

Válasz Prof. Dr. Wiener Zoltán egyetemi docens opponensi véleményére

Szeretném megköszönni a dolgozatom körültekintő áttekintését, a pozitív bírálatot, valamint az egyes területek tovább gondolását inspiráló kérdéseket. Ezekre a válaszaim a következők:

1. *A 22. ábrán anti-IgG jelenlétében a P13K és PKC inhibitorok esetében szignifikáns eredményt kaptak, míg a p38 és a TAK1 gátló alkalmazásakor hasonló mértékű, de 'nem szignifikáns' az eltérés. Mit gondol, az elemszám növelésével előfordulhat-e, hogy ebben a két utóbbi esetben is szignifikáns lesz az eredmény, amely megváltoztathatja a jelátviteli útvonalak aktiválódásával kapcsolatos következtetéseket?*

A 22 ábrán bemutatott eredményeink szerint a CpG PKC és p38, az IgG pedig PKC és PI3K függő túlélőjeleket aktivál 4 független kísérlet eredményeként $p < 0,01$ -es szignifikanciával. A p38 és a PI3K jelpályáinak eltérő szerepét egy másik módszerrel is kimutattuk a 23. ábrán. Ezek alapján úgy gondolom a bemutatott adatok valós különbségeket jelentenek.

2. *Az 57. oldal alapján a T sejtek felülűszoja és a rekombináns FasL eltérő apoptózis mechanizmust indukál, RIPK1 függően vagy függetlenül. Mi lehet ennek a magyarázata, és a jelentősége? A végeredményt tekintve (sejthalál) várható-e eltérés?*

A T sejtekből származó vezikulumokkal több közlemény foglalkozik (két vonatkozó review: 10.3389/fcell.2016.00084, 10.1155/2021/8481013), ezen belül a citotoxikus T sejtek (CTL-ek) FasL tartalmú vezikulum szekrécióját több publikáció kimutatta, humán sejtek esetében is (10.4049/jimmunol.163.3.1274, 10.3389/fimmu.2021.804895). Ezek a vezikulumok többek közt kemokineket, integrineket, MHC molekulákat, kostimulátor molekulákat, e mellett perforint és granzimeket és további TNF családba tartozó ligandumokat TRAIL, GITR tartalmazzak, melyek részt vehetnek a sejthalál szabályozásában (10.4049/jimmunol.163.3.1274).

Eredményeink szerint a rekombináns FasL más sejthalál folyamatokat aktivál, mint a CTL-ek sejtek FasL-ot expresszáló vezikulumai. Az eltérés legvalószínűbb magyarázata, hogy a vezikulum egyéb komponensei módosítják a FasL-indukált sejthalált. Sajnos semmilyen irodalmi adat nem utal erre a folyamatra, így a potenciális módosító ágens lehet fehérje, peptid, lipid, sejt permeábilis, vagy a vezikulummal a sejtbe jutó modulátor etc. Jelenlegi irodalmi adatok szerint (melyek nem a T sejt vezikulumokra vonatkoznak) a SMAC mimetikumok vagy a TAK1 inhibitorok jelenlétében a Fas függő sejthalál Fas és RIPK1 függő sejthalál folyamattá alakul. Ezeknek T sejt vezikulumokban történő kimutatására vonatkozó vizsgálataink nem vezettek sikerre.

A Fas receptor esetében ismert RIPK1 függő és független sejthalál út is. Jelátvitelét és feltehetően immunológiai kimentét tekintve is különbözik a RIPK1 függő és független apoptózis. E mellett a RIPK1 függő folyamat lehet apoptotikus vagy nekroptotikus is (10.1016/j.tcb.2019.12.009).

A sejthalál útvonalak párhuzamos aktiválásának a fertőzött sejtek elpusztításában lehet kulcsszerepe. Az intracelluláris kórokozók általános stratégiája a sejthalál gátlása. Míg a rekombináns FasL csak FADD függő apoptózist indukál, a CTL-ből származó vezikulumok, többféle apoptotikus és többféle szabályozott nekroptotikus jelpályát is egyidejűleg, ezzel csökkentve a kórokozó túlélési esélyeit.

3. *A 61. oldal szerint a dendritikus sejtek (DC) TNF szekréció által indukálnak sejthalált, ugyanakkor a TNF nem minden sejten hatásos. Megfigyelhető-e korreláció a DC-k sejt-specifikus hatása és az egyes sejt-típusok TNF-re való érzékenysége között? Az érett DC-k is RIPK1 függően fejtik-e ki a hatásukat?*

Több sejt típuson teszteltük az éretlen dendritikus sejtek (DC) citotoxikus hatást. Csak olyan sejteken figyeltünk meg sejthalált, amelyek TNF szenzitívek (HT29, Huvec, Jurkat), de nem minden TNF-re érzékeny sejt-vonal esetében volt hatásos a DC felülűszó (pl. SW480 adenocarcinoma sejt-vonal, amely az irodalmi adatok szerint érzékeny TNF-re (10.1038/s41420-024-01984-7)). Az LPS, vagy CL075 által aktivált éretlen dendritikus sejtek TNF termelése jellemzően 400-500pg/ml volt, a kísérletesen használt TNF koncentráció pedig általában 10ng/ml körüli. Ez magyarázhatja, hogy csak bizonyos sejteken volt citotoxikus hatása a DC-eknek. Pontos korreláció felállításhoz azonban nem vizsgáltunk elég sejt típust.

