

Válaszok Prof. Dr. Pintér Erika bírálataira

Először is szeretném megköszönni Dr. Pintér Erika Professzor Asszonynak a dolgozatom alapos, szakszerű és körültekintő bírálatát. A bírálatban feltett kérdéseire az alábbiakban válaszolnék:

- 1. A bevezetőben az epitél sejt iontranszportok között nem említi az apikális proton pumpát, Na^+ csatornát illetve a bazolaterális Na^+/K^+ kicserélőt. Ezeknek milyen jelentőségük van a gasztrointesztinális traktus egyes részeiben és milyen betegségekhez vezethet rendellenes működésük?**

A H^+/K^+ ATPáz és a Na^+/K^+ ATPáz a P típusú ATPázok közé tartozik. A két ATPáz sok szerkezeti homológiával rendelkezik, α -alegységei kb. 65%-os szekvencia homológiát mutatnak, míg a β -alegységek aminosav-szekvenciái ~ 35% -ban azonosak. A szerkezeti hasonlóság ellenére azonban számos fontos tulajdonságban különböznek egymástól. Ezen különbségek egyike a lokalizációjuk. A Na^+/K^+ ATPáz a legtöbb epitél sejten bazolaterálisan elhelyezkedő elektrogén transzporter, amely egy ATP molekulát felhasználva mediálja 3 Na^+ és 2 K^+ transzportját a membránon keresztül. A H^+/K^+ ATPáz a gyomor parietális sejtek apikális felszínén található, elektroneutrális kicserélő, melyen keresztül 1 H^+ cserélődik ki 1 K^+ -ra. A Na^+/K^+ ATPáz minden sejtben előfordul, alapvető feladata, hogy egy olyan iongradienst hoz létre a membrán két oldala között (magas extracelluláris Na^+ and intracelluláris K^+), ami biztosítja a sejtek nyugalmi membránpotenciálját és számos ion másodlagosan aktív transzportját. Nem megfelelő működése különböző betegség kialakulásához vezethet, melyek elsősorban kardiovaszkuláris és neurológiai eredetűek, továbbá vese illetve anyagcsere-betegségek. A proton pumpa szerepe a sósav szekrécióban van. Rendellenes működésük eredményeként csökken a savszekréció, ami a gyomorfekély kezelésében az egyik leggyakrabban megcélzott terápiás célpont.

Az epiteliális Na^+ csatorna, vagy más néven ENaC számos epitél sejt apikális membránján megtalálható, úgy mint a vese disztális nephronjában a fő sejteken, a húgyhólyag epiteliális sejtjein, a tüdő légúti sejtjein illetve a verejtékmirigyekben. A gasztrointesztinális traktus tekintetében elsősorban a disztális vastagbélben és a nyálmirigyekben fordul elő. A Na^+/K^+ ATPáz-al együttműködve ez a csatorna szabályozza a só reabszorpcióját, és nagy szerepet játszik a teljes test só és víz homeosztázisában, valamint a vérnyomás szabályozásában.

Az ENaC működési rendellenességei közvetlenül kapcsolódnak számos betegséghez, ideértve a Liddle-szindrómát, a psuedohypoaldosteronizmust és a cisztás fibrózist, továbbá szerepet játszhat a só háztartás szabályozása révén a hipertónia kialakulásában is.

- 2. A bevezetőben megemlíti, hogy a GI traktus körülbelül 10 liter folyadék szekréciójáért/abszorpciójáért felelős. A folyadék szekrécióban és abszorpcióban az iontranszport folyamatok mellett az aquaporinok szerepe is meghatározó. Milyen típusú AQP-ok találhatóak a GI traktusban, illetve milyen iontranszport folyamatokhoz kapcsolódnak?**

A folyadék transzport a gyomor-bél rendszer egyik fő funkciója. Naponta nagyjából 10 liter folyadék szívódik fel vagy választódik ki az epitel sejteken keresztül melyben a nyálmirigy, a gyomor, a máj és hasnyálmirigy, a vékonybél valamint a vastagbél vesz részt. Az általános nézet szerint a GI traktusban (hasonlóan a többi szervrendszerhez) a vízmozgás másodlagosan következik be az aktív ionmozgások által létrehozott ozmotikus hajtóerők és a hidrosztatikus nyomáskülönbségek következtében. A nyálmirigyben, az intrahepatikus cholangiocytákban és a hasnyálmirigy acinusokban feltehetőleg ilyen mechanizmussal történik a víz transzportja. Más epiteliumok esetén, különösen a vesében a sejtmembrán vízáteresztő képessége nagyobb ami nagyobb nettó folyadékmozgást eredményez. A vékony és vastagbél esetében jelentős eltérések vannak az ozmotikus permeabilitás tekintetében, ugyanis a vékonybél proximális szegmenseiben nagyobb az ozmotikus permeabilitás, mint a disztális szegmenseken (Fordtran és mtsai., 1965). A vékonybél hámján keresztüli gyors vízmozgás általában paracelluláris úton történik, azonban a legújabb vizsgálatok azt mutatják, hogy legalább két különböző akvaporin expresszálódik a vékonybélben, melyek a transzcelluláris víztranszportot szabályozzák.

