

Válasz Professzor Dr. Méhes Gábornak, az MTA doktorának opponensi bírálatára

Mindenekelőtt megköszönöm Dr. Méhes Gábor professzor úrnak, hogy elvállalta a dolgozat bírálatát, majd behatóan tanulmányozta és részletesen véleményezte.

Köszönettel nyugtázom, hogy megítélése szerint a dolgozat megfelel az MTA doktori követelményeknek és amennyiben a további feltételek is teljesülnek, támogat az MTA doktori cím elnyerésében.

A továbbiakban a bírálat során felmerült kérdéseket azok sorrendjében válaszolom meg.

Mint írja „A táblázatok formátuma, tördelése a célnak még éppen megfelel, néhol azonban kifejezetten nehezen áttekinthető, esztétikailag kívánni valót hagy maga után (pl. 3.4.4. C. táblázat)”.

A dolgozat 31 táblázatot tartalmaz. A bíráló által kiemelt 3,4,4.C. táblázat, mely ebben a formájában a 2006-os Chemotherapy c. lapban jelent meg, valóban sok információt tartalmaz annak érdekében, hogy jelezzem a myelodysplasiában észlelhető rézhiány vastöbblettel társul és hátterében a HFE génnek valamelyik patogenetikai jelentőségű mutációja igazolható. Bizonyára lehetett volna ügyesebb a táblázat szerkesztése.

A bíráló hiányolja az egyes fejezetek elejéről a kutatás célját felvezető bevezető szöveget.

Ezt a megjegyzést sajnálattal veszem tudomásul, ugyanis minden fejezet elején található a kutatások kezdeményezését magyarázó vagy azt indokoló felvezetés.

A bíráló szintén hiányolja azt a diszkussziót, amely az eredményeket - a kor és az azóta eltelt időszak szintjén - a betegségről alkotott ismereteink között általánosságban elhelyezi. Különösen érdekes lett volna a régebbi (gyakran 10-20 éves), mára már meghaladott technológiával kapott eredmények újra elemzése, értelmezése.

Ez valóban a dolgozat színvonalát emelhetné volna, de nem volt a munkám célja.

A bíráló nehezen megítélhetőnek véli azt, hogy mily módon járultam hozzá a sokszerzős publikációkhoz (pl. Ingram W et al. 2006, Valent P et al. 2010).

Ezt a hiányosságot pótolom: Ghulam Mufti és Peter Valent kongresszusi ismeretségeim és valamennyien a The Myelodysplastic Syndromes Foundation center of excellencének vezetői vagyunk. Mufti G. annak idején gyűjtötte az 5q-MDS eseteket és tőlem is kért és kapott

csontvelő betegmintát és adatokat az Ingram Wendy első szerzős anyagához. A Budapest Study (Acta Haematol. 109: 64-67, 2003.) megjelenését követően Valent P. meghívására, egyetemünk képviselőjében érkeztünk Bécsbe Csomor Judit kolleganővel egy nemzetközi kerekasztal konferenciára, ahol többek között a WHO patológusa, Arber DA. is jelen volt. A résztvevők konszenzusa alapján a bécsi kollegák vállalták a közlemény megszövegezését, melyet aztán cirkuláltak a szerzők között kommentálásra, amíg nem véglegesítették.

Az opponens szokatlannak ítéli meg, hogy 2 kongresszusi absztraktomat idézem,

mely közül az egyik a Blood-ban a másik a Leukemia Research-ben jelent meg. Tény, hogy ez szokatlan, mert ezek eredményeit közleményben nem publikáltam, de a munkásságom része és mind a kettő eredeti ötletet tartalmaz, mint az, hogy melyik MDS betegnek lenne érdemes chelát kezelést idejekorán megkezdeni: azt, amelyiket ring sideroblast jellemez, az EPO alacsony, JAK2wt és HFE mutáció jelen van. Ezt idézte Wimazal F. Az EJCI.39/5/406-411,2009 cikkében.

