



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Immunológiai Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina



H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

VÁLASZOK PROF. DR. BERKI TÍMEA

Dr. Buzás Krisztina: „*Daganatok kommunikációs stratégiái az immunrendszer válaszainak tükrében*” című MTA doktori értekezésének

BÍRÁLATÁRA



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Immunológiai Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina



H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

Tisztelt Prof. Dr. Berki Tímea!

Először is szeretném megköszönni azt a precizitást és minden egyes pontra kiterjedő figyelmet, amellyel Professzor Asszony a bírálati folyamatot végig kísérte. Kritikai észrevételei, megjegyzései hozzásegítenek ahhoz, hogy a kutatómunkát a továbbiakban is megfelelő precizitással végezzük és felhívja a figyelmünket a megfelelő prezentáció fontosságára. Mivel mindhárom Bíráló véleményében megjelenik a néhol szokatlan vagy szabatos szóhasználat, ezért ezekre az észrevételekre itt szeretnék összefoglalva reagálni. Nagyon fontos kezdeményezésnek tartom, amely nemrég a Magyar Tudományos Akadémia felmérésében nyilvánult meg, ahol a magyar nyelv természettudományos kutatásaiban való használatára vonatkozott. Több kollégával számos alkalommal került elő a beszélgetéseink során, hogy meglehetősen kevés olyan fórum létezik, ahol anyanyelvünket, mint a tudományos közlés nyelvét lektorált formában használhatnánk. Ha az ilyen fórumok száma magasabb lenne és léteznének vagy megalkotásra kerülnének olyan magyar szakkifejezések, amelyeket lektorált közegben használhatunk, segítséget nyújtanának a helytelen szóhasználat vagy nyelvi környezet elkerülésében.

*Az „Anyagok és módszerek” fejezethez megfogalmazott kritikára, mely szerint „**Nehezen követhető, hiányosak a lírások, némely módszer leírása teljesen hiányzik. pl. sebzáródási assay, sejtproliferációs assay.**” a következőt szeretném megemlíteni. Ahogyan azt a fejezet első mondatában megfogalmaztam:*

„Célkitűzéseink megválaszolásához alkalmazott módszerek legfontosabb munkafolyamatainak, logikájának és a kísérleteinkben felhasznált néhány speciális eljárásnak ismertetése.” volt a fejezet általam megfogalmazott és reálisan kivitelezhetőnek tartott célja. Mivel igen nagy számú metodikát alkalmaztunk, minden egyes rutineljárás részletes ismertetése elfogadhatatlan terjedelműre növelte volna a dolgozatot, amely I. része az alkalmazott stratégia ellenére is 144 oldalra rúg. Ezzel együtt a kritikát természetesen elfogadom.



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Immunológiai Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina



H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

1. A *C. pneumoniae* primeren tüdő pathogén. Mivel magyarázza a bőrszövetben a baktérium jelenlétét és mi lehet a hatása a melanoma sejtekre?

A C. pneumoniae primeren valóban tüdő pathogén kórokozó. A C. pneumoniae által okozott légúti fertőzések többsége (kb. 70%) tünetmentes, vagy csak enyhe tünetekkel jár, de egy kisebb részük (30%) súlyosabb légúti megbetegedésekért felelős, mint például atipikus tünetekkel járó, közösségben szerzett tüdőgyulladás, hörghurut és felső légúti fertőzések. A C. pneumoniae nemcsak a légúti fertőzésekben, hanem számos gyulladásos állapot patogenezisében is részt vesz, beleértve a krónikus obstruktív tüdőbetegséget, az asztmát, a tüdőrákot, a neurológiai rendellenességeket, mint az Alzheimer-kór, a szklerózis multiplex és a skizofrénia, valamint az érelmeszesedés és az artritisz.

A kórokozó elsősorban légúti hámsejteket és más sejteket, például érrendszeri endotélsejteket, simaizomsejteket, monocitákat/makrofágokat és atheromatosus (AM) szöveteket fertőz. Az alveoláris membrán fontos szerepet játszik célsejtként a Chlamydia-fertőzésben, és kifejezett gyulladásos választ vált ki a szervezet fertőzésére. Ez magában foglalja a gyulladásos citokinek fokozott felszabadulását az alveolusokon belül, valamint a polimorfonukleáris és mononukleáris sejtekből álló intersticiális infiltrátumok összegyűjtését. Ez a tüdőszövetet pusztító helyi hatásokat eredményez.

A fertőzést követő korai fázisban gyakoriak a neutrofil infiltrációk, de a szubakut fertőzésben szenvedőknél különálló limfocita alveolitist is megfigyeltek. A Chlamydia intracelluláris túlélése miatt a rezidens makrofág a kórokozó rezervoárjaként is működhet, ami a fertőzés perzisztenciáját okozza.

*Mindezek alapján mind az intracelluláris lokalizáció miatt, mind pedig az említett beteg szeptikus állapota miatt a kórokozó az érpályába kerülve eljuthat a bőrbe, illetve a daganatot behálózó mikrokapilláris rendszerbe. Ez lehetett az oka annak, hogy a bőrből származó mintában PCR segítségével a *C. pneumoniae* örökítőanyaga kimutatható volt.*



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Immunológiai Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina



H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

Észrevétel: A fejezet első mondatában azt a célt tűzi ki, hogy az adaptív immunrendszer szerepét vizsgálja a tumor progresszióban. Ugyanakkor mind a génextpressziós vizsgálatok, mind a citokin/kemokin fehérje expressziós vizsgálatban makrofág eredetű markereket vizsgált teljes tüdőszövet lizátumban. Sem T sem B limfocita CD marker vagy citokin vizsgálat sem történt. Az immunsejt infiltráció kifejezés a szövettani ábrák magyarázatakor is ugyanezt a bizonytalanságot jelzi.

Egyetértek a Bírálóval abban, hogy az említett fejezet céljának megfogalmazása nem volt szerencsés. A kísérletek során valóban a makrofágok kerültek a vizsgálataink középpontjába. Ugyanakkor számos olyan citokint és kemokint vizsgáltunk, aminek az adaptív immunitás kialakulásában, illetve működésében jelentős a szerepe. Ezek közül szeretném kiemelni azokat, amelyek a 7. ábrán bemutatott proteome profíleren jelet adtak. A „Kiegészített válaszok” nevű dokumentumban, amelyet a Bíráló számára előzetesen megküldtem, részletesen szerepel az adaptív immunválaszt fémjelző, vizsgált markerek leírása. Ezúttal csak fel szeretném ezeket sorolni.

