

Válaszok Prof. Dr. Gyires Klára bírálatára

Először is szeretném megköszönni Dr. Gyires Klára Professzor Asszonynak, hogy vállalta a doktori értekezésem alapos és részletes bírálatát, elismerő szavait és érdekes és elgondokodtató kérdéseit. A bírálatban feltett kérdéseire az alábbiakban válaszolnék.

Általános megjegyzések:

A Módszerek fejezetben az alkalmazott sejtvonalak leírásánál célszerű lett volna megemlíteni az epesavak vizsgálatára alkalmazott BAC összetételét.

Köszönöm szépen Professzor Asszony észrevételét. Sajnos az értekezés készítésénél elkerülte a figyelmemet, hogy az epesav koktél összetételét nem tüntettem fel a Módszerek fejezetben. Ha a doktori titkárság szabályzatával nem ütközik, akkor ezen hiányosságot az értekezés végső verziójában javítom.

Szakmai kérdések:

1. Az UDCA védőhatású, gyulladásgátló hatású a GI rendszer epithel sejtjein, csökkenti a citokin termelést (Ward JB et al., 2017. *Am. J. Physiol.* 312 (6): G550–G558; O'Dwyer AM, et al., 2016. *Am. J. Physiol.* 311 (2): G334–41.)

Kérdés: Mi a jelölt véleménye, ezen hatások hozzájárulhatnak-e az UDCA CDCA apoptozist indukáló ill. egyéb toxikus hatásaival szembeni védelem létrejöttéhez?

Irodalmi adatok igazolják, hogy az UDCA gátolja a TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4 és IL-6 proinflammatorikus citokinek expresszióját mRNA és fehérje szintjén. Ezenkívül az UDCA erős antioxidáns tulajdonságokkal is rendelkezik, emiatt egy ígéretes terápiás célpont lehet a gyulladásos bélbetegségek kezelésében. A CDCA hatására vonatkozóan az irodalom ellentmondásos. Calmus és mtsai, azt találták, hogy a CDCA dóziszfüggő módon gátolja az IL-1, IL-6 és TNF- α termelődését monocitákban (Calmus és mtsai., 1991, *Hepatology*). Míg egy másik tanulmányban arról számoltak be, hogy a CDCA gyulladásos citokinek termelődését indukálja hepatocitákban (Allen, 2011, *Am. J. Path.*). Arra vonatkozóan nem találtam adatot az irodalomban, hogy a CDCA vagy akár a hidrofób epesavak, hogyan befolyásolják a gyulladásos mediátorok felszabadulását a pancreászban, azonban feltételezhető, hogy hasonlóan a májhoz, a pankréaszban is gyulladásos faktorokat indukál. Mivel az UDCA gátolja a citokinek expresszióját, elképzelhető, hogy amellet, hogy csökkenti az mPTP nyitódását, befolyásolja a CDCA-indukálta gyulladásos mediátorok felszabadulását is.

2. A dolgozat bevezetésében olvasható, hogy a nyelőcső mucosa relatíve rezisztens a sósavval szemben. A gyomornyálkahárya rezisztenciája szempontjából számos fontos komponens, mechanizmus már ismert, bár hogy miért nem emészt meg a gyomor önmagát Davenport 1972-ben felvetett kérdésére (H.W. Davenport, *Am Sci.* 972 Jan;226 (1):87-93) még egyértelműen kielégítő választ ma sem tudunk adni.

Kérdés: Milyen mechanizmusok játszanak szerepet a nyelőcső mucosában, melyek a sósavval szemben a relatív rezisztenciáját magyarázzák a dolgozatban elemzett epitheliális transzportereken kívül?

A nyelőcső mucosa többrétegű, nem-keratinizált laphámból áll, melynek legfelső rétegei képezik a stratum corneum-ot, ezt követően több réteg, aktív transzportot végző laphám sejt alkotja a stratum spinosum réteget, majd 1-2 sejtsor vastagságban helyezkednek el a mitótikusan aktív bazális sejtek vagy stratum germinativum. A str. corneum sejtjei egy permeabilitás-gát formájában kezdeti védekezést biztosítanak a savas reflux-al szemben. Ez az úgynevezett permeabilitás-gát az apikális sejtmembránból és a junctionális komplexekből (AJC-k) áll, amelyek megakadályozzák a lumenális sav diffúzióját közvetlenül a sejtekbe vagy az intercelluláris terekben. Az apikális sejtmembrán azáltal fejt ki a hatását, hogy a nem-szelektív kation csatornái savas pH-n inaktívak, míg az AJC a szoros kapcsolatok, vagy tight junction-ök illetve a dezmoszómák révén megakadályozza a paracelluláris transzportot. Azonban ez a védekező mechanizmus nem teljesen tökéletes, ami miatt a hidrogén ionok lassan bediffundálnak a sejtbe vagy az intercelluláris térbe. A sejten belüli és sejtek közötti tér acidózisa ellen puffer molekulák hatnak, melyek képesek semlegesíteni a protont. Ilyen pufferoló hatással bírnak a fehérjék, foszfátok és a bikarbonát, melyek közül a bikarbonát bír a legnagyobb jelentőséggel, mivel a bikarbonát könnyen transzportálódik a vérből az extracelluláris illetve intercelluláris terekbe ezáltal gyorsabban képes kiegyenlíteni a pH-ban bekövetkező kilengéseket.