Megköszönöm a Bíráló elismerő szavait, mellyel magyar nyelven megjelent tudományos ismeretterjesztő, oktató tevékenységemet méltatja.

A bíráló a továbbiakban kérdéseket tesz fel a génvizsgálatokkal kapcsolatosan,

melyek megválaszolásánál klinikusként gyakorló genetikus társszerzőm, Andrikovics Hajnalka segítségét is igénybe vettem:

1. kérdés: Tisztázandó, hogy mai ismereteink alapján a kimutatott HFE szekvencia eltérések polimorfizmusnak, vagy funkcióváltozással járó génvariánsnak, ill. mutációnak felelnek-e meg, a szövegben ugyanis mindhárom megfogalmazással találkozhatunk (pl. 24.oldal).

1. válasz: Az eltelt húsz év alatt valóban a módszerek fejlődése a nomenklatura változását is eredményezte. Feder, amikor a HFE génhibát elsőként leírta 1996-ban, mutációnak nevezte. Amióta kiderült, hogy ez a mutáció a kaukázusi populációban minden 200.embert érint, polymorphismusnak minősítjük. A definíció szerint a mutáció: biztosan kóros funkcionális következmény, a polimorfizmus >1% előfordulási gyakoriság.

Az American College of Medical Genetics ajánlásai szerint (ACMG) már besorolják a variánsokat patogén, valószínűleg patogén, VUS: variant of unknown significance, valószínűleg benignus és benignus kategóriákba. A HFE p.C282Y és a HFE p.H63D patogén. Az elnevezés az ajánlás szerint lehet mutáció és polimorfizmus is, de a patogén genetikai variáns a legmegfelelőbb nomenklatura.

2. kérdés: A szerző a két HFE génvariánst összevonva HFE+ csoportot emleget továbbiakban. Lehet-e ezeket a dolgozatban alkalmazott módon egységesen kezelni, amikor a H63D és a C282Y variáns hordozók vas homeostasisa valójában eltér?

2. válasz: A HFE+ egyszerűsített, technikailag kis teret elfoglaló jelölés, a táblázat alatti magyarázatban részletezésre került jelezve, hogy az adott két géneltérést értem alatta. Egységes kezelésük megfelelő lehet, amennyiben mindkettő a HFE gén mutációja. Hatásuk ugyan nem egyforma, de az irodalom a compound heterozygota állapotot is hemokromatózissnak tekinti. A kis esetszámú vizsgálatokban nem volt mód a különálló értékelésükre. A felvetés jogos, százas nagyságrendű esetszámnál feltétlenül érdemes lenne bontásban értékelni a hatásukat.

3. kérdés: Érdekes következtetés, hogy bár a HFE status MM-ben nem okozta a vasterhelés fokozódását, ugyanakkor HFE+ MM betegekben a WBC szám a csontvelő infiltrációtól függetlenül alacsonynak bizonyult, ami a szerző szerint együttesen fennálló MDS lehetőségére utal (32. oldal). Volt-e bármely ténylegesen MDS-re utaló morfológiai vagy biológiai jel, akár a diagnóziskor, akár a követés során, amely támogatná ezt a hipotézist?

3. válasz: A mindennapi gyakorlatban is vannak esetek egyértelmű morphologia jelekkel. Ilyen esetek saját anyagomban és az irodalomban is ismertek.(1.Várkonyi J. Myelodysplasia and Multiple Myeloma or Monoclonal Gammopathy. A Non-Fortuitous Coexistence. Hungarian Medical Journal. 2007. 2. Yoshida, Yataro. Co-occurrence of monoclonal gammopathy and myelodysplasia: a retrospective study of fourteen cases. International Journal of Hematology. 2014).