C5a

CXCL1

MCP-1

CD54 (ICAM-1)

IL-16

CCL5 (RANTES)

Mindezek mellett vizsgáltuk még az IP10, CXCL11, M-CSF, CCL12, CXCL9, CCL3, CCL4, CXCL2, CCL5, CXCL12, CCL7, TIMP1, TNFalfa, TREM-1 mediátorokat is, de sajnos a negatív, illetve nem szignifikáns eredményeket, tendenciákat tudományos közleményekben nem fogadnak el a bírálók, még ha a szerzők fontosnak tartják is.



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Immunológiai Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina



H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

A szövettani ábrák elkészítésére és magyarázatára patológus és bőrgyógyász szakvizsgával rendelkező munkatárs segítségét kértem az egyértelmű szóhasználat érdekében, amelyet a cikk bírálói is megfelelőnek találtak. A bizonytalanság érzete talán az immunológusok és patológusok eltérő szóhasználati szokásaival magyarázható.

2. Irodalmi adatok szerint a *C. pneumoniae* hőinaktiválása csökkenti a fertőzött sejtek ICAM1 és citokin expresszióját (S.A. Vielma Circulation Research. 2003;92:1130–37, Jun Yang Infection and Immunity 2003. 72.620). Mennyire lehet ezt összefüggésbe hozni azzal, hogy a hőinaktivált *C. pneumoniae* az *in vitro* kísérletekben képes a CXCL-1 semlegesítésére? . A CXCL1 kemokint a melanoma sejtek is jellemzően termelik. Összefügghet-e a *C. pneumoniae* tumor progressziót és metasztázist gátló hatása ezen kemokin neutralizálásával? A *C. pneumoniae* *in vitro* CXCL1 semlegesítő hatása ezen baktérium törzsre specifikus, vagy egyéb baktériumok is képesek ezt a hatást előidézni?

*A dolgozat 3.1 fejezetében bemutatott első közlemény Melléklet (Supplementary) részében található 3. ábrán láthatóak azon eredmények, amelyek a *C. pneumoniae* és a CXCL-1 kölcsönhatását vizsgálják. A Western blot ábrán bemutatott, illetve a denzitometriás eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a *C. pneumoniae* hatására, hígítási sorban vizsgálva a CXCL-1 rekombináns fehérje mennyisége a detektálhatósági határ közelébe kerül. Ezen eredmények alapján egyetértek a Bíráló azon feltételezésével, hogy a baktérium CXCL-1-et neutralizáló hatása jelentősen hozzájárulhat a melanoma regresszióhoz. Egyéb baktérium törzsekkel ezt a hatást nem vizsgáltuk.*

Egyetértek a bírálóval abban, hogy a CD11b expressziójának emelkedése nem okoz önmagában feltétlenül antitumorális hatást. Azonban a Buzás és mtsai. JID. (doi: 10.1016/j.jid.2015.12.032.) közleményben és annak Melléklet részében bemutatott összes eredmény, úgy mint a vizsgált M1 típusú citokinek szintjének szignifikáns emelkedése, amely magában foglalja a CCL2, CCL3, CD86, IL12, IL6, IL10, CXCL16, CCL7, CD80, CXCL11, CXCL9, IL23 és TNF alfa citokineket és kemokineket, az M2 típusú mediátorok szignifikáns csökkenése, úgy mint a CD163, CXCL13, TGF béta, ILRa, CD23, CCL1, CCL232, IL4, CCL17, CCL24, CD150, IL10, CXCL1 citokinek, az immundeficiens egerekkel végzett vizsgálatok, az immunkompetens állatok látványos tumorregressziója és túlélési görbéik együttese azt



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Immunológiai Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina



H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

támasztja alá, hogy a C. pneumoniae inhalációja és az általunk vizsgált M1 profilú makrofágok túlsúlya összefügg és együttesen antitumorális hatást eredményez.

A szövettani ábrák a mintavételi időpontokat valóban nem tartalmazzák.

3. A 3.1.3. fejezetben a 6a. és b ábrán nem világos, hogy az idő skála (0-15 óra), valójában mit jelent? Ugyanis az anyag és módszer fejezetben leírtak alapján a C. pneumoniae inhalációt a 7, 9, 11, 14 és 16. napon végezték. A mintavétel az első inhaláció (7. nap) után 2 órával, a 2. inhaláció (9. nap) után 4 órával, a 3. inhaláció (11. nap) után 12 órával és 24 órával az 5. inhaláció (17. nap) után történt. Ez alapján kizárólag a 2. inhaláció után 4 órával mutatható ki makrofág M1 transzkriptum emelkedés? Ugyanakkor a COX1-COX2 arány változás a 12 órás (3. inhaláció utáni) mintában kerül ábrázolásra. Mivel magyarázza ezt?

Minden leközölt kísérletes eredményünk hosszas optimalizációs folyamat eredménye. Különösen nehéz ez abban az esetben, ha állatokkal dolgozunk, hiszen törekszünk a felhasznált kísérleti állatok számának redukálására. A makrofág polarizációt jelző citokinek mRNS szintjének emelkedése valóban nagyon gyorsan megtörténik, mindösszesen 4 órával az inhalációt követően már mérhető a csúcspont. A COX-1 és COX-2 esetében, bár tudjuk, hogy ezek szintjének változása elengedhetetlen a makrofágopolarizáció bekövetkezéséhez, nem volt lehetőségünk RT-PCR elvégzésére. Szakirodalmi adatok és az optimalizációs kísérletek során úgy találtuk, hogy az mRNS-ről történő fehérje transzkripció és transláció minimálisan 12 órát vesz igénybe. Ily módon tehát a citokinek mRNS szintjének időskálája nem hasonlítható a polarizációs fázisban lévő makrofágokban megjelenő, transzlálódott fehérje megjelenésének időskálájával.

A kérdésben említett több napos kezelést a túlélési kísérletekhez, illetve a szövettani elemzésekhez használtuk. A molekuláris vizsgálatok időskálája a bakteriális inhalációt követő néhány órás időidőintervallumban történt. Sajnálatos módon ezt nem tettem világossá a dolgozat szöveges részében.

4. A 3.2. fejezetben humán rekombináns IL-24 kemotaktikus hatását vizsgálja először *in vitro* humán neutrofil és monocita tenyészetekben, majd *in vivo* egér kísérletekben. Milyen



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Immunológiai Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina



H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

mértékben homológ a humán és egér IL-24? Van-e különbség a humán és egér IL-24 receptorok szerkezetében és funkciójában?

