

1. Általános értékelés

A disszertáció 162 oldal terjedelmű, érdemi szöveges része 125 oldal, melyhez az irodalmi hivatkozások jegyzéke, valamint a témakörben publikált saját közlemények listája csatlakozik - ez utóbbiban 24 elsőszervező vagy társszerzős közlemény szerepel. A dolgozat formája és szerkezete megfelelő, a vizsgálatok előzményeit, elméleti háttérét, anyagát és módszereit, az eredményeket és azok megbeszélését megfelelő tagolásban állította össze a Jelölt. Megállapítható, hogy az értekezés formailag megfelel a követelményeknek.

A tartalom általános értékelésére térve elsősorban azt kellett megállapítani, hogy az értekezés koherens egésznek alkot-e és a válasz egyértelmű igen. Dr. Lacza Zsombor vizsgálatainak fő célja a mitokondriális ATP-függő kálium csatornák feltérképezése mellett a mitokondriális nitroztatív stressz szerepének tisztázása volt, hipoxiás és magas glükóz szintek által kiváltott kórállapotokban, valamint e potenciálisan sejtkárosító folyamatok befolyásolása gyógyszeres vagy sejtterápiás eljárásokkal. Az egyes útvonalakat leíró okfejtés logikus, kiemelendő, hogy a vizsgálatok saját eredményekre és gondolatokra épültek, és a külföldi kooperációban végzett munkák továbbvitelére hazai környezetben került sor. A célok eléréséhez szükséges módszertan megfelelő volt, sok esetben ezek a Jelölt saját fejlesztései voltak. A végcélként megjelölhető pontok a korábbi eredményekhez képest több szempontból is lényegi továbblépést jelentenek, új kutatási útvonalat jelölnek ki a mitokondriumok és az oxido-reduktív sejtkárosodások kapcsolatrendszerében. Az általános részhez kapcsolódó kritikai megjegyzésem a dolgozat címére, pontosabban az előbb említett kapcsolatra vonatkozik, szerencsésebbnek tartottam volna a „Hipoxiás károsodás csökkentése...” kezdetű címet; a Szerző az iszkémiás károsodást közvetlenül nem vizsgálta, a mitokondrium, mint sejtalkotó, az alkalmazott *in vitro* modellekben csak az oxigén hiányára reagálhat, az ischaemia és reperfüzió definíció szerint a véráramlás jelenlétét feltételezi.

2. A doktori mű részletes bírálata

I. Formai rész

A dolgozat kissé szokatlanul, Előszóval indul, ami azonban kiváló áttekintést ad a kutatás háttéréről, bemutatja a hipotéziseket, némi személyes háttér információt is ad azokról a tudományos kérdésekről, melyek az értekezés Szerzőjét foglalkoztatták, és elmagyarázza a gondolatmenetet, melyet a közel egy évtizedes kutatási ciklus alatt követett. Mint e megközelítés alapján megtudjuk, a felvetett problémák, azaz az iszkémiás sejtkárosodások háttérében lényegében a mitokondriumok funkciózavarai állhatnak, így ebben az összefüggésben kerül látótérbe a nitrogén monoxid (NO) szintézise és a poli-ADP-ribóziláció, a nitrozótiolok, pontosabban a nitrozó-glutation (GSNO), mint lehetséges exogén NO forrás és gyógyszer-célpont, a mitokondriális ATP-függő kálium csatornák, valamint a hipoxiás sejtek mitokondrium transzferének lehetősége és leírása, és a kapcsolódó kísérletek, vizsgálati adatok rövid ismertetése. E rendkívül színesen, tömören, vagyis kiválóan fogalmazott fejezet az értekezés legerőteljesebb része - különösen tetszett a gondolat törzsfajlását bemutató 1. ábra.