A rejtett, myelomában a plasmasejtek által elfedett myelodysplasia igazolását az arra jellemző karyotypus eltérések szolgáltathatnák, de ilyen összeállítást még nem találtam az irodalomban, magam nem végeztem, de kétségtelenül volna jelentősége. A két betegség együttes előfordulásának indirekt bizonyítéka lehet, hogy a myelomára alkalmazott – szerek, pl.régebben az alkiláló melphalan, manapság az angiogenesis gátlók vagy a venetoclax (bcl-2 gátló) hatásosak lehetnek mindkét betegségben.

4.Kérdés: Az MDS kórlefordulására vonatkozóan a teljesség kedvéért szintén szerepel elemzés a dolgozatban, ebben azonban nem térnek ki az előbb emlegetett vas anyagcsere zavarra. Ismert-e a HFE polimorfizmus szerepe az MDS leukémiás transzformációjában?

4. válasz: a legújabb MDS prognosztikus score WPSS a transzfúzió dependenciát is figyelembe veszi, ami gyakorlatilag a vasterhelődés velejárója. Az irodalomból csak néhányat idézek itt azon közlemények közül, melyek a transzfúzió okozta vasterhelődésnek a MDS életkilátására kifejtett hatásával foglalkozik. Ha elfogadjuk, hogy a HFE mutáció jelenléte tovább fokozza a vasterhelődés kockázatát, akkor az alább felsorolt közlemények megadják a kérdésre a választ. 1/ Cazzola M, Malcovati, L. (2005) Myelodysplastic syndromes coping with ineffective hematopoiesis. NEJM, 352,536-538. Patients with serum ferritin levels >1000 µg/l at diagnosis had a three times poorer survival after adjusting for age, sex and WHO 2001 diagnosis”. 2/ Sanz G. Independent Impact of Iron Overload and Transfusion Dependency on Survival and Leukemic Evolution in Patients with Myelodysplastic Syndromes. Blood 2008. 3/ De Souza GF. HFE gene mutation and oxidative damage biomarkers in patients with myelodysplastic syndromes and its relation to transfusional iron overload: an observational cross- sectional study. BMJ Open 2015.

5. kérdés: A MM asszociációs genetikai vizsgálatok az egyes géneltérések jellegzetes földrajzi eloszlására utal (erre jelen esetben példa a HFE variánsok 35. oldalon bemutatott É-D orientációja). Lehet-e akkor nemzetközi tanulmányokban nagy betegcsoportokat egységesen kezelni és nem érdemes-e az adatokat minden esetben részletes országos/regionális összehasonlító elemzésnek alávetni. A MM tanulmányok esetén pl. meglehetősen sok magyar beteg és kontroll került bele a nemzetközi tanulmányba, vajon a három vizsgált lókus esetében külön elemzés történt-e?

5. válasz: Nem, nem történt. Vannak a pathogenetikai jelentőséggel bíró gének, melyek a világon mindenhol fajtától, nemtől földrajzi helytől függetlenül kiváltja az adott betegséget. Ilyen lehet a MM-ban ez a három lókus. Ugyanakkor pl. a Hemokromatózis Ázsiában nem HFE gén mutáció következtében, hanem többségében a Tfr2 gén mutációja következtében alakul ki. Ugyancsak Ázsiában a MDS-ben tapasztalható transzfúzió okozta vasterhelődést HFE génmutáció nem súlyosbítja, mert ott az gyakorlatilag nem fordul elő. A válaszom tehát az, hogy érdemes mindenképpen első lépésként országos/régionalis tanulmányokat lefolytatni nagy esetszámon, majd összehasonlítani a nemzetközi adatokkal.

6. kérdés: Az MDS-ben és MM-ben kapott génvariáns/polimorfizmus eredményeket a mára nyilvánosan rendelkezésre álló szekvencia adatbázisokból pusztán in silico bioinformatikai módszerekkel lehetne-e reprodukálni?

6. válasz: Az American College of Medical Genetics (ACMG) ajánlásban részletes leírásokat kaphatunk az in silico predikciós programokról, de az insilico predikciót, a való élet, funkcionális vizsgálatok, több nagy study epidemiológiai vizsgálata felülírhatja.

