

## Válaszok Prof. Dr. Oláh László bírálataira

Tisztelettel köszönöm Oláh Professzor úr pozitív értékelését, válaszaimat az alábbiakban részletezem:

1. A 8. oldalon a 2. ábra nehezen érthető. Négy görbe különíthető el, de nem világos melyik-melyik, a háromszög szimbólummal jelölt görbe nyilván a myogén reguláció hatását demonstráló görbe, de erre egyértelmű utalás nincs, csak kikövetkeztetni lehet.

Válasz:

Az izolált agyi erek nyomás-indukálta, myogén válaszát bemutató ábrán  $n=6$  izolált egér artéria cerebri media nyomás-indukálta válaszána szummációs görbéje látható, ezt mutatja a háromszög szimbólumokat és szórás értékeket tartalmazó vonal. Amint az az ábra alá írásban jelezve van, a szimbólum nélküli görbék az erek passzív, nyomás-indukálta átmérő értékeit mutatják. Az ábrán magán nem jeleztük külön felirattal, hogy melyik az aktív és melyik a passzív görbe.

2. 12. oldal: Többször említi az ATP szerepét a neurovaszkuláris kapcsolás regulációjában, de utalásokat tesz arra is, hogy ennek metabolitjai (ADP, adenzin) okozzák a reaktív hiperémiát. Ezt szerencsés lett volna egyértelműbben jelezni.

Válasz:

Köszönöm az észrevételt. Tekintettel arra, hogy az ATP szerepét a neurovaszkuláris kapcsolásban a disszertációban szereplő dolgozatok nem vizsgálták, azzal csak egyéb, saját eredményeink rövid összefoglalásával foglalkoztam.

“Az egyik legfontosabb jelzőmolekula, amelyen keresztül az astrocyták egymással és más sejtekkel kommunikálnak, az ATP (és metabolitjai, az adenzin és ADP). Mivel az ATP közvetlenül kapcsolódik az astrocyta metabolizmushoz, logikus feltételezni, hogy a purinerg útvonalak részt vesznek a neurovaszkuláris kapcsolásban. Valóban, részben kutatócsoportunk bizonyította, hogy az astrocyta eredetű ATP, miután adenzinná hidrolizálódott, hozzájárul az agyi reaktív hiperémiához a vaszkuláris simaizomsejtek A<sub>2A</sub> purinerg receptorain keresztül. Ezen az útvonalon kívül a neuronális aktiváció hatására felszabaduló astrocyta-eredetű ATP az endotheliális P<sub>2Y1</sub> receptorokra is hat, rajtuk keresztül indukálja az endothelialis NO termelődését és az ezt követő értágulatot [62, 67-69].”

3. A 11-13. oldalakon az aktív agyi területek vérellátásáról ír, megemlítve számos, a neuronális aktivitás okozta hiperémia kialakulásáért felelős folyamatot. Korábban erős szabályozó hatást tulajdonítottak az anyagcsere során felszabaduló CO<sub>2</sub>-nak, laktátnak. Mi a szerző véleménye ezek vazodilatációt okozó hatásáról a neurovaszkuláris kapcsolásban?

Válasz:

Az opponens egy, az agyi véráramlás szervezés központi jelentőségű vonására kérdez rá. Az agyi perfúzió végső meghatározója az agyi véráramlás szervezésben részt vevő mechanizmusok szummációs dilatátor vagy konstriktor hatása. Erre példa a disszertációban is bemutatott jelenség, amikor a magasvérnyomás által fokozott konstriktor anyag (20-HETE) termelése nem “hagyja” érvényesülni az egyidejű traumás agy károsodás következtében

fokozott dilatátor hatást. Ennek megfelelően az agyi erek fokozott összehúzódást mutatnak a nyomás növekedésével szemben.

