

## Záró beszámoló: Tulassay Tivadar - NK OTKA 84087

A krónikus fibroproliferatív megbetegedések, mint a kardiovaszkuláris betegségek, a májcirrózis, a tüdőfibrózis, a gyulladásos bélbetegség (IBD) vagy a krónikus vesebetegség (CKD) közös jellemzője a szöveti hegesedés. Ezek a fibroproliferatív betegségek világszerte milliőkat érintenek és a nyugati társadalomban a halálozás vezető okai közé tartoznak. Egyes becslések szerint a fejlett országokban a halálozások mintegy fele összefüggésbe hozható a szöveti hegesedéssel [1]. Projektünk kapcsán a fibroproliferatív betegségek közül elsősorban a CKD-ra fókuszáltunk, melyre mint a betegség etiológiájától (diabétesz mellitusz, magasvérnyomás betegség, uréter fejlődési rendellenesség, akut veseelégtelenség, gyógyszer intoxikáció, stb.) függetlenül jellemző az extracelluláris mátrix fokozott lerakódása, mely a vese szövet struktúrájának megbomlásához és a vesefunkció beszűküléséhez, a végstádiumú vesebetegség kialakulásához vezet. CKD világszerte több százmillió embert, a lakosság mintegy 8-16%-át érinti és incidenciája rohamosan nő. Jelenleg az egyik legnagyobb egészségügyi kihívást jelenti az euro-atlanti régióban. [2]. Az egészségügyi probléma nagyságát jól jellemzi, hogy jelenleg is mintegy 20-25 millió beteg szorul vesepótló kezelésre világszerte [3]. A vese hegesedését közös molekuláris patomechanizmus generálja, amely a betegség etiológiájától függetlenül (diabétesz mellitusz, magasvérnyomás betegség, uréter fejlődési rendellenesség, gyógyszer intoxikáció, irradiáció stb.) az extracelluláris mátrix (ECM) fokozott felhalmozódásával és az egész szerv vonatkozásában a szerv funkciójának irreverzibilis romlásával jellemezhető. Ebben a folyamatban a miofibroblasztoknak meghatározó szerepük van. A miofibroblasztok  $\alpha$ -simaizom aktin ( $\alpha$ SMA) pozitív, migrációra képes sejtek, melyek egészséges vesében nincsenek jelen, azonban a szövetet ért sérülés hatására gyorsan megjelennek. A miofibroblasztok eredete sokáig tisztázatlan volt. A különböző szervekben a miofibroblasztok differenciálódásának hátterében különböző patológiai folyamatokat feltételeznek. Korábban a szöveti hegesedés mechanizmusa kapcsán a kutatók jelentős szerepet tulajdonítottak az epitheliális és az endoteliális-mesenchymális tranzíciónak (EMT és EndMT). Ezen folyamatok aktiválódásakor a szövet epithel, illetve endothel sejtjei elvesztik az eredeti rájuk jellemző markereiket (CK-18, CD31) és mesenchymális típusú sejtekké differenciálódnak. A jelenlegi irodalmi adatok azonban inkább arra utalnak, hogy a miofibroblasztok elsősorban a minden szervben jelen lévő, a kapillárisok endothel sejtjeit körülölelő periciták aktivációja/differenciációja során képződnek. Bár ezen folyamatoknak a különböző szervek hegesedésben betöltött szerepéről még megoszlanak a vélemények, abban teljes az egyetértés, hogy a sérült szövetekben az aktiválódott miofibroblasztok jelentős mennyiségű kollagén-I és -III-ban gazdag ECM-et termelnek. A

vesében a hegszövet kiterjedt depozíciója glomeruláris szklerózishoz és intersticiális fibrózishoz vezet. Ezek a folyamatok ördögi körként a nefronok elvesztéshez és a vesefunkció fokozatos romlásához vezetnek.

Meglepő módon a különféle fibroproliferatív megbetegedésben szenvedők számának rohamosan növekedése ellenére sincs általánosan elfogadott diagnosztikai eljárás a hegesedés korai kimutatására és a szöveti fibrózis gátlására sincs megalapozott gyógyszeres terápia. Ezért az ezen a területen folytatott kutatásnak nem csupán tudományos, hanem közvetlen egészségügyi és gazdasági jelentősége is van.

