

A cystás fibrosis (CF) a leggyakoribb autoszomális, recesszív öröklődés menetet mutató halálos kimenetelű megbetegedés a fehérbőrű populációban. Hazánkban átlagosan 2500-3000 élvészületésre jut egy CF beteg. A CF-et a „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator” (CFTR) fehérjét kódoló génben bekövetkezett mutáció okozza, amely vagy a fehérje teljes hiányához, vagy elégtelen működéséhez vezet. A napjainkig felfedezett több mint 1000 különböző mutáció öt nagy csoportba osztható attól függően, hogy a CFTR fehérje szintézisében, érése során a sejten belüli továbbításában, szabályozásában, vagy ion-áteresztőképességében következik-e be kóros változás.

Régóta ismert tény, hogy fiziológias körülmények között a CFTR fehérje ciklikusAMP (cAMP) által szabályozott anion csatornaként működik. Az újabb kutatások azonban azt is bizonyították, hogy a CFTR képes szabályozni olyan más fehérjék működését, melyek szintén lényeges szerepet töltenek be a hámsejteken keresztül történő iontranszportban. A teljesség igénye nélkül itt csak azokat említem, amelyek a betegség tüneteinek kialakulása és a lehetséges gyógyszeres kezelése szempontjából lényegesnek tűnnek. Ezen fehérjék közé tartozik a hámsejtek nátrium csatornája (epithelial Na^+ channel [ENaC]), a klorid/bikarbonát ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) ioncserélő mechanizmus, vagy a CFTR-től eltérő elektrofiziológiai tulajdonságokat mutató klorid csatorna (outwardly rectifying Cl^- channel [ORCC]). A fentiekből következik, hogy a CFTR-ban létrejött mutáció komplex működés zavart okoz a fehérjét hordozó szervek hámsejtjeiben.

Kutatásaink során olyan cAMP-től független anion csatornát szeretnénk volna találni, amely *in vivo* is helyettesíthetné a CFTR Cl^- csatornát. A légúti hámsejtek cAMP által szabályozott klorid transzportjának károsodása elindítja a felszíni folyadékfilm [airway surface liquid (ASL)] ionösszetételének és/vagy volumenének megváltozását. Ezek a sejtek azonban hordoznak cAMP szabályozástól független Cl^- csatornákat is, melyek serkentése helyettesítheti a mutáció miatt működésképtelen, vagy csökkent hatásfokkal működő CFTR fehérjét. Az alternatív Cl^- csatornák közül a legfontosabbak az ún. intracelluláris Ca^{2+} koncentráció által szabályozott Cl^- csatornák (Ca^{2+} -dependent Cl^-

channels [CaCC]), mivel szabályozásuk viszonylag egyszerűnek tűnik. A megvalósításhoz olyan sejtfelszíni receptorokat kellett keresni, melyeknek sejten belüli másodlagos hírvivője a Ca^{2+} . Különböző szempontok figyelembe vétele után a purinerg P2Y receptorok ideálisnak mutatkoztak e célra. A főként extracelluláris ATP és UTP által stimulálható purinerg P2Y receptorok intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedéssel válaszolnak az agonisták hatására és jelen vannak a légúti hámsejtek lumenális és bazolaterális membránján. Az intracelluláris kalcium jel serkenti a CaCC-t és Cl^- szekrécióhoz vezet. Az ATP és/vagy UTP által kiváltott kalcium szint emelkedésnek további pozitív hatása, hogy a nátrium visszaszívását gátolja az ENaC-re gyakorolt gátló hatáson keresztül. Az ATP és/vagy UTP adásával kapcsolatban azonban felmerültek nehézségek is. A legjelentősebb, hogy mindkét nukleotid trifoszfát nagyon gyorsan lebomlik AMP-re és adenzinra, illetve UMP-re és uridinre. Ezek a metabolitok viszont már nem képesek serkenten a purinerg P2Y receptorokat. Említést kell azonban tenni egy másik problémáról is, nevezetesen a P2Y receptorok deszenzitizálódásáról. Ez azt jelenti, hogy a receptorok tartós, vagy ismételt ingerlése során az általuk közvetített jel gyengül, illetve egy bizonyos idő után teljesen megszűnik.

