

## **Balla József Professzor:**

Köszönöm az elismerő szavakat és támogató javaslatot. Válaszaim a feltett kérdésekre:

### **1. Milyen akadályokat lát a pályázó az általa és a nefrológia területén elsőként alkalmazott RNS interferencia klinikai alkalmazásának lehetőségei vonatkozásában.**

Az RNS interferencia leírása emlős sejtekben (Tuschl 2001) új lendületet adott a kis nukleinsavak terápiás alkalmazásának. Bár az RNS interferencia alapú FDA által jóváhagyott klinikai vizsgálatok száma 2004 óta exponenciálisan növekszi (2006: 169, 2010: 2295) az alapvető akadályok nem változtak lényegesen. Nem teljesen feltérképezett az RNS interferencia mellékhatás spektruma és általában gondot jelent a célszervbe és a célsejt citoplazmájába történő bejuttatás (Rácz: ADDR, 2010). A **mellékhatások** között felmerül a kettős szálú RNS-ek antivirális immunitást aktiváló hatása, az un. interferon válasz. Saját vizsgálataink szerint több siRNS in vivo tesztelése alapján nem kaptunk emelkedést az interferon válasz két központi jelátvivő molekulájának expressziójában egérben (Rácz: Oligonucleotides – elfogadva, 2011). Ugyanakkor klinikai vizsgálatok nem zárják ki, hogy a jelenlegi bejuttatási módok mellett az effektív dózis eléréséhez szükséges siRNS mennyiség immunaktivációt okozhat.

A **bejuttatási** nehézségek és a lehetséges szisztémás mellékhatások miatt a klinikai vizsgálatok egyik fő irányvonala a bejuttatás különböző módozatait vizsgálja, ahol úttörő szerepet látszik kapni a nanotechnológia. Másrészt főként izolált szervek a célpontok, mint például veseátültetés során a kivett, beültetésre váró vese, mely alkalmas génterápiára úgy, hogy még beültetés előtt a sejtekbe be nem jutott terápiás anyag a graftból kimosható, így szisztémás mellékhatásokkal nem kell számolni. A Nobel díjas Philip Sharp és az emlős sejtekben megfigyelhető RNS-interferencia első leírója Thomas Tuschl által alapított Alnylan Pharmaceuticals az egyik élen járó cég a másik az Acuity Pharma aki, az első RNSi alapú humán vizsgálatot is jegyezte. Mindkét cég olyan vizsgálatokat folytat jelenleg, ahol a szisztémás keringéstől többé-kevésbé izolált szerveket kezelnek, mint: szem, agy, tüdő vagy tumor. 2010-ben jelentős áttörés volt az a „first in-human” fázis I klinikai vizsgálat, melynek során szisztémásan kezeltek melanomás betegeket targetált nanopartikulumokkal (cyclodextrin polimer - transferrin liganddal). A vizsgálat hatékony RNS interferenciát igazolt a célsejtekben, elsőként adva meggyőző bizonyítékát annak, hogy emberben, szisztémásan adagolt siRNS-el is el lehet érni hatékony csendesítést célsejtekben (Davis ME: Nature, 2010).

### **2. Mi a jelenlegi álláspont a reperfüziós károsodás során kialakuló apoptotikus sejthalálban az oxidatív stressz szerepéről?**

A reperfüziós károsodás tartósabb ischemiás-hipoxiás károsodást követően lép fel. Az ischemia során kialakuló nekrotikus sejthalált a **reperfüzió** során kiterjedt **apoptotikus** sejthalál követi, mely mértékében elérheti, sőt meg is haladhatja az ischemia során bekövetkezett nekrozis mértékét. A reperfüziós károsodás két fő mechanizmusa **gyulladás és oxidatív szabadgyök**-termelés kiváltotta apoptózis. A reperfundált szervbe áramló vérrel érkező fehérvérsejtek az ischemia-reperfüzió során aktiválódott endothelhez kitapadva kapillárisok elzáródását okozhatják (no-reflow paradox) az interstitiumba vándorolva

gyulladásos mediátorok és oxidatív szabadgyökök termelésével gyulladásos folyamatokat tartanak fenn. A reperfundálódó szervbe áramló oxigén a sejtfunkciók újraindulásához elengedhetetlen, ugyanakkor káros oxidatív szabad gyökök keletkez(het)nek belőlük enzimatis úton (NADPH- vagy Xantin oxidáz). A NOX: nem-fagocita oxidázoknak kórokozók elleni védekezésben lehet első sorban fiziológiás szerepe (Leto, Geiszt: Antiox Redox Signal 2006), míg a Xantin dehidrogenáz a tartós oxigénhiány következtében fellépő ATP bomlás során keletkező hypoxantin hatására Xantin oxidázzá alakul, ami szuperoxidot termel (Granger: AJP 1988). Továbbá fontos szuperoxid forrás reperfúzióban a mitokondrium.

A reperfúzió során megfigyelhető oxidatív stressz forrása tehát kettős:

- az infiltráló fehér vérsejtek (pl. granulociták) degranulációja. Másrészt
- a beáramló oxigénből lokálisan keletkező szabadgyökök.

A szabadgyökök károsítják a sejteket: plazma membránt, DNS-t, fehérjéket, ami további apoptózist okoz.

