

A KÖTŐSZÖVETI BETEGSÉGEK TERÁPIÁJÁNAK ÚJ ÚTJAI

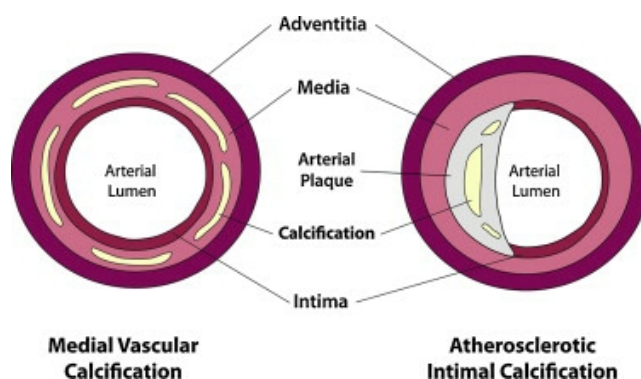
***Dedinszki Dóra¹, Szeri Flóra¹, Kozák Eszter^{1,2}, Pomozi Viola^{1,3},
Tőkési Natália¹, Mezei Tamás Róbert^{4,5}, Merczel Kinga^{1,6},
Tamás Arányi¹, András Váradi¹***

***¹MTA TTK Enzimológiai Intézet, ²ELTE Immunológiai Tanszék,
³University of Hawaii, Department of Cell and Molecular Biology, John
A. Burns School of Medicine, Honolulu, HI, USA, ⁴Central European
University, Department of Mathematics and its Applications;
⁵MTA Rényi Alfréd Matematikai Kutatóintézet, ⁶BME Alkalmazott
Biotechnológiai és Élelmiszertudományi Tanszék***

A gerincesekben az evolúció során kialakult az a szabályozó mechanizmus, amely a kalciumból és a foszfátból álló komplex szerkezetű kristályos biominerált a szervezetben csak a szükséges helyeken, a megfelelő időben és pontos formában engedi kialakulni. Ez az, amit hétköznapi nyelven csont- és fogképződésnek nevezünk. A kalciumfoszfát alapú hidroxipatit a kollagén vázakon épül. Kollagén azonban az egész testünkben jelen van, a kötőszöveti mátrix legfontosabb eleme. Finom szabályozási mechanizmusok gondoskodnak arról, hogy a meszesedés, a hidroxipatit-képződés a puha szövetekben és a kötőszövetben ne indulhasson meg. Ismert azonban számos olyan pathológiás állapot, betegség, amelyeket a kötőszövetek meszesedése jellemez, ez érintheti a bőrt, a vesét, a szemet. Legsúlyosabb következményként az artériák középső rétegét képező simaizom rostok alkotta struktúrában alakul ki hidroxipatit lerakódás (lásd 1. ábra bal oldali panel), amely következtében az érfal elveszíti rugalmasságát. Ez pedig nagyon súlyos keringési betegségekhez vezet.

A pathológiás jelenség kiváltó oka lehet genetikai és környezeti, valamint a természetes öregedés következményei is szerepet játszhatnak. A puhaszöveti meszesedés egyik fontos inhibitora a pirofoszfát, egy természetes metabolit, amely a keringésben kb. 1-2 mikromólos koncentrációban van jelen. A vérben megjelenő pirofoszfát jó részének forrása a máj [1]. Két olyan monogén