Az érett DC-ek felülűszója, még aktivációt követően is, jelentősen kisebb citotoxikus hatást mutatott, mint az éretlen DC-eké, így ennek RIPK1 függése nem volt kimutatható. (A csökkenés mértéke nem volt szignifikáns).

4. *A 74. oldalon felmerül, hogy az 5Z-7/Z-VAD indukált nekroptózis egy potenciális terápiás lehetőség a tumor mikro-környezetben a pro/antiinflammatorikus makrofágok egyensúlyának szabályozására. Minthogy a nekroptózis más sejtekben is indukálódhat, hogyan lehetne ezt az eredményt a makrofágokra specifikussá tenni, amely klinikailag is használható lenne?*

A makrofágok más sejt-típusoknál érzékenyebbek több szabályozott nekrotikus sejthalálra, így a nekroptózisra és a piroptózisra is. Z-VAD kaspáz gátló jelenlétében sok sejt típus érzékeny nekroptózisra, de csak sejthalál ligandum és SMAC mimetikum/TAK1 inhibitor jelenlétében. A makrofágok azonban, saját eredményeink szerint is, sejthalál ligandum nélkül is elhalnak SMAC mimetikum vagy TAK1 inhibitor és Z-VAD együttes kezelésre. Feltételezhetően autokrin TNF termelés is részt vesz ebben a folyamatban (10.1038/cddis.2012.64). Elméletileg tehát beállítható ezen szerek olyan dózisa, ami csak a makrofágok sejthalálát indukálja. Mind a SMAC mimetikumok, mind a TAK1 inhibitorok lehetséges alkalmazását több, már klinikai fázisban levő kutatás vizsgálja (10.3390/cells9020406, 10.1038/s41388-019-1088-8).

5. *A 77. oldal meglepő eredménye, hogy a hasonló kémiai jellemzőkkel rendelkező kemoterápiás szerek eltérő hatást váltanak ki a DC-k differenciálódására, illetve kemotaxisára is. Hogyan magyarázná a jelölt a gyakran egymással ellentétes adatokat? Van-e ezek alapján olyan, átfedő spektrumú hatóanyag, amelyet előnyben kellene részesíteni másokkal szemben a gyakorlatban?*

A hasonló kémiai jellemzőkkel rendelkező kemoterápiás szerek eltérő működését több esetben leírták. Egyes kemoterápiás kezeléseknél az epirubicint előnyben részesítik a doxorubicinnal szemben, mivel úgy tűnik, hogy kevesebb mellékhatást okoz (10.1111/febs.15583), hasonlóan a ciszplatin és oxaliplatin mellékhatási is különböznek. Eredményeinkben a legnagyobb különbségeket a platina alapú szerek és az antraciklinek között figyeltük meg, de a hasonló hatásmechanizmusú szerek is bizonyos esetekben eltérően viselkedtek. A ciszplatin és oxaliplatin összehasonlításában nem csak a mellékhatásuk különböző, de vastag- és végbélrák és más gyomor-bélrendszeri rák kezelésére csak az oxaliplatin hatásos (10.1016/j.phrs.2022.106556). Az oxaliplatin kevesebb DNS kereszt-kötést hoz létre bázisonként, mint a ciszplatin, ezért az oxaliplatin a ciszplatinnal ellentétben nem (csak) közvetlenül a DNS-károsodáson keresztül pusztítja el a sejteket, inkább riboszómális stressz válasz indukálásával (10.1038/nm.4291). A ciszplatin- vagy oxaliplatin-rezisztens sejt-vonalak általában nem mutatnak kereszt-rezisztenciát (10.1038/nm.4291). Az epirubicin/doxorubicin esetében nem tudok a hatásmechanizmusukat érintő különbségről, eltérő klinikai alkalmazásuk farmakokinetikai különbségekre vezethető vissza (10.2165/00003495-199753030-00008).

Vizsgálataink a szerek primer humán makrofágokra, dendritikus sejtekre gyakorolt hatását vizsgálták, ami a terápiás szempontoknak egy új eddig nem tanulmányozott, de kisebb aspektusa. Ez alapján konkrét klinikai ajánlásokat nem mernék tenni. Ha a két felcserélhető szer a többi fontosabb paraméterben hasonló hatást mutat, akkor eredményeink figyelembe vehetőek. Mivel a checkpoint inhibitorok használatakor felmerül ko-terápiák alkalmazása, ezért az egyes kemoterápiás szerek immunmoduláló hatására vonatkozó eredmények felértékelődhetnek. Feltétlen a vizsgálatok folytatására van szükség, például, hogy hogyan hatnak a vizsgált kemoterápiák a tumorsejtek és immunsejtek együttes jelenlétében, meghatározva a tumorra és a makrofágokra/dendritikus sejtekre gyakorolt hatásukat is.

Végezetül ismét szeretném megköszönni Wiener Zoltán professzornak a dolgozatom alapos értékelését és pozitív véleményét. Bízom benne, hogy a kérdéseire és észrevételeire adott válaszaimat is megfelelőnek találja.

Debrecen, 2024. december 18.



Koncz Gábor