

Opponensi vélemény Szarka András „Vízoldható antioxidánsok kéz a kézben: C-vitamin és Glutation” című MTA doktori értekezéséről

Készítette: Prof. Biró György, az orvostudomány doktora

A munka a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszéken készült, alapjában kémiai tárgyú. Ennek ellenére bírálatomat, szakterületemnek megfelelően, orvostudományi, illetve táplálkozástudományi szempontok alapján állítottam össze, mert a téma interdiszciplináris és a szerző is részletesen foglalkozik a humán vonatkozásokkal.

Az értekezés bevezetése – ami az olvasó számára „*captatio benevolentiae*” – Szent-Györgyi munkásságát végre a maga valóságában mutatja meg és nem a gyakran tudományos igényű munkákban is megjelenő banális leegyszerűsítésben a C-vitamin „felfedezéséről”. A munka a továbbiakban sem okoz csalódást. A téma irodalmi előzményeit, a kutatások jelenlegi állását, az elért eredményeket, a támpontként szolgáló evidenciákat bemutató rész átfogóan és nagyon világosan mutatja meg a jelölt tájékozottságát. Elsőként a növények birodalmával foglalkozik, bemutatja a C-vitamin növényi szintézisét, az aszkorbinsav alapvető funkcióit a növényekben, az antioxidáns hatást, a fotooxidáns stresszhez kapcsolódó funkciót, az enzim kofaktor szerepet, a növényi szövetek, sejtek fejlődésének előmozdítását. Kitér a C-vitamin mennyiségére a különböző növényekben, az aszkorbinsav-glutation kapcsolatra, a C-vitamin „*rekuperálására*” és transzportjára.

A szerző globális szemléletének kifejeződéseként ezután az emlős állatok, illetve az emberi sejtek C-vitamin felvételét, transzportját tárgyalja. Ehhez a területhez kapcsolódóan érdemes lett volna érinteni a biológiai felhasználhatóságot (*bioavailability*), mint a témakör lényegi *punctum saliens*-ét.

A glutationnal az aszkorbinsavhoz hasonló struktúrában ismerkedhetünk meg: glutation a növényi sejtekben, kémiai jellegzetességei, bioszintézise, funkciói (antioxidáns, kén-anyagcsere, szerepe a növény fejlődésében). A következőkben foglalja össze a glutation bioszintézisét emlős sejtekben, közreműködését az antioxidatív, illetve redox folyamatokban. Három kisebb fejezet a fő témához lazább szálakkal csatlakozó, de mindenképpen fontos jelenségekre hívja fel a figyelmet: a programozott sejthalál (*apoptózis*) és az oxidatív-antioxidatív folyamatok kapcsolatára, a redukált glutation és a glutation-diszulfid, valamint más enzimek reguláló funkciójára, az redukált glutation depléciójának következményeire, a dehidroaszkorbátra, mint elektron-akceptorra.

A kísérleti módszerek leírása foglalja el az értekezés következő mintegy 20 oldalát. Véleményem szerint minden tudományos munkának a színvonalát, értékét nagyon pontosan jelzi az alkalmazott metodika bemutatása. A leírásnak ki kell terjednie valamennyi eljárásra, azoknak minden részletére olyan mértékig, hogy adott esetben a vizsgálat egy másik kutató számára azonos feltételek mellett megismételhető legyen. Az értekezés messzemenően eleget tesz ennek a követelménynek. A munka eddig is alkalmazott felépítésének megfelelő először a növények termesztéséről, majd a növény sejt kultúrák fenntartásáról informál. Az állatkísérleteknél az állatok beszerzésétől kezdve, a sejt fenntartáson, a sejt vonalak létrehozásán és fenntartásán át a mitokondriumok és a mikroszóma izolálásáig mindenről kellő részletességgel értesülünk. A mérési módszerek szabatos leírása a kis mólsúlyú anyagok gyorsszűrési eljárásával kezdődik, folytatódik az aszkorbát és glutation koncentrációjának, az invertáz és fumaráz aktivitásának meghatározásával. Mérték a fehérje tiolokat, a mitokondriális légzést, az aszkorbil gyököt, a sejtek életképességét, pusztulását, dehidrogenáz aktivitást és expressziót, enzimek aktivitását (citokróm-c, reduktázok, peroxidáz, mitokondriális oxidatív folding enzimek), fehérje koncentrációt, C-vitamin mitokondriális transzportereket, C-vitamint élelmiszerekben.