A rágcsáló és a humán IL-24 gének nem csak a cDNS és fehérje szekvenciák szintjén, hanem az IL-10 citokin család génklasztereken belüli genomiális lókuszek és exon-intron szerveződésük tekintetében is nagymértékben homológok. A humán IL-24 gént az 1. kromoszómán lokalizálták, egy 195 kb-os citokin klaszteren belül, amely négy gént tartalmaz, az IL-10, IL-19, IL-20 és IL-24 géneket, lineáris sorrendben. A patkány IL-24 gén a 13q13 kromoszómán található, ugyanolyan génklaszter elrendeződéssel, mint a humán IL-10 citokin családé. A humán és a rágcsáló IL-24 gének összehasonlítása kimutatta, hogy nagyon hasonló exonmérettel és szerveződéssel rendelkeznek, kivéve a humán IL-24 gén 2. exonját, amely a szignálpeptidet kódolja. A rágcsáló IL-24 gén 3-5. exonjának mérete és a 6. exon kódoló régiója megegyezik a humán IL-24 gén 4-6. exonjával és a 7. exon kódoló régiójával, amelyek a megfelelő aminosavakat kódolják a fehérjeillesztés alapján.

A rágcsáló és a humán IL-24 eltérően glikozilált, azonban kevésbé befolyásolja a receptorhoz való kötődést és aktiválódást. A rágcsáló IL-24 képes a humán IL-24 receptorokhoz kötődni és aktiválni azokat.



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Immunológiai Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina



H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

Az alábbi táblázatban (1. táblázat) látható a humán és egér IL-24 hasonlósága:

1. táblázat Az interleukin (IL)-24 elsődleges szekvenciájának konzerváltsága a fajok között. h: ember; m: rágcsáló; r: rekombináns (doi: 10.1111/j.1365-2567.2005.02094.x.).

Gén	Faj	Alternatív név	Aminosav szekvencia homológ		
			MDA-7	Mob-5	FISP
hIL-24	ember	MDA-7	100%	68%	69%
rIL-24	patkány	MOB-5, C49A	68 %	100%	93%
mIL-24	egér	FISP	69 %	93%	100%

Az interleukin-24 (IL-24) receptorok az egerekben és az emberekben szerkezeti és funkcionális homológiát mutatnak, bár az expressziós minták és a downstream jelátviteli útvonalak között lehetnek különbségek.

Szerkezetét tekintve az IL-24 biológiai hatását a receptorkomplexével való kölcsönhatás révén fejti ki, amely két alegységből áll: IL-20R1 (más néven IL-20RA) és IL-20R2 (más néven IL-20RB). Ezek az alegységek a II. osztályú citokinreceptorok családjába tartoznak, és extracelluláris immunglobulin (Ig)-szerű doméneket, egy transzmembrándomént és intracelluláris jelátviteli doméneket tartalmaznak.

Funkcióját tekintve, amikor az IL-24 kötődik a receptorkomplexéhez, olyan downstream jelátviteli kaszkádokat indít el, amelyek különböző sejtválaszokat modulálnak. Ezek a válaszok közé tartozik az antiproliferatív hatás, az apoptózis indukciója, az immunválaszok modulálása és az angiogenezis gátlása.

Az IL-24 receptor jelátvitel elsősorban a Janus kináz (JAK) és a transzkripció jelátvivő és aktiváló (STAT) jelátviteli útvonalak aktiválásában vesz részt. A ligand megkötése után a receptor alegységek konformációs változásokon mennek keresztül, ami a receptor alegységek intracelluláris doménjeihez kapcsolódó JAK-ok aktiválásához vezet. Ezután az aktivált JAK-ok foszforilálják a receptor alegységek tirozin-maradványait, és ezzel dokkolóhelyeket biztosítanak a STAT fehérjék számára. A foszforilált STAT-fehérjék ezután homodimereket vagy



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Immunológiai Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina



H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

heterodimereket alkotnak, és transzlokálódnak a sejtmagba, ahol szabályozzák a különböző sejtfolymatokban részt vevő célgének transzkripcióját.

Homológia az egér és a humán IL-24 receptorok között: Az egér és az ember IL-24 receptor komplexe jelentős szekvencia-homológiát mutat, különösen a ligandkötésért és a receptor dimerizációjáért felelős extracelluláris doménekben. Mind az egér, mind a humán IL-20R1 és IL-20R2 alegységeknek vannak közös szerkezeti jellemzői és az IL-24 jelátvitel szempontjából kritikus funkcionális doménjei.

Ezenkívül az IL-24 receptorokhoz való kötődése által aktivált downstream jelátviteli útvonalak konzerválódnak az egerek és az emberek között. Mindkét faj a JAK/STAT jelátviteli kaszkádokat használja az IL-24 által közvetített sejtválaszok átvitelére.

Lényeges azonban megjegyezni, hogy fajspecifikus különbségek lehetnek az IL-24 receptorok expressziós mintázatában és a specifikus fiziológiai és patológiai folyamatokban betöltött szerepükben. Ezért, bár az egérmodellek értékes betekintést nyújtanak az IL-24 biológiájába, az eredményeket a klinikai relevancia szempontjából humán rendszerekben kell validálni, ezért is tartom fontosnak a humán monociták migrációjának vizsgálatát IL-24 indukció hatására.

5. A 8. ábrán az in vitro kísérletekben, és a 9. ábrán bemutatott in vivo eredmények is azt mutatják, hogy a 10 és 1 ng/ml IL-24 koncentráció kisebb kemotaktikus aktivitást eredményez, mint a 0,1 ng/ml és annál kisebb koncentrációk? Mivel magyarázható ez?

A kemotaxis vizsgálatokban axiómának tekintjük azt a kinetikát, amely a sejtek kemokinek hatására bekövetkező mozgását mutatja. A sejtek kemotaxisának koncentrációfüggése egy harang-vagy Gauss görbével, illetve logaritmikus lefutású görbével írható le. Ez függ a sejtek típusától és a kemokin milyenségétől is.