Ezután a törzsanyag következik, ami hat fő részből áll: a bevezetés áttekinti a célokat, majd az irodalmi áttekintés, a módszerek, az eredmények ismertetése és ezek megbeszélése után végül a következtetések és tézisek zárják a sort. Azzal kezdem e fejezetek részletes

formai elemzését, hogy a dolgozatban rendkívül sok elütés, tévesztés, helyesírási és egyéb hiba található. Véleményem szerint ez meglehetősen zavaró egy olyan világban, ahol minden számítógépes szövegszerkesztő program rendelkezik helyesírás ellenőrzési opcióval.

1. Feltételezésem szerint véletlenül maradhettek angol szavak a szövegben az eredeti közlemények magyarra fordításakor (24. oldalon: hatékony vegyület and BMS191095), néhány esetben pedig a könnyebb utat választva a fordítás elmaradt. Pedig az FP15 katalizálhatná a peroxinitrit lebontását, ahelyett hogy konzekvensen „*peroxynitrite decomposition catalyst*”-ként szerepelne (51.o. 62.o, 70.o, 72.o), a *protein mass fingerprinting* (32.o) ígés szerkezete lehetne esetleg PMF módszer, vagy akár peptide mass fingerprint (peptid-tömeg ujjlenyomat) módszerrel történő azonosítás. Vannak félig angolos, félig magyar, így teljesen helytelen kifejezések is, pl. intracellulár hatásmechanizmus (25.o), kardiovaszkulár hatás (42.o), paradoxikus folyamat (23.o), illetve egy jelenséget konfirmálnak is (33.o). Kémiai anyagok esetében az angolszász és magyar írásmód lényegében fele-fele arányban fordul elő, néha egy-egy mondaton belül is, pl. diazoxid és diazoxide, arginin/e, citrullin/e (30.o), szulfoniluria/sulfonilurea, etídium/ethidium, glibenclamide/glibenklamid - bár néha létezik egy harmadik variáns is pl. a diazoxie (22.o), glibencalmide (61.o.), ill. lézer doppler, lézer-doppler, vagy lézer Doppler esetében.

2. Az elírások a tartalomjegyzékben elkezdődnek, itt a 4.3.1. fejezet kétszer szerepel és a 2.2.16. alfejezet címe a következő: „Ismsert GNO formulációk. Megjegyezném, hogy a rövidítések jegyzéke hiányzik, a rövidítések magyarázatai sok esetben a szövegben sincsenek megadva. Ezek után a felbukkanó hibák, elütések közül említeném az alábbiakat: nitrogán monoxid (tézisek), kísérleteinekt, transzdiffereciáció, kálum fluxus (24.o), membránok (37.o), apoptózisos-indukáló faktor (40.o), nitorzótioleok (40.o), reaktív oxidén (42.o), nitozáló ágens (42.o), vizsgálatokkal (59.o), tartalamzó (93.o), sejtpopuláció (27. ábra, ugyanott éltben lévő sejtek), streptozoocin (58.o), mitokokondrium és mitokondrium (76.o ill. 112.o), és így tovább. Hangsúlyozni szeretném, hogy ezúttal nem a bíráló bosszankodása jelenti a lényegi problémát, hanem az, hogy a szakterületen kevésbé jártas olvasó esetleg megpróbál utánanézni az ismeretlen, de meggyőző tudományosságúnak hangzó kifejezéseknek és szavaknak, hiszen a tézisfüzet 13. oldalán a légzési lánc uniuinon ciklusáról, máshol a mitokondriális tranzíció pórusról (23.o), vagy a daiminofluoresceinről (70.o), olvashatunk, és az összefoglaló szerint (107.o) három hajban hozott hasonló eredményt a NOS aktivitás mérése.

3. Az ábramagyarázatokon is találunk zavaró elírásokat, itt a tévesztések mellett (pl. metabolizmeus (3. ábra szövegében), NO scavengenek (9. ábra), fehéréj (11. ábra), tartamaz (14. ábra, ugyanitt vizsgáltot, előszür, jül látható), csekéyl (17. ábra, ugyanitt amley), rreakció (20. ábra), asztrocita market (22. ábra), oxégén és glüköz megvonás (24. ábra) több esetben maga a szöveg, azaz a tartalom is hibás: a 16. ábrán például az adott magyarázattal szemben a H panel ábrázolja a proton grádiens megszüntetését követően észlelt reakciót és az I panel a IV. komplex gátlás eredményét, a 28. ábra magyarázata viszont teljesen hiányzik, helyette itt is a 25. ábrához tartozó szöveg olvasható.