A metodikai rész kellően komplex, igencsak minden részletre kiterjedő. Azonban nincs tájékoztatás arról, hogy az egyes módszereknek mik voltak az előzményei, mikor, ki vagy kik alkalmazták, validálták ezeket. Nem valószínű, hogy valamennyi eljárást a szerző maga alakította ki, azonban ekkor is szükséges lenne utalni a validításra. Miért hiányoznak ezek az adatok?

A következő fejezet demonstrálja a saját vizsgálatok eredményeit mintegy 50 oldalon, 21 táblázatban és 37 ábrán. A növénybiológiai megfigyeléseknél általánosan alkalmazott, a káposztafélekhez tartozó lúdfűvel (*Arabidopsis*) történtek a kísérletek. Ennek a növénynek a különleges tulajdonsága igen kis méretű genomja, amely lehetőséget adott arra, hogy genomjának struktúráját már 2000-ben, első növényként tisztázzák. Úgy tűnik, hogy a növényi mitokondriumnál az oxidált dehidroaskorbát (DHA) transzportja dominál, amely fehérje mediálta folyamat, de nem zárható ki, hogy intramitokondriálisan oxidálódik az askorbát és ezért az erre specifikus transzporter létezése vitatható. A glükóz és a geniszteint gátolja a DHA mitokondriális felvételét. Tanulmányozta a DHA és a glükóz transzportjának összefüggését, gátlását, a mitokondriális légzés hatását, felvételüket – az askorbáttal együtt – a mitoplasztoknál. Az askorbát és a glükóz kölcsönhatásának tisztázása azért is fontos, mert van olyan közlemény, amely szerint a szőlőcukor olyan mértékben gátolja az askorbát profilaktikus effektusát, hogy az étrend alapját hús, zsír és bőséges képezze, mert ezekből elegendő C-vitamin kerül az ember szervezetébe és hiányzik a glükóz kompetíció (Clemens Zs, Tóth Cs: Vitamin C and Disease Insight from the Evolutionary Perspective. *J Evolution and Health*. 2016;1:Iss. 1, Article 13; DOI: 10.15310/2334-3591.1030). Mi erről a jelölt véleménye?

Érdekese a növényi mitokondriumban bekövetkező elektrontranszfer kapcsolata a DHA redukciójával, amely fontosabb jelenség, mint ahogyan eddig általában gondolták. Kimutatta, hogy a növényi sejtekben kétféle DHA transzportrendszer van, az egyik mitokondriális és a glükóz-transzporterhez csatlakozik, a másik az előbbitől különbözik, és a plazmamembránban foglal helyet. A mitokondriális elektrontranszfer az askorbát bioszintézisében és regenerációjában egyaránt közreműködik. Funkció alapján bizonyította, hogy a mitokondriális mátrixban invertáz aktivitás mutatható ki, ez a neutrális invertáz jellemzőit mutatja, egyebek között neutrális invertáz inhibitorokkal gátolható. Vizsgálatai alapján valószínűnek látszik, hogy a cukrok transzportja és az invertáz között funkcionális kapcsolat van, ami elősegítheti a növényben az ozmotikus stressz elviselését, gyakorlatilag növeli a szárazságtűrő képességet, nemkülönben a légzés piruvát ellátását. Ennek a lehetőségnek a részleteit azonban még tovább kell vizsgálni.