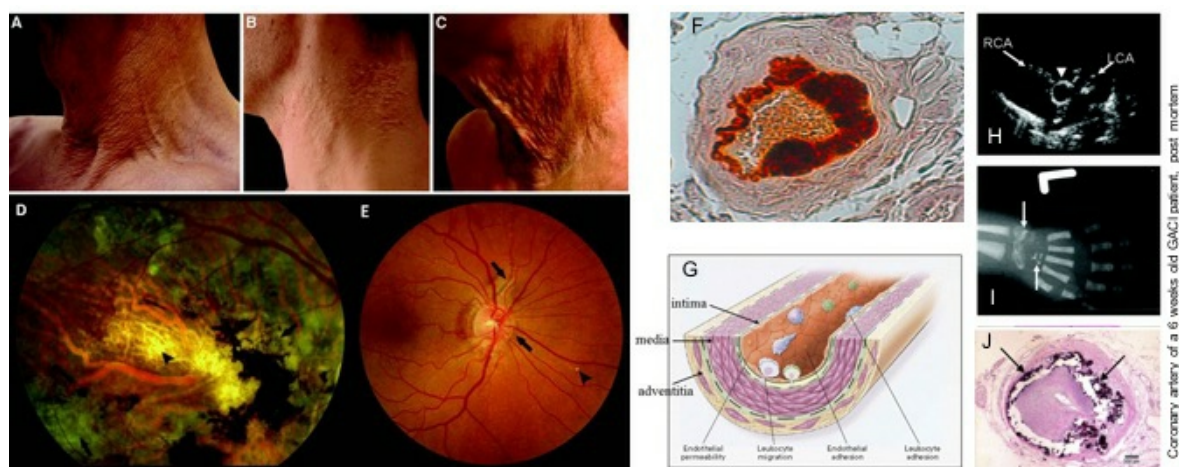
öröklődő betegség ismert – ezeket a patológiás meszesedés genetikai modelljeinek tekintjük –, amelyek a pirofoszfát termelődés zavarával függenek össze. A kevésbé súlyos kór a pseudoxanthoma elasticum (PXE), az érintett betegek várható élettartama nem csökken, életminőségük azonban igen, mert 40-50 éves koruk körül sokan elveszítik látásukat a szemben kialakult meszesedés miatt. Emellett a bőrben jelentkeznek kellemetlen tünetek, és az alsó végtagokban a keringés nem kielégítő volta a jele a betegségnek. A másik kórkép, a csecsemőkori általános artéria-meszesedés (generalized arterial calcification in infancy, GACI) sokkal súlyosabb, és az érrendszerben manifesztálódó tünetek miatt az újszülöttek egy része nem éri meg a harmadik hónapot. A GACI már magzati korban is kimutatható.



1. ábra. Arteriosclerosis és atherosclerosis. Arteriosclerosis az erek falának, elsősorban simaizomból és elastikus rostokból felépülő középső (media) rétegét érintő elváltozás. Az itt kialakuló kalcifikáció következményként az erek elveszítik rugalmasságukat (bal ábra). Atherosclerosis során az erek belső falán (intima) jelennek meg koleszterinből, kalcium-foszfátból és zsírból álló lerakódások (plakkok), amely az erek lumenének beszűkülésével jár.

