

Válaszok Dr. Pap József Sándor bíráló kérdéseire

Mindenekelőtt meg szeretném köszönni Dr. Pap József Sándornak a dolgozatom alapos áttanulmányozását. A felmerült elütésekkel kapcsolatos kritikai megjegyzését maximálisan elfogadom.

1. 15. o.: "Furthermore, the enhancement of this phenomena with an increasing excess of EGCg mimics the increase of mucin concentration in an EGCg-free system as well [23][25]."

Nem világos, hogy ez az állítás miből következik?

McColl és munkatársai írták le még meg nem jelent publikációjukban, hogy a mucin a koncentráció növelésével aggregátumokat képez, és a mucinhoz hozzáadott EGCg elősegíti ezt az aggregációs folyamatot. Tehát a fenti kissé félreérthetőre sikerült mondat lényegében arról szól, hogy a mucin aggregációt elő lehet idézni a mucin koncentráció növelésével, de ugyanazt az aggregációs effektust lehet elérni a mucin koncentráció fixen tartásával, az EGCg koncentráció növelésével.

2. 21. o. táblázat: a különböző kísérletek nagyon meggyőzőek arról, hogy az EGCg valóban sok sejttípus mozgékonyosságát csökkenti. Ugyanakkor az is valószínűnek tűnik, hogy ez egy összetett hatás eredménye, talán csak kisebb-nagyobb mértékben a sorolt inhibitor hatásoknak köszönhető. A következő fejezetben részletesen beszámol olyan eredményekről, ahol rákos sejtek apoptózisának kapcsán a kutatók a direkt/indirekt hatások mélyére ástak. Különösen ennek fényében mi a jelölt véleménye: az egyes esetekben specifikus tényezők játszanak szerepet a migrációs tulajdonságok megváltoztatásában, vagy az EGCg egy általános tulajdonságáról lehet szó, mint pl. a gyökkeltetés, amely a bármely sejt migrációját közvetett módon befolyásolja?

Véleményem szerint az EGCg egy összetett hatásáról van szó, ami bizonyos esetekben tartalmazhat molekuláris szintű adott sejtre specifikus elemeket (bizonyos sejt adott szignalizációs útvonalára gyakorolt specifikus hatás). Az EGCg-hez köthető mechanizmusok komplexitása miatt a fenotípusban megfigyelt változás pontos okainak molekuláris szintű elkülönítése nehézkes.

3. 33. o.: „The fact, that not just nanoparticles, but also clusters can be applied in carrying EGCg and curing illnesses, is just a possibility at this moment. Nobody studied nanoparticle clusters and EGCg together yet.”

Mi a klaszterek előnye az egyedi nanorészecskékkel szemben?

(Megjegyzés: az arany nanorészecskék mérete alapján ezek aerob oxidációra képesek lehetnek, amellyel elméletileg csökkenthetik a rájuk kötött antioxidánsok élettartamát.)

A klaszterek előnye véleményem szerint az lehet, hogy még nanoméretű objektumokról van szó, ugyanakkor egy klaszter jó eséllyel könnyebben tehető multifunkcióssá, mint egy egyedi nanorészecske. Pl. több hatóanyagot/több fajta hatóanyagot tudhat egy klaszter szállítani. A klaszterek kialakításában is több lehetőség, potenciál rejlik.

A későbbiekben valószínűleg majd biokompatibilis anyagokból is létrehozhatóak lesznek. A klaszterekben uralkodó körülmények természetesen befolyásolhatják a hatóanyagok élettartamát, így azokat mindenképp meg kell vizsgálni és tesztelni ilyen nanoméretű rendszerek megalkotásakor, használatakor. Az arany nanorészecskék mérete alapján ezek aerob oxidációját is figyelembe és számításba kell venni. Ugyanakkor a vizsgálataim alapján az mondható el, hogy az oxidált EGCg-nek drasztikusabb gátló hatása (adhézió, életképesség) volt a rákos sejtekre nézve, így lehet, hogy az említett tényező terápiás szempontból előnyösebb is.

4. 44. o.: „The EGCg powder (from Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany) was solved in 10 mM HEPES at pH 7.4, or in assay buffer (20 mM HEPES in HBSS, pH 7). Oxidation process happens if simply the created EGCg solutions are exposed to light and higher temperature (for example room temperature), and as a result, we get brown, oxidized liquids [11] [14] [15].”

Miért 10 az egyik és miért 20 mM-os a másik HEPES puffer, van ennek jelentősége? Ellenőrizték, hogy az oxidált forma az irodalom által említett termékeket tartalmazza, vagy elfogadták az ott leírtakat?

A protokollok szerint a PP és PPR porokat 10 mM Hepes (mQ vízben) pufferben kell feloldani, a sejtes méréseket azonban 20 mM Hepest tartalmazó HBSS pufferben végeztem, mert ez a puffer előnyösebb a sejtek számára. Amikor nem sejtes méréseket csináltam, akkor a 10 mM Hepes puffert használtam (OWLS mérések), hogy ugyanaz legyen a puffer a beoldott poroknál, és a mérés során is. Az eredményeket nem befolyásolta a pufferek eltérő Hepes koncentrációja.

