

Dr. Venglovecz Viktória: A GASZTROINTESZTINÁLIS EPITÉL SEJTEK IONTRANSPORT FOLYAMATAINAK
JELENTŐSÉGE ÉP ÉS KÓROS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT
c. MTA doktori értekezésének bírálata

Dr. Venglovecz Viktória disszertációját a Szegedi Tudományegyetem Egyetem Általános Orvostudományi Karának Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetéből nyújtotta be az MTA Orvosi Tudományok Osztályához. Tudományos kutatómunkáját nemzetközileg is magas szinten elismert kutató műhelyekben végezte neves professzorok és kutatók irányításával, akik közül kiemelném Hegyi Péter, Ifj. Rakonczay Zoltán és Varró András professzorokat.

A disszertáció kiváló példa arra, hogy hogyan lehet transzlációs medicina szemlélettel magas szintű kutatómunkát végezni. A pancreas és a nyelőcső patológia olyan molekuláris szintű vizsgálatát mutatta be Jelölt, mely nem csak a betegségek patomechanizmusának megismerését, hanem ezek terápiás lehetőségeit is felveti. A pancreas élettan és patofiziológia egyik kulcs kérdése annak megértése, hogy az epithel sejtek transzport folyamatai hogyan változnak az egyes kórképekben, ez milyen következményekkel jár a sejtek életképességére és exocrin funkciójára, ill. ezzel párhuzamosan hogyan változik a pancreas szöveti intersticium pH-ja és ionösszetétele. A transzportfolyamatok változása jelentősen hozzájárul az akut pancreatitis (AP) és pancreas ductalis adenocarcinoma (PDAC) kialakulásához is. Mindkét betegségnek rossz a prognózisa, emiatt a molekuláris szintű patomechanizmus megértése mind diagnosztikai mind pedig terápiás szempontból nagy jelentőséggel bír. Jelölt ehhez járult hozzá jelentősen azzal, hogy sejt- és szövetszintű pancreas fiziológiai vizsgálatokat végzett, melyek során az AP kiváltó tényezői közül az epesavak és az alkohol hatásait vizsgálta a epitheliális transzportra. A nyelőcső epithel sejtek károsodása és ezek neoplasztikus átalakulása szintén jelentősen függ az epitheliális transzporttól, ennek akár diagnosztikus és terápiás következménye is lehet. Jelölt lényeges új felfedezéseket tett ezen a téren is az epitheliális transzport folyamatok vizsgálatával. Az alkalmazott módszerek up-to-date, magas szintű és nagy technikai ismeretek igénylő eljárások. Ezek közül is kiemelném azokat a patch-clamp kísérleteket, melyekkel új ioncsatornát fedezett fel a pancreas epithelben. A patch-clamp technika mellett a disszertáció a modern kísérletes eljárások nagyon komoly tárházát alkalmazta, beleértve fluoreszcenciás indikátorok alkalmazását egy-sejt szintű intracelluláris Ca^{2+} koncentráció és pH mérésre, ill. szövet szinten a pancreas ductusok mikroperfúziója és az epitheliális iontranszport vizsgálata. A funkcionális vizsgálatokat modern immunfluoreszcenciás és molekuláris biológiai vizsgálatokkal egészítette ki. Összességében a témaválasztás időszerű, az alkalmazott módszerek megfelelőek és a következtetések orvosi szempontból is lényegesek.

A disszertáció 12 közleményre alapszik, melyek 9 év kutatómunkájából származnak (2008-2016). A disszertáció alapját képező közlemények közül 4-ben Jelölt első ill. 4 közleményben senior szerző, ami hűen tükrözi a bemutatott eredményekhez történő jelentős hozzájárulását. A közlemények összesített impakt faktora 78,785, az ezen közleményekre kapott független idézetek száma 442. E közlemények egy része magas impakt faktorú, a szakterület meghatározó lapjaiban közölt cikkeket jelentik. Ezek között kiemelkedők a Gastroenterology (IF~16) és Gut (IF~10) folyóiratokban publikált közleményei. Külön kiemelném, hogy disszertációjában szereplő közleményeken felül még ~23, a PhD disszertáció megvédését követően publikált cikk

szerzője, melyek a disszertációban bemutatottakhoz hasonlóan magas impakt faktorú folyóiratokban jelentek meg igen tekintélyes független idézettségi mutatóval. Hirsch indexe 16.

