

OPPONENSI VÉLEMÉNY

Dr. Krajcsi Péter

***”Membrán transzporterek mint a gyógyszerek,
növényi hatóanyagok és környezetszennyező anyagok
ADMETox tulajdonságainak meghatározói”***

című MTA doktori értekezéséről

Az elmúlt 15 évben nagymértékben felértékelődött a különböző típusú, korszerű *in vitro* - *in vivo* biokémiai módszerek a xeno- és endobiotikumok biokémiai, bioanalitikai tömegspektrometriás vizsgálatainak szerepe a korszerű membrán transzport folyamatok vizsgálatában, az ADMETox vizsgálatokban, a gyógyszerfejlesztésben, a diagnosztikában és a növénynevelésben. A XXI. században a modern, célirányos efflux és influx membrán transzport folyamatok kutatásának szerepe napjainkban egyre jobban felértékelődik a gyógyszerkutatásban az ADME és a hozzá tartozó farmakológiai vizsgálatok, a gyógyszer-transzporter interakciók szerepeként, a testidegen vegyületek teljes K+F folyamatában. Mindez nem nélkülözheti a komplex kutatási szemléletet, a preklinikai alapkutatástól a multidiszciplináris alkalmazott kutatásokig. Ez a multidiszciplináris tudás igénye az elmélet és a gyakorlat szempontjából egyaránt jelentős kihívást jelent a fenti területen dolgozó szakember számára.

Jelen akadémiai doktori értekezés kiváló példája ennek az egyre erősödő biokémiai és farmakológiai nemzetközi tendenciának. A Jelölt igen masszív klasszikus biokémiai, farmakológiai, továbbá bioanalitikai műszeres mérési alapokra és ezek kombinált tudására épülő, az *in vitro* és *in vivo* legfejlettebb transzporter vizsgálati technikákat és vizsgáló módszereket sorakoztatja fel munkássága kapcsán, amivel összességében jelentős, magas színvonalú gyakorlati és elméleti eredményeket prezentál.

Így a disszertáció alapvető fő célkitűzései és azok megvalósításának minősége a legkurrensebb nemzetközileg publikált korszerű témák közé tartozik, amit jól bizonyít, hogy a

membrán transzporterek, az ADMETox és az ezzel kapcsolatos transzporter-interakciókkal foglalkozó publikációk száma megtízszereződött az elmúlt hét évben.

Ma az alkalmazott biokémiai kutatáshoz korszerű biokémiai, analitikai, radioanalitikai módszerek és berendezések tárháza szükséges. A disszertáció szerzője az efflux és influx transzporterek *in-vitro* és *in-vivo* vizsgálataival, számos tudományterületen több szegmensű biokémiai, ADMETox vizsgálata terén végzett több mint egy évtizedes kutató munkáját foglalta össze.

A benyújtott értekezés egyik pozitívuma, hogy egyesíteni tudja a membrán transzporter vizsgálatokhoz szükséges széleskörű biokémiai, bioanalitikai fejlesztés, az *in vitro* vizsgálatokban a sejtvonalak, primer kultúrák, szövettenyésztési módszerek, a fehérjemérés, a Westenblot, a különböző membrán- és sejtes esszék, a festék transzport- és citotoxicitás esszék, valamint az *in vivo* vizsgálatokban az epevezeték kanulációs efflux transzportereken történő gyógyszerkölsönhatások, a mikrodialízis technikák alkalmazása a vér-agy gáton történő gyógyszer interakciók farmakokinetikai vizsgálatában, stb. módszerek együttes szellemiségét, komplexitását, egyben bizonyítja a Jelölt széles irodalmi jártasságát.

Az értekezésen belül az egyes fejezetek terjedelme és aránya optimálisnak mondható, bár az értekezés össz-oldalszáma meghaladja az ideális terjedelmet. A vizsgálatokhoz alkalmazott módszerek a legkorszerűbbek. A disszertációban összefoglalt vizsgálatok jelentős része alapkutatás, részben alkalmazott kutatás, amely túlmutat az új biokémiai módszerekkel kapott eredményeken és a gyógyszerkutatás más területeinek gyakorlatában is jól hasznosítható.