Az IL-24 számos kanonikus útvonal szabályzásában részt vesz. Ilyenek pl. a JAK/STAT, a p38 MAPK, a SOCS1/3 is. Az IL-24 képes apoptózist előidézni a daganatsejtek többségén. Másik fontos IL-24 által közvetített mechanizmus, az autofágiára gyakorolt hatás. Az autofágia egy alapvető katabolikus folyamat, amely valamennyi eukarióta sejt komponensének tömeges lebontását jelenti a lizoszómális gépezeten keresztül, különösen különböző stresszingerekre,



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Immunológiai Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina



H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

például éhezésre, kemoterápiára, fertőzésre és hormonkezelésre adott válaszként. Úgy tűnik, hogy az IL-24 a humán keratinociták migrációs viselkedését gátló hatása révén gátolja a sebgyógyulást, amelyet egy AKT-függő útvonalon keresztül közvetít (doi.org/10.1016/B978-0-12-801121-8.00006-3).

Mindezek alapján valószínűsítem, hogy az IL-24 nagy koncentrációban olyan jelátviteli útvonalak beindulását váltja ki, amelyek megváltoztathatják a receptorok affinitását, a sejtelettani funkciókat vagy a kinetikus cselekményeket, esetleg a sejtek halálát vagy kitapadását indukálják. Mindezek alapján a nagyobb koncentrációk olyan sejtelettani funkciókat indíthatnak be, amelyek gátolják vagy legalábbis nem indukálják a sejtek migrációját.

A kérdésre akkor lehetne precíz választ adni, ha végeztünk volna IL-24 függő molekuláris vizsgálatokat, amelyek a sejtek életképességének és kemokinetikus mozgásának összefüggéseit befolyásolják, azonban ilyen kísérletek nem történtek.

6. Gátlószerek alkalmazásával humán leukocitákon azt találta, hogy mind G-protein mind MEK és JAK-inhibitor hatására is szignifikánsan gátlódik a monocita migráció. Hogy magyarázza ezt a szignalizációs jelenséget?

Az IL-24 az IL-10 citokin család tagja, és két heterodimer receptoron keresztül történik a jelátvitel, amelyek az IL-20R1/IL-20R2 és IL-22R1/IL-20R2. A receptorokhoz való kötődés után az IL-24 a STAT-1 és STAT-3 transzkripciós faktorok gyors aktiválódását indukálja, amelyek a jelek szerint szerepet játszanak a sejtek túlélésében és proliferációjában. Fiziológiai körülmények között az IL-24 fő forrásai az aktivált monociták és a T helper 2 sejtek, míg a receptor expressziós mintázata alapján az IL-24 fő célszöveti nem vérképzőszervi eredetűek, hanem a bőr, a tüdő és a reproduktív szövetek közé tartoznak. Szerkezetileg és funkcionálisan az IL-24 nagymértékben konzervált a fajok között. Ahogyan a dolgozatban bemutatott publikációban leírtuk, az IL-24 a monociták kemotaktikus mozgását idézi elő, amely hozzájárulhat az IL-24 daganatellenes hatásához, hiszen a szekréció helyszínére vonzza az immunsejteket.



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Immunológiai Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina



H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

Mivel a GPCR gátlása, a MEK és a JAK inhibitor alkalmazása is a monociták mozgását gátolja, ezért kijelenthető, hogy az IL-24 a szokásos receptorain kívül a MEK és a JAK indukciója révén is a monociták mozgását idézi elő. Mivel olyan szakirodalmat, amely ezen mechanizmusokat pontosan leírja, nem találtam, ezért mesterséges intelligencia segítségével, az Ingenuity Pathway Analysis predikciós platformját hívtam segítségül. Tímár József Professzor Úr kérdései között szerepel egy részben átfedő megjegyzés is, így a pontos mechanizmus mibenlétére ott szeretnék majd választ adni.

7. A 3.3 fejezetben az extracelluláris vezikulák és a tumor kapcsolatáról keres alátámasztó bizonyítékokat. Elsőként jellemzi az egér B16F1 melanoma sejtvonal által termelt exosomákat méret (SEM képek), expresszált markerek (CD9, CD63, CD81 és Hsp70 WB) és fehérje tömegspektroszkópiás analízis és miRNS szekvenálás alapján. Milyen melanoma specifikus markereket sikerült azonosítani? A Western blot-al azonosított 4 exosoma markerből a fehérje profil analízisben csak kettőt tudtak azonosítani. Mivel magyarázható ez?

Ahogy az a 45. oldal 3. táblázatában felsoroltam, a Melan-a (trafficking, processing, és stabilizációja a Pmel-nek), katepszin B, katepszin D, Pmel (fibrillar matrix komponens az eumelanin polimerizációjához) tirozináz és tirozináz kapcsolt protein (melanin szintézis) alkalmas lehet diagnosztikus melanoma biomarkerként (PMC4086529).

Az, hogy a Western blottal azonosított markerekből a proteomikai analízisben nem található meg mindegyik fehérje, a proteomika mint módszer specialitásából adódik. Medzihradszky Katalin proteomikai laboratóriumában töltött hónapok alatt volt alkalmam megtanulni, hogy a tömegspektrometriai mérések során nem feltétlenül látjuk azokat a fehérjéket, amik jelen vannak a mintában. Mivel a tömegspektrometria során elektromágneses térben röptetjük a fehérjéket, ezért azt fogjuk tudni detektálni, ami például jól repül, megfelelő elektromos töltéssel rendelkezik ahhoz, hogy a detektorba becsapódjon. Másik hátránya a tömegspektrometriának, hogy a nagy mennyiségben jelen lévő fehérjék sokszor elfedik a kisebb mennyiségben jelen lévő proteineket. Szintén kérdés az, hogy a tripszines emésztéshez, amelyet a mintaelőkészítés során alkalmazunk, mennyi triptikus hasítóhely található az adott molekulában és azok hol helyezkednek el. Ráadásul amikor Western blotot végzünk, ott specifikus ellenanyagok



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Immunológiai Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina



H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

segítségével célzottan keresünk valamit, míg a proteomikai analízis alkalmával minden fehérjét látunk, amelyet a módszer lehetővé tesz. Mindezek hozzájárulnak a proteomikai analízis és a Western blottal detektálható fehérjék listájának eltéréseihez.

8. A melanoma exosomával kezelt MSC 40 féle daganatos transzformációval kapcsolatos gén gPCR vizsgálata alapján a legtöbb gén expressziója már 24 óránál is emelkedett és 72 óra múlva tovább emelkedik. Ugyanakkor néhány gén 24 óránál csökkenést mutat és nem vagy csak a 72 órás mintában mutat emelkedést. Mely gének mutatták ezt a csökkenést? Mi lehet ennek a magyarázata?

