

VÁLASZ

Dr. Homolya László bírálatára

Köszönöm Doktor úr munkásságomra és az értekezésben foglalt tudományos eredményekre vonatkozó elismerő szavait, illetve az MTA doktori fokozat odaítélésének támogatását.

A bírálatban foglalt kérdésekre és kritikai megjegyzésekre adott válaszaim:

- 1.) Tudományos művek elkészítésekor sokszor a cím megfogalmazása okozza a legtöbb fejtörést, és utólag jellemzően a címet érheti a legindokoltabb kritika. Jelen esetben olyan tudományos munka leírásához kellett címet választanom, amelyben fix vezérfonal volt az endoplazmás retikulum (ER) vizsgálata, de a tanulmányozott biokémiai folyamatok, illetve a jelenségek patológiás vonatkozásai meglehetősen változatosak voltak. Igaz ugyan, hogy magával a diabétesszel közvetlenül alig foglalkozik az értekezés, mégis úgy döntöttem, hogy a fehérjeérés zavarai, az ER-stressz, a fokozott prerreceptorális kortizoltermelés, a lipotoxicitás, az inzulinrezisztencia és a β -sejtpusztulás felsorolása helyett ezt a kórképet írom a címbe, hiszen az említett tényezők közös tulajdonsága, hogy bizonyítottan közrejátszanak a diabétesz, valamint szövődményeinek kialakulásában.
- 2.) Az aszkorbát többrétű vitális funkciót tölt be, és viszonylag nagy mennyiségben használdik fel az élő szervezetekben, ezért nem meglepő, hogy a legtöbb gerinces faj elő tudja állítani. Érdekes, hogy a csontos halak, a tengerimalac, néhány denevér, illetve énekesmadár faj, valamint az emberszabású főemlősök elvesztették e képességüket, és mindannyian a L-gulonolakton-oxidáz (GLO) génjének mutációja következtében. E gén kiesése nem érint más biokémiai folyamatot, csupán C-vitamin folyamatos bevitelére kényszeríti az organizmust. A GLO-mutációk halakban, emberszabásúakban és tengerimalacokban irreverzibilisek, ugyanakkor denevérek és énekesmadarak esetében GLO-pszeudogének reaktiválódását írták le. Az a tény, hogy a funkcionális gén kiesése vagy éppen reaktiválódása független az adott faj táplálékának összetételétől, azt látszik alátámasztani, hogy az aszkorbátszintézis képességének elvesztése evolúciós szempontból közömbös, vagyis sem előnnyel, sem hátránnyal nem jár (Drouin G. és mtsai. Curr Genomics, 2011;12(5):371-378).

A patkányok májszövetében az aszkorbát kettős forrásból származik, hiszen az endogén szintézis mellett a vegyület a szokásos táplálékkal is bejut az állat szervezetébe. Két okból valószínűsíthető, hogy az aszkorbát-utánpótlás patkányokban nem limitálja az ER lumenében történő diszulfidképződést. Egyrészt az állat diétával nem tehető skorbutossá, vagyis a szervezetén belüli aszkorbáttermelés biztonságosan ki tudja elégíteni a szükségletet. Másrészt, ha az állatot a GLO szubsztrátjával, gulonolaktonnal kezeljük, és így az aszkorbátszintézist mesterségesen fokozzuk, ez a máj – a májsejteken belül különösen az ER – súlyos oxidatív károsodását eredményezi (Margittai E. és mtsai. FEBS Lett, 2008;582(30):4131-4136). Ez pedig azt jelzi, hogy ilyenkor még az intenzív fehérjeszintézist és diszulfidképzést folytató szövetekben is feleslegben keletkeznek oxidánsok.

Az oxidatív fehérjeérés általános zavarát *in vivo* nehéz közvetlenül kimutatni, ugyanis ez lényegében egyet jelent az ER-stresszel, ami pedig az „unfolded protein response”-on (UPR-en) keresztül automatikusan kompenzáló mechanizmusokat indít be (köztük az éretlen fehérjék

lebontását). Mikor tehát kimutattuk az ER-stressz egyértelmű jeleit a skorbutos tengerimalacok májában, ezt az oxidatív fehérjeérés zavarára utaló jelként értékeltük. Hasonló vizsgálatok emberben nem ismertek, és nem is várhatók, mivel a skorbut ma már önálló kórképként nem szokott előfordulni.

