

Válasz Prof. Dr. Molnár Béla opponensi bírálói véleményére

Először is szeretném megköszönni Professzor Úrnak az MTA doktori értekezésem bírálatát, dicsérő szavait, építő jellegű kritikáit és tartalmas kérdéseit. Észrevételeire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok:

Professzor Úr a metodikai egységesség hiányát kifogásolja. Ez egyfelől hátrány, másrészt viszont ennek előnyeit szeretném megvilágítani. Véleményem szerint a módszerek különbözősége egy dinamikus fejlődés eredménye, melyet leginkább a projektekkel kapcsolatban felmerült új ötletekkel, új metodikák beállításával és új kollaborációs partnerek bevonásával tudok magyarázni. A Pancreas laboratóriumba 1999-ben kerültem Ph.D. hallgatóként. Az azóta eltelt több, mint 10 évben szerencsére több különböző irányba is sikerült bővíteni metodikai repertoárunkat. Bár az RT-PCR technika már régebb óta elérhető a laboratóriumunkban, ezt az akut pancreatitis vizsgálatokhoz valóban nem használtuk. Ez főleg a pancreasból való RNS izolálás nehézségeinek tudható be (a pancreas tele van RN-ázzal és nagyon nehéz belőle intakt RNS-t izolálni), főleg ami az akut nekrotizáló pancreatitis hasnyálmirigy mintákat illeti. Kísérleteinkben éppen ezért inkább a fehérje expressziós vizsgálatokra (pl. ELISA, Western blot) törekedtünk. A bíráló által felvetett teljes genom vizsgálat mindenképpen jó gondolat. Köszönöm az ötletet a humán és nem invazív pancreatitis modellek genomikai vizsgálatára. Ez irányba a későbbiekben vizsgálatainkat kibővítjük.

A kísérletekhez használt optimális elemszám kiválasztásánál állatetikai, anyagi, helyi- és időbeli megfontolásokat is figyelembe vettünk. Minden esetben törekedtünk annak a minimális elemszámnak a használatára, ami még nem veszélyezteti a statisztikai analízist. Az egyes csoportokban így jellemző módon hatos elemszámot használtunk. Ez a kontroll csoportra is ugyanúgy igaz.

A statisztikai analízis leírása valóban elég rövidre sikerült. Az analízishez többfajta programot is használtunk. Az egyszerűbb számításokhoz Microsoft Excelt használtunk, a bonyolultabb statisztikai kiértékeléseket SPSS és SigmaPlot programokkal végeztük el.

Számunkra is igen érdekes volt az, hogy a 2,9 g/kg L-citrullin *i.p.* injekciója nem okoz akut pancreatitist. Az L-citrullin dózisa ekvimoláris volt az L-argininével, illetve az L-ornitinével,

így nem valószínű, hogy emiatt nem alakult ki pancreatitis a patkányokban. Mindenesetre ennél nagyobb dózis alkalmazását mi nem próbáltuk. A strukturális különbözőség mindenképpen lehet egy magyarázat, hiszen az L-citrullin neutrális pH-n nem bázikus aminosavként viselkedik. Sokkal könnyebb magyarázatot találni az L-hisztidin és a D-ornitin hatástalanságára. Az előbbi aminosav a legkevésbé bázikus a bázikus aminosavak közül, ráadásul nem egy alifás, hanem egy cirkuláris oldallánccal rendelkezik.

Véleményem szerint az L-arginin *i.p.* injekciójának hatása az I κ B és NF- κ B fehérjék expressziójára/aktivációjára nem feltétlenül független a beadott dózistól. A dózis-hatás görbe valószínűleg egy fordított haranggörbe alakot írhat le. Nem publikált eredményeink szerint a kis dózisú L-arginin - mely akut pancreatitis nem okoz - ugyanúgy képes indukálni a HSP fehérjék szintézisét. A 4 g/kg L-arginin *i.p.* injekciója már szisztémás toxicitást okozott, amely mindenképpen befolyásolhatja az NF- κ B aktivációt is. Vizsgálati eredményeinkből azt nem tudjuk megállapítani, hogy az NF- κ B aktiváció milyen sejtekben jön létre (pl. acináris vagy gyulladásozó).

Valóban érdekes megfigyelés, hogy a gyulladásozó citokinek pancreaticus koncentrációja 18-36 óra után is magas marad. Ez magyarázható a NF- κ B aktiváció perzisztálásával, illetve más (általunk nem vizsgált) egyéb gyulladásozó transzkripciós faktorok aktivációjával is (pl. AP-1). A fokozott TNF- α és IL-1 β szintekért valószínűleg a pancreas elárasztó gyulladásozó sejtek a felelősek, hiszen az acinus sejtek nagy része a betegség során elhal.

A dolgozatban szereplő ábrán az L-ornitin szérumkoncentrációt az L-arginin injekció beadása után 2 órával néztük. Akkorra az L-arginin nagy része már lebomlik, és L-ornitin formájában lesz jelen a szérumban. Ezért magasabb az L-ornitin koncentrációja. Nem publikált eredményeink szerint az L-arginin *i.p.* injekciója után 1/2-1 órával az L-arginin koncentráció magasabb volt az L-ornitinéhez képest, így nem valószínű a lebomlás gátlása. Kísérleteinkből azonban egyértelműen kiderül, hogy az L-arginin nagy részét az argináz, és nem a nitrogén monoxid szintáz enzim metabolizálja.