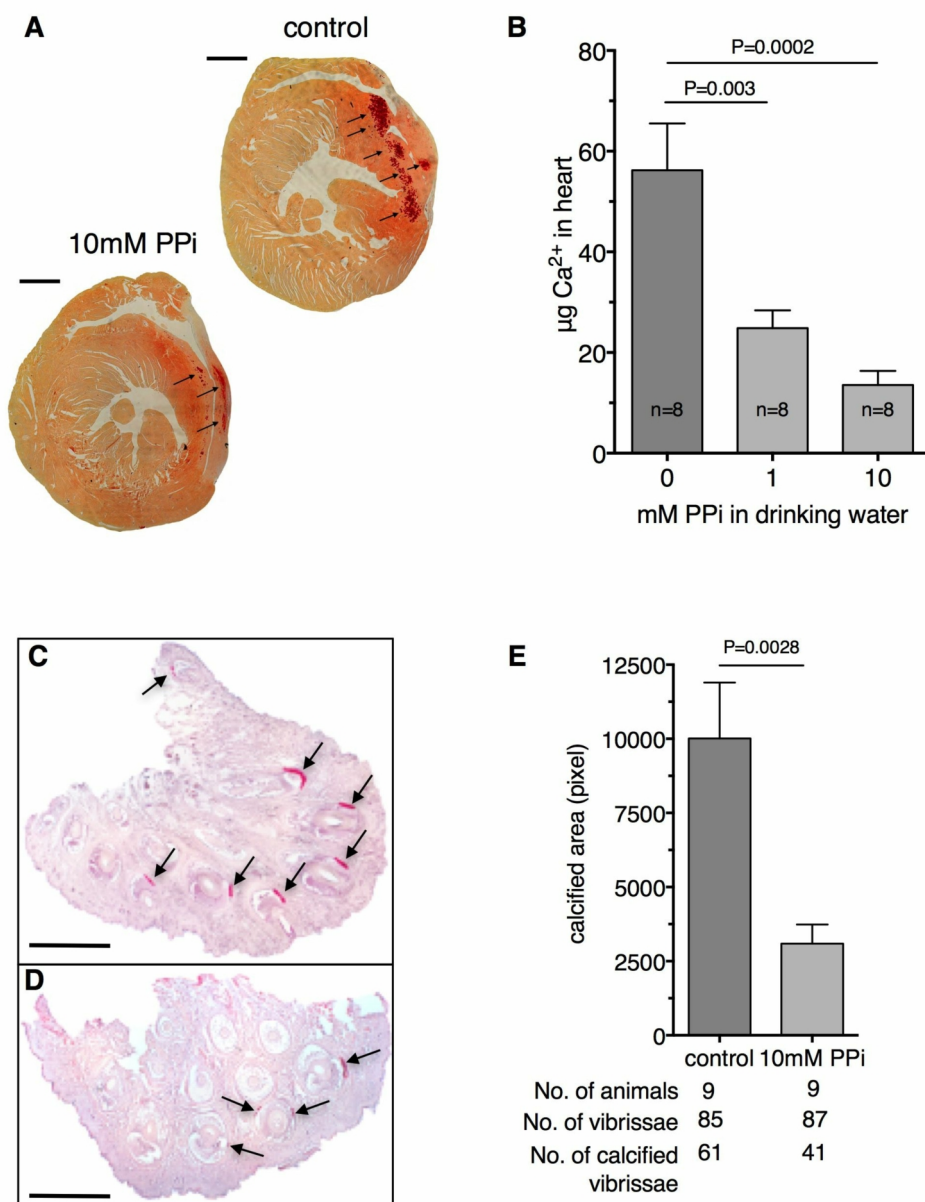
A PXE genetikai oka egy transzporter fehérjét kódoló génben, az ABCC6-ban bekövetkező mutáció. A betegek mintegy 70%-a legalább egy misszensz mutációt hordozó alléllal rendelkezik. Korábbi munkánkban olyan terápiás megoldásokon dolgoztunk, amelyek során a misszensz mutáns humán fehérje konformációját „korrigáltuk” *in vivo*, így azt működőképesé tettük. Ezekhez a kutatásokhoz a betegség egérmodelljét használtuk, amelyben a kötőszöveti meszesedés tünetei a beteg emberhez hasonlóképpen jelentkeznek. A humanizált egér-modellünkben sikerült a meszesedést meggátolni, ezzel egy allél-specifikus terápia alapjait teremtettük meg [2-4].

Mintegy két éve vált ismertté, hogy mind a PXE, mind a GACI betegségre a vér alacsony pirofoszfát-szintje jellemző [1, 5].