4. A szerkesztési és formázási hiányosságok, hibák közül említék párat: alsó indexbe került vagy nagybetűs szavak (ATP, 23.o, 8. ábra magyarázata AZ), a 33. oldalon a szövegbe illesztve szerepel (David) Jourd’heuil, 2002, Free radic Biol Med 33, 678-84) közleménye, ami később nem szerepel a referenciák listájában, fölös betűk (pl. 6. ábra magyarázata), a 43. oldalon bemutatott táblázat első része az oldal alján véget ér, így a Megjegyzések oszlopban a “*Nitorvazodilatátoro*” a következő, 44. oldal tején a következőképpen folytatódik: „*k in vitro*

és *in vivo* összevetése”. Hozzátenném, hogy e táblázat szinte mindegyik oszlopa tartalmaz hasonló hibákat, ezeket nem sorolom fel.

5. Jobb híján 'laborzsargonnak' nevezem a fogalmazás bizonyos jellegzetes hiányosságait. Az a stílus, ami személyes hangvételénél fogva az Előszóban hatásos és figyelemfelkeltő volt, a dolgozat további fejezeteiben sokszor zavaróvá válik. Példákat említek: „*azonosítottak egy pentabasic aminosav szekvenciát az eNOS autoinhibitory doménjében, amely dokkolja az enzimet a membránokhoz*” (109.o). A „blottolás”, „knockoutokkal azonosítás” vagy a „blockbuster molekula” kifejezések inkább a laboratóriumi - gyógyszerfejlesztési munkakörnyezetben lennének elfogadhatók.

7. Vannak emellett olyan részek is a szövegben, amelyek nem, vagy csak alapos figyelemmel és oknyomozással követhetők. Néhány példát említek. A 26. oldalon ezt olvashatjuk: „*Mivel azonban az agyi keringés mind a diazoxide kezelésre, mind annak gátlószereinek jelenlétében kialakult, de az iszkémia ellen védő hatást csak a diazoxid tudta kiváltani, ezért a védőhatást nem lehet csak a keringésfokozás számlájára írni.*” A 24. oldalon: „*Egyenlőre ezen kísérletek megismétlése más laboratóriumokban még várat magára, ezért az értékelésük ma még nem lehet messzemenő.*”

A 34. oldalon olvashatjuk, hogy „*a mitokondriális szuperoxid termelést az előző fejezetben részletesen tárgyalta*” a Szerző, de az előző alfejezet (2.2.2.) a gáz fázisú kemilumineszcenciával foglalkozik, maga a fejezet pedig (2.2.) az NO termelés mechanizmusával. Ugyanakkor valóban nagy szükség lett volna a mitokondriális gyökképzés részleteivel foglalkozó önálló fejezetre, kitérve esetleg a proteinek poszttranszlációs módosításához vezető nitrozilációra, nitrációra is.