Elfogadtuk a szakirodalomban leírt oxidált EGCg termékek létezését, mivel ezek jól dokumentáltak.

5. I used oppositely charged gold nanoparticles (average metal core diameter 5.5 nm and standard deviation 15%) stabilized with self-assembled monolayers of N,N,N-trimethyl(11-mercaptopundecyl)ammonium chloride (TMA, positively charged) and mercaptoundecanoic acid (MIJA; negatively charged and fully deprotonated at pH 11).”

Hogyan kapcsolódhat az EGCg ilyen nanorészecskékhez?

Hong és munkatársai 2014-es publikációjában a kitozán és aszparaginsav nanorészecskékhez adszorpcióval stabilan kötött az EGCg (EGCg-CS-PAA), és a pH megváltoztatásával az EGCg le tudott válni.

Landis-Piwowar és munkatársai 2013-ban publikált cikkében az oligomerizált EGCg esetén kovalens rögzítést alkalmaztak, és kiaknázásra is került az EGCg szállításában (PEG-OEGCg).

Shukla és munkatársai (2012) úgy hoztak létre Au-EGCg nanorészecskét, hogy NaAuCl₄-et (Na-tetrakloroaurát) ioncserélt vízben összekeverték az EGCg-vel. Az EGCg erős redukáló hatása miatt az arany sóból arany nanorészecske lett.

Ezen lehetőségek állnak rendelkezésre az TMA, MUA arany nanorészecskék esetén is, a kezdeti kísérletekben a legegyszerűbbnek mondható adszorpcióval próbálkoznék.

6. 46. o.: A 3.3. fejezetben részletesen ír az MTT redukciós kísérletekről, ahol a tetrazolium-só redukciója formazánná szolgáltatja a spektrofotometriásan mérhető jelet. Az EGCg tulajdonságai között korábban említi, hogy részt vehet ROS gyökkeltő folyamatban, pl. SO gyökiont generálhat. Az SO ismert redukálószer a tetrazolium-sóknak.

Nem okozhat az EGCg és MTT együttes jelenléte ilyen közvetett keresztreakciót? Miért két hullámhosszon mért?

Véleményem szerint az EGCg és az MTT együttes jelenléte okozhat keresztreakciót. Wang és munkatársai (2010) is megemlítik, hogy az MTT-vel végzett teszteknel az EGCg-vel történő kezelés fokozza a mitokondriális dehidrogenáz aktivitását, valamint az EGCg redukálja az MTT-t, és fokozza a formazánná alakulást. Ezek a műtermékek is rámutatnak a jelölésmentes vizsgálatok fontosságára.

A két mért hullámhossz az 540 nm és a 620 nm. A 620 nm referencia hullámhossz. A leolvasás, referencia hullámhossz függ a keletkező formazán színétől, pl. MTT esetén: 570/30 nm vagy 690 nm lehet. A referencia hullámhosszon már a formazánnak és az MTT-nek nincs jele, a turbiditás, sejttörmelék, karcolások stb. okozta hibát "simítja".

Megfelelő kontrolok esetén (csak oldat, sejtmentes, sejtes oldat, DMSO stb.) akár el is hagyható, de sokkal kisebbek a tapasztalt szórások referencia hullámhossz alkalmazása esetén.

7. 58. o. Fig4.5c, a motility speed-ben bekövetkező és narancssárga vonallal jelzett változás szignifikáns?

A motilitás sebessége megközelítően 35%-kal csökkent, így jelentősnek mondható, azonban korrekt szignifikancia analízishez nem áll rendelkezésre a motorizált, mozgatható asztal, amivel több párhuzamos mérést tudnánk végezni. Így az említett eredmény a jelenség demonstrálásának tekinthető.

8. Jól értelmezem, hogy a sejt adszorpciója összevethető mértékben következik be „üres” felületre és EGCg(OX)-szal kezeltre? Ez reverzibilis adszorpciót jelent csupán. tehát a sejtes oldat kiöblítése után ezek nem maradnak a felületen? Számomra ez a 4.7. ábráról nem derült ki.

Az üres felületen és az ox. EGCg-vel kezelt polimer felületen a sejtek kitapadása adszorpciós jellegű kinetikát mutatott, a biológiai jel által indukált szigmoid jellegű görbét nem tapasztaltam ezeken a felületeken. Adszorpciós jellegű görbéket olyan esetben lehet tapasztalni, amikor a sejtek kitapadnak ugyan a felületre, de a kitapadás nem biológiai kötések révén jön létre (nem receptor-ligandum kölcsönhatáson keresztül). Hasonló görbe figyelhető meg az erősen pozitívan töltött PLL filmen. Ezekben az esetekben a sejtek nem moshatóak le könnyen a felületről.