A bikarbonát szekréció mellett a mukóza felszínét borító nyálka réteg is fontos szerepet játszik a nyelőcső hám savval szembeni védelmében. Ez a nyák réteg bikarbonátban gazdag és az első védő gátat jelenti még az epitél sejtek előtt. A nyák réteg folyamatosan ki van téve mechanikai illetve kémiai behatásoknak, melyek károsíthatják, viszont a szubmukóza mirigyek által folyamatosan újratermelődik, illetve a lenyelt nyálból is kiválasztódik. A nyák egyik alkotóeleme a mucin, amely amellett, hogy fontos szerepet játszik a sav semlegesítésében megváltozott expressziója révén szerepet játszik a metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma szekvenciában. Emellett a nyelőcső mirigyek egyéb, a védekezésben fontos szerepet játszó fehérjéket is szekretálnak, úgy mint a prosztaglandinok vagy növekedési faktorok, melyek szekrécióját az 5HT₄ receptor stimulálja.

A nyelőcső hámjának ezen védekező mechanizmusainak a működését a megfelelő vérrellátás biztosítja, amely oxigénnel és tápanyagokkal látja el a sejteket, ami a növekedéshez elengedhetetlenül szükséges, valamint szerepet játszik a sav-bázis egyensúly kialakításában, az elektrolitok szállításában valamint a felesleges szén-dioxid eltávolításában. Ezenkívül a vérrellátás bizonyos mértékig képes alkalmazkodni a megváltozott körülményekhez az áramlási sebesség növelésével.

3. Míg a sav a gyomorban fiziológiásan jelenlévő irritatív agens, az epesavak a gyomorban is afiziológiás.

Kérdés: Milyen súllyal játszik szerepet az epesav a GERD-ben? Az epe reflux önmagában is lehetséges-e vagy mindig a gyomorsavval együtt regurgitál a nyelőcsőbe? Az epesav - a pepszinhez hasonlóan - szenzitizáló faktor-e sósav irritatív hatásával szemben a nyelőcsőben?

Nehra és mtsai (Nehra és mtsai, 1999, Gut) GERD-ben, Barrett nyelőcsőben illetve ezofagitiszben szenvedő betegekből vett aszpirátum pH-ját és epesav összetételét vizsgálták. Azt találták, hogy az epesavak változó pH-értéken regurgitálnak a nyelőcsőbe, bár jellemzően a legtöbb esetben a nyelőcső minták pH-ja savas volt. Mindamellet, bizonyítékok vannak arra nézve is, hogy az epesavak a savaktól függetlenül is regurgitálódhatnak. Ezekben az esetekben a betegeknél a refluxátuma nagyrészt nyombél eredetű volt, ami jellemzően lúgos kémhatású, vagy a gyomorsav-termelésük gyógyszeresen gátolva volt.

Számos tanulmányban vizsgálták, az epesav és a sósav együttes hatását a nyelőcsőre. Ezekben a vizsgálatokban azt találták, hogy az epesav sósavval együtt adva lényegesen toxikusabb, nagyobb mértékű károsodást okozva a nyelőcső mucosa-ban, mint önmagában adva. Ezzel szemben, a tripszin az epesavak káros hatását csak lúgos pH-n potenciózza. Érdekességként, Vaezi és mtsai. (Vaezi és mtsai, 1995, Gastroenterology) kimutatták, hogy a nyelőcső nyálkahártya viszonylag ellenálló a savas expozícióval szemben, míg pepszin vagy epesók hozzáadása (savas pH-n konjugálva, semleges pH-n konjugátlanul) nagyobb mértékű elváltozásokat okoz.

Ezek a megfigyelések együttesen a sav, a pepszin és az epesavak közötti szinergizmust bizonyítják, mely során számos olyan molekuláris esemény történik, amelyek a nyelőcső-károsodásához vezetnek. Így például a proteolitikus enzimek, mint a pepszin vagy a tripszin közvetlen szövetkárosodást és gyulladáshoz vezető mediátorok felszabadulását okozzák. Míg az epesavak a lipid membránok károsodása révén indukálhatják az intracelluláris mediátorok felszabadulását.