Mind a CO<sub>2</sub> (lokális szöveti és vérben lévő), mind a laktát a neurometabolikus kapcsolat központi jelentőségű negatív feed back szabályozói. Azonban, egészséges körülmények között a neurovaszkuláris hiperémia egy feed-forward mechanizmus (az aktiválódó terület közvetlenül okoz pozitív választ). Azonban, a fent bemutatott logika mentén, az aktiváció-kiváltotta hiperémiát az említett mediátorok természetesen alapvetően befolyásolhatják. Ez egy fontos metodikai aspektust is felvet. Pl., ha az alap, bazális véráramlás a magasabb CO<sub>2</sub> szint miatti dilatáció következtében magasabb, akkor egy kisebb neurovaszkuláris hiperémia azt a látszatot kelti, mintha az aktivált neuronális területek ellátása deficiens lenne, miközben abszolút értékben a “peak” agyi perfúzió nem változik. Ez minden mérésnél figyelembe veendő körülmény.

4. A 16. oldalon szerepel: Fiatal, normotenziós kontroll egerekből izolált arteria cerebri mediában (MCA) az intravaszkuláris nyomás növekedése, kb. 60 Hgmm-nél kezdődve, myogén összehúzódást váltott ki, majd a myogén konstriktió közel azonos szinten maradt ~120 Hgmm-ig, átfedve az *in vivo* látott autoregulációs tartománnyal. Sajnos nem szerepel, hogy ez szisztolés vérnyomás vagy artériás középvérnyomás? Ugyanígy az 5. ábra vérnyomást jelző tengelyein sincs jelölve, hogy mely vérnyomásértéket látjuk, bár az 5. ábra A és B részeit magyarázó ábraaláírásban már szerepel a szisztolés vérnyomás megjelölés.

Válasz:

Az izolált erek esetén a nyomásértékek a miográf kamrában beállított értékek, az *in vivo* kísérletek esetén a szisztolés nyomásértékek.

5. A 20. oldal utolsó és 21. oldal első fejezetében hiányoltam a pericyták számának, a kapillárisűrűségnek, s a mikroglia aktivációnak a változását bemutató számszerű eredményeket, esetleg azok ábrákon történő bemutatását. Szokatlan, hogy az Eredmények fejezetben szereplő állítások mögött nem látunk számszerű adatokat.

Válasz:

Köszönöm a megjegyzést. Bár az említett értékek relatív változása és annak szignifikáns volta jelezve van a szövegben, egyet értek, hogy szerencsésebb lett volna ezen eredményeket is ábrával demonstrálni. Annak kihagyását a fejezet hosszának csökkentése és áttekinthetőségének növelése miatt tettem.

6. A 22. oldalon írja, hogy hipertóniás állatokban az autoregulációs görbe jobbra tolódik. Ez jelenti-e azt, hogy a kisebb nyomástartományokban károsodik az autoreguláció? Más szóval, jobbra tolódás, vagy kiszélesedés történik? A III.1. fejezetben, melyben a hipertónia és öregedés autoregulációra gyakorolt hatását vizsgálták, mértek-e a relatív véráramlás mellett abszolút vérátáramlást? Ha igen, a kapilláris denzitás csökkenés együtt járt-e agyi vérátáramlás csökkenéssel?

Válasz:

Hipertóniában feltehetőleg az autoregulációs görbe jobbra tolódása következik be (Circulation. 1976;53:720–727, Cerebrovasc Brain Metab Rev 1990;2:162–192), a klinikai tapasztalatok is ezt támasztják alá. Ennek megfelelően az autoregulációs tartomány alsó nyomásértéke is magasabb lesz, a krónikusan magasvérnyomásos állatok és emberek kisebb vérnyomás csökkenést tolerálnak megtartott agyi perfúzióval (bár vannak ennek ellentmondó eredmények is) (Hypertension. 2005;45:216–221, Hypertension. 2007;49:1149–1155). A



bemutatott dolgozatokban jól kontrollált módon a nyomásnövekedésre adott áramlási és érválaszokat vizsgáltuk. A nyomás csökkenésére bekövetkező dilatáció feltehetőleg egyéb vaszkuláris mechanizmusoknak köszönhető, abban szerepet játszhat a hypoperfúzió során felszaporodó adenozin (J Cereb Blood Flow Metab 2010;30:808–815). A jobbra tolódásban ezen mechanizmusok megváltozása, valamint az erek strukturális átépülése (remodeling) egyaránt szerepet játszhatnak.