A pancreas és nyelőcső epithel transzportfolyamatok molekuláris mechanizmusának vizsgálata területén megítélésem szerint az alábbi önálló új tudományos eredményeket adta:

1. Elektrofiziológiai, transzport fiziológiai, molekuláris farmakológiai és mikroszkópos technikák kombinálásával azonosította a KCa1.1 (BK) csatornák jelenlétét a pancreas ductalis sejtek apikális membránjában, és kimutatta, hogy a kenodezoxikólsav aktiválja a csatornát.
2. Kimutatta, hogy az urzodezoxikólsav 24 órás előkezelésben hatékonyan kivédi a kenodezoxikólsav sav-bázis transzportereket gátló hatását pancreas ductusokban, ill. ugyanezen sejtekben védő hatást fejtett ki a mitokondriumokra: csökkentette a kenodezoxikólsav -indukálta mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus nyitást és csökkentette a sejtek apoptózisát.
3. *In vivo* kísérletekben kimutatta, hogy az urzodezoxikólsav jelentősen javítja a kenodezoxikólsav-indukált pancreatitis patkány modelljében a klinikai képet, csökkenti az acinus károsodást.
4. Leírta, hogy az etanol fokozza a CFTR áramot, viszont gátolja forskolin-indukált CFTR konduktancia fokozódást. Az etanol hatásmechanizmusával kapcsolatban megállapította, hogy azt az intracelluláris ATP szint csökkenése közvetíti.
5. Kimutatta, hogy az epesavak hatására csökken a nyelőcső epithel sejtek pH-ja és megnő az $[Ca^{2+}]_i$ is, mely utóbbi hatás mértéke jelentősen függ az intracelluláris pH-tól.
6. Akut epesav kezelésre jelentősen változott a displáziás és metapláziás, nyelőcső-eredetű sejtek pH szabályozásában résztvevő transzporterek aktivitása, míg krónikus kezelés esetén az mRNS szintű expresszió változik.
7. Humán nyelőcső biopsziás mintákból származó metaplasztikus hámban kimutatta a Na^+/H^+ kicserélő transzporter 1-es és 2-es izoforma expressziójának fokozódását mind RNS mind pedig fehérje szinten.

A disszertáció magyar nyelven készült, 143 számozott tartalmazott. Az irodalomjegyzék 329 irodalmi hivatkozást tartalmaz, melyek között nagy számban találhatók 10 évnél régebbi hivatkozások. A disszertáció elején megtalálható a rövidítések jegyzéke is, mely elősegítette a leírtak megértését. A disszertáció megértését 37 többpaneles, többségében színes ábra könnyíti meg.

A disszertáció olvasását helyesírási hibák vagy szerkesztési hiányosságok nem nehezítik. Egy-két helyen található csak apró figyelmetlenségből adódó hiba vagy fogalmazási hiányosság amelyek részletezésétől a hibák elhanyagolható volta miatt eltekintek. Ezek közül megemlítem azt, hogy a mondatok ponttal történő lezárása utánra tette az irodalmi hivatkozásokat, ami nekem szokatlan.

Általános észrevételek:

A disszertáció bevezetője tömör, lényegre törő, a megértéshez szükséges információt általában tartalmazza.

A disszertáció jelentős része a CFTR csatorna működésével foglalkozik. Itt érdemes lett volna részletesebben ismertetni a CFTR csatorna elektrofiziológiai szempontból releváns tulajdonságait és specialitásait. Az elmúlt időszakban jelentős közlemények jelentek meg ebben a témában, ezek között hazai szerzőktől is (Csanády labor munkáját pl. nem hivatkozta egyáltalán).