Az AQP-k expressziója nagy változatosságot mutat a GI traktusban. Az AQP1 az intrahepatikus epevezeték hámjában, a bél nyirokereiben és a nyálmirigy mikrovaszkuláris endotéliumában fordul elő, ahol az epe képződésében, a zsírok felszívódásában illetve a nyálszekrécióban játszik központi szerepet. Az AQP4 a gyomor parietális sejtek bazolaterális membránjában fejeződik ki, ahol a sav/folyadék szekrécióban vesz részt. Az AQP3 és AQP4 a vastagbél felületi hámjának bazolaterális membránjában található és a székletből történő vízvisszaszívást segíti elő. Az AQP5 a nyálmirigy acináris sejtek apikális membránjában az AQP1-el szabályozza a nyálszekréciót. Míg az AQP8 a jejunális bélbolyhok-ban fordul elő. Az AQP8 és AQP9 transzkriptumokat in situ hibridizációval lokalizálták a májsejtekben is, feltételezve ezen AQP-ok lehetséges szerepét a májsejtek térfogatának szabályozásában és az epe szekréciójában. Emellett Northern-blot elemzéssel az AQP3 transzkriptum erőteljes expresszióját találták emberi vékonybélben. Saját kutatásaink során sikerült azonosítani az AQP1 szerepét a pankreasz duktális sejtek folyadék és HCO_3^- szekréciójában, illetve kimutattuk, hogy ezen izoforma szoros összhangban működik a CFTR Cl^- csatornával.

3. Az akut pankreatitisz kialakulásában megemlíti az Opie-féle elméletet. Az utóbbi évek kutatási eredményei alapján azonban az epe reflux helyett egyre inkább a megnövekedett nyomást teszik felelőssé az AP kialakulásáért. Vizsgálták-e a nyomásviszonyokat a duktuszokban?

Köszönöm a kérdést. Való igaz, hogy a megnövekedett nyomás hatása egyre inkább előtérbe kerül az epe-indukálta pankreatitisz kapcsán. Romac és munkatársai kimutatták, hogy a nyomás indukálta hasnyálmirigy gyulladás egyik fő szabályozója a Piezo 1 mechanoszenzitív csatorna (Romac és mtsai, 2018, Nat. Commun.). A Piezo fehérjék, beleértve a piezo 1-et és 2-t specifikus mechanotranszduktorok emlősökben, amelyek számos mechanikai stimulust képesek elektrokémiai szignállá alakítani. A Piezo1 leginkább a nem szenzoros szövetekben, folyadékáramlásnak és nyomásnak kitett szövetekben fordul elő. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a piezo1 aktivációja mechanikai nyomás hatására hasnyálmirigy gyulladásához vezethet (Yao és mtsai, 2019, Acta Biochim Biophys Sin), továbbá ismeretes, hogy az intraduktális nyomás megemelése egerekben acináris károsodáshoz és akut hasnyálmirigy

gyulladásához vezethet (Wen és mtsai, 2018, Gastroenterology). Az kísérletes kutatások mellett számos klinikai adat mutat rá a nyomás megemelkedésének fontosságára például akut biliáris pankreatitiszben. Munkacsoportunk jelenleg is vizsgálja, hogy a különböző nyomásviszonyok miként hatnak a hasnyálmirigy duktális epithél sejtek funkciójára *in vitro*. Előkísérleteink során, egy újfajta módszer segítségével az izolált duktuszokon luminális nyomást alkalmazunk a duktusz lumenébe vezetett üvegpipetta segítségével. Az előzetes kísérletek során azt találtuk, hogy 25 Hgmm nyomás a duktális sejtek funkciójának súlyos károsodását okozza, mely elsősorban az iontranszport folyamatok, úgy mint a HCO_3^- szekréció gátlásában nyilvánul meg.

4. Az AP kialakulásának közvetlen kulcsfontosságú előzménye a tripszin idő előtti aktiválódása. Milyen legújabb irodalmi adatokat ismer a molekuláris pathomechanizmust illetően?

Az acinus az exokrin hasnyálmirigy funkcionális egysége, melyben az emésztő enzimek szintézisének, tárolásának és exportjának rendkívül szabályozott folyamata történik. A zimogének az apikális membránhoz közel eső granulátumokban raktározódnak, proenzimek formájában, a hidrolázoktól elkülönítve, melyek sejten belüli enzimaktivációt indukálnának. Az idő előtti enzimaktiválódástól, számos további mechanizmus is védi a sejtet, úgy mint az $\alpha 1$ -antitripszin, az $\alpha 1$ -makroglobulin, az $\alpha 1$ -intertripszin, a proteáz aktivált receptor 2 (PAR-2) vagy a hasnyálmirigy szekréciós tripszin inhibitor (PSTI). Kísérleti tanulmányok igazolták, hogy az AP kialakulása során az első lépésben gátlódik az emésztőenzimek szekréciója, az aktin filamentumok és a mikrotubulusok károsodása következtében, majd a következő lépésben a tripszinogén lizoszómális enzimekkel, például a katepszin B-vel kölcsönhatásba kerül, melynek hatására intraacinárisan aktiválódik és tripszin keletkezik, mely az acináris sejt károsodását eredményezi. Az utóbbi évek kutatásai további mechanizmusokat azonosítottak az AP pathomechanizmusában, úgymint a megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció, mind a citoszol-ban mind pedig a mitokondriumokban, mely kritikus szerepet játszik az idő előtti tripszinogén aktivációban. A különböző szekretagógok (kolecisztokinin, acetilkolin), illetve toxikus faktorok (epesavak, zsírsav-etil észter, zsírsavak) hatására az endoplazmatikus retikulumban (ER) tárolt Ca^{2+} az inozitol-triszfoszfát és ryanodin receptorokon keresztül a citoszol-ba és a mitokondriumokba jut, ahol felhalmozódik. Az ER-ban lecsökkent Ca^{2+} -ot a sejt kívülről próbálja pótolni és ehhez az ER és a plazmamembrán között egy speciális kapcsolat alakul ki a stromal interaction molekula (STIM), a Ca^{2+} release-aktiválta Ca^{2+} csatorna (ORAI) és a tranziens receptor potenciál kation csatorna (TRPC) között. A toxikus stimulus hatására bekövetkező Ca^{2+} felszabadulás és további Ca^{2+} felvétel túlterheli a mitokondriumokat ami a mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus (mPTP) megnyitását eredményezi. Az mPTP-n keresztül H^+ jut a mitokondriális matrix-ba, ami a membrán potenciál és a ATP szintézishez szükséges elektrokémiai grádiens megszűnését eredményezi. Ennek eredményeként tartósan megemelkedik mind a mitokondriális mind pedig a citoszol-ban lévő Ca^{2+} koncentráció, hiszen a clearance mechanizmusok, úgy mint a plazmamembránon található Ca^{2+} -ATPase (PMCA) vagy a szarco/endoplazmatikus retikulumon lévő Ca^{2+} -ATPase (SERCA) az ATP hiányában nem megfelelően működnek. A csökkent ATP termelés következtében az autofágia, szekréció illetve az endolizoszómális trafficking folyamatok gátlódnak. Az aktiválódott zimogének hatására gyulladásos citokinek szabadulnak fel, közben a szabadgyökök a sejtekben felhalmozódnak és apoptózist indukálnak. A sejtkárosodás hatására az interstitiumba,

