

Dr. Venglovecz Viktória

GASZTROINTESZTINÁLIS EPITHÉL SEJTEK IONTRANSPORT
FOLYAMATAINAK JELENTŐSÉGE ÉP ÉS KÓROS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT
című
doktori értékezésének bírálata

A gasztrointesztinális rendszer felső szakaszának a leggyakoribb megbetegedései a gyomor és nyombél fekély, a gastro-oesophagealis reflux betegség (GERD), ill. a hepatobiliaris megbetegedések és a pancreatitis. A pathomechanizmusra és az ebből következő új terápiás célpontok meghatározására irányuló vizsgálatok az agresszív tényezők csökkentése, a védő mechanizmusok stimulálása ill. a jelátviteli rendszer befolyásolása csak néhány a fő kutatási irányzatok közül.

A dolgozat a gasztrointesztinális rendszer két gyakori megbetegedének az akut pancreatitis és a oesophagealis reflux patofiziológiáját vizsgálja. Az akut pankreatitisz (AP) mortalitása még ma is magas, a súlyos esetekben a halálozás a 30%-ot is elérheti. Az oesophagealis reflux betegség a népesség kb. 30 %-át érinti, és gyakorisága növekvő tendenciát mutat. Kialakulásában a nyelőcső megváltozott motilitása mellett a legfontosabb a nyelőcsőbe regurgitált sósav és az epesavak. Szövődménye az extra oesophageális tünetek, a Barrett-nyelőcső illetve az ebből kifejlődő adenocarcinoma.

A dolgozat a fenti betegségek patomechanizmusának feltárását új, eredeti, szempontból közelíti meg, melynek kiinduló pontja, hogy az epiteliális iontransport folyamatok mind fiziológiás, mind patofiziológiás körülmények között meghatározóak lehetnek egy-egy szerv működése szempontjából és fontos szerepet töltenek be az epiteliális rezisztencia fenntartásában.

Az epiteliális iontransport folyamatok zavara számos megbetegedésben alapvető szereppel bír pl. a hasmenésben vagy cystás fibrózisban. A pancreas esetében amellet, hogy az epiteliális iontransport felelős a pancreás nedv ionösszetételéért és az optimális pH értékéért, a legújabb kutatások szerint jelentős szereppel bír a pancreatitis patomechanizmusában is. Másrészt a nyelőcső esetében megfelelő iontransport jelentős mértékben hozzájárul a nyelőcső epitélium kellő

rezisztenciájához a reflux esetén visszalépő sav agresszív hatásával szemben, másrészt a nyelőcső pre-cancerosus elváltozásában, a Barrett oesophagusban kialakuló metaplasia-dysplasia kialakulásában is szerepet játszhat, bár ennek pontos mechanizmusa nem ismert. Feltárása új terápiás célpont meghatározását, következképp, új, a malignus transzformációt megelőző/gátló hatóanyag kifejlesztését eredményezheti.

A dolgozat célkitűzése tehát kettős:

1. Az epesevak, különös tekintettel a CDCA és UDCA ill. alkohol hatásának vizsgálata a pancreas ductális sejteire. Ezen belül választ keres arra
 - hogyan hat az ethanol és metabolitjai a ductális CFTR csatorna működésére,
 - milyen mechanizmuson keresztül valósul meg a kis dózisu CDCA ductális HCO₃ szekréciót stimuláló hatása
 - az UDCA előkezelés képes-e kivédeni a nagy dózisu CDCA ductális sejtekre kifejtett gátló hatását, ha igen milyen mechanizmussal, és mindez a hatás megfigyelhető-e in vivo is.
2. A Barrett oesophagusban mely sav/bázis transzporterek a jellemzőek, ill. hogy az epesav és sósav hogyan hat az iontranszporterek aktivitására és kifejeződésére.

A dolgozat terjedelme 107 oldal, szerkezetileg a klasszikus tagolást követi: 32 oldal a Bevezetés, 2 oldal a Célkitűzések, 11 oldal az Anyagok és módszerek, 40 oldal Eredmények, 11 oldal Megbeszélés, 2-2 oldal az Új megállapítások és az Eredmények jelentősége. A dolgozat 38 ábrán (melyek jelentős hányada több panelből áll) és 4 táblázatban mutatja be az eredményeit.

Ezt követi a 26 oldal irodalmi hivatkozás (329 referencia), a Saját közlemények listája (3 oldal), Scientometriai adatok és a Köszönet nyilvánítás 2-2 oldalon.