A Szerző kutatási eredményeiből készített téziseit 9 főfejezetben és számos alfejezetben, 152 oldalon foglalja össze. Tudományos eredményeit 34 ábra és 20 táblázat felhasználásával dokumentálja. Mindez imponáló, egyben jól segíti az értekezés érthetőségét. A disszertáció felépítése logikus, jól nyomon követhető.

Külön kiemelendő az 5 oldal terjedelmű rövidítések jegyzéke és az igen értékes és részletes, 313 db, minden igényt kielégítő irodalmi összefoglaló, valamint a jól elkülönülő 68 saját irodalmi hivatkozás gyűjteménye. A Jelölt nemcsak a tudományos publikációival ért el jelentős elismeréseket, hanem könyvfejezeteivel és 2 szabadalmával is, amely bizonyítja a kísérletes vizsgálati hozzáértésén túl a rendszerbe foglaló képességét is.

A disszertáció formai szempontból megfelel az MTA doktori értekezések követelményeinek, gondos munka, dokumentációja mintaszerű, ortográfiája modern, következetes. Külön kiemelendők az igen szemléletes összefoglaló ábrák, táblázatok (pl. 1-4 táblázat), amelyek jól követhetővé teszik a szerteágazó értekezést. Külön kiemelendő az FDA

által elfogadott transzporter mediált gyógyszerkölsönhatások összefoglalása (4. táblázat), amely az ADME-gyógyszerinterakciók legkorszerűbb katatási irányát vetíti az olvasó elé.

A vizsgálatok tervezése és precíz kivitelezése, továbbá a nagyszámú együttműködő partner, meggyőzi a bírálót a Jelölt kísérletes vizsgálatokban való jártasságáról és a tudományos együttműködő képességéről is, amely ma nélkülözhetetlen. Mindez mutatja a SOLVO-ban a kiváló műhelymunka elméleti és gyakorlati eredményességét.

A Jelölt a biológiai membránok efflux és influx transzportfolyamatainak széleskörű biokémiai, HPLC, LC-MS, izotóptechnika, stb. legkorszerűbb vizsgálataival, széleskörű vizsgáló módszereket vonultat fel. A disszertációban szereplő biokémiai technikák arzenálja bizonyítja a Jelölt széleskörű módszertani jártasságát is.

A Jelölt korrekten írja le a saját és az együttműködésben végzett vizsgálatok eredményeinek arányát. Jelentősen segíti az opponenst, hogy az egyes fejezetekben feltüntetésre kerül a releváns publikáció.

Részletes megjegyzések

A bíráló feladata a mű méltatásán kívül kritikai megjegyzések ismertetése. A bíráló zavarban van, mert az elkészített disszertáció gondosan kivitelezett munka, olvasása közben csak elvétve merülnek fel szakmai bíráló megjegyzések, ezek is javarészt, szerkesztési és formai kifogások.

- Sajnálatos, hogy nincs megadva az internetes hivatkozások évszáma és időadatai a disszertáció 141. oldalán és a tézisek 26. oldalán.
- Az értekezés igen demonstratív része, hogy számos rövidítést mutat be. Sajnálatos, hogy a Rövidítés jegyzékből kimaradt több fontos fogalom, amely rontja a nyomon követhetőséget (123., 124. oldal).
- A 132. oldalon a 6. pontnak nincs előzménye.
- Talált betűhibák: 6., 49., 63., 78. oldal, 10. táblázat.
- A 2.6.1.1. bekezdésben a membrán vezikula alapú vizsgálatokban, csak az kerül leírásra, hogy az emlős sejtek sokszor nem rendelkeznek elegendően magas expresszióval, de nincs leírva, hogy akkor mi használható.
- A 29. ábra aláírásából hiányzik a calcein tesztre való utalás.
- A glikokenodeoxikolát (GCDC) intrinszik klírens (77. oldal, 11. táblázat) egyik transzporter esetében sem változott koleszterinnel való töltés hatására. Ezért nem lehet

kijelenteni, hogy a vizsgált szubsztrátokra az intrinszik klírensz emelkedett a koleszterin töltés hatására.