A következő gének felelnek meg a Professor Asszony által állított feltételnek: HGF, Casp9, Met, Map2k1, Casp8, Thy1, Itgb1, Eng, Stat3, Map2k2, Akt1. A sejtekben a gének működése nem egyszerre indul be, azok kinetikáját számos tényező befolyásolja, valószínűsítem, hogy az exoszomális indukció nélkül ezen gének nem, vagy csak kis mértékben írótak volna át. Azonban a melanoma EV-k hatására olyan transzkripciós faktorok aktiválódtak, amelyek elindították az említett gének működését. Feltehetően az említett gének transzkripciós faktorainak működése több időt vett igénybe, esetleg áttételesen, több mediátor működéséhez volt arra szükség, hogy a felsorolt gének megszólaljanak.

9. A citosztatikumok (Doxorubicin és Ag-TiO₂) a tumorsejtek osztódásának gátlásával hatnak. Ez a tumorsejtek pusztulásához vezet. Miért meglepő, hogy a tumorsejtekből több EV szabadul fel?

A Doxorubicin és az Ag-TiO₂ letális dózisének alkalmazása valóban sejthalálhoz vezet. Viszont mi a kísérleteink során optimalizációs lépéseket követően olyan stresszor koncentrációkat alkalmaztunk, amelyek nem ölik meg a sejteket, csupán szuboptimális környezetet teremtenek, amely a rövid idejű (72 h) kezelésknél csupán a sejtosztódás lassulásában nyilvánult meg. A sejthalál folyamata során a sejtek nem termelnének vezikulákat, illetve kisméretű EV-k (melyekre vizsgálataink irányultak), helyett sokkal inkább apoptotikus testeket látnánk, ha az EV preparálási módszerünk nem zárna ki a nagy méretű apoptotikus testek együttes izolációját. Ugyanakkor egyetértek a Bírálóval: valóban nem meglepő, hogy a stresszelt sejtek nagyobb mennyiségben termelnek EV-eket. Viszont a vizsgálataink idején minimális számú szakirodalom



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Immunológiai Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina



H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

állt rendelkezésre ezen folyamatokról, hiszen a közlemény 5 évvel ezelőtt jelent meg, amelyet minimálisan 2 év munka előzött meg. Tehát a 2017-es tudásbázis alapján állítottuk fel hipotézisünket és akkor ezek az eredmények újdonságnak számítottak, amit mutat a rangos folyóiratban való közlés ténye és az idézettség viszonylag magas értéke. Mindazonáltal a Bíráló kérdésének pontos megválaszolásához érdemes lenne további vizsgálatokat végezni a stresszorok okozta apoptotikus folyamatok, vagy a termelt vezikulák osztályozására, mivel nem kizárható, hogy a sejtek stresszorok következtében bekövetkező pusztulása is eredményez többlet EV felszabadulást.

Milyen ezeknek az apoptotikus sejtekből származó exosomáknak a sejtfelszíni marker expressziója és fehérje profilja a miRNS változások mellett?

A fehérjeprofil a dolgozat II. fejezetében a Harmati és mtsai. (<https://doi.org/10.1038/s41598-019-51778-6>) Scientific Report cikk 3. ábráján található. A fehérjék nagy száma miatt ennek a felsorolásától szeretnék eltekinteni. A vezikulák felszínén megjelenő markerek változását nem vizsgáltuk. Szeretném viszont kiemelni, hogy a stresszorok hatására mind a termelt fehérjék száma, mind azok milyensége szignifikáns mértékben változik, tehát a stresszorok hatására a termelődő EV-k meglehetősen különböző információkat szállítanak az optimális körülmények között kibocsájtott melanoma EV-khez képest.

Elképzelhető-e az in vitro citosztatikummal kezelt tumorsejtekből származó sEVk in vivo tumorgátló hatása?

Véleményem és szakirodalmi adatok szerint elképzelhető a tumorgátló hatás, hiszen a kibocsájtott vezikulák tükrözik a donorsejtek állapotát. Mivel ez az állapot azonban nem jár okvetlenül a daganatra veszélyes változásokkal, a túlélő tumorsejtek képesek adaptálódni a mikrokörnyezeti stresszhez, amely a kibocsájtott vezikulák mennyiségében, tartalmában és célsejteken kiváltott hatásában is tükröződik. Ennek eredményeként mára több kísérleti bizonyíték van a kemoterápiás hatások alatt termelt vezikulák tumortámogató hatásáról, a tumorgátló hatásokhoz képest, többek közt fokozhatják a tumorsejtek metasztatikus képességét, kemorezisztenciáját, vagy összejtszerű fenotípusát.



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Immunológiai Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina



H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

Szakirodalmi adatok szerint a citosztatikus kezelések alatt termelt tumoreredetű vezikulák hatása főként a túlélés és a metasztázisképzés elősegítésében mutatkozik meg. Saját kutatási eredményeink (a predikciók és a kísérleti bizonyítások) szerint a Doxo sEV-k gátolhatják a tumorsejtek sejtciklusát és fokozhatják a melanómasejtek migrációját. A kezelt kultúrákban megnövekedett a G1 fázisú sejtek aránya és migrációs képessége is. Bár direkt bizonyítékunk nincs, ezen adatok, összhangban a szakirodalmi adatokkal, mégis arra utalnak, hogy a Doxo sEV-k az osztódás mérséklésével a tumorsejtek túlélését, valamint a migráció fokozásával azok metasztázis képességét támogatják.

Publikálatlan in vivo kísérletekben Doxo sEV-vel kezelt mezenchimális őssejteket oltottunk B16F1 melanóma tüdőáttéteket hordozó C57Bl/6 egerekbe, és azt tapasztaltuk, hogy a Doxo sEV-vel átnevelt őssejtek fokozták az őssejtek tumortámogató hatását. A tumorfejlődés ezekben az állatokban sokkal gyorsabb volt, ami alacsonyabb túlélési időkhöz vezetett az indukálatlan MSC-vel, vagy Ctrl sEV-vel átnevelt MSC-vel oltott egerekhez képest.

10. A különféleképpen kezelt EV-k hatása a mezenhimális őssejtek (MSC) Ki-67 expressziójára IPA-predikció (21. ábra) bizonyítására elvégzett immuhisztokémiai vizsgálatnál hiányolom a képeket. Az oszlopdigramon mutatott Ki-67 expresszió változások oly minimálisak, hogy gyakorlott mikroszkópos értékelő számára megkérdőjelezi ezen különbségek (13% vs 16%) biológiai jelentőségét.

