

VÁLASZ OPPONENSI VÉLEMÉNYRE

Bíráló: Dr. habil. Rakonczay Zoltán, tudományos tanácsadó, MTA doktora

Tisztelt Tanár Úr!

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani akadémiai doktori értekezésem részletekbe menő bírálatáért. Köszönöm munkámat méltató elismerő szavait, melyek tartalmi és formai vonatkozásúak egyaránt, s nem utolsó sorban mindazokat az értékes megjegyzéseket és gondolkodásra ösztönző kérdéseket, melyeket az opponensi vélemény megfogalmaz.

A bírálat formai észrevételeit illetően őszintén el kell mondanom, hogy az értekezés írása során számomra is gondot okozott a latin írásmód magyar megfelelőjének következetes használata, amit tovább bonyolított az a tény, hogy igen sok angol nyelvű elnevezés napjainkra létjogosultságot nyert a magyar nyelvben, s nemcsak a mindennapi szóhasználatban, hanem a tudományos szakirodalomban is. Az értekezésemben – amint azt jeleztem is – a többségi irodalmi gyakorlathoz igazodtam, ami talán nem volt mindig egyértelműen sikeres az egységes nyelvhasználat szempontjából.

A rövidítéseket illetően, megértéssel fogadom, hogy nem könnyítik az Olvasó dolgát. Használatuk azonban a tudománygyógyászatban elfogadott, annál is inkább, mivel elhagyásuk értekezésem esetén nemkívánatos terjedelmnövekedést eredményezett volna.

Egyetértek azzal a bírálói megjegyzéssel is, hogy nem a magyar nyelv sajátja a tizedesjegyek ponttal való jelzése, helyesebb lett volna a vessző használata.

A bírálat általános tartalmi észrevételeivel kapcsolatban szeretném megjegyezni, hogy az értekezésben a jobb áttekinthetőség kedvéért tárgyaltam a „Betegek és módszerek” részt az „Eredmények” résszel együtt. Nevezetesen, az egyes betegcsoportok és a hozzájuk rendelt protokoll igencsak sokfélesége miatt, közvetlenül tárgyalásuk után tartottam célszerűnek bemutatni az eredményeket. Kétségtelen ugyanakkor, hogy a „Módszerek” részben fellelhetők bizonyos redundanciák, amelyek csökkenthetők lettek volna.

A tartalmi észrevételeket egyetértéssel fogadom, azzal a megjegyzéssel, hogy egy tudományterülettel való gondolati azonosulás gyakran elfedi egy-egy fogalom, vagy jelenség mindennapi egyszerű és szabatos megközelítését, használatát. Például: Cl^- , valóban felesleges

mellette az ion szó; ugyancsak felesleges százaz nagyságrend mellett tizedesjegyet is kiírni (120. oldal) és a „nem szignifikáns” szóhasználat is kerülendő.

Végül, a 163-165., valamint a 179. referenciák olyan saját közleményekre vonatkoznak, amelyek értekezésemben részletes tárgyalásra nem kerültek, de az adott témához kapcsolódtak és eredményeiket említésre érdemesnek tartottam.

A tartalmi vonatkozású opponensi kérdésekre pedig – azok sorrendjében – az alábbiakban szeretnék válaszolni:

1. Kutatómunkánk során a dohányzásról való leszokásnak a gyulladásos mediátorokra gyakorolt hatását nem vizsgáltuk. Közismert, hogy dohányzás elhagyását követően a fokozott légúti gyulladás továbbra is fennáll, ami gyakran megmutatkozik a biomarkerek magasabb koncentrációjában (Hogg JC. Thorax 2006; 61: 96-7). Feltételezések szerint a dohányzás az arra érzékeny személyekben az adaptív immunválasz (T-lymphocyták) tartós aktiválódását okozza, amely folyamatban a dendritikus sejteknek, különböző T-lymphocytá szubpopulációknak, esetleg mikrobiális vagy más auto-antigénnel stimulált B-lymphocytáknak lehet meghatározó szerepe (Roche és mtsai. Eur Respir Rev 2011; 20: 175-82).
2. A legtöbb légúti biomarker szintjét a dohányzás befolyásolja. Kivételként említhetők például a köpetben mérhető GRO- α és MCP-1 kemokinek (Traves és mtsai. Thorax 2002; 57: 590-5). Értekezésem 3.4.6. fejezetében én is megemlítettem, hogy a dohányzás lipid mediátorokra gyakorolt hatása ellentmondásos: egyes szerzők a dohányzással összefüggő, míg mások attól független hatásokról számolnak be.
3. Az említett vizsgálatban az életkor és a FENO szint között szignifikáns korreláció nincs ($p > 0.05$). Irodalmi adatok alapján a FENO koncentráció egyedül a gyermekkorban (12 év alatt) kissé alacsonyabb (~5 ppb), így a felnőttekre és a gyermekekre vonatkozó szakmai ajánlások kismértékben, de eltérnek egymástól (Dweik és mtsai. Am J Respir Crit Care Med 2011; 184: 602-15).
4. Az említett vizsgálatba azért vontunk be nagyobb számú tüdődaganatos beteget, hogy e betegeket alcsoportokra bontva az EBC pH-ját különböző daganat típusokhoz (kissejtes tüdődaganat, planocellularis carcinoma vagy adenocarcinoma) tartozóan tudjuk meghatározni. Az alcsoportokban és a nem daganatos kontroll csoportban szereplő betegek száma már jól összevethető. A demográfiai adatokat tekintve (17. táblázat) a daganatos betegek életkora valóban magasabb ($p < 0.05$) volt, és különbözőség mutatkozott a nemi arányban is a kontroll csoporthoz képest, azonban ezek a különbségek

nem befolyásolták az EBC kémhatását. A 20. táblázat adatai szerint a vizsgálatban szignifikáns különbséget az életkor vonatkozásában nem tapasztaltunk ($p > 0.05$). E vizsgálatban ugyanakkor a daganatos betegek száma valóban nagyobb volt a kontroll csoporthoz képest. Oponensemnek igaza van, hogy célszerűbb lett volna a két csoportot egyedszám tekintetében jobban közelíteni egymáshoz.

5. Véleményem szerint a két kondenzáló berendezés közül az EcoScreen kondenzátor a megbízhatóbb. Ez az eszköz ugyanis a beépített hűtési rendszerének köszönhetően a mintagyűjtés teljes időtartama alatt konstans hőmérsékletet (-20°C) biztosít. Ezzel szemben, az R-Tube eszköz külső fémhengere mintagyűjtés során lassan felmelegszik, ami adott esetben befolyásolhatja a mérési eredményeket. Az EcoScreen eszközzel hasonló időtartam alatt a gyűjtött kondenzátum mennyisége is nagyobb (Czebe és mtsai. *Respir Med* 2008; 102: 720-5).
6. A vizsgálatban a mintákat azért tároltuk viszonylag hosszabb ideig, mivel a vizsgálat során több mint 200 EBC minta gyűjtése történt, és a pH-méréseket lehetőség szerint egy időben végeztük. Korábbi megfigyeléseink azt mutatták, hogy a mintatárolás alatt (-80°C) a kondenzátum pH-ja nem változott meg, és akár 1 év múlva is változatlan értéket adva pontosan meghatározható (Kullmann és mtsai. *Respir Med* 2007; 101: 2566). Így, ez a körülmény az eredményeket nem befolyásolhatta.
7. Az említett vizsgálat során köpetgyűjtésre – technikai okok miatt – a CF-es betegeknek csak egy részénél került sor. A vizsgálat fő célkitűzése azonban nem a köpet citológiájának vizsgálata, hanem az EBC pH-jának meghatározása volt. A pH értékeknek a köpet sejtprofillal való összehasonlítását kiegészítő jelleggel csak a betegek egy részénél végeztünk el.
8. A citokinek eredetére a microarray technikával végzett vizsgálatok eredményeiből nem lehetett következtetni. Különböző citokinek termelődhetnek akár a gyulladásozó sejtekben, de a tüdő szövetét felépítő reziduális sejtekben is.
9. Az EBC pH-jának nagy napi variabilitását számos tényező okozhatja, és munkacsoportunk egyik célkitűzése éppen ennek a vizsgálata volt. A CO_2 standardizációs módszer használatával kimutattuk, hogy a kondenzátor típusa (Czebe és mtsai. *Respir Med* 2008; 102: 720-5), a kondenzálóberendezés hőmérséklete (Czebe és mtsai. *Respir Med* 2008; 102: 720-5), a nagy mennyiségű folyadékbevitel (Kullmann és mtsai. *Lung* 2008; 186: 263-8), a dohányzás (Antus és mtsai. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 1492-7), valamint a külső környezet páratartalmának változása (Kullmann és mtsai. *Eur*