Az időbeni különbség az amiláz és tripszin aktivitások változása között egy nagyon érdekes kérdés. Ez - legalábbis részben - a pancreas „non-paralell” enzim szekréciójának tulajdonítható. Az aminosav injekció hatására a pancreas valószínűleg tripszinogén

szekrécióval „válaszol”, ami a pancreas tripszinogén tartalmának csökkenésével fog járni. Másrésztől *in vitro* biokémiai eredményeink arra utalnak, hogy a bázikus aminosavak direkt módon is gátolják a tripszin aktivitást. A szérum amiláz aktivitásának fokozódása a bázikus aminosavval kiváltott pancreatitisek esetén igen kis mértékű, főleg, ha figyelembe vesszük azt is, hogy a pancreas akár 90%-a is nekrotizál. Az akut pancreatitis során kialakuló ascitesben viszont nagyon magas amiláz aktivitásokat mértünk. A nekrozis során az amiláz és valószínűleg a többi emésztőenzim is nagyrészt a peritoneumba juthat.

Az apoptózis kimutatására használatos módszerek közül az elektroforetikus assay bár rendkívül specifikus, mégis igen alacsony szenzitivitású. Mennyiségi összehasonlítások nem végezhetőek el, főleg akkor, amikor már nekrozis is jelen van a szövetben. A 24 órás képen pedig egyértelműen a nekrozis képe dominál, az apoptózisra jellemző DNS létrát elfedi. A TUNEL technika ellenben egy kvantitatív módszer, de nagyfokú nekrozis esetén már nem csak az apoptotikus sejtek jönnek fel pozitívként. A TUNEL technika kiértékelésénél szöveti területegységre adtuk meg az apoptózis rátát, ami nem teljesen veszi figyelembe az ödéma mértékét. Az erősen ödémás szövetben (a pancreas tömege 2-3-szorosára nő) ezért alulbecsüljük az apoptózis mértékét.

Professzor Úr teljesen jól látja az L-lizin távoli szervekre kifejtett hatását, ami lehet direkt és (az akut pancreatitis hatására kialakult) indirekt is. Az akut pancreatitist kiváltó bázikus aminosavak közül az L-lizin más szervi hatása a legerősebb. Jogos a mitokondrium funkcióra vonatkozó kérdése is. Az igazat megvallva ennél a projektnél merült fel először a mitokondriális károsodás központi szerepe a betegség kialakulásában. A mitokondriális funkció méréseket Gukovskaya Professzor Asszony munkacsoportja végezte el. Egy általam elnyert NF OTKA pályázatnak köszönhetően viszont a közeljövőben Szegeden is lehetőségünk lesz mitokondriális funkció mérésekre.

A szérum amiláz aktivitás az argináz enzim gátlásos kísérletekben nem változott szignifikáns mértékben. A szérum amiláz aktivitás csökkenése a többi bázikus aminosav modell esetén is megfigyelhető, főleg ami a későbbi időpontokat illeti (ld. pl. a 11/A ábrát az L-ornitinnel kiváltott akut pancreatitis esetében). A szérum- és pancreas amiláz aktivitásának csökkenése minden bizonnyal azzal magyarázható, hogy az acinaris állomány elpusztul, és egy ideig nem lesz túl sok amiláz a pancreasban. Mindez kihathat a vérben keringő amiláz aktivitásra is.

Mivel az argináz az urea ciklus egyik kulcs enzime, így a gátlószereknél mindenképpen felmerül a potenciális toxicitás problémaköre. Ezen vegyületek így nem hiszem, hogy használhatóak lennének a humán akut pancreatitis kezelésére. Meg kell jegyezni, hogy kísérleti jelleggel a tumor terápiában használják a rekombináns arginázokat (pl. Id. Lam és mtsai. Cancer Lett. 2009; 277:91-100). Ezek az enzimek az L-arginin lebontását katalizálják, amely a tumorsejtek citotoxicitásához vezet. Bár valóban szerencsés lett volna az állatok klinikai állapotának felmérése, ilyen adatokkal sajnos nem tudok szolgálni.

A metilspemidinnek nem volt védő hatása L-ornitin-indukálta akut pancreatitisben. Ez mindenképpen váratlan volt, hiszen az L-argininnel kiváltott betegségben megfigyelhető volt a metilspemidin jótékony hatása. Az L-argininnel kiváltott pancreatitis egy enyhébb lefolyású betegséget okoz, így elképzelhető, hogy az L-ornitines pancreatitisben a súlyosabb fokú nekrozist a metilált poliamin származékok már nem képesek kivédeni. Utókezelésben alkalmazva a metilspemidint a laborparaméterekben „inverz” reakciót észleltünk. A megfigyelés háttérében álló biokémiai folyamatok magyarázatára további kísérletek elvégzése szükséges.

A PDTC hatása dózisfüggő volt az L-arginin indukálta akut pancreatitisben. A 100 mg/kg PDTC dózisa valószínűleg már nem volt optimális a vizsgált folyamatok lefolyására, és több nem-specifikus hatást okozhatott. Meg kell jegyezni, hogy a patkányok nagy része ráadásul ezt a dózist már nehezen tolerálta, egy közülük el is pusztult.

Ismét szeretném megköszönni Professzor Úr értékes bírálatát. Köszönöm, hogy a nyilvános védelem kitűzését javasolta. Egyúttal kérem Professzor Urat válaszaim elfogadására.

Szeged, 2012-12-12

Tisztelettel:

Dr. Rakonczay Zoltán
tudományos főmunkatárs