Az immuncitokémiai vizsgálatok esetében részben a tartalmi korlátok miatt nem mutattunk be reprezentatív képeket. Mivel a Ki-67 expressziós különbségek alacsonyak a minták közt, ezek valóban nem is látványosak: a negatív kontroll kultúrában 12,2%, az Ag-TiO₂ sEV-vel kezelt kultúrában 17,31% a Ki-67 pozitív sejtek aránya (1. ábra).

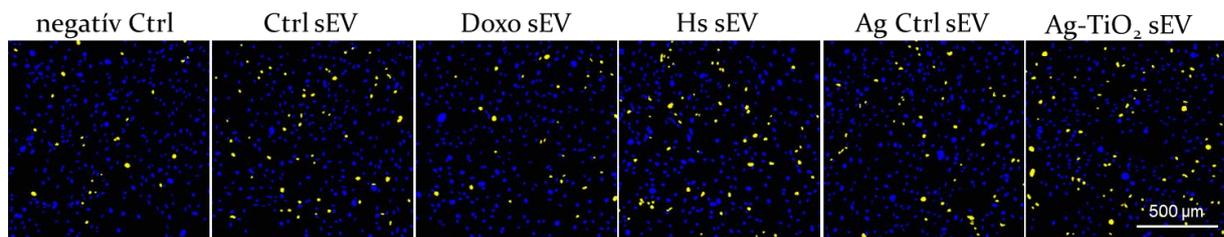
A gépi tanulási módszerek széleskörben való elterjedése előtt a legtöbb esetben csak ott kerestünk és teszteltünk különbségeket, ahol az szemmel egyébként is jól látható volt. Nagy elemszámok emberi szemmel és aggyal való vizsgálata azonban tévedésekhez vezet – mégpedig ahhoz, hogy nem tudunk különbséget tenni kis, konzisztens különbségek és véletlenszerű zaj között. Mára azonban az általunk használt automatizált képfeldolgozó eljárások elvégzik a sejtek felismerésének és annotálásának időigényes folyamatát, így nagyobb mintaméreten, jelen

H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

esetben 160,000 sejten is elvégezhetünk statisztikai próbákat. A konvencionális statisztikai tesztek alkalmazásakor (ebben az esetben Welch-féle ANOVA) már az átlagok kis különbsége is szignifikánsnak adódhat, ha elég nagy az elemszám. A szignifikanciáról, a p értékről ismeretes, hogy nem a hatás nagyságáról és biológiai jelentőségéről, hanem megfigyelt hatás általánosíthatóságáról árulkodik – mégha az alacsony is.

A megfigyelt különbséget, mindamellet, hogy szignifikánsnak, tehát általánosíthatónak adódott, releváns eredménynek tartottuk, mert részben (i) igazolja az IPA predikcióit, valamint (ii) igazolja, hogy már egy rövidebb sEV-indukció is okozhat konzisztens, általánosítható eltérést az őssejtek proliferációs kapacitásában.

Ahogy Timár József bírálata kapcsán is felmerült, érdemes lett volna hosszabb távú proliferációs vizsgálatokat is végezni, azonban ezt technikai okok miatt nem valósult meg.



1. ábra. Ki-67 immunfestést bemutató képek. A kék szín jelöli a Ki-67 negatív, a sárga pedig a Ki-67 pozitív sejtmagokat.

11. A ctrl és Ag ctrl sEV között, ha jól értem a fénykezelés a különbség. Milyen hatást gyakorolhat a fénykezelés a sEV-ra? Mi az oka annak, hogy a két ctrl nem ugyanazt a hatást mutatja a sejtciklusra, sőt a ctrl sEV inkább a Doxo kezelt sejtekből származó sEVk hatásához hasonlít?

A fénykezelés befolyásolhatja a tenyésztő folyadék karboxilsav és aminosav-összetételét, ez azonban nincs hatással a sejtek életképességére, növekedésére.

A tenyésztő folyadék összetételének változása azonban metabolikus változásokat indukálhat a tumorsejtekben, amely vezikuláris kommunikációjukban is megmutatkozik. Ily módon a Ctrl és Ag Ctrl sEV-k termelésében, összetételében és hatásában is láttunk eltéréseket, habár ezek elmaradtak a valódi stresszfactorok indukálta eltérésektől.

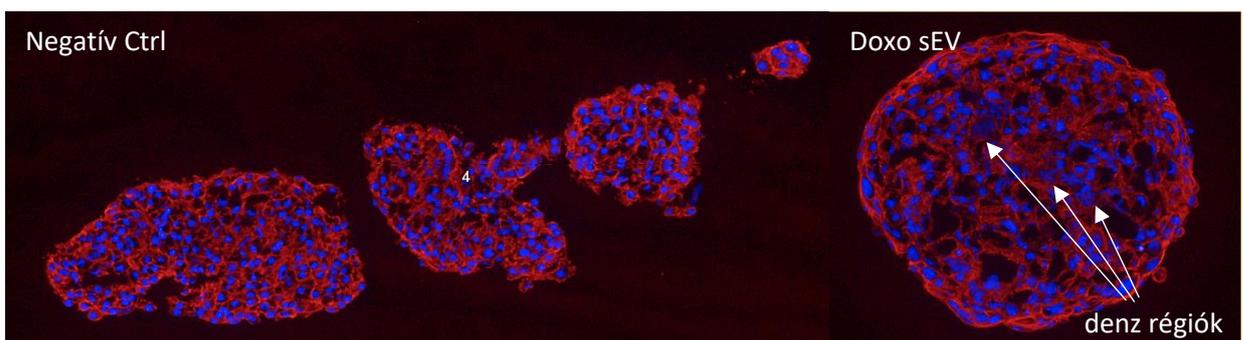
H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

Észrevétel: Összességében a 16. 21, 23 25 és 27 ábrán mutatott in silico IPA-predikciós ábrákat szerencsésebb lett volna a bizonyítási kísérlettel és eredményével együtt, egy komplex ábrán mutatni, ahogy az a közleményben is történt.

Az IPA predikciók és bizonyítási kísérleteik közös ábrán való bemutatása valóban átláthatóbbá tette volna az egyes kísérletcsoportokat, azonban a nagydoktori dolgozat formai követelményei miatt (széles margók, 1,5-es sorköz, 12-es betűméret) több, egymást követő nagyméretű ábra beillesztése az igényes dolgozatszerkesztés korlátait érzésem szerint meghaladta volna.

12. A 28. ábrán mutatott szövet szferoid képződésre gyakorolt ctrl és kezelt sEV hatás esetén csökkent a szferoid térfogata. Felvetődik, hogy ez a zsugorodás miért történik és a sejtek életképessége, hogy változott a kezelés hatására? Ugyanis minden paraméter esetében a Doxo kezelt sEV okozta a legjelentősebb hatást. Lehetséges-e, hogy a méretcsökkenés a sejtek pusztulása miatt van?