- 3.) Az ER-t valóban nem sikerült eddig senkinek úgy frakcionálni, hogy az organellum tiol/diszulfid és NADPH/NADP⁺ redox rendszere elkülönüljön egymástól. Tulajdonképpen a térbeli elkülönülés nem is várható, hiszen a sejtek egy darab egybefüggő ER-hálózattal rendelkeznek, tehát a sima és durva felszínű ER, valamint minden egyéb ismert „ER-szubdomén” közös lumennel rendelkezik. Ráadásul az ER teljes egészének fehérjéi a durva felszínű részben termelődnek, és minden jel arra utal, hogy érett, funkcionális állapotban jutnak pl. a sima felszínű részbe. Azok az enzimek, amelyek a piridin-nukleotidok redukálását vagy oxidálását végzik, maguk is diszulfidokat tartalmaznak (pl. Ozols J. és mtsai. J Biol Chem, 1995;270(5):2305-2312). Így nehezen képzelhető el, hogy akár a tiol/diszulfid, akár a NADPH/NADP⁺ redox státusz eltérő legyen az organellum különböző részein. Saját eredményeink éppen azért érdekesek, mert azok az oxidált tiol/diszulfid rendszer és a redukált NADPH/NADP⁺ rendszer békés együttélését magyarázzák.
- 4.) Egyetérttek a bírálóval, hogy a fruktóz-6-foszfát (F6P) és a glukóz-6-foszfát (G6P) ER-membránon keresztüli transzportjának sebességkülönbsége önmagában nem jelenti feltétlenül egy független F6P-transzporter jelenlétét. Azt azonban, hogy a két vegyület szállításáért különböző fehérjék felelősek, erősen alátámasztja, hogy az S3483, a G6P-transzporter specifikus gátlószere nem befolyásolta a F6P átjutását, valamint hogy egyik cukor-foszfát transzportját sem gátolta a másik jelenléte magas koncentrációban. Az a megfigyelésünk pedig, hogy a glukóz-1-foszfát csak a F6P átjutásával kompetált, a G6P-éval nem, arra enged következtetni, hogy a F6P-nak az ER-membránon való keresztülhaladását nem önálló F6P-transzporter, hanem a korábban leírt „nem specifikus glukóz-foszfát-transzporter” facilitálja, amely a G6P szállításában csak másodlagos, elhanyagolható szerepet játszik (Senesi S. és mtsai. Endocrinology, 2010;151(10):4830-4839).
- 5.) A citoplazmai hexóz-6-foszfát-izomeráz, amely a glikolízisben és glukoneogenezisben betöltött szerepe miatt viszonylag nagy mennyiségben található a májsejtekben, lazán tapad az ER membránjához, ezért a meg nem mosott mikroszóma preparátum is tartalmazza. Nem feltétlenül jelenti ez azt, hogy a membrán külső felszínén folyó izomerizációnak a citoplazma más területein lévőttől eltérő, sajátos funkciója van. Elképzelhető, hogy a membrán közelében termelődő G6P könnyebben bejut a lumenbe, de ennek *in vivo* bizonyítása nagyon nehéz lenne. Az intakt mikroszóma F6P-ból kiinduló glukóztermelése a felszínhez tapadt fehérjék eltávolításakor valóban nagyjából tizedére csökkent. A permeabilizált mikroszómán végzett mérésekből viszont kiderül, hogy a luminális izomerizáció teljesítménye lényegesen többet tenne lehetővé (az összes aktivitás közel felét), de a folyamatot a F6P bejutása fékezi. Az értekezés és a F6P-felhasználás szempontjából sokkal relevánsabb kortizoltermelés egészen más képet mutat. Ez esetben ugyanis a felszínhez tapadt izomeráz eltávolítása csak egy harmadával csökkenti az aktivitást, ami azt jelenti, hogy ennél a lassabb folyamatnál már dominánsabb szerepe van a luminális izomeráznak.
- 6.) A Metopirone nevű metiraponkészítmény adatlapja szerint 750 mg-os dózis alkalmazása után a hatóanyag közel 20 µM plazmaszintet ér el, ami összhangban van a kísérleteinkben alkalmazott 5-50 µM tartománnyal (<http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/m/metopironecap.pdf>). Hangsúlyozni szeretném azonban, hogy a metirapon kutatásaink során pusztán a mikroszomális

