen csökkentette volna kutatásainak értékét. *Kutatásainak célja egyrészt az oxidatív stressz paraméterek, az apoptózis jelátviteli útjainak, az ischaemiás pre- és poszt kondicionálásnak, valamint a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) oxidatív stresszre gyakorolt hatásainak vizsgálata* meleg I/R autotranszplantációs modellben (ez az art.mesenterica superior leztorítását jelenti in situ bélen) és hideg konzerválási és autotranszplantációs modellben (ami vékonybél resectiot és a mesenterica superior-on keresztüli perfusiot, a resectált bél megfelelő

oldatban való tárolását, majd visszaültetését és az art. és vén. mes. sup. anastomosisát jelentette). Az értekezés **második része** melanomás, emlőtumoros, pancreas daganatos, illetve pancreatitis és psoriasisos betegek vérplazmájának *differentiál pászta* *kalorimetriás* (DSC) módszerrel végzett analízisének eredményeit ismerteti. Ennek a résznek célja a DSC-nek, mint termoanalitikai módszernek tesztelése: alkalmas diagnosztikai eszköz-e a DSC a felsorolt betegségek identifikálására, súlyosságukkal, gyógyszeres, vagy műtéti kezelésük eredményességével való összefüggések kimutatására. (Az értekezés első és második részét elvileg összeköthetné az a körülmény, hogy a DSC módszer az első rész ischaemiás/reperfúziós kísérleteiben is felhasználásra került, de ezt a tény a szerző - nagyon helyesen - nem használta fel a két témakör erőltetett összekapcsolására).

A kísérletek hat célkitűzése az autotranszplantációs témakörre, hetedik célkitűzése a DSC metodikai használhatóságának tisztázására vonatkozik. Az egyes témakörökkel kapcsolatos kérdések világosak és lényegesek. Az alkalmazott műtétek és vizsgáló módszerek széles spektruma (biokémiai, szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok, vérgáz analízis, radioimmúnassay, kemiluminescens citokin array, luminex multiplex immunoassay) imponáló, a klinikai és kísérletes orvostudomány ma használatos legmodernebb módszerei. Külön elismerést érdemelnek az adatelemzésre használt módszerek, pl. a morfológiai változások kvalitatív, Park féle klasszifikációján kívül a bélfal egyes rétegeiben történt változások Scion Image softverrel történő kvantitatív számszerűsítése és a villusmagasság/kriptamélység arány meghatározása, a sav-bázis paraméterek számadatain kívül Siggaard-Anderson nomogrammon való bemutatása, vagy a DSC módszer fő termikus görbéinek dekonvolálásával elválasztható komponensek kimutatása. Látható, hogy az értekezés szerzője a kísérleti adatokból nyerhető reális következtetések maximumára törekszik. Törekvései következményeként a célkitűzésekben felvetett valamennyi kérdésre jól prezentált, biometriailag biztosnak tekinthető új adatokat szolgáltató válaszok születtek, kivéve a nagy tapasztalattal tervezett és magas színvonalon kivitelezett, de túl alacsony állatszámú posztkondicionálási kísérletek adatait.

Egyértelmű, hogy a vékonybél 1, 2, 3 és 6 órás meleg ischaemia/reperfúziós modelljében az ischaemiás időszak időtartamával arányosan fokozódott az oxidatív stressz: szignifikánsan emelkedett az MDA szöveti koncentrációja, drámaian csökkent a bél szöveti scavenger GSH és endogén antioxidáns SOD aktivitása és folyamatosan súlyosbodó metabolikus acidózis alakult ki. A bélfal szerkezetében ezzel párhuzamosan egyre súlyosabb a mucosa, submucosa és a kripták károsodása, a villusok 1 órás ischaemia után kezdődő, kis mértékű leválásától kezdve a 6 órás ischaemia végére a teljes bélstruktúra széteséséig.

Az értekezésben ismertetett adatok arra utalnak, hogy az ischaemiás pre- és posztkondicionálás hatására a vékonybél oxidatív statusa és morfológiai képe egyaránt kevésbé károsodott, mint a pre- vagy posztkondicionálás nélküli állatoké. A prekondicionálás hatásait 40 kutyán 5 csoportban csoportonként 8 állaton, valamint 45 patkányon, 9 csoportban, csoportonként 5 állaton vizsgálták. A posztkondicionálás hatásait viszont 26 sertésen, 7 csoportban, csoportonként csak 2 állaton vizsgálták. (Nem világos, hogy akkor hogy lett a megadott teljes állatszám 26?) Az értekezés szövege szerint: „Az állatfelhasználás optimalizálása érdekében minden állattól a mintavételeknél 4-4 mintát vettünk, hogy az eredmények statisztikailag értékelhetők legyenek”. Ez azt jelenti, hogy minden csoportban 8 adat származik 2 sertéstől,

ahelyett, hogy állatonként egy-egy adatból számítanák az eredményeket. Ez véleményem szerint nem teszi lehetővé, hogy ennek a vizsgálatnak az eredményeit reálisnak tekintsük. Ezen az alapon – ad absurdum – az is megtehető lenne, hogy 1 sertés képezzen egy önálló csoportot, minden állatból 8 minta vételével.