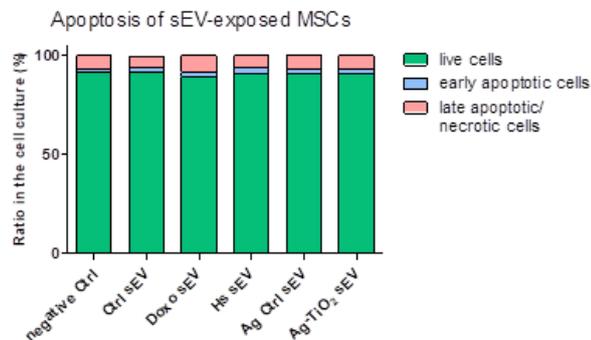
Ezek a mikroszövetek nemcsak kisebbek, hanem kompaktabbak is a többinél, erre utalnak a magasabb szfericitás, kompaktság és konvexitás értékeik (2. ábra). A 3D kultúrák beágyazása, szeletelése, CD44 és sejtmagfestése során pedig nagyobb sejtdenzitást figyeltünk meg.



2. ábra. MSC-B16F1 kokultúrák mikroszöveti képe DAPI (kék) és CD44 immuncitokémiai (piros) festéssel.

A sejtek pusztulását közvetlenül nem mértük a 3D ko-kultúrákban, viszont Annexin V és propidium iodide festést alkalmazva, áramlási citometriás méréseink szerint az őssejtekben apoptózis nem következett be (3. ábra. MSC sejtek apoptózisa sEV expozíció után).

Az IPA analízisek (bár nehezen kivehetők az árnyalatnyi különbségek) a Doxo és a Hs sEV-k esetén erősebb sejtaggregációs hatást prediktáltak. Ezzel összhangban a dolgozatban a kisebb méretű struktúrák kialakulását inkább a sejtek aggregációjának fokozásával magyaráztuk, amely mintegy túlélési stratégiája lehet a citosztatikummal kezelt tumoroknak. Vezikuláris kommunikációjuk olyan sejtfiziológiai változásokat indukálnak, amely fokozza a felszín-térfogat arányát, ezáltal elősegíti az oxigén, és a tápanyagok felvételét, ráadásul kompaktabb struktúrák esetén a gyógyszerek penetrációja is mérséklődhet.



3. ábra. MSC sejtek apoptózisa sEV expozíció után.

13. A sEV-k mint jelerősítők a KIR-i tumorok diagnosztikájában fejezetben összehasonlítja a szérumban és EV-ben kimutatható fehérjék expresszióját. A 311 fehérjéből 17 a sEV-ban míg 10 a szérumban mutatott legnagyobb csoportközi eltérést, de a legtöbb nem szövetspecifikus biomarker. Ugyanakkor számos fehérje gyengébb intenzitással jelent meg a sEV-ban, mint a szérumban. Az eredmények alapján nem látom, hogy milyen különbségeket talált a glioblastoma és a kissejtes tüdőrák agyi metasztázisában szenvedő betegcsoportok között?

A glioblastoma multiforme (GBM) és a kissejtes tüdőrák agyi metasztázisában szenvedő páciensek vezikula-dúsított mintáiban fellelhető proteomikai különbségekre a főkomponens-analízis biplotja világít rá a legszemléletesebben (77. oldal, 29. ábra).

A főkomponens-analízist azért végeztük el, hogy a sokdimenziós, proteomikai adatsort 2 dimenzióban tudjuk ábrázolni. Az analízis eredménye az úgynevezett biplot. A biploton szereplő különböző formájú és színű adatpontok a sEV mintákat jelölik, míg a vektorok az egyes



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Immunológiai Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina



H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

proteineket. A vektorok iránya és mérete árulkodik arról, hogy az adott mintáknak a 2 dimenziós térben elfoglalt helyét mely proteinek, milyen módon határozzák meg.

Ennek alapján, ha azt szeretnénk megtudni, melyek a GBM-re jellemző fehérjék a BM-hez képest, meg kell vizsgálnunk, hogy melyik vektorok mutatnak inkább a GBM irányába, és kevésbé a BM csoport felé.

Legelőször az SPRR2E (Small Proline Rich Proteine 2E) tűnhet fel, mely a GBM irányába mutat, de viszonylag nagy szöveget zár be az összes BM felé tartó vektorral. A számadatokat ellenőrizve azt tapasztaljuk, hogy az SPRR2E kétszer nagyobb átlagos intenzitással van jelen a BM csoporthoz képest.

Egy másik, GBM felé mutató, de a BM vektoraitól távolabb elhelyezkedő fehérje az IGLL1, mely szintén kétszeres intenzitással van jelen a BM-hez képest. Mind az SPRR2E (doi: 10.1111/cas.13310.; doi: 10.1038/s41467-023-40271-4.), mind az IGLL1 fehérjéről leírták már, hogy kapcsolatban állnak az invazív fenotípussal (doi: 10.2147/OTT.S281032.; doi: 10.1155/2023/3804605.), azonban nem specifikusak a GBM-re.

A GBM-hez képest a BM csoportra az ábra és a számértékek alapján az MMRN1 (multimerin 1) és az FGB (fibrinogén béta lánc) lehet jellegzetes. Átlagos intenzitásuk a BM csoportban kétszer nagyobb, mint a GBM csoportban.

Az MMRN1 protein egy endoteliális sejt marker, mely leginkább a tüdő endotél sejtjeiben expresszálódik, de fokozott expressziója számos daganattípusban tumorprogresszióval korrelál (doi: 10.1590/S1415-47572012005000045). Az FGB-ről szintén leírták már, hogy intenzitása korrelációban áll a tüdődaganatok méretével, a metasztázis képződéssel, valamint jelezheti a nyirokcsomókba való infiltrációt (doi: 10.1042/BSR20211248.). Azonban a tumoros folyamatokban betöltött szerepét nem kizárólag tüdőátétben, vagy primer tüdődaganatok esetén igazolták, hanem más tumorok, mint például emlőrák vagy melanóma esetében is (doi: 10.1515/biol-2020-0035.).



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Immunológiai Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina



H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

Össességében elmondható, hogy azonosítottunk a GBM és BM csoportok között különbözőképpen expresszálandó fehérjéket, melyek más-más módokon vesznek részt a tumoros folyamatokban, azonban nem specifikusak egyik tumortípusra sem.