nyirokrendszerbe, portális és szisztémás keringésekbe olyan molekulák kerülnek, melyek további immunválaszokat generálnak, súlyosbítva ezáltal a helyi és lokális károsodást.

5. A Barrett oesophagus kialakulásában lehet-e szerepe a nyelőcső bikarbonát szekréciójának vagy a mucoprotein szintézisének csökkenésének?

A nyelőcső epitél sejtek apikális membránja és az apikális junkcionális complex egy szerkezeti akadályt biztosít a luminalis ionok, különösen a refluxált gyomorsavból származó hidrogén ionok sejtbe vagy az intercelluláris térbe történő bejutásával szemben. 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 HCO_3^- , melyek közül a HCO_3^- bír a legnagyobb jelentőséggel, mivel a HCO_3^- könnyen transzportálódik a vérből az extracelluláris illetve intercelluláris terekbe ezáltal gyorsabban képes kiegyenlíteni a pH-ban bekövetkező kilengéseket. A HCO_3^- sejtbe történő transzportja mellett a sejt enzimatikus reakció útján is állít elő HCO_3^- , mely reakciót a szénsav-anhidrázok közvetítik, mely során a vizet és a szén-dioxidot szénsavvá alakítják, majd a szénsav bomlik protonra és HCO_3^- . Ezáltal normál körülmények között a sejt citoszoljába illetve az intercelluláris terekbe diffundáló protont a puffer rendszerek semlegesítik, és így az egészséges nyelőcsőhám pH-ját egyáltalán nem, vagy csak csekély mértékben képes befolyásolni. Abban az esetben, ha a sejtbe nagy mennyiségű proton jut be, amit a puffer rendszerek már nem képesek neutralizálni, a felesleges protont iontranszporterek segítségével próbálja eltávolítani illetve neutralizálni a sejt. Ilyen transzporterek a sejtek bazális membránján található Na^+/H^+ kicserélő vagy a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ anion kicserélő. Mindkét esetben a transzporterek működésének köszönhetően a citoszol pH-ja a alkalózis felé tolódik. Ebből adódóan a HCO_3^- transzport károsodása érzékenyítheti a sejteket a savval szemben, melynek eredményeként sejtkárosodás, sejtnekrózis következhet be, ami növelheti az esophagitis kialakulásának a kockázatát.

A HCO_3^- szekréció mellett a mukóza felszínét borító nyálka réteg is fontos szerepet játszik a nyelőcső hám savval szembeni védelmében. Ez a nyálka réteg HCO_3^- -ban gazdag és az első védő gátat jelenti még az epitél sejtek előtt. A nyálka réteg folyamatosan ki van téve mechanikai és kémiai behatásoknak, melyek károsíthatják, viszont a szubmukóza mirigyek által folyamatosan újratermelődik, illetve a lenyelt nyálból is kiválasztódik és ezáltal helyreáll. A nyálka egyik alkotóeleme a mucin, amely fontos szerepet játszik a sav semlegesítésében a nyelőcsőben. A GERD-ben szenvedő betegekben a mucinkiválasztás jelentősen lecsökken, még az eróziós nyelőcsőgyulladás gyógyulása után is. A mucin jelentőségét mutatja az is, hogy azokban a patkányokban, melyeknél a mucin termelést 70%-al csökkentették a nyelőcső hám érzékenyebb volt a savval és pepszin-el szembeni károsodásra (Kinoshita és mtsai, 1999, Am. J. Physiol). A Barrett nyelőcső kapcsán megváltozott mucin expressziót figyeltek meg. A normál nyelőcsőben a laphámsejtekben expresszált fő mucinok a MUC1 és a MUC2, míg a MUC5B a szubmukozális mirigyekben fordul elő. Barrett nyelőcsőben a MUC5AC és a MUC6 down regulációja csökkenti a nyálkahártya védelmét a gyomorsavval szemben. Fokozott MUC1 expresszió a diszplázia-adenocarcinoma irányába történő progresszióhoz társul, míg a MUC2 gén nagyfokú kifejeződése, intesztinális metapláziát tükröz Barrett nyelőcsőben. Mivel bizonyos mucin gének up regulálódnak, mások pedig alul expresszáltak Barrett nyelőcsőben, a mucin szerepe a nyálkahártya védelmében nem teljesen egyértelmű Barrett nyelőcső esetén.

