



Válasz Dr. Virág László egyetemi tanár bírálatára

Köszönöm Virág László professzor úrnak, hogy elbírálta a doktori értekezésemet, és hogy azt nyilvános vitára alkalmasnak tartja. Nagyon örülök, hogy bírálatában elismerően nyilatkozott a munkámról. Az értekezéssel kapcsolatos kérdéseire válaszaim a következők:

1. A glutation peroxidáz fontos szerepet játszik a sejtek antioxidáns védelmében. Az értekezésem peroxidázokkal foglalkozó fejezetéből azért maradt ki ez az enzim, mert én csak a hemet tartalmazó állati peroxidázokat ismerttem, amelyek egymással nagyfokú homológiát mutatnak, azonban a szelént tartalmazó glutation peroxidáztól különböznek. A glutation peroxidázok szerepet játszhatnak a redox alapú jelátviteli folyamatok szabályozásában oly módon, hogy a H_2O_2 -t elbontva csökkentik a H_2O_2 növekedési faktorok jelátvitelét erősítő hatását. A glutation peroxidázoknak szerepük van az apoptózis szabályozásában is. A ROS-nak magasabb koncentrációban ugyanis számos sejtben vannak pro-apoptotikus hatásai és ezt a H_2O_2 -t elbontó glutation peroxidázok mérsékelhetik (1).

2. A vastagbélben expresszáldó, és a fagocita sejtekben működő NADPH oxidáz komplexek közötti hasonlóság alapján elsőként vetettük fel annak a lehetőségét, hogy a Nox1 szerepet játszhat az immunvédekezésben. Ez a funkció azonban valószínűleg nem jelenti a vastagbélben normálisan jelenlevő kórokozók folyamatos pusztítását. Valószínűbb, hogy az enzimnek akkor lehet jelentősége, ha az epitél folytonossága megszakad, vagy ha a vastagbél baktérium összetétele kórosan megváltozik. A Nox1 KO egerekben nem figyeltek meg olyan fenotípust ami arra utalna, hogy az enzimműködés hiányában baktériumok jutnának át az epitél gáton, azonban tudomásom szerint olyan kísérletet nem végeztek, ahol mechanikusan sértették volna a barrier funkciót és vizsgálták volna a Nox1 hiány következményeit. Ezeket a kísérleteket mindenképpen érdemes lenne elvégezni Nox1 KO egereken.

3. A Nox1-el és Nox4-el foglalkozó kutatások érdekes sajátossága, hogy a publikált eredmények viszonylag kis hányada származik olyan kutatásokból, ahol az enzimeket magas szinten expresszáldó szerveket (vastagbél, vese) vizsgálták. A Nox1-et valóban leírták a vastagbélen kívül is, pl. vaszkuláris simaizomban, idegsejtekben és szívizomsejtekben is. A Nox1 idegsejtekben betöltött funkcióját vizsgáló kísérletben Ibi és munkatársai kimutatták, hogy a Nox1 részt vesz a termális és mechanikus hiperalgéria kialakulásában (2). Egy másik munkacsoport Nox1 expressziót írt le dopaminerg neuronokban és kimutatta, hogy az enzim szerepet játszik az alpha-synuclein fehérje expressziójának fokozódásában és a fehérje aggregációjában (3).

Ezekben a munkákban problémásnak látom azt, hogy nem mutatták ki a Nox1 rendszer további komponenseinek jelenlétét, holott Nox1-függő ROS termelés csak akkor figyelhető meg, ha a p22^{phox}, valamint a NOXO1 és NOXA1 fehérjék is jelen vannak a sejtekben. További probléma, hogy a Nox1 fehérje detektálására jelenleg nem állnak rendelkezésünkre megbízhatóan működő antitestek és ezt gyakran figyelmen kívül hagyják a területen kísérletezők (4). A Nox1 jelen van még vaszkuláris simaizom sejtekben, ahol megtalálható a NOXA1 és a p22^{phox} is és a NOXO1-et pedig valószínűleg a p47^{phox} fehérje helyettesíti. Nox1 KO egereken végzett kísérletek szerint az érfal simaizomsejtjeiben található Nox1-nek szerepe van az Angiotenzin II infúzióval létrehozott hipertenzió kialakulásában (5). Nem világos azonban, hogy a Nox1-nek mi a pontos funkciója vérnyomásemelkedéshez vezető jelátviteli folyamatokban.