Az anyagok és módszerek fejezet kellő részletességgel mutatja be a használt módszereket, a megfelelő irodalmi hivatkozások beépítésével lehetőség nyílik a módszerek egyes speciális kérdéseinek tisztázására. Nagyon jónak tartottam, hogy az oldatok összetételének bemutatását táblázatos, nem pedig szöveges formában csinálta meg, így azok összetétele könnyen összevethető. Néhány, a metodikákkal kapcsolatos kérdést lentebb fogalmaztam meg.

Az eredmények és megbeszélés fejezetek különválasztását sok esetben a folyóiratok kérik, itt azonban jobbnak láttam volna ezeket együtt tárgyalni. Különösen jó lett volna olyan esetekben, ahol az eredmények interpretációjához ismételni kellett az eredményeket a megbeszélésben, több téma összefoglalása miatt a diszkusszió messze került az eredmények bemutatásától.

Tekintve azt, hogy a disszertáció háttérét adó közlemények magas impakt faktorú, nemzetközi, referált folyóiratokban jelentek meg ahol a szigorú sztenderdeknek az eredmények már megfeleltek, a részletes tartalmi bírálattól el lehet és el is kell tekinteni. Ennek megfelelően csak a disszertáció olvasása közben felmerülő egyes kérdéseimre, észrevételeimre vonatkozóan kérem Jelölt válaszait:

Formai megjegyzések:

1. A Ca^{2+} felső index néhol elmaradt (pl. 39. oldal)
2. Az 5. ábra szövegét szerencsés lett volna részletesebbre készíteni, transzporterek azonosítás, jobb oldal „CF” és „normal” jelentése (gondolom itt a beteg és egészséges összehasonlítása lett volna)
3. Szerencsés lett volna az ábrák szövegében feltüntetni a disszertáció alapjául származó közleményt, amiből az ábra származik- nagyban segítette volna a disszertáció követését.

Szakmai kérdések:

1. A módszerek fejezetben írja, hogy nyelőcső biopsziás mintákat is nyertek, melyeket szövettani és PCR vizsgálatokhoz használtak fel. Lehet-e ezekből a mintákból esetleg elektrofiziológiai vizsgálatot végezni? Történt-e erre próbálkozás?
2. Co^{2+} -quench technika: hogyan lehet arról meggyőződni, hogy a sejtek hasonlóan veszik fel a Co^{2+} -t, és a kimutatott különbségek nem a Co^{2+} akkumuláció különbözőségének eredményei? Azaz pl. a 16. ábrán látható különbségek esetén elképzelhető-e hogy a CDCA fokozhatja a sejtek Co^{2+} felvételét, ezért a Co^{2+} quench is hatékonyabb lehet ebben a mintában. Kizárható-ez?
3. Patch-clamp, áram sűrűség: hogyan határozták meg a sejtek kapacitását? Az erősítőn leolvasható C_m értékből, vagy esetleg speciális, C_m meghatározására dedikált feszültség protokollból? Ez a pA/pF

számítások esetén kritikus lehet. Tapasztalatom szerint a whole-cell capacitance compensation áramkör C_m értéke nem minden esetben írja le helyesen a C_m értéket. Mi erről Jelölt véleménye?