Az elnyert OTKA kutatási pályázat anyagi támogatása lehetővé tette, hogy az elmúlt 3 évben a szöveti hegesedés intenzív kutatásának alapjait lerakjuk. Ennek keretében **új tudományos technológiét és mérőmódszereket honosítottunk meg, illetve a kutatáshoz szükséges műszerfejlesztés és módszertanfejlesztés történt meg.**

1. Új géldokumentációs (VersaDoc 5000, BioRad) rendszert állítottunk be, mely lehetővé teszi a fehérjék mennyiségi meghatározásához elengedhetetlen Western blot mérések elvégzését, illetve kiértékelését.
2. A pályázat időtartama alatt új szakemberek bevonásával elsajátítottuk és a kutatási eszköztárunkban alkalmaztuk egy korábbi pályázat során beszerzett multifoton mikroszkóp használatát [4]. A multifoton mikroszkópia egyedülálló lehetőséget biztosít számunkra, hogy állatmodelljeinkben az *in vivo* képkötés lehetőségeit kihasználva vizsgáljuk a vese funkcióját, fibrotikus elváltozásait, az erek állapotát, az immunsejtek mozgását vagy a renin-angiotenzin rendszer (RAAS) komponenseit.
3. Az új technológiák között kiemelendő az *in vitro* és *in vivo* modellrendszerek és mérések beállítása.
  - a. A multifoton mikroszkópia használata mellett kidolgoztuk az *in vivo* kísérleteinkből származó minták unikálisnak számító áramlási citometriás vizsgálatának lehetőségét. Ez a vizsgálati rendszer lehetővé teszi, hogy számszerűen meghatározzuk, hogy a vizsgált szövet egy adott sejttípusa milyen mértékben expresszálja a vizsgált markereket ( $\alpha$ SMA, vimentin stb.).
  - b. Sikerült meghonosítani számos új állatmodellt (diabéteszes nefropátia, unilaterális uréter obstrukció, dextrán szodium szulfát-indukálta kolitis, bleomicin indukálta tüdőfibrózis), valamint a humán eredetű primer mifibroblasztok előállításának, tenyésztésének, illetve karakterizálásának módját, a velük való munkát.
  - c. A szöveti hegesedés lokalizációjának és mértékének meghatározására alkalmas módszereket vezettünk be, (Masson's trikróm és Sirius red festési eljárások).

- d. Meghonosítottuk a miofibroblasztmarkerként is alkalmazott  $\alpha$ SMA, immunhisztológiai lokalizációjánk vizsgálatát, a kollagén-I, -III, fibronectin, mátrix metalloproteináz (MMP) 2, MMP9, MMP12, a tumor növekedési faktor (TGF) $\beta$ -1, a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF)-BB expressziójának meghatározását.

A pályázat keretén belül **jelentős és sikeres volt a tudományos utánpótlás nevelés:** lehetőségünk nyílt új, fiatal szakemberek bevonására. Az előzőekben felsorolt személyi, anyagi és tárgyi eszközök, illetve a kialakított tudásbázis segítségével a krónikus veseelégtelenség, illetve a **szöveti hegesedés mechanizmusának vizsgálata kapcsán számos új megállapítást tettünk.**

1. A CKD patomechanizmusának vizsgálata kapcsán végzett kísérleteinket kiterjesztettük a szteroid rezisztens nefrózis szindrómára (SRNS). A nefrózis szindróma a glomerulusok barrier funkciójának sérülésével létrejövő kórkép, amelynek egyes formái CKD-hez és végstádiumú veseelégtelenséghez vezetnek. Az SRNS hátterében eddig több mint 20 mutációt azonosítottak, melyek többsége a podociták barrier funkciót érintő mutáció. Jelentős hazai és nemzetközi kollaborációban végzett vizsgálataink során sikerült egy eddig le nem írt, teljesen új, autoszomális recesszív öröklődés menetét igazolnunk, melyben a podocin gén Arg229Gln allél mutációjának patogenitása egy másik transz-asszociált mutációtól függ. Ez, a genetika egyes eddigi téziseit meghaladó felismerés további, eddig nem-értett betegségek esetében is sikeres modellként lesz alkalmazható. Továbbá direkt klinikai, diagnosztikai hatása van a betegség lehetséges öröklődés-menetének megítélés szempontjából. Tanulmányunkat az általunk megtalált öröklődés-menet újszerűsége, a prenatális diagnosztikát befolyásoló jelentősége miatt a Nature Genetics közölte [5].
2. További kísérletes munkánk során megállapítottuk, hogy állatmodellekben a vese szöveti hegesedése kapcsán interleukin(IL)-17, illetve -24 szabadul fel. Egerek hegesedő vesemintáiból készült áramlási citofluorimetriás méréseink illetve immunhisztológiai vizsgálataink alapján valószínű, hogy az előbb említett citokinek fő forrásai a vese tubuláris epithelsejtjei.
  - a. Az IL-17 fibrózisra kifejtett hatásait áramlási citofluorimetria segítségével vad és IL-17 génkiütött (KO) egerek uréterobstrukciós (UUO) modelljében vizsgáltuk tovább. Vizsgáltuk az IL-17 hiányának hatását a különböző jelátviteli utak aktivációjára (ERK1/2, SAMD2/3, JNK1/2/3), illetve az EMT markereinek (vimentin, proliferáló sejt nukleáris antigén PCNA,  $\alpha$ SMA, MMP2, MMP9,