4. Az epesav a gyomornyálkahártyára is irritatív hatású. Az epesavak gyomorból történő reflux következtében jutnak a nyelőcsőbe, és a gyomorban gastritises tüneteket okoznak. Az epesavak okozta gastritis egyik javasolt terápiája a UDCA. Bár a histológiai kép nem mutatott szignifikáns javulást, a betegek panasza jelentősen csökkent (fájdalom intenzitása és gyakorisága) (McCabe et al., 2018, Clin. Gastroenterol. Hepatol. 16(9):1389-1392)

Kérdés: Lát-e jelölt hatásmechanizmusbeli hasonlóságot az UDCA epe-reflux okozta gastritisre kifejtett kedvező hatása és az UDCA ductalis sejtekre gyakorolt CDCA szembeni védőhatása között (bár a két epithel sejt eltérő funkciójú)?

A szakirodalom némiképp ellentmondásos az UDCA védő hatására vonatkozóan epe gastritiszben. Egy 2011-es klinikai tanulmányban (Nezam, S.K., 2011, Zahedan Journal of Research in Medical Sciences) 60 beteg bevonásával vizsgálták a 3 hetes UDCA kezelés hatását epés gastritiszben. Azt találták, hogy a szukralfát kezelés kiegészítése UDCA-val nem csökkentette a betegek tüneteit. Egy másik tanulmányban (Stefaniwsky A.B., 1985, Gastroenterology) 12 alkalikus reflux-gastritiszben szenvedő beteget kezeltek 1 M-os UDCA-val (1000 mg / nap), melynek hatására a fájdalom intenzitásának és gyakoriságának jelentős csökkenését tapasztalták, illetve csökkent az émelygés és hányás előfordulása is. A gyomor nyálkahártyájának makroszkópikus és mikroszkópikus megjelenése azonban az UDCA kezelés után sem változott. Az epesavkezelés során az UDCA aránya a gyomorban az összes epesav 50% -ára emelkedett, a kólsav és dezoxikólsav mennyisége csökkent, míg a CDCA mennyisége

változatlan maradt. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az UDCA arányának növelése a refluxáltumban lévő epeben csökkenti az epe reflux-al járó fájdalmat és a tünetek gyakoriságát. Mindamellet, elképzelhetőnek tartom, hogy sejt szinten hasonló mechanizmusok zajlanak le, mint a pankreász duktális sejtek esetén, mint például az mPTP gátlás, viszont a gyomor esetében az UDCA-indukálta celluláris mechanizmusok feltehetőleg nem képesek kivédeni a hidrofób epesavak irritatív és gyulladáskeltő hatását, melyben valószínűleg más mechanizmusok is szerepet játszanak.

5. Az alkalmazott sejtvonalak a humán CP-A nyelőcső metaplázia, nem-diszpláziás sejtvonal ill. a CP-D humán nyelőcső diszpláziából származó sejtvonal.

Kérdés: Történt -e vizsgálat normál nyelőcső sejtvonalon is?

Normál sejtvonalon nem végeztünk kísérleteket, melynek oka a normal nyelőcső sejtek nehézkes tenyésztése. Jelenleg viszonylag kevés, kereskedelmben kapható normal nyelőcső sejtvonal érhető el. Munkacsoportunk kísérletet tett a HET1A normal nyelőcső sejtvonal tenyésztésére, melyet az American type culture collection cégtől szereztünk be és ami egy SV40 immortalizált sejtvonal. A normal sejtekre alapvetően jellemző, hogy nagyon specifikus tápot és tenyésztési protokoll-t igényel a fenntartásuk, illetve csak néhány passage-on keresztül őrzik meg életképességüket. Jelenleg munkacsoportunkban sikerült beállítani a nyelőcső epitél sejtek izolálását tengerimalacból, valamint nyelőcső organoid kultúrákat tenyésztünk egérből. Ezek a tenyészetek funkcionális mérésekre illetve molekuláris biológiai vizsgálatokra egyaránt alkalmasnak bizonyultak, ezért a jelenlegi projektjeinkben, a normal nyelőcső epitél sejtek karakterizálásához ezen tenyészeteket alkalmazzuk. Továbbá folyamatban van a human nyelőcső organoid-ok tenyésztése is, amely amellet, hogy kitűnő kísérleti model-t biztosít az egyes nyelőcső betegségek patológiájának a megértéséhez, kilátásba helyezi az egyénre szabott terápia alkalmazásának a lehetőségét is.

6. Az epesavak hatásának elemzésére a GERD patomechanizmusában a BAC oldatot alkalmazta a jelölt, mely 7 epesavat tartalmaz.