Megjegyzendő, hogy a biploton szereplő fehérjék egy nagyon szigorú válogatás eredményeként létrejött panel tagjai, melyek egyenként nem, de együttesen alkalmasak voltak a betegcsoportok megkülönböztetésére. Ezen fehérjék alapján teljesen homogén és teljes klaszterek jöttek létre.

Elképzeltető, hogy ha kifejezetten egy GBM-BM különbségekre fókuszáló analízist végzünk el, több megkülönböztető proteint és biológiai kontextusban is specifikusabb eredményt kapunk. Azt is fontos hozzátenniünk, hogy a kutatás alátámasztotta azon elképzelésünket, hogy a tumortípusok megkülönböztetése több marker esetében eredményesebb, mint egy markerrel. A kutatás célja nem konkrét biomarkerek megnevezése volt, hanem egy metodika kidolgozása, amely az általunk vizsgált esetben konkrét eredményt hozott.

Észrevétel: Ezen utóbbi tumor heterogenitása és a tüdőben levő primer tumorból származó sEV szerepe mennyire került megfontolásra?

Már a GBM heterogenitása is nagy kihívást jelent a tumor karakterizálásában. A szöveti biopszia során gyakran nem sikerül optimális helyekről és optimális mennyiségű mintát gyűjteni, hogy az megfelelően reprezentálja a tumorszövet teljes molekuláris diverzitását.

Viszont extracelluláris vezikulák vizsgálata – de a folyadékbiopszia önmagában is – áthidalhatja ezt a problémát. Ugyanis a heterogén tumorszövet EGÉSZE szekretál EV-eket, melyek átjutva a vér-agy gáton kilépnek a keringésbe. Ezen felül a kiváltott immunválasz szereplői által kibocsátott vezikulák információtartalma is jelentős szereppel bír az azonosításban.

Ha feltételezzük, hogy a keringésben a különböző forrásból származó EV-k homogén módon keverednek, akkor egységnyi EV izolátumban a betegség egészének egyfajta információs poolja található meg.

14. A sEV-ban mért MMP-9 egy nagyon általános gyulladáshoz vezető marker. A sEV-ban mért



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Immunológiai Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina



H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

MMP9 tartalom mennyire korrelál a tumor mérettel? Összefügghet-e ez a túléléssel kapcsolatos 33. ábrán bemutatott eredménnyel? Retrospektív elemzés erre a következtetésre nem alkalmas.

A 2023-as kutatásunk során megállapítottuk, hogy az MMP-9 szintje negatívan korrelál a túléléssel. Logikusan merül fel a kérdés, hogy az MMP-9 mennyisége a tumor méretével is korrelál-e. Azonban sajnos a tanulmány idején rendelkezésünkre álló klinikai adatok nem tartalmaztak információt a primer tumorok méretéről, így nem tudtunk következtetéseket levonni ezzel kapcsolatban a beteganyagra vonatkozóan.

A szakirodalmat áttekintve sem vonhatunk le egyöntetű következtetéseket. Például egyes tanulmányok alapján az MMP-9 expressziója sem az emlőrák, sem a glioblasztóma ([doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42731-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42731-7).) esetében nem mutat korrelációt a tumor méretével. Ugyanakkor szájüregi laphámsejtes karcinóma (doi.org/10.1186/s40478-021-01305-4) és pajzsmirigy karcinómát vizsgálva szoros összefüggést azonosítottak ([doi: 10.7759/cureus.34954](https://doi.org/10.7759/cureus.34954)).

A tumor is csak akkor nő gyorsan, azaz lesz nagy a mérete, ha a tumorsejtek nagy inváziós képességgel bírnak. Egy glioblasztóma tumor mérete a környező szövetekbe történő infiltrálódás miatt kevésbé állapítható meg pontosan, mint pl. egy meningeoma esetén. A fentiek tekintetében a prognózis becslésére alkalmasabb lehet egy jól definiált tumormarker használata.

Úgy tűnik, hogy mivel az MMP-9 egy meglehetősen sok funkciót ellátó fehérje, ezért a túlélés befolyásolásában való szerepe nem minden esetben köthető a tumor méretéhez.

15. A KIR-i tumorok esetében a Raman spektroszkópiával történő sEV elemzése a tumorok eltérő eredetéből, biológiai tulajdonságaiból és sejtes összetételéből adódó különbségeket mutattak. Mennyiben segítheti egy ilyen módszer a radiológiai és szövettani diagnózist? Alkalmas lehet-e tumor markerként történő alkalmazásra és esetleges progresszió előre jelzőnek?



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Természettudományi és Informatikai Kar
Immunológiai Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina



H-6725 Szeged, Korányi fasor 6., E-Mail: kormondine.buzas.krisztina@med.u-szeged.hu; kr.buzas@gmail.com

Az általunk használt megközelítés az sEV izolációval, a Raman spektroszkópiával és az adatok elemzésével együtt összesen 5-5.5 órát vesz igénybe. Természetesen, ha az adatok elemzésére felépítésre kerül egy erre alkalmas programkörnyezet, egy könnyen kezelhető szoftver, amely automatikusan elvégzi a spektrumok transzformációját és a klasszifikációt, ez az idő tovább rövidül.

A folyamathoz egy erre alkalmas Raman spektroszkóp, valamint a differenciál centrifugáláshoz szükséges eszközpark szükséges. Ezen kívül a teljes folyamatnak meglehetősen kevés fogyóeszköz igénye van, és a spektrumokon alapuló klasszifikálás lényegesen kevesebb szakértelmet követel, mint a patológusok által használt szövettani elemzések.

*Nem állítjuk, hogy a szérum EV-k Raman spektroszkópia alapú klasszifikációja helyettesítené a szövettani vizsgálatokat. Azonban tapasztalatainkból és eredményeinkből, azok specifitására és szenzitivitására alapozva akár milliós mintaszámú populációk szűrővizsgálatainak elvégzésére alkalmas lehet. Véleményem szerint integrálhatóvá válna a klinikai gyakorlatban, mint egy gyors, költséghatékony, **diagnosztikai döntést segítő vagy előszűrő módszer.***

Összefoglalásképp szeretném még egyszer megköszönni azt az alaposságot, amellyel Berki Tímea Professzor Asszony a téziseim bírálatát elvégezte és kritikai észrevételeivel, kérdéseivel segítséget nyújtott munkánk folytatásához.

Szeged, 2024. 04. 10.

Dr. Buzás Krisztina