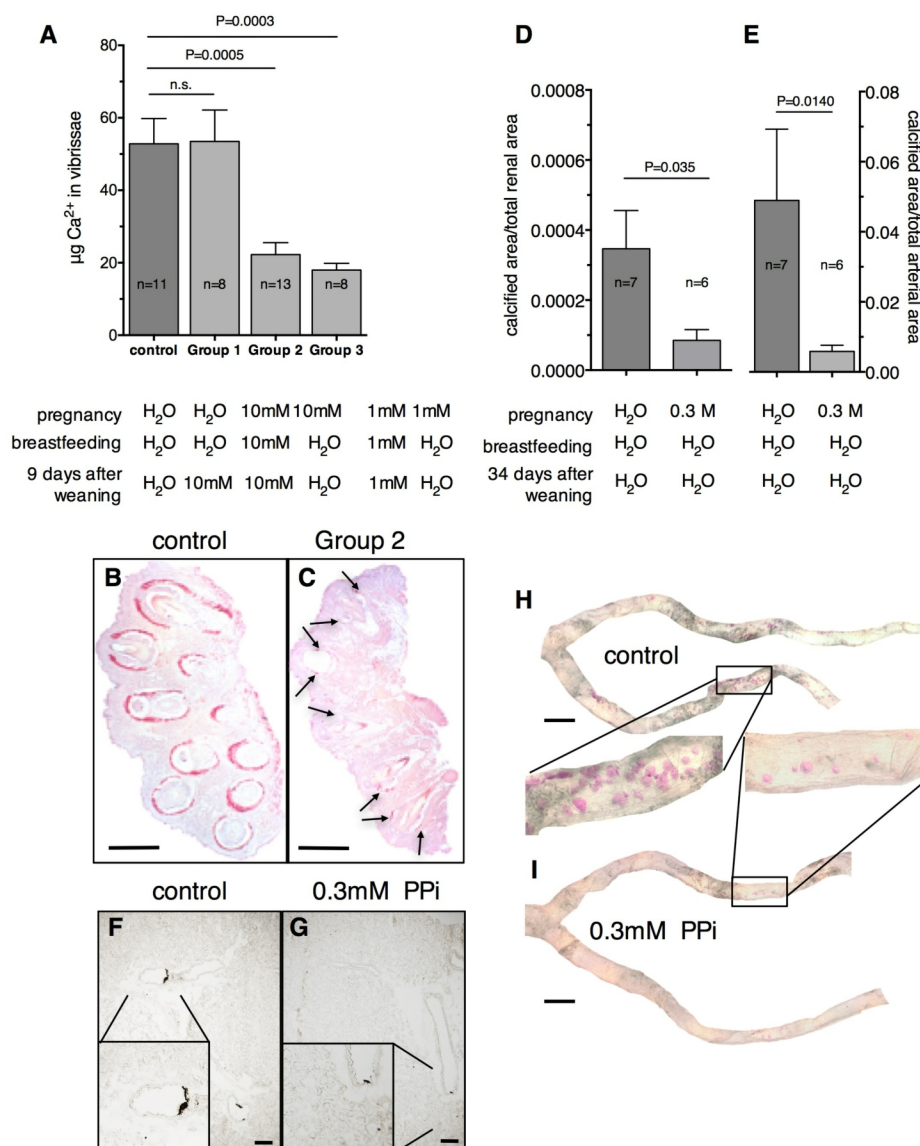


2. ábra. PXE és GACI szimptómák. (A-E) A PXE tünetei az artériák falában megjelenő kalcifikáció mellett a bőrben és a retina Bruch membránjában jelentkeznek. (F-G) PXE és GACI megbetegedések során a közepes méretű artériák falában megfigyelhető, a media rétegét érintő elváltozás, kalcifikáció. (H-I) A GACI tünetei már magzati korban kialakulnak, és elsősorban az érrendszeri tünetek miatt az újszülöttek egy része nem éri meg a harmadik hónapot.

Amikor kiderült, hogy ebben a betegségben is a pirofoszfát alacsony szintje a valószínű funkcionális ok, mint mindenki más, mi is örültünk a holland barátaink felfedezésének (ráadásul egy kicsi részünk nekünk is volt benne, mert egy kritikus kísérletet mi végeztünk el), de az első gondolatunk nekünk is az volt: milyen kár, hogy nem lehet ezt az egyszerű vegyületet szájon át adott gyógyszerként alkalmazni, és egyszerű, a természetes metabolitra alapuló szubsztitúciós terápiát kialakítani. Ugyanis általánosan elfogadott (volt), hogy ez a vegyület biológiailag nem hasznosul („*bioavailability zero*”). Az okát is tudtuk: az emésztőrendszerünkben nagyon sok olyan enzim működik – részben saját sejteink, részben pedig a bélflóra baktériumai termelik ezeket –, amelyek igen hatékonyan bontják a pirofoszfátot (nukleázok, foszfatázok). Mindez már-már dogmaként szerepelt minden idevágó tudományos közleményben jó pár évtizedre visszamenőleg. Mi azonban kíváncsiak voltunk, milyen kísérletek alapján vonták le ezt az – egyébként logikus – állítást. Főleg az okozott fejtörést, hogy hogyan mérték a pirofoszfátszintet a vérben? Hiszen az egyáltalán nem egyszerű, ma is csak néhány labor képes azt megbízhatóan meghatározni.