Kérdéseim:

- A ciklosporin A (CS) IC₅₀ értékében mért gátlás különbség az ABCB11/CTRL esetén 2 µM és az ABCB11-HAM membrán esetében 18,9 µM, amely közel tízszeres értéket mutat (12. táblázat, 78. oldal). Mivel magyarázható ez a kiugró érték?
- Van-e *in vivo* igazolása annak, hogy a seliciclib agyi expozícióját az ABCB1 fehérje limitálja?

Az értekezés tudományos eredményei

A Jelölt az alapkutatás jellegű elméleti és gyakorlati eredményeit 3 fő irányvonal köré csoportosítja és 16 pontban foglalja össze, számos alfejezettel kiegészítve. Az Opponens ezeket új tudományos eredményeknek fogadja el. Az eredményeket javarészt neves külföldi folyóiratokban publikálták. Az eredmények hozzájárultak a SOLVO stratégiai jelentőségű új termékcláncának tudományos és gyakorlati hasznosíthatóságához.

- Kidolgozta, hogy az apikálisan expresszáldó efflux transzporterek aktivitása jelentősen függ az expressziós rendszer membrán koleszterin tartalmától. Kifejlesztettek és szabadalmaztattak egy új teszt-reagens sorozatot, a koleszterinnel feltöltött rovarsejt membránokat (High-Activity-Membrane (HAM)).
- Bemutatta, hogy a molekulák lipofilicitása, valamint a sejtes vizsgálatok esetében a transzporter expresszió fontos meghatározói a membrán és sejtes esszékben mért IC₅₀ adatoknak. Mindez felveti a barrier specifikus sejtvonalak és a primer kultúrák használatának szükségességét.
- Megmutatta, hogy a klorotiazid és teriflunomid szelektív ABCG2 szubsztrátok használhatók különböző *in vivo* tesztekben.
- Kidolgozott és szabadalmaztatott egy fluoreszcens VT esszét az ABCB1 transzporter gátlásának vizsgálatára. Igazolta, hogy a CDCF alkalmas ABCC2 szubsztrát próbaként való alkalmazására nagy áteresztőképességű vezikuláris transzport metodikájú szűrőtesztekben.
- Bemutatta, hogy a membrán és sejtes tesztrendszerek alkalmasak növényi hatóanyagok, valamint környezeti szennyezőanyagok és konjugátumaik

transzportfolyamatainak vizsgálatára. Az így kapott adatok felvetik a lehetőségét a fejlesztések racionalizálásának, illetve a biztonságosabb peszticidek előállításának.

- Igazolta, hogy különböző komplexitású módszerek "barrier"-specifikus integrációjával gyógyszerek hepatikus exkréciójának és vér-agy gát penetrációjának vizsgálatával mechanisztikus és relevancia adatok egyaránt nyerhetők.

Összefoglalásképpen ismételten ki kell emelni **Dr. Krajcsi Péter** hiteles adatokon nyugvó, igen értékes, széleskörű elméleti és gyakorlati munkásságát, amely hozzájárult a tudományterület fejlődéséhez. Az értekezés kimagasló szintű, szerteágazó kísérleti adatai és az efflux és influx membrán transzporter fehérjék vizsgáló módszereinek eredményei bizonyították a Jelölt rátermettségét és precíz kísérlettervezését, valamint sokoldalú képességeit. Új módszertani bázist teremtett az ADMETox transzportfehérjék *in vitro* és *in vivo* vizsgálataihoz, amely gyakorlati alkalmazhatóságával rászolgált pályatársai megbecsülésére és tiszteletére. Korszerű magyarországi transzporter vizsgálataival nemzetközileg elismert szakemberré vált.

Megjegyzéseim az értekezéshez, a több mint egy évtizedes kimagasló kutatási tevékenység egészét nézve nem érdemiek.

Mindezek alapján **Dr. Krajcsi Péter** disszertációját komoly gyakorlati hasznú, értékes munkának tartom, amely messze megfelel az MTA doktora fokozat szakmai és formai követelményeinek.

Mindezek alapján, messzemenőleg javaslom az értekezés nyilvános vitára való bocsátását és sikeres védelem esetén az MTA doktora fokozat odaítélését.

Budapest, 2014. június 30.



Dr. Klebovich Imre
az MTA doktora
egyetemi tanár