A Bevezetésben a jelölt összefoglalja

- az epitheliális sejtet általános jellemzőit és azok transzport mechanizmusait,
- a gasztrointesztinális rendszer epithel sejteinek jellemzőit, ezen belül részletesen a pancreas és nyelőcső epithel sejtek tulajdonságait,
- végül az epithel sejtek szerepét a magas halálozással járó akut pancreatitisben és a pre-cancerosus Barrett szindrómában.

A bevezetés egyes alfejezeteit a jelölt az irodalmi adatok alapján felvetődött kérdések

megfogalmazásával zárja, ami szokatlan és új, és nagymértékben segíti a dolgozat logikai felépítésének követését és a célkitűzések indokoltságát. (Többször előfordult, hogy a bíráló, az egyik alfejezetet olvasva felírta az ehhez kapcsolódó kérdéseit, amely azonban a következő alfejezetnek már a címében olvasható volt.)

Az alkalmazott módszerek az in vivo, ex vivo, elektrofiziológiai vizsgálatoktól a molekuláris biológia, farmakológia széles skáláját öleli fel, pl. az intra-interlobuláris pankreász duktuszok izolálása tengerimalacból, kísérletes akut pankreatitisz modell patkányon, a Barrett nyelőcső vizsgálatára humán CP-A nyelőcső metaplázia, nem-diszpláziás sejtvonal ill. a CP-D humán nyelőcső diszpláziából származó sejtvonal, pankreász duktuszok mikroperfúziója, humán fluoreszcens vizsgáló módszerek, HCO_3^- szekréció mérése, patch clamp technika, transzmissziós elektronmikroszkópia, immunhisztokémia, az intra-interlobaris pancreas ductusok apoptóziának vizsgálata epesav kezelést követően, Western blot az NHE1, NHE2 NBC ill. Slc25a6 meghatározására és a PCR technika az előzők expressziójának meghatározására.

A vizsgálatokban 14 Barrett-nyelőcső diagnózisú beteg is résztvett, kiken a rendszeres ellenőrzés céljából endoszkópos vizsgálat és biopsiás mintavétel történt.

Az Eredmények két fő fejezetre oszlanak:

- az epesavak és az alkohol hatása a pankreász duktális sejteire, melyen belül tárgyalja a CDCA, UDCA és az alkohol és a (nem-oxidatív) metabolitok hatásait,
- az epesavak a nyelőcső epithel sejtekre kifejtett hatásai vizsgálatára, melynek kapcsán a főbb vizsgált témák a pH szabályozó mechanizmusok és a az intracelluláris Ca^{2+} szint változásának elemzése, az epesavak akut hatása az iontranszporterek aktivitására ill. krónikus hatásuk az iontranszporterek expresszáldására a nyelőcső epithel sejtekben.

A jól megtervezett kísérletsorozatok és a gazdag módszertani háttér számos, fontos eredeti megfigyelést eredményezett, melyet a jelölt 4 témakörben összesen 18 pontban foglat össze. Ezek közül az alábbiakat emelném ki.

I. Epesavak hatása a pancreas ductalis sejtekre

- Elsőként azonosították a BK csatornák jelenlétét a pankreász duktális sejtek apikális membránján, melyek a CDCA alacsony koncentráció (0,1 mM) hatására aktiválódnak, és a duktális HCO_3^- szekréciót fokozódását eredményezik.
- A CDCA magas koncentrációban (1mM) gátolja a sav-bázis transzportereinek

működését, ami a dukális HCO_3 szekréció csökkenését eredményezi.

Következtetés: *a csatorna aktivációja a HCO_3 szekréció fokozása által terápiás hatású lehet az epe-indukálta pankreász károsodás kivédésében.*

- Az UDCA 24 órás előkezelést követően kivédte a CDCA fenti hatását, valamint csökkentette a CDCA okozta mitokondriális károsodást, apoptozist és a CDCA indukálta pancreatitist.

Következtetés: *az UDCA hatásos lehet a biliáris, rekurrens pancreatitis terápiájában.*

2. Alkohol hatása a panreas ductalis sejtekre tengerimalacon

- Az alkohol gátolja a stimulált CFTR áramokat (specifikus hatás a csatorna blokkolása révén).

- Ebben a gátlóhatásban az alkohol oxidatív metabolitjai nem vesznek részt, míg a POA és annak észtere a POAEE, mind az alap, mind pedig a stimulált áramokat gátolja.