A Nox4 vesén kívüli funkciói között a mindenképpen említést érdemel, hogy az enzim valószínűleg szerepet játszik a miofibroblasztok differenciálódásában és ez fontos lehet a szervfibrosis patogenezisében (6). A Nox4 expresszálódik még a szívizomban is és valószínűleg a szívizomsejtekben található. Egy amerikai munkacsoport Nox4 KO egereken végzett kísérleteiben azt találta, hogy a Nox4 részt vesz az aortaszűkítéssel kiváltott szívelégtelenség kialakulásában (7). Érdekes módon egy másik munkacsoport – szintén Nox4 KO egereket vizsgálva – ellenkező eredményre jutott és a Nox4 hiányában figyelt meg súlyosabb szívkárosodást (8). Ez utóbbi munkacsoport adatai arra utalnak, hogy a Nox4 fokozza az érképződést a szívben és ez által nyújt védelmet a szívelégtelenség kialakulása ellen. Schröder és munkatársai, akik endothel sejtekben vizsgálták a Nox4 szerepét, szintén az találták, hogy a Nox4 hiánya az angiogenesis gátlásához vezet (9).

4. Az állati hem peroxidázok és a reaktív nitrogén származékok közötti interakció meglehetősen komplex és jelenleg nem tudjuk pontosan, hogy az *in vitro* körülmények között megfigyelt reakcióknak mi lehet az *in vivo* jelentőségük (10). A hem peroxidázok H₂O₂ jelenlétében képesek a nitrit (NO₂⁻) inokat oxidálni és nitrotirozin kialakulását katalizálni. Jelenleg nem teljesen világos, hogy ebben a reakcióban mi a nitráló anyag, de az valószínűleg a nitrogén dioxid (NO₂).

Valószínű tehát, hogy az élő szervezetekben zajló nitrotirozin kialakulás (ami az oxidatív stressz fontos markere) nem csak közvetlenül, a peroxinitrit hatására, hanem peroxidáz mediált módon is létrejöhethet. Az emlős peroxidázoknak természetesen vannak olyan „preferált” szubsztrátjai (az MPO-nak a Cl⁻, az LPO-nak a SCN⁻) amelyek *in vivo* limitálhatják a peroxidáz-mediált tirozin nitrálást. Például cisztikus fibrózisban szenvedő betegek MPO-t tartalmazó köpetmintáiban elsősorban a klorotirozin és ditirozin mennyiségének markáns növekedését detektálták, míg a nitrotirozin szint csak mérsékelten volt emelkedett (11).

A laktoperoxidáz enzimről leírták, hogy képes katalizálni a peroxinitrit lebontását, ami csökkentheti a peroxinitrit hatására közvetlenül bekövetkező nitrotirozin képződést (12) és a peroxinitrit egyéb hatásait is gátolhatja. A nitrotirozin képződéshez hasonlóan a ditirozin képződés és az ennek következményeként kialakuló fehérje keresztkötés kialakulhat közvetlenül a peroxinitrit hatására, de peroxidáz-mediált reakcióban is. Sajnos a ditirozin keresztkötések detektálása nem egyszerű, ezért nehéz vizsgálni, hogy *in vivo* mennyire jellemző a ditirozin képződés hatására kialakuló fehérje keresztkötés.

5. A Nox gátlószerek közül jelenleg a GenKyoTex cég által fejlesztett Nox4-et és Nox1-et is gátló anyag (GKT 137831) fejlesztése van a legelőrehaladottabb (fázis II.) stádiumban. Erről a gátlószerről kimutatták, hogy egerekben csökkentette a kísérletes májfibrózis súlyosságát (13, 14). A gyógyszer cég szerint a májfibrózison kívül még más betegség modellekben (pl. diabéteszes nefropátia, tüdőfibrózis) is hatásosnak bizonyult ez a molekula.