3. ábra. A szájon át bejuttatott pirofoszfát a PXE egér szívizomban indukált és a bajuszszőrtüszőben spontán kialakuló meszesedési tüneteit is képes volt mérsékelni. (A) A szívizom fagyasztásos sérülés indukálta meszesedése (meszes területek nyíllal jelölve). Kontroll (vízzel itatott) és 10 mM koncentrációjú pirofoszfát oldattal itatott állat szívizom-metszete. (B) A szívizom kalcium-tartalma a fagyasztásos sérülést követően, komplexometriás módszerrel meghatározva. Az állatok 0, 1 ill. 10 mM koncentrációjú pirofoszfát oldatot ittak a sérülés előtti naptól kezdve az azt követő 4. napig. (C, D) A PXE egerek bajuszszőrtüszőinek Alizarin Reddel festett tipikus metszetei (meszes területek nyíllal jelölve). A PXE egerekben kialakuló spontán meszesedés első biomarkere a bajuszszőrtüszőt körülvevő kötőszövetes tokban figyelhető meg. A fenti kép egy kezeletlen, vízzel itatott állatból, míg az alsó kép egy leválasztástól 22 hetes koráig 10 mM pirofoszfát oldattal itatott állatból származik. (E) A kalcifikáció morfometriás módszerrel történő kvantitatív meghatározása. Az adatok kiértékelése Mann-Whitney nemparametrikus próbával történt.



4. ábra. A GACI betegséget modellező egértörzs több különböző, spontán meszesedő szövetében kialakuló kalcifikáció gátlása orálisan adagolt pirofoszfáttal. (A) A bajuszszőrtüszőket tartalmazó szöveti minták kalciumtartalma, komplexometriás módszerrel meghatározva. Kontroll csoport: a heterozigóta anyák és utódaik vízben tartva, az utódok 30 napos koráig. 1. csoport: a kontroll csoporthoz hasonlóan tartva, de az utódok leválasztásuktól kezdve (21. nap) 10 mM pirofoszfát oldatot kaptak 9 napon keresztül. 2. csoport: a heterozigóta anyák és az utódai 1 mM pirofoszfát oldaton tartva a vemhesség, illetve a laktációs időszak alatt, valamint a leválasztást követően a 9. napig. 3. csoport: az anyák 1 mM pirofoszfát oldaton tartva csak a vemhesség alatt. (B, C) Különböző csoportokból származó egerek Alizarin Reddel festett, bajuszszőrtüszőket tartalmazó tipikus metszetei. (D) A veseartériák kalcifikációjának mértéke. A heterozigóta anyák vemhesség alatt vagy vizet, vagy 0,3 mM pirofoszfát oldatot ittak, majd az utódok 55. napos korukig ivóvízen tartva. (E) A hátsó lábak artériáinak kalciumtartalma. A heterozigóta anyák vemhesség alatt vagy vizet, vagy 0,3 mM pirofoszfát oldatot ittak, majd az utódok 55. napos korukig ivóvízen tartva. (F, G) Tipikus vese-metszetek a kontroll állatokból, és a csak a vemhesség alatt 0,3 mM pirofoszfát oldatot fogyasztó anyák utódaiból. A metszetek Yasue-protokollal kezelték, a festést Emmanuel Letavernier (Franciaország, Párizs) végezte. (H, I) Alizarin Reddel festett tipikus hátsó láb artériák a kontroll állatokból, és a vemhesség alatt 0,3 mM pirofoszfát oldatot fogyasztó anyák utódaiból. Az adatok kiértékelése Mann-Whitney nemparametrikus próbával történt.

A legnagyobb meglepetésünkre azonban az eredeti kísérletek(et) nem sikerült a publikációkban megtalálnunk, pedig majd ötven évre mentünk vissza az időben. Egy napon azt mondtuk magunknak: hiszen mi pár hét alatt ellenőrizni tudjuk, mindez igaz-e: itt a meszesedő PXE-állatmodell a laboratóriumban, itassuk az egereket pirofoszfát oldattal. Legnagyobb csodálatunkra a szájon át az ivóvízzel bejuttatott pirofoszfát meggátolta a meszesedés kialakulását!