Ezekben a vizsgálatokban (tekintettel az autoregulációs funkció relatív jellegére, valamint a hasonló kiindulási érátmérő értékekre) abszolút agyi véráramlást nem mértünk, a látott kapilláris sűrűség csökkenés minden bizonnyal csökkent szöveti perfúzióhoz vezet, ami feltehetőleg hozzájárul a neuronális diszfunkció kialakulásához (J. Clin. Invest., 120 (2) (2010), Microvasc Res. 2022 Mar;140:104300).

7. 26. oldal, 11. ábra, ábraaláírás: '...ha a perfúziós nyomás növekszik, az autoregulációs diszfunkció agyi hyperperfúziót eredményez, ami megnövekedett koponyaűri nyomáshoz, citotoxikus és vazogén ödéma kialakulásához vezet. Az oxigén- és tápanyagellátás ebből eredő csökkenése hozzájárul az agyszövet másodlagos károsodásához.' Kérdés: hogyan okoz a hiperperfúzió citotoxikus ödémát?

Válasz:

A citált szövegben a citotoxikus és vazogén ödéma nem megfelelő sorrendisége a félrevezető. Az autoregulációs diszfunkció a vaszkuláris kompartment volumenének megnövekedésével, a vér-agy gát károsodásával vazogén ödéma kialakulásához vezet, ami a lokális perfúzió károsodásán keresztül járulhat hozzá a citotoxikus ödémához. A leírtak lényegi üzenete egy önerősítő kör létrejötte, ami az agyödéma folyamatos növekedéséhez vezet.

8. A 31. oldalon szerepel: 'Mind a megnövekedett térvolumen, mind a vazogén ödéma hozzájárul a koponyaűri nyomás emelkedéséhez, különösen akkor, ha az intracranialis compliance a citotoxikus ödéma miatt eleve csökkent.' Mit ért az alatt, hogy az „intracranialis compliance a citotoxikus ödéma miatt eleve csökkent”. A citotoxikus ödéma az IC tér megnövekedését jelenti az EC tér rovására. Miért csökken emiatt az intracranialis compliance?

Válasz:

Súlyos koponya sérülés után a sejtek energiaháztartásának felborulásával a normális iongrádiensek megváltoznak, a sejtekbe (neuronokba, astrocytákba) extracelluláris kationok (főként  $\text{Na}^+$ ) áramlanak, amiket anionok és víz követnek, a sejtek osmoticusan megduzzadnak, volumenük megnövekszik (Neurosurg Focus. 2007 May 15;22(5):E2). Mindez az EC tér rovására történik, amibe azonban transzkapilláris ion és folyadék áramlás történik, ami szöveti duzzadásként manifesztálódik, intracranialis nyomás növekedéshez vezet (Lancet Neurol. 2007;6:258–268. doi: 10.1016/S1474-4422(07)70055-8). Ennek megfelelően az intracranialis compliance, az intracranialis tér volumen növekedést kompenzálni tudó képessége csökken. Amennyiben ilyen esetben autoregulációs zavar is fennáll, úgy a nagyobb intravasculáris volumen intracranialis nyomás növelő hatása kevésbé kompenzálható, valószínűleg kisebb volumen emelkedés nagyobb nyomásnövekedést idéz elő. Ezen túlmenően a kialakuló, és a vér-agy gát zavar miatt tovább fokozott vazogén ödéma a citotoxicus ödéma rosszabbodásához vezet, és egy önerősítő kör jön létre, ami az intracranialis nyomást folyamatosan növeli (Neurosurg. Focus 22, E1 2007, Lancet Neurol 6, 258–268. doi: 10.1016/S1474-4422(07)70055-8 2007, Neurosurg. Clin. N. Am 27, 473–488 2016).