6. Az ursodeoxycolsav pancreas ductusokon kifejtett pozitív hatása minek tulajdonítható? Van-e ilyen pozitív hatása az acinusokra is? Ismer-e olyan experimentális vizsgálatot, ahol pankreatitiszben is vizsgálták az ursodeoxikolsav védő hatását?

Az UDCA védő hatásának mechanizmusát elsősorban hepatocitákon végzett tanulmányokban vizsgálták. Ezen tanulmányokban egyrészt annak tulajdonítják az UDCA védő hatását, hogy az UDCA csökkenti az endogén epesavak bélben történő felszívódását, csökkentve ezáltal a hidrofób epesavak koncentrációját az epében. Másrészt az UDCA illetve konjugátumai, közvetlen védő hatást is kifejtenek a májsejtek szerkezetére és működésére. Az UDCA citoprotektív hatása magába foglalja a sejtszerkezet stabilizálást, valamint a szubcelluláris és anti-apoptikus útvonalak aktiválását. Korábbi feltételezések szerint az UDCA hozzákötődik a membránhoz és stabilizálja azt. Azonban Heumann és munkatársai kimutatták, hogy az UDCA nem stabilizálja közvetlenül a membránokat, hanem megakadályozza a hidrofób epesav-indukálata membrán károsodást azáltal, hogy megváltoztatja a membrán szerkezetét és összetételét (Heumann és mtsai, 1996, J Lipid Res.). A hidrofób epesavak sejtkárosító hatását a mitokondriális diszfunkcióval magyarázzák. Az mPTP nyitódásával a mitokondrium átjárhatóvá válik az ionok számára, ami a mitokondriumok hízásához, valamint a mitokondriális membránpotenciál és oxidatív foszforiláció megszűnéséhez vezet. Az oxidatív foszforiláció hiányában, ATP depléció alakul ki, a sejt ion homeosztázisa felborul ami végső soron sejthalált indukál. Így az mPTP indukciója lehet a sejthalál egyik kritikus lépése. Májsejteken végzett *in vitro* vizsgálatban kimutatták, hogy a kenodezoxikólsav glicin-konjugált formája, dózisfüggő módon indukálja az mPTP-t, ahogy azt mi is tapasztaltuk a pankreász duktális sejteken. Az UDCA kezelés gátolta a GCDCA-indukálta mPTP indukciót és megakadályozta a májsejtek elhalását. Egy másik vizsgálatban az UDCA csökkentette a dezoxikólsav-indukálta mitokondriális membránpotenciál csökkenést és csökkentette a szabadgyök termelődést is. Leuschner és mtsai. azt találták, hogy az UDCA védő hatása feltehetőleg a membrán stabilizáló tulajonságából fakad, ugyanis az UDCA képes csökkenteni a membrán polaritását azáltal, hogy beépül a membrán apoláris doménjébe, ezenkívül gátolja a CDCA-indukálta glutamát dehidrogenáz (GLDH) felszabadulást a mitokondriumokból (Güldütuna és mtsai, 1993, Gastroenterology). Az UDCA pankreász duktuszokra kifejtett védő hatása feltehetőleg a mitokondriális membrán stabilizálásán keresztül valósul meg, azáltal, hogy gátolja a mitokondriális membrán depolarizációját illetve az mPTP nyitódását.

Vizsgálataink kiterjedtek az UDCA védő hatásának *in vivo* körülmények közötti vizsgálatára is. Kísérletink során patkányokban váltottunk ki pankreatitist, CDCA intraduktális injektálásával. A CDCA adása acinus sejt nekrozist illetve emelkedett szérum amiláz szintet eredményezett. Két hetes UDCA kezelés hatására jelentősen lecsökkent a CDCA-indukálta nekrozis és ödéma mértéke, amely feltételezi, hogy az UDCA védő hatását nem csak a duktális sejtekre, hanem az acinusokra is kifejti. Ennek vizsgálatához egér és patkány acinusokat izoláltunk és megnéztük az epesavak hatását a viabilitásra. Sajnos többszöri próbálkozás ellenére sem sikerült az UDCA esetleges védő hatását *in vitro* megvizsgálni, mivel az izolált acinusok lényegesen érzékenyebbek, mint az intakt duktuszok, emiatt a krónikus epesav kezelést a sejtek nem bírták. Továbbá az epesavak már igen kis koncentrációban

lecsökkentették az acinusok viabilitását (még az UDCA is), amely tovább nehezítette a vizsgálatokat.

7. Mi a szerepe a CFTR (cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulator) csatornának a pankréaszban? Vizsgálták az alkohol és zsírsavak hatását a CFTR Cl⁻ csatornára. Mindkét esetben nagyon magas dózisokat is alkalmaztak. Van-e arra human adat, hogy ezek a koncentrációk emberben is jelen vannak?