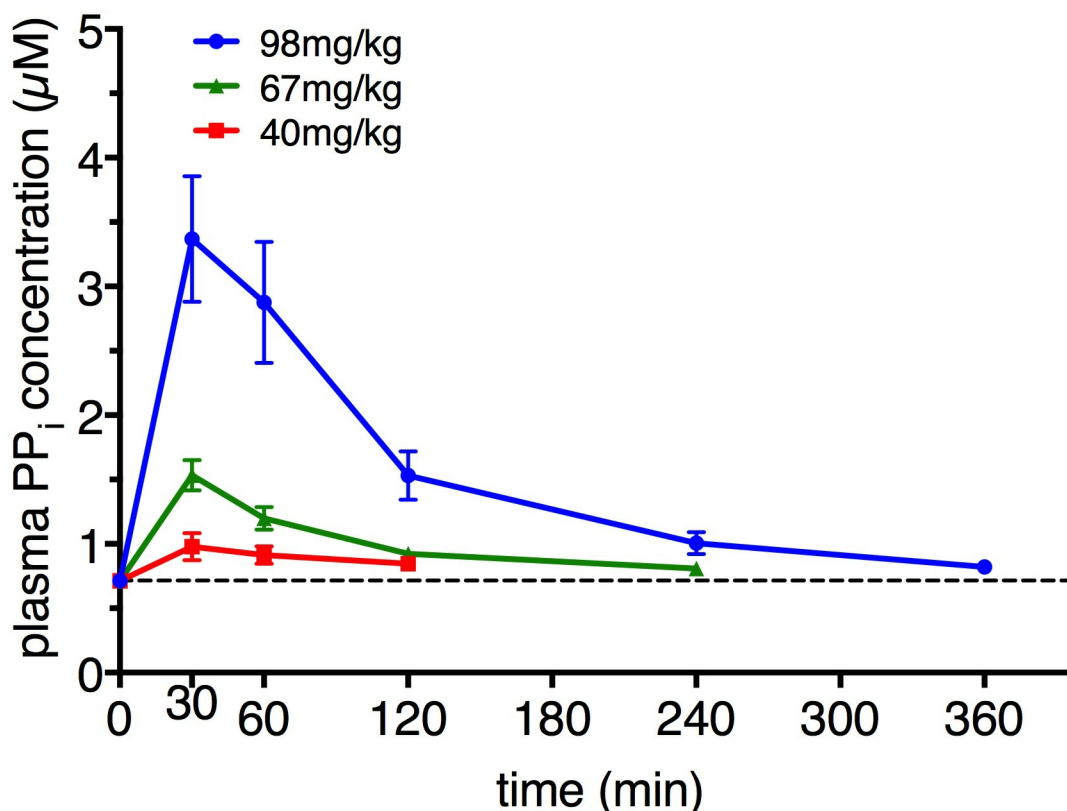
Ekkor a másik, súlyosabb genetikai betegség, a csecsemőkori általános artériameszesedés egérmódeljéhez nyúltunk, és ezekben az egerekben is sikerült megakadályoznunk a tüneteket.

Azt is kimutattuk, hogy a szer megjelenik az állatok keringésében, tehát legalább egy része felszívódik, mielőtt lebomlana. Ennyi pedig elég a meszesedés gátlásához. Megfelelő engedély birtokában önkénteseken (saját magunkon és kollégáinkon) kipróbáltuk, hogy a szájon át bejuttatott pirofoszfát észlelhető-e a véráramban. Amit egyébként – ahogy már fent jeleztük – nem túl egyszerű megmérni. De a laboratóriumunkban rendelkezésre álltak a megfelelő analitikai módszerek, és azt találtuk, hogy emberben is felszívódik a vegyület, és könnyen elérhető az a dózis, amelyik a betegekben már helyreállítaná a normális plazma pirofoszfát-szintet.

Mindez azt jelenti, hogy munkánk eredményeként előtérbe kerül egy nagyon egyszerű, nagyon olcsó terápiás megoldás, hiszen ez az anyag nem mérgező. Az élelmiszeripar nagy mennyiségben használja „állományjavítóként”, még néhány bébiételben is engedélyezett. És mindez itt volt az orrunk előtt, csak „bedőltünk” a dogmának. Szerencsére csak egy kis időre.

Ha azt kérdezi valaki, mi a legváratlanabb, a legérdekesebb eredményünk, talán az, hogy rájöttünk, a súlyosabb betegség, a GACI egereiben a szer csak akkor hatásos (az utódokra), ha azt az anya a terhesség idején kapja. Tehát a meszesedés kezdeti tüneteit kell megakadályozni, amelyek az utód egerekben

már a magzati korban kialakulnak. Ez összevág azzal, hogy az emberi betegség is „veleszületett”, az artériák és az ízületek meszesedése már az újszülötteken kimutatható.