9. A 35. oldalon írja: 'Az SHR-ek vérnyomása szignifikánsan magasabb volt, mint a normotenzív patkányoknak (Wistar:  $109 \pm 3$  Hgmm, SHR:  $183 \pm 3$  Hgmm).' Nem szerepel, hogy milyen vérnyomásértékről van szó. Szisztolés vérnyomás? Minden bizonnyal!

Válasz:

Szisztolés vérnyomásértékek szerepelnek a leírásban.

10. Ugyancsak a 35. oldalon: 'Két héttel az mTBI után a hipertóniás patkányok agyi ereinek simaizom és endothél rétegében egyaránt fokozott DHE festődés oxidatív stressz jelenlétére utalt.' Miért pont 2 héttel a trauma után vizsgálták az oxidatív stressz hatását?

Válasz:

Korábbi vizsgálatainkban azt találtuk, hogy 2 hetes SS31 kezelés eredményesen csökkentette az öregedés által okozott cerebrovasculáris oxidatív stresszt (Aging Cell. 2018 Feb 6;17(2):e12731). A disszertációban bemutatott kezelési protokollt erre a publikációra alapoztuk.

11. A 36. oldalon írtak szerint 'A spontán hipertóniás patkányok izolált agyi artériáinak simaizom- és endotheliális rétegeiben a DHE és MitoSox fluoreszcenciával jelzett, enyhe TBI által kiváltott cerebrovaszkuláris oxidatív stressz szignifikánsan csökkent a NADPH-oxidáz inhibitor apocinin jelenlétében.' Valójában ez csak az endothelium esetén volt igaz, a simaizomsejtekben nem, legalábbis a 18/ A ábráról ez olvasható le.

Válasz:

Az opponens felvetése jogos, a simaizom rétegben a hatás a szignifikancia szint felé tendált ( $p=0.057$ ) -feltehetőleg az adatok nagyobb szórása miatt- de azt nem érte el.

12. Általános kérdés: ROS scavenger-ek-vel van-e pozitív tapasztalat humán vizsgálatokban?

Válasz:

A disszertációban vizsgált drogok klinikai vizsgálatát illetően nagy betegszámú vizsgálat egyelőre nem áll rendelkezésre a resveratrol agyi véráramlásra és kognitív funkcióra gyakorolt hatásáról. Amint Klekner tanár úrnak adott válaszomban is említettem, folyamatban van egy multicentrikus vizsgálat REVAMP (REsveratrol for VAscular cognitive impairment investigating cerebral Metabolism and Perfusion) (Front Nutr. 2024 Apr 23;11:1359330) néven. Ebben carotid stenosisban szenvedő betegeket ( $n=50$ ) kezelnek resveratrollal vagy placeboval ( $n=50$ ) 35 hétig. Végpont a kognitív státusz felmérése, másodlagos cél  $O^{15}$  pozitronemissziós tomográfiával az agyi véráramlás és véráramlási válaszok meghatározása.

Egy placebo kontrollált, 22 egészséges személyt bevonó vizsgálatban Kennedy és mtsai (Am J Clin Nutr 2010; 91: 1590-1597) mutatták ki, hogy napi 250-500 mg resveratrol kognitív tesztek végzése során a prefrontális kéreg véráramlásának növekedését idézi elő. Witte és mtsai 23 túlsúlyos beteget vizsgálva kimutatták, hogy 200mg/nap resveratrol 26 hét után a memóriefunkció javulását, valamint erősebb hippocampalis funkcionális konnektivitást eredményez.

A resveratrol kezelés endothel funkcióra gyakorolt hatására emberekben Gimblet és mtsai eredményei mutatnak rá (Clin J Am Soc Nephrol. 2024 Feb 1;19(2):161-168). Randomizált multicentrikus vizsgálatukban bemutatták, hogy krónikus vesebetegségben és diabetesben szenvedő betegeknél 6 hét resveratrol kezelés fokozta a brachiális artériában mért endothel-függő áramlás-indukálta dilatációt. Ez arra utal, hogy a betegek endothel funkciója javult.