A CFTR fehérje egy cAMP által szabályozott Cl⁻ csatorna, amely számos epitél sejt luminális membránján előfordul. Az exokrin hasnyálmirigyben a CFTR csatorna a dukális sejteken fordul elő, ahol kulcsszerepet játszik az apikális Cl⁻ és HCO₃⁻ transzportjában. Az Slc26A6 anion kicserélővel szoros összhangban működik, melynek eredményeként egy alkalikus, izotonikus szekrétrum képződik, melyben akár a 140 mM-t is elérheti a HCO₃⁻ koncentrációja. A CFTR gént érintő mutációk különböző mértékű funkcióvesztést okoznak, mely a hasnyálmirigy kóros elváltozásaihoz vezet. Emellett a különböző etiológiai tényezők, úgy mint a túlzott alkoholfogyasztás is képesek megváltoztatni a CFTR működését, melynek eredményeként pankreatitisz alakulhat ki. Kísérleteink során az alkohol hatását 1-100 mM-os koncentrációban, míg a zsírsavak és zsírsav-etil észterek hatását 10-200 μM-os koncentrációban vizsgáltuk. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy az etanol nagyon magas koncentrációi, akár 100 mM is előfordulhat emberben. Kísérleti körülmények között munkacsoportunk kimutatta, hogy ahhoz, hogy emberben 20 mM véralkohol szint kialakuljon nagyjából 4 dl vodka elfogyasztása szükséges. Ehhez képest idült alkoholisták vérében ennek többszöröse is előfordul, sőt egy esetben 108 mM véralkohol szintet sikerült detektálnunk, aminek eléréséhez nagyjából 2 liter tömény alkohol elfogyasztása szükséges. Ilyen mennyiségű alkohol akár kómát vagy légzésbénulást okozhat azoknál akik nem fogyasztanak rendszeresen alkoholt. Ez alapján feltételezhető, hogy a krónikus alkoholisták szervezete valamilyen mértékben alkalmazkodott nagyobb mennyiségű alkohol elfogyasztásához. Irodalmi adatok alapján az alkoholisták szervezete a 700 mg/dl-es véralkohol szintet is képes tolerálni, ami feltehetőleg a felgyorsult anyagcserével magyarázható. Vizsgálataink során átlagosan 65 mM véralkohol szintet mértünk az alkoholistáknál.

8. Ismert, hogy a CFTR Cl⁻ csatorna változtatja érzékenységét a Cl⁻ és HCO₃⁻ ionokra. Az alkohol és zsírsavak befolyásolják-e a csatorna szelektivitását? Milyen típusú anionok mehetnek keresztül a CFTR Cl⁻ csatornán?

A CFTR csatorna a Cl⁻ ionok mellett HCO₃⁻-ra, tiocianátra, jódra és glutationra is permeábilis. A csatorna szelektivitását a CFTR-t érintő mutációk képesek befolyásolni, úgy mint a lizin oldalláncot érintő mutáció. Kísérleteink során igazoltuk, hogy az etanol és zsírsavak magas koncentrációja csökkenti a csatorna aktivitását és expresszióját, arra vonatkozóan azonban, nem lelehető fel adat az irodalomban hogy képesek-e megváltoztatni a csatorna szelektivitását

9. Mind az alkohol és a zsírsavak csökkentik a CFTR Cl⁻ csatorna aktivitását? Milyen mechanizmus állhat e mögött? A csatorna nyitásának/zárásának frekvenciája változik-e? Változik-e a csatorna szerkezete?

A CFTR Cl⁻ csatorna tagja az ATP-kötő kazetta (ABC) transzporter szupercsaládnak, amely megköti és hidrolizálja az ATP-t annak érdekében, hogy megkönnyítse a csatorna konformációs átrendeződését, amely az aktivitáshoz nélkülözhetetlen. Számos vizsgálatban igazolták, hogy ATP hiányában a CFTR aktivitása drámaian lecsökken (Hennager és mtsai., 2001, Proc Natl Acad Sci U S A; Alexandrov és mtsai., 2009, J Physiol). Mivel korábban kimutatták, hogy a zsírsavak és zsírsav-etil észterek ATP depléciót okoznak patkány hasnyálmirigy-acináris sejtekben (Criddle és mtsai., 2006, Gastroenterology) megvizsgáltuk, hogy az intracelluláris ATP (ATP_i) szint csökkenése szerepet játszik-e az EtOH, POAEE és POA CFTR gátló hatásában. Eredményeink azt mutatták, hogy mindhárom vegyület csökkenti az ATP_i szintet a duktális sejtekben. Ezzel összhangban a glikolitikus és mitokondriális ATP-termelés gátlása hasonló mértékben csökkentette a CFTR-áramot, mint amelyet az EtOH, POA és POAEE okozott, ami azt sugallja, hogy az ATP_i csökkenése kulcsfontosságú lépés ezen ágensek CFTR-t gátló hatásában. Ezt támasztja alá továbbá az is, hogy az ATP visszajuttatása a sejtekbe a patch pipettán keresztül szinte teljesen megszüntette ezen szerek gátló hatását a CFTR aktivitásra. Alapvetően az ATP a csatorna nyitott/zárt állapotát szabályozza, ugyanis az ATP molekula képes kötődni a CFTR nukleotid-kötő doménjeihez (NBD), melynek hatására a két NBD dimerizálódik és másfajta konformációt vesz fel. Ez a konformációs változás az NBD-ben együtt jár a transzmembrán domének konformációs változásával, melynek eredményeként a szubsztrátkötő hely az extracelluláris oldal felé nyitottá válik. Az ATP hidrolízise és levállása a csatorna konformációjának a visszaállítását és a csatorna záródását okozza.

10. Amennyiben elfogadjuk azt a tényt, hogy a CFTR Cl⁻ csatorna döntő szerepet játszik a pankreatitisz kialakulásában, akkor a jelenleg elérhető potenciátorok vagy aktivátorok csökkenthetik-e a pankreatitisz súlyosságát vagy a recidívák kialakulását?