MMP12, E-cadherin) expressziójára. Eredményeink alapján úgy véljük, hogy az UOU-t követően elsősorban a SMAD2/3 jelátviteli rendszeren keresztül fokozódik az EMT markerek, illetve a TGF $\beta$ 1 és a PDGF-BB expressziója. Ezeknek a fehérjéknek az expressziója kivétel nélkül függött az IL-17 jelenlététől. Eredményeinket *in vitro* humán proximális tubuláris epithel (HK-2) sejtek IL-17 kezelését követően is megerősítettük. Adataink arra utalnak, hogy a vese epithel sejtjei IL-17 dependens módon *in vivo* is átmennek EMT-n és részt vesznek a fibrózisban központi szerepet játszó TGF $\beta$ 1, illetve PDGF-BB termelésében is. Ezt követően vizsgáltuk a TGF $\beta$ 1 és PDGF-BB fibroblasztok aktivációjára, proliferációjára, illetve kollagén termelésére kifejtett hatását. Azt tapasztaltuk, hogy az NRK49F fibroblaszt sejtek PDGF-BB kezelése elsősorban a fibroblasztok proliferációjára hat, míg a TGF $\beta$ 1 kezelés kollagén termelésüket indukálja.

- b. Az IL-24 vesehegesedésre kifejtett hatását vad típusú (C57Black/6), illetve az IL-24 receptorára (IL-20R2) nézve KO egereken vizsgáltuk. Meglepetésünkre, bár a hegesedő vesékben az IL-24 mennyisége szignifikánsan megnőtt, a KO egerek veséinek vizsgálata nem igazolta az IL-24 korábban feltételezett, a vese fibrótikus átalakulásában betöltött szerepét. IL-20R2 KO egereken végzett vizsgálataink nem támasztották alá azt sem, hogy a vese IL-24 expressziója összefüggne az  $\alpha$ SMA, kollagén-I és -III szintjével, valamint a vese Masson's pozitivitásának mértékével.
3. Ismereteink szerint a szöveti hegesedés folyamata a különböző szervekben hasonló módon játszódik le. Az érintett szövetől és kiváltó hatástól függetlenül a hegesedés folyamatában, az ECM és bazalmembrán komponensek, illetve aktív hatóanyagok, mint az MMP-k termelésével, a miofibroblasztok központi szerepet játszanak. Ezért vizsgálatainkat kiterjesztettük más szövetek hegesedéssel, szöveti átépüléssel járó kórképeinek, így a gyulladós bélbetegség (IBD) és a cöliákia pathomechanizmusának tanulmányozására is [6]. Összesen mintegy 50 IBD-s beteg, illetve egészséges gyermek colon nyálkahártyájából származó biopsziás mintájában vizsgáltuk az IL-24 expresszióját, illetve az IL-24 receptorának lokalizációját. A vesében tapasztaltakkal összhangban az IL-24 az IBD-s betegek bél mukózájában is fokozott mértékben expresszálódott. Az IL-24 receptora mind az enterocitákon mind a szubepitheliális miofibroblasztokon jelen volt. *In vitro* humán colon epithel (HT-29) sejteken végzett vizsgálataink során azt találtuk, hogy az IL-24 fokozza a SMAD2/3, a JNK1/2/3 és az ERK1/2 aktivációját. Kimutattuk továbbá, hogy a HT-29 sejtek IL-24 kezelése ezen jelátvivőkön keresztül fokozza az epithel sejtek TGF $\beta$ 1 és PDGF-BB termelését. Ezt követően megvizsgáltuk az IL-24 szubepitheliális miofibroblasztokra kifejtett direkt hatását is. Humán colon fibroblaszt