2. Tartalmi rész

Az értekezés gerincét alkotó közlemények anyagai három fő témakörbe csoportosíthatók, a kapcsolódásokat indokló logikai lánc világos, egyedül a humán mikrokeringési vizsgálatok estében lesz kissé laza. A Jelölt a dolgozat Előszavában úgy fogalmazott, hogy tömören, lényegre törően próbált fogalmazni, hiszen a közleményeket és könyvfejezeteket a dolgozathoz mellékelte. Kiindulásként le kell szögezni, hogy a doktori mű bírálata csakis a kapott anyagra szorítkozhat, ami nem tartalmazza a hivatkozott közleményeket. Az értekezés ugyanis nem azonos a szerző közleményeivel vagy közlemények összességével, ezek anyaga új, önálló szellemi alkotásként él tovább, vagyis a részeknek fel kell oldódniuk a dolgozat egészében. Éppen ezért a Szerzőnek minden fontos információt, részletet, lényegi paramétert, technikai adatot az olvasó rendelkezésére kell bocsátania, természetesen az esetleges ismétlések, redundanciák elkerülésével. Fontos tehát, hogy a tömörsége mellett figyelmet kell fordítani a tudományos kommunikációk szokásos elemeire is, mivel ezek hiányában kérdések fogalmazódhatnak meg a disszertáció olvasóiban. A továbbiakban észrevételeimet, megjegyzéseimet sorolom fel, nem feltétlenül az értekezés fejezeteit követve, inkább az előbbi gondolatmenet alapján azokra a pontokra fókuszálva, ahol a Szerző fogalmazása túlságosan lényegre törő volt. Fontos azonban azt is leszögezni, hogy a fő célt, vagyis az önálló, *sui generis* doktori mű létrehozását sikerült elérni, a kézhez kapott anyag alapján a bíráló és a későbbi közönség is véleményt alkothat a Jelölt tudományos munkavégzésének eredményességéről.

1. K-ATP csatornák szerepének megbeszélésekor - amennyiben a farmakológiai prekondicionálásról mint az ischaemiás prekondicionálás alternatívájáról esik szó – fel lehetett volna sorolni más, jól ismert anyagokat is, pl. az adenosin, volatilis (gáz)

anesthetikumok, vagy a nikotinamid-nitrát hatásait, különösen az utóbbi említését hiányolom, hiszen K-ATP csatorna nyitó, ráadásul nitrát analóg tulajdonságokkal rendelkeznek.

2. A megbeszélés 117. oldalán található mondatrész szerint „*a nitrotirozin szint a keringő leukocitákban folyamatosan emelkedik a terhesség előrehaladtával*”. A diszkusszió 89. oldalon található szövegrészben ugyanakkor az olvasható (nitrotirozin stressz terhességi cukorbetegségben), hogy csak a 36-40. héten következett be az emelkedés. A pontos adatokat nem ismerjük; valóban egyenletesen fokozódik a nitroztatív stressz az egészséges terhesekben és a diabeteses populációban a terhesség kezdetétől a szülésig? Némileg zavarónak tartható ugyanis, hogy ez a változás az egészséges terheseken is kimutatható volt. A nitroztatív stressz terhességi cukorbetegségben összefoglaló (19. ábrán) nem találtam erre nézve pontos adatot: kérdésem tehát, hogy volt-e statisztikailag szignifikáns különbség az egészséges és diabeteses terhesek között ebben a paraméterben? Kérem, hogy részletesen értelmezze a kapott eredményeket (ez a diszkusszióban elmaradt).

3. Az előzőkhez csatlakozó kérdésem, mi a Szerző véleménye a protein nitrálás élettani aspektusairól. Erről a diszkusszióban nem olvashattunk. Az utóbbi időkben ugyanakkor egyre több közlemény jelenik meg erről az eshetőségről (pl. Abello N és mtsai összefoglalója; J Proteome Res 2009) - a vonatkozó adatok szerint a poszt-transzlációs módosítások biológiai funkciót láthatnak el, aktiválnak, inaktiválnak, vagy funkciónyerésben (gain-of-function) is szerepet játszhatnak.

4. További kérdésem, hogy a nitroztatív szöveti reakció (általában, illetve specifikusan pl. a vizsgált egészséges terhesek esetében) irreverzibilisnek tekinthető-e. Számos sejt és szövet esetében kimutatták a 3-NT protein módosulások reverzibilitását (Kamisaki Y, PNAS 1998; Kuo WN, Mol Cell Biochem 1999), sőt az utóbbi időben egyre több adat utal arra, hogy a protein tirozin nitráció (vagy nitrotriptofán képződés) nem random kémiai folyamat. Itt szeretnék hivatkozni Koeck és munkatársai egyik közleményére (Rapid and selective oxygen-regulated protein tyrosine denitration and nitration in mitochondria J Biol Chem 2004), melyben a szerzők rendkívül alapos vizsgálatok után arra a következtetésre jutottak, hogy rövid ideig tartó (mintegy 20 perces) hipoxiát követően a mitokondriumok teljesen eliminálhatják a nitrotirozin származékokat.