Az értekezésnek két fejezete - a bennük rejlő potenciális diagnosztikai és terápiás lehetőségek miatt - különösen figyelemre méltó. Az egyik az, amelyben a szerző egy neurointesztinális peptid, a PACAP szerepét vizsgálta, mely jelen van a teljes gasztrointesztinális traktusban, legnagyobb mennyiségben a vékonybélben. Meleg ischaemia/reperfuzios modelljében kimutatta, hogy I/R hatására szignifikánsan csökkent a vékonybél endogén PACAP38 immunoreaktivitása. Ha a reperfúzió során PACAP38-at adtak, javult a bél (MDA, GSH, SOD aktivitás meghatározásával mérhető) antioxidáns státusza és javultak hisztológiai paraméterei. A resectált, hidegen konzervált majd autotranszplantált bélben a tárolási idővel arányosan csökkent a szöveti PACAP 38 és PACAP27 aktivitás. A konzerválási oldathoz adott „exogén” PACAP38 hatására nőtt a bél PACAP38 és PACAP27 aktivitása, csökkent a bél antioxidáns státusza és kisebb szöveti károsodás alakult ki. Ebben a kísérlet sorozatban azt is kimutatták, hogy az UW konzerválási oldathoz adott PACAP38 a jelátviteli kinázok közül az ERK1/2 foszforilációs szintjét növelte, a pro-apoptotikus JNK és p38MAPK foszforilációs szintjét csökkentette és a gyulladáshoz közlő citokinek közül az sICAM-1, L-Selectin és TIMP-1 expresszióját szignifikánsan csökkentette. Meleg I/R modellben bizonyították, hogy PACAP génhiányos egerekben I/R hatására nagyobb oxidatív stressz és szöveti károsodás alakult ki, mint a PACAP vad típusú egerekben.

Az értekezés másik, különösen figyelemre méltó fejezete az, amelyben a DSC módszer diagnosztikus eszközként való felhasználásának lehetőségét vizsgálja. Ezen kísérletek legfontosabb eredménye az, hogy a lokális daganatok következetesen korai eltérést okozhatnak a plazma fehérjeösszetételében és ezek a változások kimutathatók a DSC görbék dekonvolúciójával. Az ismertetett kísérletek eredményei szerint a DSC segítségével a bélszövetben azok az I/R okozta finom szerkezeti változások (főleg az izomkárosodások) is kimutathatók, melyeket H/E festett metszeteken nem tudtak detektálni. A szerzőnek a DSC módszerrel az irodalomban elsőként sikerült kimutatni melanoma malignum, emlőtumoros, pancreas daganatos, valamint pancreatitis és psoriasisos betegek vérplazmájából, hogy ezekben egyediek, de a betegségekre jellemzőek a DSC-görbék termikus paraméterei és karakterisztikájuk összefüggést mutat a betegség súlyosságával, előrehaladottságával, vagy a kezelésre adott válasszal. Ezért nem zárható ki, hogy a DSC-görbék további dekonvolúciós analízise a klinikai gyakorlatban lehetővé teszi a vizsgált daganat típusok vérmintából történő korai diagnosztizálását, a betegség alakulásának monitorozását, a terápia hatékonyságának megítélését.

Az értekezés egésze minden szempontból megfelel az MTA doktori értekezésekkel szemben támasztott követelményeknek. Nyelvezete világos, könnyen érthető, a témák tudománytörténeti vonatkozásai pedig kifejezetten olvasmányosak. Itt jegyzem meg, hogy ezek között néhány klasszikusnak számító közlést talán említeni kellett volna (pl. Johnson, P.C.: Autoregulation of intestinal blood flow (1960) *Am. J. Physiol.* 199, 311-318, vagy Hamar, J., Ligeti, L., Kovach, A.G.B., Tkachenko, B.I., Ovsjannikov, V.I., Tcherniovskaya, G.V.: Blood supply and oxygen consumption of the small intestine in low flow (1978) *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 52:381-

390). Az idegen szavak következetes írásmódjára különös hangsúlyt fektet a szerző, a rövidítések nagyon precíz 3 oldalas jegyzéke nélkül pedig a disszertációt aligha lehetne megérteni. Ilyen körülmények között az opponens szinte kárörvendően látja, hogy a scavenger szó kimaradt a jegyzékből és a „shock” szó írásmódja a 123. és 126. oldalakon egymástól eltérő. A grafikonok, ábrák nagyon szépek és informatívak, az utóbbiak részben saját készítésűek, részben más közleményekből származnak de szövegük magyarítva van és eredetük megjelölésre került. Kár, hogy a legtöbb ábrán a feliratok olyan kicsik, hogy alig olvashatók (pl. 5., 10. ábra, 72 o.).

Az értekezéssel kapcsolatos kérdéseim a következők:

1. Érthető, hogy a szerző miért zárta 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 (pl. Folkow, B., Lewis, D.H., Lundgren, O., Mellander, S., Wallentin, I.: The effect of graded vasoconstriction fibre stimulation of the intestinal resistance and capacitance vessels (1964) Acta Phys. Scand. 61. 445-457) és saját kísérletei is bizonyítják, hogy a graft eltávolításával összefüggő denerváció csökkenti az endogén PACAP szinteket a vékonybélben.

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

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

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

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

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

Az értekezésről összességében elmondható, hogy hosszútávú, koncepciózus kutatómunka eredményeit foglalja össze, melyek a legmodernebb módszerek alkalmazásával születtek. A kísérletek elméleti és klinikai orvostudományi szempontból is igen időszerűek, relevánsak és jelentősek és hozzájárulhatnak a mesenterialis ischaemiás károsodások, valamint egyes daganatos és gyulladásos betegségek gyors, egyszerű diagnosizálásához, azok dinamikájának monitorozásához és gyógyításához. Az értekezés szakmai színvonala, valamint Dr. Ferencz Andrea elméleti tudása, kutatói kvalitásai, tudomány iránti több évtizedes elkötelezettsége alapján támogatom számára az MTA doktora cím odaítélését és javaslom az értekezés nyilvános vitára bocsátását.

Budapest, 2023. augusztus 30.

Dr. Benyó Zoltán