Az irodalmi és saját kísérletekből összegyűlt jókora és helyenként bizonytalanságot tükröző adattömeg rendszerezésére és értékelésére számítógépes programokat alkalmazott. Ezek segítségével végzett becsléseket a mitokondriális transzporter fehérjék mitokondriális elhelyezkedésére, a GLUT membrán-transzporter család (amelyet az SLC2 gén kódol), valamint az SLC23 humán géncsalád nátriumfüggő SVCT1 ('sodium vitamin C transporter') és SVCT2 C-vitamin-transzportereinek mitokondriális lokalizációjára. Ezek értékelése alkalmat teremt az enzimek működését meghatározó faktorok bemutatására, illetve meggyőző hipotézisek felállítására, különös tekintettel a mitokondriális askorbát transzporter működésére. Eredményesen tanulmányozta a flavin-adenin-dinukleotid felvételét, szerepét a diszulfid kötések kialakulásában, gátlását és fehérje-mediálta transzportját, ennek jellegzetességeit. A fehérjék térbeli, harmadlagos struktúrája szorosan kapcsolódik a fehérje funkciójához. Éppen ezért fontosak azok a megfigyelések és következtetések, amelyek a mitokondriális oxidatív foldingra irányulnak, milyen folyamatok zajlanak le a diszulfid-regeneráló rendszerben a mesterségesen légzési elektrontranszferlánc hiányos, mitokondriális DNS-től megfosztott sejtekben. A kapott eredmények arra utalnak, hogy a mitokondriális

DNS fontos feladatot lát el a májregeneráló fehérjék szintjének szabályozásában és ez a fehérje hozzájárulhat a mitokondriális funkciók fenntartásához.

A munka zárásaként a redukált glutation bioszintézisét és szintjét analizálta. A hiány produkáláshoz BSO-t, azaz γ -glutamilcisztein szintáz gátló butionin sulfoximin (a rövidítések jegyzékéből a BSO kimaradt) és acetaminofent (APAP) alkalmazott állatkísérletekben. [Megemlítem, hogy a 43. ábra A részében hiányzik a jelmagyarázat (a fehér és szürke oszlopok jelentése), ez csak a 44. ábránál látható.] Az APAP okozta májkárosodást egy nikotin amidoximin származék (BGP-15) adása az endoplazmás reticulumban a redox változásokat nem mérsékelte, de a kísérleti állatok a nekrotikus sejtelhalás ellenére életben maradtak. Az acetaminofen okozta májsejthalál folyamatában a ferroptózis szerepet játszhat. Ennek antioxidáns kivédésében a C- és E-vitamin, valamint a glutation együttes hatást fejt ki, hiszen ebben a triumvirátusban kölcsönös reciklás lehetséges, az aktivitás megtartható.

Az orvostudomány vonatkozásában az értekezés mindhárom főiránya az elmélet és a gyakorlat számára egyaránt értékes adatokat szolgáltat. Az aszkorbinsav bioszintézise a növényekben, a lezajló biokémiai folyamatok jellege és lokalizációja egyaránt lényegesek a folyamatosan aktuális C-vitamin problémák tisztázásában. A fehérjeláncoknál a kén szerepe, a tiol-csoportok oxidációja diszulfid-kötésekké, mindennek összefüggése az elektronáramlással, a sejtlegzéssel alapvető humánbiológiai kérdés. Hasonló jelentősége van a humán fiziológia és patofiziológia számára az előzőekben említett komplex antioxidatív rendszer struktúrájának, kölcsönhatásainak és funkcionális jellemzőinek.

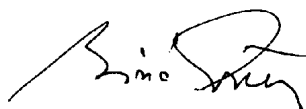
Az opponens nem hagyhatja említés nélkül az értekezés kiváló megjelenését: a remekül szemléltető, jól áttekinthető szerkezetű ábrákat, táblázatokat és nem utolsósorban a szinte hibátlanul leírt, tömör, lényegre törekvő, markánsak egyszerű, de mindig világos, remekül érthető szöveget.

Az előzőek alapján, orvosbiológiai vonatkozásban a következőket tekintem új tudományos eredménynek:

- A növények mitokondriális dehidroaszkorbinsav felvétele, transzportja, a mitokondriális elektrontranszfer szerepe ennek redukciójában, befolyása a reaktív oxigénvegyületek keletkezésére (Tézisek 4/1, 2, 3, 7, 8 pont).
- A mikroszomális GSH, illetve redukált GSH szint változása kémiai kezelés következtében és ennek hatása a sejtek apoptózisára, nekrozisára, valamint a ferroptózis jelentősége, e jelenségek befolyásolása C-vitaminnal (Tézisek 4/11, 12, 13 pont).

Az értekezés vitára bocsátását ajánlom.

Budapest, 2017. január 31.



Prof. Dr. Biró György
az orvostudomány doktora