- Az $(\text{ATP})_i$ alapvetően szükséges a CFTR csatorna nyitásához. Az alkohol és POA hatására az ATP szint lecsökken, ami a CFTR csatorna gátlását eredményezi.

A dukális sejtek CFTR aktivitásának gátlása valószínűleg az alkohol és PAO okozta mitokondriális károsodás és következményes $(\text{ATP})_i$ szint csökkenésének az eredménye.

Következtetés: *Mivel az ATP adása kivédte az alkohol és metabolitjainak gátló hatását a CFTR csatornákra, és mivel pancreatitis patomechanizmusában az ATP depléció fontos szerepet játszik, az alkohol-okozta pancreatitis kezelésében az ATP adása terápiás értékű lehet.*

3. Epesavak hatása a nyelőcső epitél sejtekre

- Az epesavak hatására csökkent a nyelőcső epitél sejtek pH-ja, és megnőtt a $(\text{Ca}^{2+})_i$ szint IP_3 -mediálta mechanizmus révén.

- Az akut epesavas kezelés csökkentette az NHE aktivitást, de növelte az NBC és PAT-1 aktivitást a metapláziás CP-A sejtekben, amíg a diszpláziás CP-D sejtekben mind a NHE, mind az NBC aktivitására fokozó hatás fejtett ki.

- A krónikus epesavas kezelés hatására valamennyi iontranszporter expressziója megnőtt a CP-A sejteken, és az NHE1 és NBC expressziója megemelkedett a CP-D sejtekben.

- Humán metapláziás sejteken fokozott volt a NHE1, NHE2, NBC és Slc26A6 transzporterek expressziója.

Következtetés: A transzporterek fent leírt megváltozott működése és kifejeződése adaptációt szolgálja, mely révén a nyelőcső epitel sejtek alkalmazkodását és következményes túlélését segíti.

Kérdések, megjegyzések

Formai észrevételek:

- A disszertáció magyar nyelven készült, jól olvasható stílusban, betűhibák, elütések elvértve fordulnak elő. Tagolása, jól követhető, a fejezetek, alfejezetek és azok további osztása decimális számozással került felosztásra, ami segíti az összefüggések követését. Az ábrák világosak, demonstratívák, s bár számos közülük több panelből áll, ez megkönnyíti az összetartozó eredmények átláthatóságát, és a számos kísérleti eredmény követhetőségét.

Egy megjegyzés: A Módszerek fejezetben a az alkalmazott sejtvonalak leírásánál célszerű lett volna megemlíteni az epesavak vizsgálatára alkalmazott BAC összetételét. Lehet, hogy elkerülte figyelmemet, de csak a 33.G. ábrán találtam meg mely epesavakat tartalmazott a koktél.

Ismételten kiemelendő a bevezető egyes témakörének tárgyalása után a kutatási cél megfogalmazása, ezzel az olvasót végigvezeti a kutatás egymást követő lépésein.

Tartalmi észrevételek, kérdések:

A disszertáció alapját a 12 magas impakt faktorú, élvonalbeli folyóiratokban (pl. Gut, IF: 10.11, Gastroenterology, IF: 16.71) publikált közlemény adja, mely dolgozat eredményeinek megalapozottságát, nemzetközi megmérettetését és elfogadását egyértelműen alátámasztja. A 12 közlemény közül a jelölt 7 esetben első vagy utolsó szerző, ami jelzi a szerző önálló alkotó munkáját és témavezetői aktivitását.

Kérdések:

Előrebocsátom, hogy az alábbi kérdések nem a dolgozat hiányosságaira vonatkoznak, hanem azokat épp a dolgozatban bemutatott gondosan tervezett, logikusan felépített kísérlet-sorozatok, az új, eredeti megfigyelések, és az eredmények izgalmas volta indukálta. Ennek tükrében tehát a kérdések a

sejtvédelem mechanizmusának egy új, nem konvencionális megközelítése kapcsán felvetődő gondolatok megfogalmazásból erednek.

1. Az UDCA védőhatású, gyulladásgátló hatású a GI rendszer epithel sejtjein, csökkenti a citokin termelést (Ward JB et al., 2017. *Am. J. Physiol.* **312** (6): G550–G558; O'Dwyer AM, et al., 2016. *Am. J. Physiol.* **311** (2): G334–41.)

Kérdés: Mi a jelölt véleménye, ezen hatások hozzájárulhatnak-e az UDCA CDCA apoptozist indukáló ill. egyéb toxikus hatásaival szembeni védelem létrejöttéhez?