Respir J 2008; 31: 474-5) szignifikánsan befolyásolja az EBC pH-ját. Ezeket a tényezőket igyekeztünk a vizsgálatok során figyelembe venni, és konstans körülményeket biztosítani: a mintagyűjtés ugyanazon helységben, ugyanolyan hőmérsékletű eszközzel, délelőtt 9 és 12 óra között történt. A dohányzó és a nem dohányzó betegektől külön-külön gyűjtöttünk mintákat. Mivel a nem és az életkor nem befolyásolta a pH-méréseket, ezeket a tényezőket külön nem kellett figyelembe venni. Végül – amint azt az értekezésemben már jeleztem (46. oldal) – az ammónia szerepe ellentmondásos az EBC pH-jának meghatározásában: különböző munkacsoportok, más és más megfigyelésekre alapozva jelentőségét eltérően ítélik meg. Valószínű, hogy az ASL-nek az EBC-ben való nagyfokú felhígulása (1:10000) miatt az ammónia nem játszik olyan szerepet, mint azt korábban gondolták.

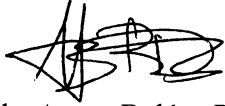
10. Az MDA értékek napi variabilitása csak az EBC esetében volt jelentős, a köpetben a reprodukálhatóság sokkal kedvezőbb volt. A marker napszakon belüli változását nem vizsgáltuk, de mint említettem, a mintagyűjtések hasonló időben (9 és 12 óra között) történtek, így az esetleges napszaki ingadozás eredményeinket érdemben nem befolyásolhatta.
11. Közismert, hogy a szteroidok csökkentik az eosinophilejt-dominanciával járó (asztmás típusú) légúti gyulladást, míg hatásuk a COPD-re jellemző neutrophilsejtes gyulladásra sokkal szerényebb. A szteroidok hatásai rendkívül összetettek, a legtöbb szerző a klasszikus genomikus mechanizmusok mellett akut (nem genomikus) hatásokat is említ. A genomikus hatásokat a citoplazmatikus receptor közvetíti, amely direkt DNS kötődéssel vagy transzkripciós faktorok (AP-1, NF- κ B) inaktivációjával befolyásolja a transzkripciót. A nem genomikus hatásokat sejtmembrán-asszociált vagy citoplazmatikus glükokortikoid receptorok vagy a sejtmembránnal való aspecifikus kölcsönhatások közvetítik. A szteroidok gátolják a hisztamin, a Th2-típusú citokinek és a ciszteinil-leukotriének (cisz-LT) termelődését, ami közvetett módon eredményezi a gyulladás mérséklődését és az eosinophilejtek számának csökkenését a légutakban. A neutrophilsejtes gyulladás során a neutrophilsejtekből felszabaduló szabadgyökök inaktiválják a hiszton-deacetiláz (HDAC) enzimsaladot, melynek következtében a szteroidok a Th2-es típusú és az egyéb, pro-inflammatorikus citokinekre (IL-8, TNF- α) gyakorolt gátló hatásai felfüggesztődnek, és a neutrophilsejtes gyulladás intenzitása nem csökken számottevően a légutakban. Végül, a teofillin készítmények csak minimális