A Vasopharm cég VAS2870 nevű gyógyszerjelölt molekulája több Nox izoforma működését is gátolja. Jelenleg a molekula preklinikai tesztelése folyik. A VAS2870 egy agyi infarktus állatmodellben hatékonyan csökkentette az elhalt terület méretét (15).

Több más területen is felmerül a Nox enzimek gátlása mint terápiás lehetőség. Például a központi idegrendszert érintő neurodegeneratív megbetegedések kialakulásában valószínűleg szerepe van az oxidatív stressznek és lehetséges, hogy ezekben az állapotokban a mikroglia sejtekben expresszáldó Nox2 a domináns ROS forrás. A Nox2 aktivitásának gátlása tehát ígéretes megközelítés lehet a neurodegeneratív megbetegedések terápiájában.

A belső fülben expresszáldó Nox3 valószínűleg hozzájárul a ciszplatin kezelés hatására megjelenő halláskárosodáshoz, ugyanis az enzim expressziójának siRNS technikával történő gátlása csökkentette a halláskárosodás mértékét (16). A Nox3 farmakológiai gátlása tehát alkalmas lehet ennek a kellemetlen gyógyszer mellékhatásnak a kivédésére.

A Duox-LPO rendszer esetében nem a gátlásnak, hanem az antibakteriális működés fokozásának lehet klinikai jelentősége. Az Alaxia cég Meveol nevű inhalációs készítménye a Duox-LPO rendszer termékét a hipotiocianátot (OSCN-) és laktoferrint tartalmaz. A Meveol antibakteriális hatását egyelőre *in vitro* körülmények között és egérben mutatták ki. A készítményt a cisztikus fibrózis terápiájában tervezik használni. A Duox-LPO rendszert leíró közleményben vettem fel először annak a lehetőségét, hogy a Duox-LPO rendszer működése több ponton is sérülhet cisztikus fibrózisban (CF). Az egyik lehetőség, hogy a CFTR hiányában csökkenhet a tiocianát ionok légutak felszínére irányuló transzportja. A CF betegségben további problémát jelenthet, hogy a szubmukozális mirigyek degenerációja és a légutak váladékának besűrűsödése miatt is csökkenhet a rendszer komponenseinek (LPO, H₂O₂, SCN⁻) termelődése és célba jutása.

Régi megfigyelés, hogy a daganatos sejtek ROS termelése gyakran fokozódik. A különböző szövetekből induló daganatok expresszálnak Nox/Duox izoformákat azonban jelenleg nem tudjuk, hogy ezek az enzimek mennyiben felelősek a fokozott ROS termelésért és azt sem tudjuk pontosan, hogy a Nox izoformák működése hozzájárul-e a daganatos sejtek fokozott proliferációjához. A Nox1 enzimről eredetileg leírták, hogy heterológ expressziója daganatos transzformációhoz vezet (17), azonban később kiderült, hogy ez az ígéretes megfigyelés kísérleti műtermék volt (18). Egy közelmúltban megjelent közlemény szerint a Nox1-nek szerepe lehet colon ráksejtek adhéziójának fokozásában, aminek az áttétképződésben lehet jelentősége (10). Májtumorból származó sejtekben a Nox4-nek pro-apoptotikus, míg a Nox1-nek a sejtek túlélését serkentő hatását írták le. Ezekben a sejtekben a VAS2870 nem specifikus Nox inhibitor

csökkentette a proliferációt és növelte a TGF-beta pro-apoptotikus hatása iránti érzékenységet (19). A GenKyoTex által fejlesztett molekulák közül a GKT136901-ről írták le, hogy egy egér tumor modellben (Lewis tüdő karcinoma) *in vivo* daganatellenes aktivitással rendelkezik (20). Természetesen minden gátlószeres kísérletnél felmerül annak a lehetősége, hogy a megfigyelt hatás nem Nox gátlás eredménye és sajnos a nem megfelelően kontrollált siRNS kísérletek eredményei is félrevezethetők lehetnek.