Az apoptózis (programozott sejthalál) két fő útvonal felől aktiválódhat.

- Az extrinsic út receptor közvetítette (FAS, TNF receptorok)
- Az intrinsic utat a sejtkárosodás során sérült mitokondrium indítja be.

A reperfúziós károsodásban domináló apoptotikus sejthalált részben

- infiltráló citotoxikus T-limfociták hatására fellépő receptor közvetítette apoptózis indítja be (Hamar: PNAS, 2004) részben

- felszabaduló szabadgyökök indukálják (membrán, DNS és mitokodrium károsítása révén).

Ez utóbbi mechanizmust jelenleg vizsgáljuk XO ill. NADPH-oxidáz (NOX) gátló siRNS és NOX-2 knockout egerek segítségével. Érdekes megfigyelés, hogy egyes NOX enzimek gátlása nem javítja az ischemiát követő szervfunkciót és túlélést, aminek lehetséges magyarázata, hogy a NOX-ok által kis mennyiségben termelt szuperoxidnak újabban jelátvivő szerepet tulajdonítanak, ami a sejt környezetének redox állapotáról informálja a sejtet segítve a környezethez való alkalmazkodást (Geiszt: Cardiovasc. Res. 2006).

### **3. A dolgozatban bemutatott kísérletekben sokat vizsgált citokinek vese allograft kilökődésben és lupus nefritis patomechanizmusában játszott szerepe ma a Th-17 helper sejtek leírása óta az érdeklődés középpontjában áll. Mennyiben befolyásolják ezen új ismeretek a dolgozatban bemutatott eredmények értelmezését?**

Egyetemista koromban a CD8 pozitív sejtekről azt tanultuk, hogy van köztük citotoxikus és szupresszor típusú (Gershon, R.K. Immunology 1971). Aztán a 1980-as években szupresszor sejtek létezését megkérdőjelezték („szupresszor szkepticizmus ideje”) (Chess L: Nat Immunol: 2004). Pályám kezdetén, a kilencvenes években nagy divatja volt Th1-Th2 polarizációnak. Ennek értelmében a Th1 sejtek gyulladást serkentő citokineket (IL-2, IFN- $\gamma$ ) termelnek és a sejtes immunválaszt serkentik, míg a Th2 sejtek IL-4 és 10 termeléssel gátolják a celluláris, de serkentik a humorális immunválaszt. A „dogma” szerint a Th1 és Th2 sejtek kölcsönösen gátolják egymást (Mosmann TR: Annu Rev Immunol. 1989). Aztán felfedezték (újra) a „regulátor” sejteket, melyek közt van CD8 pozitív is, de a legtöbbet vizsgált ún. természetes regulátor sejtek a felszínükön CD25-öt nagy koncentrációban expresszáló és Foxp-3 jelátvivő molekulával rendelkező sejtek (Fontenot JD: Nat Immunol. 2003). Leírásuk óta egyre szaporodnak a „regulátor” sejtek. Újabban a Th1-Th2 dogma is megdőlni látszik, egyre több kórfolyamatban. A Th1 és Th2 citokinek párhuzamos aktivitását mutatták ki Lupus nefritisben is, krónikus allograft nefropátiában is. Közben leírtak olyan

„regulátor” sejteket, melyek nem kizárólag Th1 vagy Th2 citokint termelnek, hanem mindkettőt pl. NKT sejtek hatékony IL-10 és IFN- $\gamma$  termelésükről ismertek (Godó: CMC, 2008), vagy a legújabban leírt Th-17 sejtek, melyek nevüket az IL-17 termelésről kapták (Harrington: Nat. Immunol. 2005).

A Th17 sejteket a gyulladás-gátló TGF-beta és gyulladás serkentő IL-6 együttes jelenléte stimulálja és a termelt citokinek is képesek mind a sejtes, mind a humorális immunválasz serkentésére. A Th-17 sejtek élettani szerepe fertőzések elleni védekezés. A Th-17 túlműködés autoimmun betegségekben így lupusban és első sorban fertőzések kiváltotta autoimmun betegségekben játszik központi szerepet, míg hiányuk opportunisták fertőzésekre hajlamosít.

Összefoglalva: a vizsgálatok végzésekkor domináló Th1-Th2 polarizáció ma már több szempontból megkérdőjelezhető, de ennek csak az eredmények interpretációjában lehetne szerepe. Még 2000-ben próbálkoztunk lupus nefritis modellünkben a Th1-Th2 polarizáció vizsgálatával, de nem kaptunk konklúzív eredményt. Ezért vizsgálatainkban az egyes citokineket mindig elkülönítetten, nem a jelenleg megkérdőjeleződő Th1-Th2 polarizáció szempontjából vizsgáltuk és diszkutáltuk, így a megfigyelt eltérések ma is helytállóak.

Ez úton is szeretném megköszönni Professzor Úrnak szakmai és emberi támogatását és elismerő szavait, valamint, hogy példaképpül szolgált abban, hogy lehet Magyarországon is nemzetközileg is kiemelkedő tudományos kutatómunkát folytatni.

Budapest, 2011. április 18.

.....  
Dr. Hamar Péter