Az SS31 vizsgálatát illetően eddig pozitív eredményű, nem multicentrikus vizsgálatok szív érrendszeri betegségekben, mitokondriális myopathiában szenvedő betegekben, valamint vesebetegekben történtek (Circulation-Cardiovascular Interventions, vol. 10,no. 9, 2017).

13. Krónikus hipertóniában az autoregulációs görbe jobbra tolódik. Van-e adat arra, hogy sikeres hipertónia kezelést követően, visszaáll-e az eredeti vérnyomás-vérátáramlás autoregulációs kapcsolat?

Válasz:

Az autoregulációs funkció ilyen jellegű vizsgálatáról nem tudok (Circ Res. 2019 March 29; 124(7): 1025–1044). Logikus feltevés, hogy amíg a jobbra tolódás funkcionális eredetű (fokozott konstrikciónak köszönhető), addig feltehetőleg vissza fordítható. Amikor a rezisztencia növekedés morfológiai eredetűvé válik, annak reverzibilitása feltehetőleg nehezebben elérhető.

14. 47. oldal: Nem lát-e ellentmondást azon állítások között, hogy a farmakológiai kezelés nem befolyásolta a kérgi kiváltott válaszokat, ugyanakkor a neurovaszkuláris szétkapcsolás az agyi extracelluláris glükóz szint neuronális aktivációt követő csökkent növekedésével járt, mégha az oly kismértékű volt is. Másként fogalmazva, a normális neuronális aktivációhoz nem szükséges a standard körülmények közötti glükóz szint emelkedése?

Válasz:

A dolgozatban szereplő vizsgálatokban az extracelluláris glükóz szint meghatározása a neurovaszkuláris hyperaemiás válasz során az érválaszt jellemző addicionális paraméternek tekinthető (az eredeti szövegben "surrogate" áll), ami demonstrálja, hogy nem csak a perfúzió, hanem a területre szállított anyagok mennyisége is csökken. A kérdés megválaszolásához a sejtek glükóz felvételét, metabolizmusát, a szinaptikus folyamatok *in vivo* változásait stb. is vizsgálni kellene.

15. 53. oldal, 26. abra: 'Az ábrán kontroll, festetlen sejtek is láthatók', írja. Az ábrán nem láthatók sejtek, csak azok számát tüntette fel a szerző.

Válasz:

A flow citometriás eredeti ábrán ugyan festetlen sejtek is szerepelnek, de valóban, a sejtek morfológiai megjelenésükben nem láthatók. Köszönöm az igen alapos átnézést, átolvasást.

16. 58. oldal: Mi az a TBG-eGFP-AAV8?

Válasz:

Az IGF-1 hiányos állatokhoz kontrollként használt állatok pontos megnevezése (amelyek esetében a beadott adenovírusához nem Cre rekombináz, hanem zöld fluoreszcens fehérje kifejeződés asszociált).

17. 59. oldal: Az IGF-1 hiány vizsgálatának Eredmények fejezetében írja: 'Mindez azt jelzi, hogy az IGF-1 hiány által kiváltott neurovaszkuláris szétkapcsolás a térbeli munkamemória károsodásával és az újdonságkereső magatartás csökkenésével is összefüggésbe hozható.' Ez a mondat nem az Eredmények, hanem a Megbeszélés fejezetbe illik. Továbbá, mivel az IGF-1



hiánynak egyéb hatásait nem vizsgálta, ez a megállapítás, legalábbis az ok-okozati kapcsolat megkérdőjelezhető.