NADPH oxidálásának kísérletes eszköze volt, és – amint azt ki is fejtettem – nem számoltunk vele a prerreceptorális kortizoltermelés csökkentése révén ható antidiabetikumként. Minden jel arra utal, hogy az általunk kihasznált effektus a gyógyszer szedésekor élőben is érvényesül, azonban a prerreceptorális kortizoltermelés gátlása a mellékvese kortizoltermelésének blokkolása mellett (ami a hatóanyag elsődleges effektusa) nyilván jelentéktelen mellékhatás.

Humán farmakokinetikai vizsgálatok szerint zöldtea rendszeres fogyasztásával vagy zöldteakivonat orális alkalmazásával nagyjából 4 μM EGCG-szintet lehet fenntartani a vérplazmában. A teakatekinék gyorsan felszívódnak a bélből, és az EGCG plazmakoncentrációja kb. 4-órás felezési idővel csökken. Egyszeri, 1200 mg EGCG-t tartalmazó Polyphenon E (koffeinmentesített teakatekin-keverék) bevétele után a legmagasabb plazma EGCG-szint $8,7 \pm 4,5 \mu\text{M}$ volt. Érdemes megjegyezni, hogy a katekinék javarésze bélbaktériumok által módosult formában szívódik fel, és e módosulatok biológiai hatásai nem ismertek. Az EGCG *in vitro* kísérletekben legtöbbször 10-100 μM koncentrációtartományban fejt ki szignifikáns hatásokat. Mi például 25 μM esetén már a kortizoltermelés 50%-os gátlását észleltük intakt mikroszómában. Számos megfigyelés támasztja alá, hogy ilyen koncentrációk jóval alacsonyabb plazmaszintek esetén is elérhetők a sejten belül. Fluoreszcensen jelölt EGCG sejten belüli eloszlását konfokális fluoreszcens mikroszkópiával vizsgálták humán köldökvéna endotel sejtjeiben, és a vegyület intracelluláris felhalmozódása mellett a fluoreszcencia egyenetlen, retikuláris mintázatú eloszlását írták le, ami alapján mitokondriális vagy ER-ben való akkumuláció valószínűsíthető (összefoglaló közlemény a témában: Révész K. és mtsai. Nutr Res, 2011;31(10):731-740).

- 7.) A metformin ismert AMPK-aktiváló hatása valóban nem csak az inzulinhatás erősítésében játszhat szerepet, hanem az általunk tanulmányozott β -sejtvédelemben is. A lipotoxicitás és lipoapoptózis részben az ER-stressz kiváltásán keresztül valósul meg, és mi azt találtuk, hogy metirapon jelenlétében az ER-stresszre adott jellegzetes válasz, az UPR lényegesen enyhébben jelentkezik a palmitáttal kezelt inzulinóma sejtekben. Feltételezhető, hogy ennek egyik magyarázata, az AMPK közvetítésével csökkenő fehérjeszintézis, ami jelentősen csökkentheti az ER terhelését, vagyis az ER-stressz intenzitását. NIT-1 inzulinóma sejtekben nemrég kimutatták, hogy metformin hatására enyhül a tapszigarginnal kiváltott ER-stressz, és javul az így kezelt sejtek túlélése. A metformin védő hatása e tanulmány szerint az AMPK és ezen keresztül a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) aktiválásán alapult (Jung T.W. és mtsai. Biochem Biophys Res Commun, 2012;417(1):147-152).

Bár az EGCG diabétesz elleni védő hatását intenzíven kutatják, és leírták, hogy csökkenti a magas zsírtartalmú (lipotoxikus) diéta következtében kialakuló inzulinrezisztenciát, nem találtam olyan adatot, amely a β -sejtek lipoapoptózisának EGCG általi kivédésére utalnának.

Még egyszer köszönöm értekezésem alapos bírálatát és az értő, tanulságos kérdéseket, illetve megjegyzéseket.

Budapest, 2016. március 15.


Dr. Csala Miklós