Örömmel nyugtáztam, hogy a Bíráló tetszését elnyerte az AMWBC score (albumin/M-komponens, WBC), mint írja: mivel a létező legegyszerűbb módszerrel, már meglévő laboradatok kombinációjával szignifikáns betegcsoportok keletkeztek. (megjegyzem, hogy nem maradt le a 4.2.1. táblázatból oszlop. A 2-e score a két pontból (A/M:1 és WBC:1) adódik össze és a legrosszabb prognózist hordozza: magyarázat az ábra alatt.

A mastocytosis-sal kapcsolatos vizsgálatok esetében az IL6/IL6R problémakör megértéséhez-a bíráló szerint célszerű lett volna a hízósejtekre gyakorolt hatást valamely ábrán szemléltetni.—Ez valóban a dolgozathoz kiharadt, de irodalmi hivatkozást csatolok a fejezethez, mely egyébként nemzetközi összefogással elvégzett vizsgálat érvényességét alátámasztja.

7. kérdés: Sajnos az előfordulási gyakoriságon túl az IL6/IL6R genotípusok esetlegesen eltérő szerepe mastocytosisban nem került ismertetésre, elemzésre. Lehet-e tudni valamit a kimutatott génpolimorfizmusoknak a daganat jelentkezésében, lefolyásában, agresszivitásában játszott szerepéről?

7. válasz: a mastocytosis fejezet bevezetőjében irodalmi idézetekkel vezetem fel az IL-6/IL-6R vizsgálatainkat, melyek ezekre a kérdésekre választ adnak, idézem:

„SM - ban szenvedő betegek szérum IL-6 szintje az egészségesekhez képest magasabb értéket mutat, mely mértéke korrelál a tünetek, a betegség súlyosságával (80). Az IL-6 hízósejtekre részben indirekt módon, a multipotens hemopoetikus őssejt differenciálódására hatva, részben közvetlenül a masztociták érését befolyásolva fejti ki hatását. Az IL-6 cytokint és receptorát kódoló génszakaszban bekövetkező SNP-k hatására a cytokin szérumban mérhető koncentrációja változhat, melynek következtében a hízósejtekre gyakorolt hatása módosul. Az IL-6 gén -174 lókuszán bekövetkező Guanin / Citozin csere következtében az IL-6 transzkripciójának mértéke megváltozik. Az adott lókuszon G allél jelenléte magasabb IL-6

szinttel hozható összefüggésbe (81,82). Az IL-6 receptor (IL-6R) gén exonjának funkcionális polymorphismusa (Asp358Ala) az IL-6 membránhoz történő kapcsolódásának megváltozásához vezet (83). Mivel a solubilis IL-6R a szérumban keringő IL-6-ot megköti, az IL-6 szintje a keringő receptor mennyisége-, illetve annak sequestrációs hatása szerint módosul (84). Az IL-6R polymorphismusát vizsgálva többen is közöltek, hogy a „C” allél az IL-6 magasabb szérumszintjét eredményezi (85). A fentiek alapján feltételeztük, hogy mastocytosis kialakulása összefüggésben állhat a hízósejtekre ható IL-6 termelődésének / serum szintjének mértékét befolyásoló SNP változásokkal.”

Mi magunk csak a betegségre való hajlamosító tényezőként vizsgálatuk az IL6/IL6R polymorphismusokat.

Még egyszer hálásan köszönöm Prof. Dr. Méhes Gábornak, az MTA doktorának a bírálattal kapcsolatban kifejtett alapos munkáját, nem utolsósorban azt, hogy bizonyítottan látja a „jelölt kutatói elhivatottságát és képességeit” és hogy az MTA doktori cím odaítélését készséggel támogatni tudja.

Budapest, 2021-09-30.

dr. Várkonyi Judit