A nehézség áthidalására a hámsejtek membrán potenciáltól független kalcium csatornáinak serkentése kínálhat megoldást. Ezek olyan plazma membrán csatornák, amelyek többé-kevésbé szelektív módon engednek át kalcium ionokat. Ilyenek például az intracelluláris Ca^{2+} raktárak telítettségétől függő kalcium csatornák („store operated calcium channels” [SOCC]), vagy a P2X purinerg receptorok, amelyek receptorként és nem-szelektív kation csatornaként egyaránt működnek. A P2X receptor fehérje kis része a membránba ágyazottan, nagyobb része viszont (kb. 75 %) a sejten kívül helyezkedik el, ami lehetővé teszi az extracelluláris térben lévő ionok (elsősorban kationok) közvetlen interakcióját a fehérje aminosavaival. A lehetséges kölcsönhatások közül kiemelendő az extracelluláris hidrogén és cink kötődése a hisztidinhez, amely befolyásolja a P2X receptorok ATP-vel történő aktiválhatóságát. Kihhasználva a P2X receptorok e tulajdonságát alkalikus közegben ATP és cink jelenlétében sikerült *in vitro* tartós és reverzibilis kalcium jelet kiváltanunk, amely a szignál ideje alatt folyamatos klorid szekrécióhoz vezetett CF légúti hámsejtekben. Annak érdekében, hogy a sejten

kívüli térben magas koncentrációban lévő Na^+ ne akadályozza a Ca^{2+} beáramlást a kísérleteket nátrium-szegény környezetben végeztük. Az *in vitro* nem-polarizált sejteken elvégzett kísérletek mellett *in vivo* kísérletekkel is igazoltuk a módszer hatékonyságát. CF egerek orrüregébe juttatott ATP-t és cinket tartalmazó, Na^+ mentes, alkalikus oldat tartósan, reprodukálhatóan, de egyúttal reverzibilisen serkentette a lumenbe történő Cl^- kiválasztást. A CF terápiában a cink nemcsak a Cl^- szekréció serkentésével fejthet ki kedvező hatást. Ismert, hogy a CF-ben szenvedő egyének jelentős hányadában (kb. 30 %) cink felszívódási zavarok és következményes cink hiány lép fel, amely jellegzetes bőr tünetekhez (acrodermatitis enteropathica) vezet. Cink adása tehát ezért is indokoltnak tűnik. Meg kell még említeni a cink gyulladáscsökkentő hatását, amely fontos szerepet tölthet be a CF-ben megfigyelhető gyakori légúti gyulladások elleni küzdelemben. Mindent egybe vetve elmondhatjuk, hogy a cink jövőbeli alkalmazása új lehetőségeket nyithat a CF gyógyszeres kezelésében.

Az ASL savanyodásában valószínűleg szerepet játszik a hámsejtek bikarbonát szekréciójának csökkenése, mely legalább két különböző okra vezethető vissza. Egyrészt a CFTR maga is anion csatornaként működik és fiziológiás körülmények között átenged bizonyos mennyiségű bikarbonát iont, másrészt CFTR hiányában a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ioncsere működése gátolt, mivel az intracelluláris Cl^- koncentráció megemelkedik. Említésre méltó, hogy Choi és munkatársai kimutatták, hogy CF-ben a hasnyálmirigy elégtelen működése a HCO_3^- szekréció kritikus szint alá csökkenésével függ össze. Azon betegekben viszont, ahol a HCO_3^- szekréció legalább részben megtartott a hasnyálmirigy funkciója is elégségesnek bizonyult. Az eredmények tehát arra utalnak, hogy CF-ben nem elegendő kizárólag a Cl^- szekréciót helyreállítani, a HCO_3^- transzport korrekciója legalább annyira fontos. Ezzel összefüggésben a mi munkacsoportunk is kimutatta, hogy a Ca^{2+} -függő Cl^- csatornák aktiválása nemcsak a Cl^- szekréció helyreállítása miatt fontos, hanem a Cl^- sejten belüli koncentrációjának kívánt szinten tartásával biztosítja a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ioncsere hatékony működését. Következésképpen, az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció megemelése a Cl^- és a K^+ szekréció serkentése és a Na^+ reabszorpció gátlása mellett a HCO_3^- transzportot is serkenti.