Saját megfigyeléseink szerint az aktív Nox enzimek magas szintű expressziója elsősorban a differenciáltabb sejtekre jellemző. Hasonló eredményre jutottak Luxen és munkatársai, akik tüdőrák mintákat vizsgálva azt találták, hogy a Duox1 és Duox2 enzimek expressziója gyakran alacsony a rákos szövetekben és sejtvonalakban, aminek a magyarázata a gének promóter régiójának epigenetikus módosítása lehet (21).

6. Az antioxidánsok szedésének elterjedése azon az elképzelésen alapul, hogy a reaktív oxigén származékok káros molekulák, melyek ellen mindenképpen küzdeni kell. Az antioxidánsok népszerűségéhez biztosan hozzájárult, hogy feltételezett hatásuk (a „jó” és a „rossz” harca) egy könnyen megérthető, népszerűsíthető és árusítható gondolat. Az antioxidánsok esetleges betegségmegelőző hatását vizsgáló klinikai kísérletek azonban eddig csalódást okoztak (22). A Nox/Duox enzimesalád felfedezése jelentősen árnyalta a ROS-ról alkotott eddigi képet és jelenleg úgy gondoljuk, hogy a Nox/Duox által termelt molekuláknak számos fontos élettani hatása van és ezeket egészséges egyénben semmiképpen sem célszerű gátolni. A fagociták ROS termelésének például nélkülözhetetlen a különböző kórokozók elpusztításában és a ROS-termelés gátlása fokozhatja a különböző fertőzések iránti érzékenységet. Azt is tudjuk, hogy a pajzsmirigyhormonok szintéziséhez szintén szükségünk van reaktív oxigénre és ha a Duox2 hiányzik a pajzsmirigyben, akkor az hipotireózis kialakulásához vezet. Újabb kísérleti adatok arra utalnak, hogy a hidrogén peroxidnak kulcsszerepe lehet a bazális membránok szerveződésében (23), ami alapvető jelentőségű számos szövet és szerv működésében. Ha antioxidánsokkal árasztjuk el a szervezetet, akkor ebben a működésében is zavar támadhat. Számos kísérleti megfigyelés utal arra is, hogy a jelátviteli folyamatokban is szerepelnek reaktív oxigén molekulák és jelenleg úgy gondoljuk, hogy ezek intracelluláris szintjének megváltozása valószínűleg nem az egész sejtre terjed ki, hanem gyakran lokális marad. Ha antioxidáns anyagok magas koncentrációban vannak jelen a szervezetben, akkor a jelátviteli folyamatokban is zavar támadhat.

A ROS-nak természetesen vannak káros hatásai, azonban ezek elsősorban akkor jönnek létre ha túl nagy mennyiségben termelődnek, vagy ha a lebontásukban zavar támad. Valószínű, hogy a fokozott ROS termelésért gyakran a Nox/Duox enzimek megváltozott működése lehet a felelős. Amennyiben egy betegség kialakulásában bizonyított a fokozott, Nox/Duox eredetű ROS termelés, akkor az ilyen állapotok kezelésére olyan enzim gátlószeres lehetnek alkalmasak, amelyek specifikusan gátolják a ROS forrást.

Azt is meg kell azonban említeni, hogy a mediterrán diéta egészségvédő hatását számos kísérleti adat bizonyítja. A mediterrán diétában szereplő élelmiszerekre valóban jellemző, hogy magas az antioxidáns tartalmuk. Azonban amikor ilyen ételeket fogyasztunk, akkor nem egyféle anyaggal árasztjuk el a szervezetünket, hanem sok, különböző szerkezetű és hatásmechanizmusú antioxidáns mérsékelt koncentráció emelkedése jön létre. Lehetséges, hogy a változatos szerkezetű és hatású antioxidánsok szimultán jelenléte

felelős az egészségvédő hatásért. Végül azt sem lehet kizárni, hogy jelenleg az antioxidáns tartalmuk alapján kapcsoljuk össze ezeket az élelmiszereket, de az egészségvédő hatásukért valamilyen más, jelenleg ismeretlen mechanizmus a felelős.

Végül még egyszer szeretném megköszönni Virág László professzor úr bírálói munkáját és kérem a válaszaim elfogadását.

Budapest, 2013. március 25.