Jelenleg két klinikai forgalomban kapható szer áll rendelkezésünkre a cisztás fibrózis kezelésére, melyek a CFTR működését állítják helyre. A VX-809 (Lumacaftor), egy orálisan is adható CFTR korrektor, ami Fázis II. vizsgálatokban hatékonyan bizonyult a CFTR csatorna p.F508del típusú mutáció esetében, a tüdőfunkció javulásának a tekintetében. A F508del típusú mutáció a CFTR gén egyik leggyakoribb mutációja, amely egy nem megfelelő konformációjú CFTR fehérjét eredményez. A hibásan szintetizálódott fehérjét a sejt lebontja, mielőtt elérné a sejtmembránt. Még ha a hibás fehérje egy része eléri is a sejtmembránt, nem képes megfelelően működni, hogy lehetővé tegye a Cl⁻ átjutását. A Lumacaftor növeli a hibás CFTR fehérjék stabilitását, elősegítve a sejtmembránra történő lokalizációt. A Lumacaftort általában az Ivacaftorral (VX770) kombinációban alkalmazzák, amely a csatorna nyitási gyakoriságát növeli, elősegítve ezáltal a membránon keresztüli Cl⁻ transzportot.

Vizsgálataink során igazoltuk, hogy a pankreatitisz kialakulásában szerepet játszó etiológiai tényezők közül, az alkohol és annak nem-oxidatív bomlástermékei csökkentik a CFTR aktivitását és expresszióját, súlyosabb AP kialakulását eredményezve. Egyelőre nincs adat arra vonatkozóan, hogy Lumacaftor és Ivacaftor AP-ben alkalmazhatóak-e.

Munkacsoportunkban folyamatban vannak *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok, annak eldöntésére, hogy a CFTR csatorna funkciójának és expressziójának korrekciója kivédi-e az alkohol indukálta duktális sejtkárosodást. Eredményeink azt mutatják, hogy a VX-770 és VX-809 képes helyreállítani az alkohol-kiváltotta CFTR expresszió csökkenést Capan-1 duktális sejteken,

illetve a két szer kombinatórikus adása csökkentette az alcohol-indukálta pankreatitisz súlyosságát tengerimalac modell-ben. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a Lumacaftor és Ivacaftor adása terápiás előnyökkel szolgálhat a pankreatitisz kezelésében.

11. Az ATP visszaadása kedvezőnek bizonyult a CFTR Cl⁻ csatorna aktivitásának fokozásában. Milyen lehetőséget látna a sejtek ATP tartalmának a növelésére a klinikumban?

Az ATP sejtbe juttatása egyelőre még nem megoldott a klinikumban. A fő problémát az jelenti, hogy az ATP-t a hidrolázok gyorsan elbontják, illetve a molekula féléletideje nagyon rövid, mindössze 1-2 perc. A másik nehézséget az okozza, hogy a molekula hidrophil természeténél fogva nem képes átjutni a sejtmembránon. A megoldást az jelentheti, ha az ATP-t liposzómába csomagolva tudnánk bejuttatni, specifikusan a pankréász epitél sejtekbe helyreállítva ezzel a sejt energetikai szintjét. Erre irányuló kísérletek jelenleg is folyamatban vannak kollaborációban a SZTE GYTK Gyógyszertechnológiai Intézettel. Előkísérleteink során propidiumjodid-ot tartalmazó micellákkal inkubáltunk Capan-1, pankréász adenokarcinóma sejteket. Mivel a propidium jodid önmagába képtelen átjutni az élő sejtek membránján, a sejtekben megjelenő fluoreszcens intenzitás a liposzómákba csomagolt propidium jodid bejutására utal. *In vitro* kísérleteink során kimutattuk, hogy a propidium jodid tartalmú micellák közel 30%-a jutott be a sejtekbe. Továbbá *in vivo* kísérleteket is végeztünk egereken, mely során sikerült kimutatnunk, hogy az állatok fark vénájába injektált pankréász-specifikus, Evans Blue fluorescens festéket tartalmazó micellák eljutottak a pankréászba. Eredményeinkből arra következtetünk, hogy a micellák alkalmasak lehetnek különböző molekulák pankréászba történő bevitelére, bár további vizsgálatok szükséges ezen hipotézisünk alátámasztásához.

12. A pankreatitisz patomechanizmusában (illetve a sejthalálban) döntő szerepe van az intracelluláris kalcium koncentráció emelkedésének. Van-e bármi kapcsolat az intracelluláris kalcium koncentráció és a CFTR Cl⁻ csatorna aktivitása között? Van-e kapcsolat a store operated és IP3R mediálta calcium csatornák és a CFTR Cl⁻ csatorna között?

A CFTR csatorna alapvetően egy cAMP által aktivált csatorna, azonban egyre több adat mutatja azt, hogy a cAMP mellett az intracelluláris kalciumban (Ca^{2+})_i bekövetkező változások is befolyásolják a csatorna aktivitását. A CFTR Ca^{2+} általi szabályozása egy összetett mechanizmus, mely többféle útvonalon keresztül is megvalósulhat. Az egyik ilyen útvonal az adenilil cikláz aktivációja a Ca^{2+} által. A citoszol-ban lévő Ca^{2+} szint kis mértékű emelkedése stimulálhatja a Ca^{2+} -függő adenilil-cikláz egyes izoformáit, ami a megnövekedett cAMP szinten keresztül aktiválja a csatornát. Egy újabb tanulmányban kimutatták, hogy a CFTR csatorna része egy olyan makromolekuláris jelátviteli komplexumnak, melyben a store-operated Ca^{2+} csatorna, az Orai1 is megtalálható melyen keresztül Ca^{2+} jut a sejtbe. Bozóki és mtsai. azt találták, hogy a kalmodulin közvetlen kölcsönhatásba lép a CFTR csatorna szabályozó régiójával, Ca^{2+} - és foszforiláció-függő módon, melynek eredményeként a CFTR nyitódását szabályozza a foszfokináz A általi foszforilációhoz hasonlóan (Bozóki és mtsai,

PNAS, 2017). Ezzel szemben, egy friss tanulmányban Mike Gray és mtsai. kimutatták, hogy a Ca^{2+} szint megemelkedése a citoszol-ban, a forrástól vagy mechanizmustól függetlenül, a CFTR által közvetített vezetőképesség csökkenését okozza a csatorna internalizálása révén (Patel, 2019, Cell and Mol Life Sci). Elképzelhető, hogy a Ca^{2+} sejten belüli koncentrációja egy kritikus faktor a CFTR csatorna működését illetően és míg fiziológias koncentrációban a csatorna aktivációját okozza, patofiziológias koncentrációja gátló hatást fejt ki a CFTR működésére.