4. 48. oldal. Az alábbi állítás nem tűnik nagyon megalapozottnak: “100 μM CDCA a vizsgálatok 20 %-ban (5/26 sejt) volt képes növelni a teljes sejtes áramot, melyből egyedül egy esetben sikerült igazolni a CaCC aktivációját.”. Milyen egyéb bizonyítékok támasztották alá az állítást?
5. A 49. oldalon az ábra alatt szerepel ez az állítás: membrán potenciál $25,5 \pm 6,8$ mV-al depolarizálódott (8B ábra). Valószínű valami más paramétert kívánt itt írni mert az ábrán nincs membránpotenciál mérés.
6. Mennyi volt a szabad Ca^{2+} koncentráció a pipetta töltő folyadékban 0.2 mM EGTA mellett? Tekintve a pipetta töltő folyadék végtelen térfogatát a sejthez képest ez az EGTA koncentráció is igen jelentős puffer kapacitást jelent. Ilyen pipetta töltő oldat mellett mekkora intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változás képzelhető el? A KCa1.1 csatorna feszültség- és Ca^{2+} -függése miatt a csatorna működésének nagyon komoly feltételei vannak. Van-e adat arra, hogy CDCA hatására mekkora Ca^{2+} koncentráció változás alakul ki duktális epiteliális sejtekben, ill. hogy esetleg CDCA hatására kialakul-e depolarizáció, ami elősegítené a KCa1.1 aktiválódását. Későbbi (15. ábrán) látható ugyan F340/F380 változás Ca^{2+} mérések során, de kalibráció hiányában nem világos hogy ez mekkora Ca^{2+} koncentráció emelkedést jelent.
7. Ismert, hogy a KCa1.1 β alegységek jelentősen befolyásolják az α alegység működését, feszültség-függését, sőt, gátlószer érzékenységét is. Azt szeretném kérdezni, hogy végeztek-e esetleg β alegység meghatározást, vagy ismer-e esetleg irodalmi adatot erre.
8. Mind CDCA mind UDCA esetében mM koncentráció tartományban (1 mM ill. 0.5 mM) vizsgálta a pl. a Ca^{2+} koncentrációra vonatkozó hatást. Mekkora ezen vegyületek koncentrációja *in vivo*?
9. A 64. oldalon azt írja, hogy “Az EtOH-al ozmotikusan megegyező koncentrációjú mannitol (177 mM)”. AZ EtOH bejut a sejtbe, és ott így dehidrálja a citoszolt, míg a mannitol impermeabilis és extracellulárisan okoz dehidrációt. Hogy lehetett megfeleltetni egymásnak a 177 mM mannitol-t és a sejtmembránon átjutó EtOH-t, főleg annak tükrében, hogy az EtOH metabolizálódik?
10. Mi a kórélettani jelentősége a 0.1 M EtOH kezelésnek, ahol a jelentős hatásokat látták a CFTR csatornára? Mennyi alkoholt kell ehhez fogyasztani?
11. A 77. oldalon azt írja, hogy “megvizsgáltuk az epesavak sejtbe jutásának a sebességét is (-J(B-)). A -J(B-)-t az időegység alatti pH változásból számoltuk ($\Delta\text{pH}/\Delta t$) az epesav adását követő 60 másodpercben.” Ez a bíráló számára azt jelenti, hogy az epesavak jelenlétében mért intracelluláris pH változás az epesavak sejtbe jutásával magyarázható, nem pedig pl. az epesavak sav/bázis transzporterekre gyakorolt hatása miatt. Különösen nehezen érthető ez a rész annak tükrében, hogy egy későbbi fejezet az epesavak hatását mutatja az intracelluláris pH szabályzásban résztvevő transzporterekre. Kérem fejtse ki véleményét ezzel kapcsolatosan. Van arra kísérletes bizonyítékuk, hogy az epesavak valóban bejutnak a sejtekbe? Különös tekintettel arra, hogy pl. CDCA pl. hidrofób, nagymolekula (89.oldal), a transzportert pedig nem sikerült azonosítani.

12. Extracelluláris Ca^{2+} depléció esetén azt tapasztalták, hogy 500 μM BAC hatására kismértékű (Ca^{2+}), emelkedés volt megfigyelhető, ami arra utal, hogy az epesavak hatására az intracelluláris organelumokból szabadul fel a Ca^{2+} . A bíráló ebből a kísérletből pont ellenkező következtetést vont volna le. Kérem fejtsse ki részletesebben, hogy mi a Ca^{2+} jel forrása.

A fenti kérdések/megjegyzések érdemben nem befolyásolják Jelölt tudományos eredményeinek igen pozitív megítélését. Összefoglalásképp megállapítható, hogy az MTA doktori cím megszerzésének feltételeit a disszertáció alapján magasan teljesítette. Javaslom a disszertáció nyilvános vitára történő kitűzését és sikeres védelem esetén az MTA doktori cím odaítélését.

Végezetül szeretnék gratulálni a példamutatóan magas szintű kutatómunkához, és további sikeres munkát kívánok!

Debrecen, 2020. február 14.



Panyi György
az MTA doktora