5. További kérdésem, hogy pontosan milyen módszert alkalmaztak a nitrotirozin kimutatására az anyai vér leukocytái, ill. anyai és magzati szövetek esetén, vagyis a méhlepényen, a köldök artérián és vénán (erre nincs adat az ábrán és az anyag és módszer fejezetben nem találtam meg a nitroztatív stressz jellemzésére alkalmazott hisztológiai eljárások részleteit). Ide kapcsolódó kérdésem, hogy vizsgáltak-e valóban a magzatokból származó szövetek reakcióit (esetleg *post mortem*).

6.a. Több pontra bontható kritikai észrevételem van a statisztikai elemzéssel. Egyrészt hiányolom az alkalmazott módszerek összefoglalását és rövid ismertetését, ennek szokásos helyén, az Anyag és Módszer fejezet végén. Sok esetben ugyanis nem világos, hogy egyedi eredményeket vagy csoportok változásait ábrázolta-e (pl. Western blot eredmények esetén szükségesnek ítélném a csoportok eredményeit ábrázoló változások bemutatását, a releváns statisztikai eredményekkel együtt). További lehetőség lett volna a szövegbe illeszteni a statisztikai próbákra vonatkozó rövid közléseket, eredményeket, de csak elvétve találtam nyomát a “szignifikáns”, vagy “statisztikailag szignifikáns” szavaknak, kifejezéseknek, helyettük az erősen pozitív, erős aktivitás, erős festődés olvasható, ami még talán elfogadható alternatíva lenne, de nem világos, hogy mit kell érteni az „enyhén erősebb” és hasonló, minőségi jelzős szerkezetek esetében.

6.b. Hasznos lett volna a statisztikai próbák legfontosabb jellemzőit az ábrák magyarázatánál feltüntetni. Példaként említem a 17. ábrát, ahol a kontroll és kezelt csoportok közti különbséget jelző szimbólum valószínűleg hiányzik néhány helyen. Itt az E panelen a PARP enzimaktivitás mérés eredményei láthatók, és csak a KGDH csoport felett látjuk a statisztikailag szignifikáns különbséget jelző szimbólumot, a többi oszlop esetében nincs jelzés. Hiányzik a sokkal markánsabb differenciát mutató PARP - PARP+3-AB csoport esetében is. Nem igazán világos tehát, hogy miért kapott a PARP+3-AB csoport a szövegben “részlegesen gátolható” jelzőt, hiszen, mint az ábrából kiderül, a DLDH csoporthoz képest a DLDH+3-AB teljesen megszüntette az aktivitást (természetesen az is látható, hogy a DLDH enzim önmagában csekély aktivitást mutat, ám ezt az aktivitást a 3-AB teljesen gátolta – szemben a “részlegesen gátolható” csoporttal, ahol az aktivitást felére csökkent).

7.a. A talpbőr mikrokeringését laser Doppler módszerrel mérték patkányokon. GSNO hatására mind az egészséges kontrollok, mind diabeteses állatokban azonos mértékben változott a véráramlás a vizsgálat 30 perce alatt (kétszeres PU emelkedés), és lényegében hasonló, (háromszoros PU emelkedés) választ észleltek az emberi alkaron is. Kérdésem, hogy milyen mélységben képes információ szolgáltatni ez a módszer, valamint hogy a bőr mikrokeringése mennyiben reprezentálja a diabetes láb mélyebb szöveti struktúráinak keringését.