13. Milyen pankreatitisz állatmodelleket alkalmazott a kutatásai során? Emelje ki az egyes modellek transzlációs jelentőségét! A rágszáló modellek nem igazán jók a CFTR Cl^- csatorna vizsgálatára. Van-e experimentális pankreatitisz modell tengerimalacban?

Vizsgálataim során akut pankreatitisz-t váltottam ki egérben, patkányban illetve tengerimalacban. Az egér és patkány esetén a cerulein által kiváltott pancreatitis az akut pancreatitis (AP) legszélesebb körben alkalmazott kísérleti állatmodellje. A modell egyik legfontosabb előnye, hogy reprodukálható és mind patkányokban mind pedig egerekben alkalmazható AP kiváltására. A cerulein egy olyan hormon, amely analóg a kolecisztokinin-el, mely fiziológias körülmények között a hasnyálmirigy enzim szekrécióját indukálja. Ennél a model-nél AP-t a cerulein supramaximális dózisának intravénás vagy intraperitoneális injektálásával lehet kiváltani, melynek protocol-ja patkányokban 5 $\mu\text{g}/\text{ttkg}/\text{óra}$, míg egér esetében 50 $\mu\text{g}/\text{ttkg}/\text{óra}$. A cerulein hasnyálmirigy enzim aktiválást indukál az intravénás beadástól számított 30 percen belül. Jellemzően a cerulein által kiváltott AP modellben a hasnyálmirigy szövettani elváltozásai kezdetben enyhék, néhány órán belül előrehaladottak, és egy idő elteltével teljesen megszűnnek. A kialakult pankreatitisz sok tekintetben megegyezik az emberi AP-vel, úgy mint a hyperamylasemia kialakulása illetve a pankréász szövettani elváltozásai, azaz a gyulladós sejtek infiltrációja, hasnyálmirigy ödéma megjelenése illetve bizonyos esetekben acinus nekrosis figyelhető meg. Mivel a cerulein-indukálta AP kórszövettani eredményei nagyban hasonlítanak az embereknél fellépő AP-hez, ezt a modellt tekintik az enyhe-közepes AP reprezentatív modelljének, és széles körben használják az AP patogenezisének tanulmányozására, különös tekintettel az emésztő enzimek autoaktivációs folyamatainak a vizsgálatára. Továbbá a cerulein-indukálta AP modell a legmegfelelőbb az AP patogenezisének vizsgálatához géntechnológiával módosított egerek esetében is. A cerulein mellett a CDCA intraduktális injektálásával is váltottunk ki AP-t patkányban, mely acinus sejt nekrozist illetve emelkedett szérumszintet eredményezett.

Egyetértek Professzor Asszonnyal abban, hogy a tengerimalac egy lényegesen jobb modell állat a CFTR tanulmányozására, hiszen a dukális sejtek nagy mennyiségben expresszálják a CFTR csatornát, míg az egérben az elsődleges Cl^- csatorna az anoctamin. A tengerimalac esetében a hasnyálmirigy gyulladás kiváltására az egereknél használt cerulein-indukálta pankreatitisz modell-t használjuk. A 10. óra után 2 órával történik az állat feláldozása. A szövettani analízis és szérumszint mérés ödéma, leukocita infiltráció, nekrosis jelenlétét és emelkedett szérumszintet mutat a kontroll csoportokhoz képest.

14. Kísérletes munkái alapján milyen potenciális gyógyszer-célpontokat tudna azonosítani, melyek terápiás jelentőséggel bírhatnak az akut és krónikus pankreatitisz, valamint a Barrett nyelőcső kezelésében?

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 pankréász 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 HCO₃-szekrécióban, melynek patológiai szempontból is jelentősége van. A BK csatorna aktivációja fokozza a duktális sejtek HCO₃-szekrécióját melynek patofiziológiás szempontból abban van jelentősége, hogy a fokozott szekréció révén védi a pankréaszt a káros 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 aktivációja 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.

15. Az elmúlt 5 évben hogyan változtak meg e betegségek kezelési protokolljai?

Az American Gastroenterological Association (AGA) 2018 márciusában kiadta az akut pancreatitis (AP) kezelésére vonatkozó irányelveket.

Az AP diagnosztizálásához az alábbiak közül legalább két tünet megléte szükséges: jellegzetes hasi fájdalom; emelkedett amiláz vagy lipáz szint (felső határ háromszorososa) vagy a hasi képealkotó vizsgálatok (ultrahang, CT) során igazolt gyulladás jelenléte. Az AP-nek alapvetően két átfedő fázisa van, a korai és a késői. Az AP korai fázisa a betegség kialakulását követő első 2 hét, a késői szakasz pedig ezt követően hetektől hónapokig tarthat. AP-ben szenvedő betegeknél az AGA terápiás javaslata a következő:

1. A folyadékpótló kezelés esetén a AGA a hidroxietil-keményítő (HES) folyadék alkalmazását javasolja, mivel a kezdeti folyadékpótló kezelésben hatékonyabbnak tűnik a HES alkalmazása, bár egy másik tanulmány szerint a Ringer laktáthoz képest fokozza a

veseelégtelenség és a mortalitás arányát az intenzív ellátásban, ezért alkalmazása megfontolandó

2. Prediktív súlyos AP-vel és nekrotizáló AP-vel rendelkező betegek esetén az AGA javasolja a profilaktikus antibiotikumok alkalmazását.