Dr. Geiszt Miklós

HIVATKOZÁSOK

1. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:1957-97.
2. Ibi M, Matsuno K, Matsumoto M, Sasaki M, Nakagawa T, Katsuyama M, et al. Involvement of NOX1/NADPH oxidase in morphine-induced analgesia and tolerance. *J Neurosci* 2011;31:18094-103.
3. Cristovao AC, Guhathakurta S, Bok E, Je G, Yoo SD, Choi DH, et al. NADPH oxidase 1 mediates alpha-synucleinopathy in Parkinson's disease. *J Neurosci* 2012;32:14465-77.
4. Altenhofer S, Kleikers PW, Radermacher KA, Scheurer P, Rob Hermans JJ, Schiffers P, et al. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:2327-43.
5. Matsuno K, Yamada H, Iwata K, Jin D, Katsuyama M, Matsuki M, et al. Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation* 2005;112:2677-85.
6. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, et al. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med* 2009;15:1077-81.
7. Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD, Sadoshima J. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:15565-70.
8. Zhang M, Brewer AC, Schroder K, Santos CX, Grieve DJ, Wang M, et al. NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:18121-6.
9. Schroder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J, et al. Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circ Res* 2012;110:1217-25.
10. O'Leary DP, Bhatt L, Woolley JF, Gough DR, Wang JH, Cotter TG, et al. TLR-4 signalling accelerates colon cancer cell adhesion via NF-kappaB mediated transcriptional up-regulation of Nox-1. *PLoS One* 2012;7:e44176.

11. Van D, V, Nguyen MN, Shigenaga MK, Eiserich JP, Marelich GP, Cross CE. Myeloperoxidase and protein oxidation in cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L537-L546.
12. Gebicka L, Didik J, Gebicki JL. Catalytic scavenging of peroxynitrite by lactoperoxidase in the absence and presence of bicarbonate. *Free Radic Res* 2010;44:217-23.
13. Jiang JX, Chen X, Serizawa N, Szyndralewicz C, Page P, Schroder K, et al. Liver fibrosis and hepatocyte apoptosis are attenuated by GKT137831, a novel NOX4/NOX1 inhibitor in vivo. *Free Radic Biol Med* 2012;53:289-96.
14. Aoyama T, Paik YH, Watanabe S, Laleu B, Gaggini F, Fioraso-Cartier L, et al. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in experimental liver fibrosis: GKT137831 as a novel potential therapeutic agent. *Hepatology* 2012;56:2316-27.
15. Kleinschnitz C, Grund H, Wingler K, Armitage ME, Jones E, Mittal M, et al. Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol* 2010;8.
16. Mukherjea D, Jajoo S, Kaur T, Sheehan KE, Ramkumar V, Rybak LP. Transtympanic administration of short interfering (si)RNA for the NOX3 isoform of NADPH oxidase protects against cisplatin-induced hearing loss in the rat. *Antioxid Redox Signal* 2010;13:589-98.
17. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999;401:79-82.
18. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004;4:181-9.
19. Sancho P, Fabregat I. The NADPH oxidase inhibitor VAS2870 impairs cell growth and enhances TGF-beta-induced apoptosis of liver tumor cells. *Biochem Pharmacol* 2011;81:917-24.
20. Garrido-Urbani S, Jemelin S, Deffert C, Carnesecchi S, Basset O, Szyndralewicz C, et al. Targeting vascular NADPH oxidase 1 blocks tumor angiogenesis through a PPARalpha mediated mechanism. *PLoS One* 2011;6:e14665.
21. Luxen S, Belinsky SA, Knaus UG. Silencing of DUOX NADPH oxidases by promoter hypermethylation in lung cancer. *Cancer Res* 2008;68:1037-45.
22. Steinhubl SR. Why have antioxidants failed in clinical trials? *Am J Cardiol* 2008;101:14D-9D.
23. Bhave G, Cummings CF, Vanacore RM, Kumagai-Cresse C, Ero-Tolliver IA, Rafi M, et al. Peroxidasin forms sulfilimine chemical bonds using hypohalous acids in tissue genesis. *Nat Chem Biol* 2012;8:784-90.