gyulladáscsökkentő hatásúak, alkalmazásuk az utóbbi években visszaszorult, és általában csak a súlyos, akut exacerbációs epizódok kezelésére korlátozódik.

12. Véleményem szerint a citokinek szintjeiben észlelt változások (21. és a 23. táblázatok, 105. és 107. oldal) igen jelentősek, hiszen 2-5-szörös növekedést vagy csökkenést mutatnak. Az előkísérletek eredményei alapján az assay reprodukálhatósága a poolozott minták esetében 5-8% körül mozgott. A microarray módszerrel kapott eredményeket más módszerrel nem vizsgáltuk vagy validáltuk, mivel ez esetünkben 120 különböző ELISA teszt elvégzését jelentette volna, melynek munka- és költségigénye rendkívül tetemes.
13. Az említett vizsgálatban az átlagos követési idő nagy különbözősége (SEM értéke) abból adódott, hogy a transzplantáltak egy részében akut szövődmények nem fordultak elő, így a mintákat három, egymást követő ambuláns vizit során gyorsan be lehetett gyűjteni, míg más betegekben időről-időre akut szövődmények léptek fel, így a mintagyűjtéseket a szövődmények teljes szanálódásáig fel kellett függeszteni.
14. A különböző baktériumokkal kolonizált betegek EBC pH-ja hasonló volt, tehát a kolonizáció típusa nem befolyásolta eredményeinket.
15. A 40. és a 43. ábrákon szereplő „inadekvát” vagy „nem megfelelő” köpetminta elnevezés arra utal, hogy e betegek köpetében laphámsejtek aránya 20%-nál nagyobb volt, vagy a betegek egyszerűen nyálmintát adtak le köpet helyett. Ilyen esetekben a betegekből még egy alkalommal próbálkoztunk megfelelő köpetminta gyűjtésével.
16. Az asztma exacerbáció során kimutatott vagy a dohányzással összefüggő pH-változások biokémiai háttere nem ismert. A feltételezések szerint az EBC összetételének változásából az ASL kémiai tulajdonságaira és komponenseire lehet következtetni. Az ASL pH-szabályozásának mechanizmusa rendkívül összetett, melyben Bírálóm által említett transzporterek mellett számos egyéb ioncsatorna is részt vesz. A hazai szakirodalomban Bikov és mtsai. számoltak be a közelmúltban részletesen e transzporterek élettani és kórélettani működéséről (Bikov és mtsai. Med Thor 2011; 64: 391-6). A közleményből kiderül, hogy a légúti epithelsejteken a Na^+ - K^+ cserélő, a NADPH-oxidáz, a K^+ - H^+ ATPáz, illetve a vakouláris H^+ pumpa felelősek az apikális H^+ transzportért, míg a legfontosabb HCO_3^- transzporter a cisztás fibrózis transzmembrán regulátor (CFTR), a glutamináz és a Ca-függő Cl csatorna. Bazális oldalon a pH-szabályozását a Na^+ - K^+ cserélő, az anion-cserélő protein és a Na^+ -bikarbonát csatorna végzik. Ezen kívül ismert a paracellularis szerepe légúti pH homeosztázisban.

Végezetül ismételen szeretném megköszönni Bírálómnak tudományos eredményeink elismerését és a munkámmal kapcsolatos valamennyi kritikai észrevételét.

Tisztelettel,

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'AB', written over a faint grid or background.

dr. Antus Balázs PhD
osztályvezető főorvos

Budapest, 2015. augusztus 24.