Az 59. oldalon kezdődő 'Az IGF-1 hiány károsítja a cerebro-mikrovaszkuláris endothel funkciót, ami hozzájárul a neurovaszkuláris szétkapcsoláshoz' alfejezet egy része sem az Eredmények, hanem a Megbeszélés fejezetbe illik, hisz nem eredményekről szól, hanem magyarázatokról, feltevésekről. Pl.: 'Ez alátámasztja azt az elképzelést, hogy az IGF-1-hiány károsítja a cerebromikrovaszkuláris endothel funkciót. A perifériás keringés ereiben az IGF-1 csökkenti a vaszkuláris oxidatív stresszt és javítja az endothel funkciót [224].'

Válasz:

Köszönöm, hogy Professzor úr ezekre a stilisztikai kérdésre felhívta a figyelmemet. Az eredmények leírása után, a könnyebb érthetőség kedvéért röviden az eredményeket a vizsgálat kontextusába szoktam helyezni. Természetesen az eredmények objektív leírásának ez nem megy a rovására.

18. A 60. oldalon az A ábrarész, ha jól értem, a whisker stimuláció kiváltotta áramlási válasz csökkent (kisebb mértékű) csökkenését mutatja az IGF-1 hiányos állatokban. Direktebb lett volna, ha az L-NAME jelenlétében mutatja a CBF válasz nagyságát, s az is jól mutatta volna, hogy az L-NAME okozta áramlási válasz csökkenés kisebb volt az IGF-1 hiányos állatokban. Utána még meg lehetett volna mutatni ezt az A ábrarészt is, mint ezt teszi is a 32. ábrán. A 33. ábrán ismét elmarad majd az indomethacin, MS-PPOH és HET0016 jelenlétében mért relatív áramlási válasz bemutatása a kontroll és IGF-1 hiányos állatokban, s már csak a válaszok különbségét látjuk.

Válasz:

A neurovasculáris hyperaemia létrejöttében több egyidejűleg aktiválódó dilatátor útvonal vesz részt. A különböző útvonalak IGF-1 hiány által okozott megváltozott hatásának vizualizálása miatt döntöttünk úgy, hogy az említett dolgozatban (Aging Cell. 2015 Dec; 14(6): 1034–1044) az egyes antagonisták által blokkolt útvonalak vizsgálati csoportok közötti különbségét mutatjuk meg. Ezáltal látható, hogy a teljes hyperaemiás válasz mekkora hányadáról mekkora hányadára csökken az adott mediátor út hatása IGF-1 hiány jelenlétében.

19. 85.o A VI.4. alfejezetben a Módszereknél írja, hogy az MCA-k nyomás által kiváltott átmérő válaszait, valamint az a. basilaris összehúzóási képességet vizsgálták a TXA2 receptor agonista U46616 vazokonstriktor adásával szemben. Mi az oka, hogy a kísérlet egyik részében MCA-t, másik részében a. basilarist használtak?

Válasz:

Az agonistákra adott érválaszok esetében drót myográfia alkalmazásával gyorsabban, több eret lehet egyszerre vizsgálni. Ehhez a megfelelő méretű ér az a. basilaris volt. Tehát pusztán metodikai megfontolásból vizsgáltunk eltérő cerebrális eret.

20. A 91. oldalon az arterial spin labeling módszerrel végzett perfúziós MR vizsgálatoknál írja, hogy 'Az állatokat izofluránnal, arcmaszk használatával altattuk, a légzésszám fiziológiás tartományban tartása mellett.' Hogyan tartották a légzésszámot fiziológiás tartományban?

Válasz:

A vizsgálatok a University of Oklahoma MRI Core Facility-jében történtek publikált protokollok szerint. A légzésszámot fiziológiás tartományban az altatás mélységének szabályozásával tartották.

21. Az ábrákon rendre nem szerepel, hogy milyen adatokat látunk. Átlag±SD, átlag±SE? A Módszerek fejezetben a Statisztikai elemzések részénél már jelzi a szerző, hogy átlag±SEM-et ábrázol.

Válasz:

A Módszerben leírtaknak megfelelően mindenhol átlag±SEM, amennyiben eltér, ott helyileg jelezve van.

Tisztelettel:



Dr. Tóth Péter József

Pécs, 2025.01.07.