5. ábra. A szájon át adagolt tetraszódium pirofoszfát felszívódása emberekben. Az önkéntesek 43, 72, 110 mM (pH 8.0) koncentrációjú tetraszódium pirofoszfát oldatot fogyasztottak, amelyek rendre 40 mg/kg ($n = 10$), 67 mg/kg ($n = 10$), illetve 98 mg/kg ($n = 9$) dózisnak felelnek meg. A plazma pirofoszfátszintje az oldat elfogyasztása előtt (0 perc), illetve azt követően 30, 60, 120, 240 és 480 perccel került meghatározásra.

Az EMBO Molecular Medicine szerkesztője, ahol a cikkünk megjelent [6], külön kiemeltette, hogy az esetleges terápiás alkalmazás milyen alacsony költségű megoldással szolgál egy olyan, a fent említettnél nagyobb betegségcsoportnál, amelyre eddig nem állt rendelkezésre oki terápia. Ugyanis a kötőszöveti meszesedés számos betegség – némelykor igen súlyos – velejárója. Jelenleg ilyen betegségek állatmodelljeivel kezdünk „barátkozni”.

A történethez tartozik, hogy 2017. november végén a finnországi Tampere University Clinic Ritka Betegségek osztályának vezetője írt nekünk, és elmondta,

annyira perspektivikusnak gondolják az általunk javasolt terápiás megoldást, hogy úgy határoztak, a körzetükhöz tartozó PXE-betegeket ezzel az egyszerű, a szájon át bejutatott pirofoszfát-terápiával fogják kezelni. Mi vállaltuk, hogy részt veszünk a személyre szabott dózis kidolgozásában, ugyanis individuális különbségek észlelhetők a felszívódás kinetikájában, mértékében. Ez a munka januárban elkezdődött, két beteg felszívódási görbéit határoztuk meg, őket már ezzel a terápiával kezelik Tamperében. Mi pedig izgatottan várjuk, hogy az artériáik meszesedése csökken, vagy legalábbis nem romlik tovább. Mivel a PXE lassan progrediáló betegség, nem biztos, hogy ez hamar kiderül.

Irodalomjegyzék

- [1] Jansen, R.S., Duijst, S., Mahakena, S., Sommer, D., Szeri, F., Váradi, A., Plomp, A., Bergen, A.A., Elferink, R.P.J.O., Borst, P. et al. (2014) ABCC6-mediated ATP secretion by the liver is the main source of the mineralization inhibitor inorganic pyrophosphate in the systemic circulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **34**: 1985-1989.
- [2] Le Saux, O., Fulop, K., Yamaguchi, Y., Ilias, A., Szabo, Z., Brampton, C.N., et al. (2011) Expression and in vivo rescue of human ABCC6 disease-causing mutants in mouse liver. *PLoS One*, 6(9): e24738.
- [3] Pomozi, V., Brampton, C., Fülöp, K., Chen, L.H., Apana, A., Li, Q., Uitto, J., Le Saux, O., Váradi, A. (2014) Analysis of pseudoxanthoma elasticum-causing missense mutants of ABCC6 in vivo; pharmacological correction of the mislocalized proteins. *J Invest Dermatol*, **134(4)**: 946-953.
- [4] Pomozi, V., Brampton, C., Szeri, F., Dedinszki, D., Kozák, E., van de Wetering, K., Hopkins, H., Martin, L., Váradi, A., Le Saux, O. (2017) Functional Rescue of ABCC6 Deficiency by 4-Phenylbutyrate Therapy Reduces Dystrophic Calcification in Abcc6^{-/-} Mice. *J Invest Dermatol*, **137(3)**: 595-602.
- [5] Rutsch, F., Ruf, N., Vaingankar, S., Toliat, M.R., Suk, A., Höhne, W., Schauer, G., Lehmann, M., Roscioli, T., Schnabel, D. et al. (2003) Mutations in ENPP1 are associated with 'idiopathic' infantile arterial calcification. *Nat Genet*, **34**: 379-381.

- [6] Dedinszki, D., Szeri, F., Kozák, E., Pomozi, V., Tőkési, N., Mezei, T.R., Merczel, K., Letavernier, E., Tang, E., Le Saux, O., Arányi, T., van de Wetering, K., Váradi, A. (2017) Oral administration of pyrophosphate inhibits connective tissue calcification. *EMBO Mol Med*, **11**: 1463-1470.