7.b. További kérdésem: a legstabilabbnak bizonyult formula esetén pontosan mekkora volt és meddig tartott a relatív áramlásnövekedés a GSNO-val kezelt humán csoportban. A 21. C. ábra csak egyedi értéket ábrázol. Nem világos, hogy volt-e eltérés az állati modelltől human diabetes mellitus esetén, utóbbi vizsgálati csoportra vonatkozó adatot nem találtam és erre a diszkusszióban sincs hivatkozás (117. o). Meg kell jegyezni azt is, hogy ennek hiányában a cukorbeteg láb szindrómára vonatkozó következtetés szövegezése félreérthető lehet.

8. További kérdés, hogy a helyi NO tartalom változása a bevitel fokozódása után (amivel a bőr véráramlás válaszát magyarázza a Szerző) bizonyított-e. Ha igen, és ha a hiperglikémiás környezetben a fokozódó véráramlással bejutó szubsztrát (molekuláris oxigén) kapcsán még fokozódik is a szuperoxid anion generálás, van-e változás a helyi peroxinitrit képződésben? Ha van, mivel lehet magyarázni a változatlan intenzitású nitro tirozin reakciót?

9. Kérdéses lehet az is, hogy az S-nitrozóglutathion lebontását szabályozó GSNO reduktáz (GSNOR) milyen szerepet játszik (játszik-e) a folyamatban.

3. Összefoglalás

Végezetül a dolgozatban ismertetett eredmények összefoglalására térve, megállapítható, hogy Dr. Lacza Zsombor téziseiben számos új felismerés található:

- Kísérletei nyomán fontos új ismereteket szereztünk a mitokondriális ATP-függő kálium csatornák alegység összetételére vonatkozóan.
- Kimutatta, hogy a jelenleg ismert NO-szintáz enzimek közül nincs jelen a mitokondriumban olyan izoforma, ami érdemi mennyiségben termelne NO-t, ugyanakkor igazolta, hogy a mitokondrium belső membrán respirációs láncának működése kapcsán reaktív nitrogén intermedierek képződnek, főképp a III. komplex révén.
- Kimutatta, hogy a mitokondriális dihidrolipoamid-dehidrogenáz (DLDH) enzim részt vehet az oxido-reduktív stressz alatt aktiválódó poli-ADP-ribozilációban, így ez a folyamat a mitokondriális funkció károsodásának egyik új összetevője lehet.

- Kimutatta, hogy a nitroztatív stressz marker nitro tirozin mennyisége fokozódik terhességi diabetes alatt, ami a megváltozott NO metabolizmus kórtani szerepére utalhat. Új gyógyszer formulát fejlesztett ki az NO donorként is alkalmazható GSNO topikális bevitelére és kimutatta, hogy az exogén NO bevitelére alkalmas készítménnyel a bőr mikrokeringése fokozható.
- Mesenchimális őssejtek alkalmazásával kimutatta, hogy a működő mitokondriumoknak, valamint a sejt-sejt közötti kapcsolatnak fontos szerepe van a sérült sejtek működésének megtartásában, és in vivo körülmények között végzett vizsgálataival igazolta, hogy a sejt-sejt közötti kapcsolat membránhidakon keresztül valósul meg.

A fentieket összefoglalva elmondható, hogy Dr. Lacza Zsombor új eredményei és felismerései jelentősen hozzájárultak a humán biológia és orvostudomány alap-problémáját jelentő hipoxiás sejtkárosodás mechanizmusainak jobb megértéséhez és a kapcsoló terápia továbbfejlődéséhez. Megállapítható, hogy az alkalmazott vizsgálati modellek jól választottak, korrektül kivitelezettek és célkitűzéseinek megfelelően nyertek felhasználást. A szakirodalmat helyesen használta fel, a dolgozatban foglalt tudományos eredmények hitelesek, a pályázó saját eredményei. Az értekezés tartalmi erényeit összevetve a kritikai megjegyzésekkel, megállapítható, hogy a munka alkalmas az MTA Doktora cím pályázására, ezért javaslom a nyilvános vita kitűzését és az értekezés téziseinek elfogadását.



Dr. Boros Mihály
MTA doktora

Szeged, 2013. február 4.