Kérdés: Vizsgálta-e az irritatív epesavak iontranszporterekre gyakorolt hatását UDCA előkezelést vagy a koktélhoz történő hozzáadását követően ? Vagyis az UDCA módosítja-e az epesavak iontraszporterekre gyakorolt hatását?

Az UDCA hatását nem vizsgáltuk az epesavak iontranszporterekre kifejtett hatásában. Elképzelhető, hogy hasonlóképpen a pankreásznál tapasztaltaknál, képes csökkenti a hidrofób epesavak transzporterekre gyakorolt hatását. Mivel a kísérleteink során epesav koktélt alkalmaztunk, amely hidrofil epesavakat is tartalmazott, nehéz lett volna megítélni az UDCA specifikus hatását. Mindamellet irodalmi adatok azt mutatják, (Peng és mtsai. 2014, Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol) hogy az UDCA adása előkezelésben, csökkenti az epesavas/savas kezelés-indukálta oxidatív stresszt, DNS károsodást és NF κ B aktivációt Barrett nyelőcsőben. Abban az esetben, ha az UDCA-t együttesen adták a többi epesavval ez a védő hatás nem volt megfigyelhető, ami arra utal, hogy az UDCA védőhatása a nyelőcsőben nem közvetlen, hanem sokkal inkább valamilyen védő factor szintézisén keresztül valósul meg. Kimutatták, hogy az UDCA kezelés fokozza a glutation peroxidáz-1 és kataláz expresszióját,

melyek antioxidáz hatásuk révén védik a sejtet.

7. A dolgozat, mint a jelölt is hangsúlyozta, az alap kutatások tudományterülethez tartozik. A kísérleti eredmények értelmezése során azonban többször is megfogalmazódott a terápiás alkalmazás lehetősége. Ezek közül melyiket látja a jelölt a legígéretesebbnek és leginkább megvalósíthatónak?

Kutatásaim során a megváltozott iontranszport szerepét vizsgáltam mind a pankreatitisz mind pedig a Barrett nyelőcső kialakulásában illetve progressziójában. Vizsgálataim során számos olyan új útvonalat azonosítottam, melyek akár kiindulópontot jelenthetnek hatékonyabb terápiák kifejlesztésében. A pankreász kapcsán a duktális iontranszport folyamatok jelentőségét tapasztaltam a pankreatitisz kialakulásában. Az újonnan felfedezett apikális BK csatorna segítségével eddig nem ismert mechanizmusokat sikerült azonosítani a duktális HCO_3^- szekrécióban, melynek patológiai szempontból is jelentősége van. A BK csatorna aktivációja fokozza a duktális sejtek HCO_3^- elválasztását ezáltal védi a pankreázt a toxikus faktorok, úgy mint az epesavak károsító hatásával szemben. Hasonlóan az epesavakhoz, az alkohol is károsítja a duktális funkciókat a CFTR csatorna gátlása révén. Ezen eredmények alapján felmerül, hogy a BK_{Ca} csatornák vagy a CFTR aktiválása szintetikus farmakonok által egy új terápiás lehetőséget vet fel a biliáris vagy alkohol-indukálta pankreatitisz kezelésében. Mindamellett, mivel a sejten belüli energiaháztartás zavartalan működése elengedhetetlen ezen transzport folyamatok megfelelő működéséhez, az intracelluláris ATP koncentráció emelése, az energetikai károsodás helyreállításával szintén kedvező hatású lehet pankreatitiszben.

Az UDCA-val végzett kísérletek azt mutatták, hogy az UDCA előkezelés képes kivédeni a hidrofób epesavak-indukálta duktális károsodást, ezért bár jelenleg máj- és epeúti megbetegedésekben alkalmazzák, kedvező lehet a biliáris, rekurrens pankreatitisz terápiájában is. A Barrett nyelőcső kapcsán, szintén az iontranszport folyamatok helyreállításában látok terápiás lehetőséget. Ahogy eredményeink mutatták, a káros tényezők, úgy, mint a sósav illetve epesav hatására megváltozott működéssel reagálnak az ion transzport fehérjék. Azon transzporterek aktiválása, melyek az intracelluláris savasodás ellen hatnak növelhetik a sejtek ellenállását a savas reflux-al szemben, lassítva ezáltal a metaplasztikus elváltozások kialakulását.

Végezetül ismét szeretném megköszönni Dr. Gyires Klára Professzor Asszonynak értékes bírálatát és releváns kérdéseit. Köszönöm, hogy a nyilvános védés kitűzését javasolta. Egyúttal kérem Professzor Asszonyt válaszaim elfogadására.

Tisztelettel és köszönettel:

Dr. Venglovecz Viktória
Tudományos főmunkatárs

Szeged, 2020.06.29