(CCD18Co) sejtek IL-24 kezelése jelentős mértékben fokozta a sejtek kollagén-I és -III termelését. Ez a hatás jóval jelentősebb volt, mint a sejtek TGF $\beta$ 1 kezelésével kiváltott expressziós változás. Ez nem csak a vesében tapasztaltakkal szemben meglepő, hanem azért is, mert eddigi ismereteink szerint a hegesezés központi útvonalát a vastagbélben, és más szervekben így a vesében is, a TGF $\beta$ 1 által képviselt útvonal jelenti. *In vitro* eredményeinket *in vivo* az egerek vastagbélének lokális IL-24 kezelésével, illetve a IL-20R2 KO egerek alkalmazásával is igazoltuk. Mindez egyrészt azt jelenti, hogy a szöveti hegesezés mechanizmusa a vesében jelentősen különbözik a bélben tapasztaltaktól (ez az eddigi közös patobiokémiai út dogmája ellen szól!, ami a kutatások új irányát is megszabja), valamint azt, hogy az IL-24 által képviselt útvonal legalább olyan jelentős, mint a TGF $\beta$ 1 mediálta. Végezetül a bélben az IL-24 mind az epithelsejtek TGF $\beta$ 1 és PDGF-BB expressziójára, mind direkt módon a miofibroblasztok kollagén termelésére hatva befolyásolja a szöveti hegesezést.

4. Az elmúlt években a streptozotocin indukált diabétesz experimentális modelljében igazoltuk, hogy megnő az  $\alpha$ SMA expressziója, melyet a RAAS gátló kezelés hatékonyan csökkentett. Korábbi irodalmi adatok alapján kezdetben úgy véltük, hogy a jelenségért elsősorban az angiotenzin II EMT-t indukáló hatása lehet a felelős. Feltételeztük, hogy az akkori irodalmi adatokkal összhangban az epithel sejtek a RAAS rendszer hatására miofibroblasztokká alakulva kötőszöveti mátrixot termelnek. Mivel az elmúlt években megkérdőjelezték az EMT fibrózisban betöltött szerepét, ezért mi is további magyarázatokat kerestünk. Korábbi adataink és irodalmi ismereteink alapján két lehetőséget feltételeztünk. Az egyik lehetőség, hogy a RAAS rendszer elemei, mint az angiotenzin II, illetve az aldosteron direkt módon aktiválják a fibroblasztokat, azonban az sem zárható ki, hogy indirekt módon az epithel sejtekre hatva befolyásolják a fibroblasztok aktivációját. Mindkét elméletet igaznak találtuk. Az aldosteron kezelés fokozta az NRK49F fibroblasztok proliferációját, ugyanakkor az angiotenzin II kezelés nem volt hatással a fibroblasztok aktivációjára. Diabéteszes modellünkben a vese epithel sejtjeit PDGF-BB pozitívnak találtuk és glükóz kezelés hatására a HK-2 proximális tubuláris epithelsejtek is termeltek PDGF-BB-t. Az epithel sejtek által termelt PDGF-BB pedig indukálta az NRK49F sejtek proliferációját. Ezért igazolva látjuk a RAAS rendszer komplex és központi szerepét a folyamatban: vagyis a RAAS rendszer direkt módon a fibroblasztokra és indirekten az epithelsejtek PDGF-BB termelésére hatva is szabályozza a fibroblasztok aktivációját.
5. A vesefibrózis pathomechanizmusának vizsgálatára irányuló kísérleteinkből származó tudást összegezve megkezdtük egy általunk beazonosított biológiai útvonal, illetve egy

arra ható, a szöveti fibrózist gátló hatóanyag részletesebb vizsgálatait. Ennek jelentőségét alátámasztja a fibrózis orvosbiológiai jelentősége, és az a tény, miszerint jelenleg nem rendelkezünk a fibrózis folyamatát célzottan befolyásoló gyógyszerekkel. Vizsgálataink több *in vivo* fibrózis modellre is kiterjednek, teszteltük a hatóanyag effektivitását a CKD kezelésére jelenleg alkalmazott gyógyszerek, RAAS inhibitorok hatásosságához képest, illetve együttes adásuk esetleges előnyeit. Mivel a korábbi irodalmi adatok alapján a szöveti hegesedés mechanizmusa a különböző szervek esetén számos hasonlóságot mutatott, kísérleteinket a vesehegesedés különböző modelljei mellett más szervekre is kiterjesztettük. Eredményeinket az *in vivo* kísérletek mellett *in vitro* rendszerekben is teszteltük. A vizsgált hatóanyag szignifikánsan csökkentette mind a vese eredetű fibroblasztok PDGF-BB-indukálta proliferációját, mind a TGF $\beta$ 1 kezelés által kiváltott kollagén-I és -III termelést. A hatóanyag kapcsán végzett vizsgálatainkból származó eredményeket egy az Európai Szabadalmi Hivatal-hoz benyújtott szabadalmi beadványban összegeztük (Application/Patent NO.: 14462004.4 -1464) felé [7].