2. A dolgozat bevezetésében olvasható, hogy a nyelőcső mucosa relatíve rezisztens a sósavval szemben. A gyomornyálkahárya rezisztenciája szempontjából számos fontos komponens, mechanizmus már ismert, bár hogy miért nem emészti meg a gyomor önmagát Davenport 1972-ben felvetett kérdésére (H.W. Davenport, *Am Sci.* 972 Jan;226 (1):87-93) még egyértelműen kielégítő választ ma sem tudunk adni.

Kérdés: Milyen mechanizmusok játszanak szerepet a nyelőcső mucosában, melyek a sósavval szemben a relatív rezisztenciáját magyarázzák a dolgozatban elemzett epitheliális transzportereken kívül?

3. Míg a sav a gyomorban fiziológiásan jelenlévő irritatív agens, az epesavak a gyomorban is afiziológiás.

Kérdés: Milyen súllyal játszik szerepet az epesav a GERD-ben? Az epe reflux önmagában is lehetséges-e vagy mindig a gyomorsavval együtt regurgitál a nyelőcsőbe? Az epesav - a pepszinhez hasonlóan - szenzitizáló faktor-e sósav irritatív hatásával szemben a nyelőcsőben?

4. Az epesav a gyomornyálkahártyára is irritatív hatású. Az epesavak gyomorból történő reflux következtében jutnak a nyelőcsőbe, és a gyomorban gastritises tüneteket okoznak. Az epesavak okozta gastritis egyik javasolt terápiája a UDCA. Bár a histológiai kép nem mutatott szignifikáns javulást, a betegek panasza jelentősen csökkent (fájdalom intenzitása és gyakorisága) (McCabe et al., 2018, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 16(9):1389-1392)

Kérdés: Lát-e jelölt hatásmechanizmusbeli hasonlóságot az UDCA epe-reflux okozta gastritisre kifejtett kedvező hatása és az UDCA ductalis sejtekre gyakorolt CDCA

szembeni védőhatása között (bár a két epithel sejt eltérő funkciójú)?

5. Az alkalmazott sejtvonalak a humán CP-A nyelőcső metaplázia, nem-diszpláziás sejtvonal ill. a CP-D humán nyelőcső diszpláziából származó sejtvonal.

Kérdés: Történt -e vizsgálat normál nyelőcső sejtvonalon is?

6. Az epesavak hatásának elemzésére a GERD patomechanizmusában a BAC oldatot alkalmazta a jelölt, mely 7 epesavat tartalmaz.

Kérdés: Vizsgálta-e az irritatív epeavak iontranszporterekre gyakorolt hatását UDCA előkezelést vagy a koktélhoz történő hozzáadását követően? Vagyis az UDCA módosítja-e az epesavak iontranszporterekre gyakorolt hatását?

7. A dolgozat, mint a jelölt is hangsúlyozta, az alap kutatások tudományterülethez tartozik. A kísérleti eredmények értelmezése során azonban többször is megfogalmazódott a terápiás alkalmazás lehetősége. Ezek közül melyiket látja a jelölt a legígéretesebbnek és leginkább megvalósíthatónak?

Összefoglalva: Venglovecz Viktória doktori értekezésének témája a gasztrointesztinális rendszer két gyakori és terápiásan nem, vagy csak részben megoldott betegségének, a pancreatitis és GERD patomechanizmusának elemzése az epitheliális iontranszport folyamatok megváltozása szempontjából. Épp az utóbbi évek kutatásai mutattak rá arra, hogy a megváltozott iontranszport jelentőséggel bír a pancreatitisben és a sósav/epesav refluxának következtében kialakuló szöveti elváltozások (Barrett-nyelőcső) pathomechanizmusában. A dolgozat igényesen megírt, gondosan tervezett, elmélyült kutatómunkát tükröz. Eredményei lehetőséget nyújtanak új gyógyszer-célpontok kifejlesztésre. A dolgozat alapját, mint már említettem 12 igen rangos nemzetközi folyóiratban publikált cikk képezi, mely egyértelműen jelzi a dolgozat eredményeinek megalapozottságát, nemzetközi megmérettetését és elfogadását.

Mindezek alapján melegen támogatom dolgozat nyilvános vitára bocsátását és sikeres védelem esetén az MTA Doktora cím elnyerését.

Budapest, 2020. június 9.

Dr. Gyires Klára professor emerita
az MTA doktora