9. 65. o.: Fig.4.9 D) és H) esetében mi lehet az oka a nagyon eltérő bizonytalanságnak?

Tapasztalatunk szerint az egyedi mérési pontok szórása nagymértékben függ attól, hogy az optimális sejtszámot mennyire sikerült elérni a kísérletben (Ez 384 lyukú plate esetében 12000 sejt/well). A 4.9 D ábrán megfigyelhető különbségnek ez az oka.

10. 70. o. Fig.4.11.: én inkább élő-élettelen párhuzamos folyamatok burkológörbéjeként látom a 20 gg/ml EGCg koncentráció fölötti eredményeket.

Elképzelhető ilyen párhuzamosság?

Igen, ez egy nagyon jó megfigyelés, mivel csak az élő sejtre jellemző a szigmoid kinetikájú sejtdahéziós görbe.

11. 71-72. o.: „Note, that negative cytotoxicity values can be occurred, if there are higher OD values in several wells, than in control wells. This is most probably due to the inhomogeneous distribution of cell number between the wells and to the low values of signals.”

1) A fentiek alapján tehát az inhomogén sejtszám-eloszlás látszólagos negatív sejthalált mutathat. Ennek ellenkezője nem fordulhat elő? Persze mindez épp a dolgozat újdonságértékét adó mérések előnyét emelné ki a klasszikus MTT módszerrel szemben, amit a jelölt ellenőrzésképpen végrehajtott.

Igen, a sejtszám fluktuációja mind negatív, mind pozitív irányba torzíthatja az eredményeket.

2) A 4.13 és 4.14 ábrákon milyen görbét illesztett és ebből hogyan számította az IC50 értéket?

Citotoxicitás/citosztázis (%) = $[1 - (OD_{\text{kezelt}} / OD_{\text{kontrol}})] \times 100$

Ezeket az értékeket ábrázoltam a koncentrációk logaritmusának függvényében. Az illesztés alapvetően többféle lehet, a lényeg, hogy legyen a görbének egy alapvonal része (ahol nincs hatás), másrészt pedig egy maximális (telítési) szakasz. Az illesztésnél törekszünk szigmoidra, ez akkor lehetséges, ha van IC50. Ha nincs IC50, tehát az anyag nem éri el a 90 vagy 100% gátlást, akkor általában exponenciális görbét lehet illeszteni, mivel nincs felső plató. Ha az anyag nem éri el a teljes gátlást, nem adunk meg IC50 értéket, csak annyit, hogy az IC50 nagyobb, mint a kipróbált legmagasabb koncentráció. Tehát a két említett mérésnél a 4.13. ábra (citotoxicitás) esetében exponenciális görbe lett illesztve (Origin: ExpGro1. Képlet: $y = A1 \cdot \exp(x/t1) + y0$), a 4.14. ábra esetén (citosztázis) szigmoid görbét illesztettem (Origin: Growth/sigmoidal, Boltzmann. Képlet: $y = A2 + (A1 - A2) / (1 + \exp((x - x0)/dx))$). A görbéken behúzott vízszintes vonal jelzi/jelezné az IC50 értéket.

12. 77. o.: A 4.18 ábra alapján nekem úgy tűnik, hogy a pozitív AuTMA csak jóval kisebb mértékben épül ki a felületre, mint a negatív töltésű AuMUA. Ez netán az eltérő töltés/nanorészecske arányukkal magyarázható?

A TMA és MUA nanorészecske oldatokat Dr. Lagzi Istvántól (BME) kaptam. Ezek tömény oldatok voltak, így a legelső kísérletek arra vonatkoztak, hogy az OWLS számára melyik koncentráció az optimális, ezért 10x-es, 100x-os és 1000x-es hígításokat készítettem az eredeti tömény oldatokból. Az 1000x-es hígítás bizonyult az optimálisnak, ami az MUA esetében $2,5 \times 10^{-6}$ mM, míg TMA esetében $1,58 \times 10^{-6}$ mM volt. Az eltérő nanorészecske-oldat koncentrációk egyrészt okozhatták ezeket az eltéréseket. Másrészt a bírálónak igaza van, eltérő töltés/nanorészecske arány is tapasztalható volt. Az oldatok titrálásával fény derült arra, hogy a TMA esetében 30-40%-kal nagyobb volt a töltéssűrűség a MUA nanorészecskékhez képest. Így ahhoz, hogy a bioszenzor felületen a töltések kiegyenlítsék egymást, kevesebb mennyiség kellett belőle. Ezenkívül az oldatok kb. 11-es pH-n stabilak, azonban az OWLS-sel történő mérések miatt a pH-jukat le kellett csökkentenem (maximum pH=10 lehetett). A MUA nanorészecskék funkciós csoportjai érzékenyebbek erre a pH változásra, és ez is okozhatta az eltérő töltés/nanorészecske arányt a két nanorészecske oldat esetében.

Peter Beatrix