3. Azoknál a betegeknél akik akut biliáris pankreatitiszben (ABP) szenvednek az AGA javasolja a sürgős endoszkópos retrográd cholangiopancreatography (ERCP) rutinszerű alkalmazását.

4. Az AGA javaslata alapján AP-ben szenvedő betegek esetében 24 órán belül meg lehet kezdeni szájon át az újratáplálást normal étrenddel, amely rövidebb kórházi tartózkodást eredményez.

5. Azoknál az AP-s betegeknél, akik nem képesek orális táplálkozásra, az AGA inkább enterális, mint parenterális táplálást javasol, ezen belül is a nazogastrikus vagy a nasojejunalis utat.

6. ABP-ben szenvedő betegeknél a cholecystectomy biztonságosnak tűnik és javasolt. Elbocsátást követő tervezett cholecystectomy, enyhe ABP-vel kezelt beteg esetében, a visszatérő epeúti esemény (ismételt ABP) miatti újrafelvétel jelentős kockázatával jár.

A Barrett nyelőcső kezelése:

A Barrett nyelőcső meglétét a klinikai gyakorlatban endoszkópos vizsgálattal állapítják meg. A biopsziás mintavétel követően a diszplázia megléte illetve mértéke ("low" vagy "high" grade diszplázia) határozza meg a további terápiát. Az American College of Gastroenterology (ACG) legújabb irányvonalai az alábbi protokoll-t javasolják:

Ha a biopszia nem mutat diszpláziát, akkor 3-5 évente javasolt az endoszkópos megfigyelés és mintavétel. Alacsony fokú diszplázia esetén javasolt 6 hónapon belül egy új endoszkópia, és ezt követően 6-12 havonta további nyomonkövetés. Azoknál a betegeknél akiknél magas fokú diszpláziát, vagy korai stádiumú nyelőcsőrákot diagnosztizálnak, kezelésként az endoszkópos terápiát részesítik előnyben, mely során a metaplasztikus szövet eltávolításra kerül. Ez radiofrekvenciás ablációval történik Ezt követően javasolt nagy dózisú PPI-ok szedése, illetve a reflux sebészi kezelése. Továbbá az utóbbi években egyre nagyobb hangsúlyt kap a biomarkerek alkalmazásának előnye, különösen olyan rákmegelőző állapotokban mint a Barrett nyelőcső. Az utóbbi években számos olyan sejtszintű változást sikerült feltérképezni, amelyek akár diagnosztikus markerként is szolgálhatnak és segítségükkel ellenőrizhetőek a magasabb rizikófaktorba tartozó Barrett-es betegek, akár már a diszplázia kialakulása előtt. Egy nemrég megjelent tanulmányban azt találták, hogy a p53 és a ciklinA megváltozott expressziója jelezheti a súlyosabb diszplázia illetve adenokarcinóma kialakulását Barrett-es betegeknél, bár egyelőre az ACG guideline nem javasolja a biomarkerek használatát.

16. Milyen BK csatorna aktivátorokat ismer, melyeket terápiásan is felhasználnak? Milyen betegségek kezelésében alkalmazhatók ezek a vegyületek?

Mivel a BK csatornák szinte minden sejtben előfordulnak és számos élettani folyamatban játszanak alapvető szerepet intenzív kutatás folyik olyan BK csatorna aktivátorok kifejlesztésére, melyek szelektíven nagy hatékonysággal képesek a csatornát aktiválni. Tudomásom szerint jelenleg egyetlen BK csatorna aktivátor van forgalomban, amely

szelektíven csak a BK csatornákat aktiválja. Ez az Andolast nevű vegyület, amely klinikai fejlesztés alatt áll és bizonyítottan hatékony az enyhe és közepes fokú asztma kezelésében. Mindemellett számos olyan vegyület ismert, melyek képesek a csatorna aktivitását növelni. Az endogen vegyületek közül egyes telítetlen szabad zsírsavak, szteroid hormonok illetve az antimikrobiális β -defensin 2 növelik a csatorna konduktanciáját, ezáltal csökkentik a vérnyomást. A szintetikus vegyületek közül az NS1619-et fejlesztették ki először, melyet a simaizom rendellenességekhez köthető betegségek kapcsán vizsgáltak. Kimutatták, hogy ez a vegyület védi a szívet az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodásban. Az NS1619 alkalmazását azonban akadályozta a gyenge hatékonyság és a számos mellékhatás (kálcium csatornák gátlása). Az NS11021 egy újjabban kifejlesztett vegyület mely sokkal szelektívebbnek és hatásosabbnak bizonyult az NS1619-hez képest melynek köszönhetően számos tanulmányban alkalmazták ezt az aktivátort a BK csatorna funkciójának a tanulmányozására. Ezekben a tanulmányokban elsősorban az NS11021 kardioprotektív hatását tanulmányozták. A hatásmechanizmus nem teljesen ismert, de feltehetőleg a mitokondriális BK csatornák aktivációja csökkenti a mitokondriumok kálcium túlterhelését és a szabadgyökök termelődését, valamint fokozza az ATP szintézisét. Az NS11021 kedvező hatását ezenkívül a húgyhólyag működési rendellenességei esetében is igazolták.

Végezetül ismét szeretném megköszönni Dr. Pintér Erika Professzor Asszonynak értékes bírálatát és hogy időt szánt a dolgozatom alapos átnézésére, értékelésére. 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