A **NK OTKA 84087** pályázat eredményeit összegezve a kutatás támogatásával számos jelentős előrelépést sikerült megtennünk a krónikus vesebetegség, illetve a szöveti fibrózis mechanizmusának feltárása kapcsán. Az MTA és a Semmelweis Egyetem közös kutatólaboratóriuma jelentős hazai, és nemzetközi mértékkel mérve is figyelemre méltó műhellyé vált. A laboratórium eszköztárát a különböző generációkhoz tartozó kutatóközösség működteti, s ennek mérhető eredményeképpen a pályázat támogatásával számos hazai, illetve nemzetközi konferencián vettünk részt. Tudományos eredményeinket magyar nyelvű és angol nyelvű közleményben tettük közzé. Vizsgálataink egy részét sikerült a legrangosabb nemzetközi konferenciákon (ERA-EDTA, ESPN, ASN), illetve folyóiratokban, mint a Nature Genetics közzétenni. Az elmúlt időszakban publikált közlemények mellett több olyan kísérletes munkát is végeztünk, melyek véleményünk szerint jelentős nemzetközi érdeklődésre tarthatnak számot és jelenleg már közvetlenül publikáció előtti fázisban vannak. Az egyik ilyen munkánk egy gyógyszerfejlesztési projekt, melyet Európai Uniósz szabadalmi beadványunkban tettünk közzé (Patent NO.: 14462004.4 -1464). A projekt keretein belül a vese és egyéb szervek kötőszöveti átépülésében jelentősnek tűnő biológiai útvonalra ható gyógyszer sajátosságait vizsgáltuk. A vizsgált hatóanyag mind a miofibroblasztok proliferációját, mind kollagén termelését kedvezően befolyásolta. A hatóanyag további értékesítése kapcsán is jelentős előrelépéseket tettünk. A Semmelweis Egyetem Innovációs Központjának támogatásával megkezdtük a benyújtott szabadalom értékesítését, melyben jelenleg az Aquincum Technológiai Inkubátorház nyújt támogatást. A projekt kapcsán jelenleg

piackutatást, illetve üzletfejlesztési tervet készítünk a hatóanyag további fejlesztése kapcsán szükséges klinikai vizsgálatok további finanszírozásának érdekében. Ezek alapján a befektetői döntés 2014 októberében várható.

Az OTKA pályázat támogatása jelentősen hozzájárult a szakterület felfedező kutatásaihoz, új eredményeinek szintézisével létrejött ismeretanyag a laboratóriumunkban ill., a kooperációs partnerek műhelyeiben folyó kutatásokra gyakorolt közvetlen jótékony hatása mellett, más kutatási pályázatokban való részvételünk előmozdításával is hozzájárul a további sikeres felfedező és alkalmazott kutatói, illetve innovációs munkánkhoz.

### **Irodalomjegyzék**

---

- <sup>1</sup> Wynn, T.A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of clinical investigation* 2007;117:524-529.
- <sup>2</sup> Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY, Yang CW. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*. 2013; 20:260-272.
- <sup>3</sup> Locatelli F, Pozzoni P, Del Vecchio L. Renal replacement therapy in patients with diabetes and end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15 Suppl 1:S25-9.
- <sup>4</sup> Prókai Á, Berta N, Vannay Á, Sziksz E, Kis-Petik K, Fekete A, Toma I, Tulassay T, Kellermayer M, Peti-Peterdi J, Szabó JA.: Multi-Foton képalkotás a vese szabályozó mechanizmusának vizsgálatában. *Hypertonia és Nephrológia*, 2012; 16 (1):4-9.
- <sup>5</sup> Tory K, Menyhárd DK, Woerner S, Nevo F, Gribouval O, Kerti A, Stráner P, Arrondel C, Cong EH, Tulassay T, Mollet G, Perczel A, Antignac C. Mutation-dependent recessive inheritance of NPHS2-associated steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*. 2014;46(3):299-304.
- <sup>6</sup> Sziksz E; Veres-Székely A; Pap D; Fekete A; Veres G; Tulassay T; Szabó A; Vannay Á. Mucosal architectural rearrangement in coeliac disease. *International Journal of Celiac Disease*, 2014, közlésre elfogadva
- <sup>7</sup> Vannay Á, Fekete A. Novel use of sigma-1 receptor agonist compounds. *EPO*. Patent NO.: 14462004.4 -1464