Az elmúlt években végzett kísérleteink eredményei arra utaltak, hogy az extracelluláris pH megváltoztatása jelentősen befolyásolja az ATP és a cink által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedést CF és kontroll légúti hámsejtek kultúrájában. Az elmúlt években végzett munkánk során megvizsgáltuk az extracelluláris pH hatását az intracelluláris Ca^{2+} szintre a pH 6.4 és 8.4 közötti tartományban ATP és cink exogén hozzáadása nélkül. Az extracelluláris pH csökkentése 7.4-ről 6.4-re nem befolyásolta az intracelluláris Ca^{2+} szintet. Ezzel szemben a pH 8.4-re való emelése szignifikáns intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedést eredményezett. Abban az esetben, ha a pH emelésével egy időben az extracelluláris Na^+ -t a sejtmembránra impermeábilis N-methyl-D-glucamin ionokkal (NMDG^+) helyettesítettük az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedés mértéke tovább fokozódott. Az extracelluláris Ca^{2+} elvonása megakadályozta az intracelluláris Ca^{2+} emelkedést mind a Na^+ -t, mind az NMDG^+ -t tartalmazó alkalikus oldatban. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a sejtmembránban lévő Ca^{2+} permeábilis csatornák szabályozhatók az extracelluláris pH által, még akkor is, ha agonistákat, ATP-t és/vagy cinket nem adunk az extracelluláris oldathoz. További lényeges megfigyelés, hogy az extracelluláris pH változtatása a 6.4 és 8.4 közötti tartományban nem járt az intracelluláris pH szignifikáns megváltozásával, kizárva annak lehetőségét, hogy az intracelluláris Ca^{2+} szint változása a sejten belüli pH változás következménye lenne. A nem excitábilis sejtekben (pl. hámsejtek) a Ca^{2+} permeábilis csatornák között fontos szerepet töltenek be az ún. „store-operated” Ca^{2+} csatornák (SOCC). A thapsigargin irreverzibilisen gátolja a sejten belüli Ca^{2+} raktárak membránjában lévő Ca^{2+} -ATPáz-t, amely a SOCC csatornák aktiválásához vezet. Következésképpen, thapsigargin előkezelés után is megvizsgáltuk az extracelluláris pH szerepét a Ca^{2+} beáramlásra. A fentiekhez hasonlóan ezeket a kísérleteket is CF és kontroll légúti hámsejteken végeztük és azt találtuk, hogy pH 6.4 csaknem teljesen gátolta a SOCC mediálta Ca^{2+} beáramlást, míg pH 8.4 szignifikánsan serkentette a Ca^{2+} bejutását a sejtekbe. A Na^+ jelenléte vagy hiánya nem befolyásolta lényegesen az intracelluláris Ca^{2+} szintet a thapsigarginnal való SOCC aktiválást követően, amely arra utal, hogy ezek a csatornák szelektíven engednek át Ca^{2+} -ot. A „patch clamp” technika teljes sejt konfigurációját használtuk annak igazolására, hogy az extracelluláris pH emelése által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedés okoz-e Cl^- áram fokozódást.

Az eredmények egyértelműen igazolták, hogy az extracelluláris pH emelése a Cl^- áram aktiválásához vezetett. Meg kell azonban jegyezni, hogy a különbség csak akkor állt fenn, ha az extracelluláris oldat legalább 0.5 mM Ca^{2+} -ot tartalmazott, máskülönben az extracelluláris pH emelése nem befolyásolta a Cl^- áramot.

Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy az extracelluláris pH változtatása a 6.4 és 8.4 közötti tartományban szignifikánsan befolyásolja az intraceluláris Ca^{2+} szintet CF és kontroll hámsejtekben egyaránt. Az alkalikus extracelluláris pH a sejt Ca^{2+} koncentrációjának megemelkedéséhez vezet, amely CF sejtekben alternatív anion csatornák serkentése révén fontos szerepet kaphat a klorid és bikarbonát transzport helyreállításában.