

Bírálati vélemény

Dr. Illés Árpád

„Etiopatológiai, klinikai sajátosságok és a kezelés késői szövődményeinek vizsgálata Hodgkin lymphomában”

címmel benyújtott

MTA doktori értekezéséről

Általános bírálat

Dr. Illés Árpád több mint 2 évtizede vezeti a DE OEC III. Belgyógyászati Klinika jelentős hagyományokra visszatekintő lymphoma munkacsoportját. Szűkebb szakmai-tudományos érdeklődése a Hodgkin lymphomás (HL) betegek terjedésére terjed ki. 1999-ben közel félezer HL-ás beteg adatait elemezve nyújtotta be egyetemi doktori (Ph.D.) értekezését és nyert tudományos fokozatot. A gyógyító- és oktatómunkával párhuzamos kutatómunkáját azóta is töretlen lendülettel végzi. Benyújtott egyetemi doktori értekezésében a Ph.D. fokozat megszerzése óta eltelt több mint egy évtized megfigyeléseit, eredményeit, következtetéseit foglalta össze „Etiopatológiai, klinikai sajátosságok és a kezelés késői szövődményeinek vizsgálata Hodgkin lymphomában” címmel benyújtott értekezésében. A munka a jelölt saját intézményében 2000 és 2010 között kórismézett mintegy 200 új HL-ás és velük együtt összesen 700 gondozott HL-ás beteg adatainak és mintáinak elemzése mellett több multicentrikus és országos anyagot is felölel, amelyeknek vizsgálatát jelölt a Magyar Hematológiai és Transzfuziológiai Társaság (MHTT) Hodgkin-kór Munkacsoport vezetőjeként irányította. Az experimentális kutatómunkát külföldi és hazai elméleti és klinikai kutatókkal együttműködve valósította meg.

Az értekezés 146 oldal terjedelmű, hagyományos szerkesztésű munka. A fejezetek arányos terjedelműek, informatívak, szépen szerkesztettek. Elütéssel, helyesírási hibával csak elvétve találkoztam (ld. részletes bírálat). A munka tartalmi szempontból hét fontosabb egységre tagolódik: (1) irodalmi áttekintés; (2) módszertani leírás; (3) a HL etiopatológiai vizsgálatainak eredményei; (4) a HL klinikai jellemzőivel kapcsolatban tett saját megállapítások; (5) a kezelések késői szövődményeinek vizsgálata; (6) a saját eredmények megbeszélése a szakirodalmi adatok tükrében; és (7) irodalomjegyzék, amely tartalmazza az értekezés megírásához felhasznált szakirodalmat és a szerző saját munkáit.

Az értekezés 58 *in extenso* közleményen alapszik, amelyeket jelölt első, vagy utolsó (ún. „senior investigator/author”) szerzőként jegyez. A közlemények közül 21+1 (egy kettős közlést jelölt egy opusként, 11/a. és b. jegyez) angol nyelvű, közülük 18 nemzetközi, lektorált folyóiratban jelent meg, 13 közlemény 1,0-t meghaladó impakt faktorú médiumban. Az értekezést megalapozó *in extenso* közlemények kumulatív impakt faktora 22,775. A nemzetközi, lektorált folyóiratokban megjelent közlemények önmagukban is minősítik jelölt munkáját, garantálják eredményei nemzetközi színvonalát, újdonság értékét. A nagyszámú (37) magyar nyelvű publikáció nagyobbik része szemléletformáló klinikai áttekintő közlemény, illetőleg esetek, kisebb kohortok ismertetése (21., 32., 33., 41., 48., 49., 50., 51. és 58). A hasonló, évek alatt szisztematikusan egymásra építkező tematikájú összefoglaló cikkeket (2., 4., 16., 22., 24., 29., 35., 36., 37. és 57. vm. 7. és 17.) áttekintve nyomon követhetjük a szakterület markáns fejlődését a XXI. század első évtizedében. Jelölt fenti közleményeit az értekezés benyújtásáig 144 független szerző/csoport idézte.

Jelölt teljesítményét az MTA doktori értekezés szakterületi követelményeinek megfelelő szcientometriai adatainál is jobban minősíti munkájának eredménye: amint az a döntően leíró jellegű értekezésből, illetőleg az annak alapjául szolgáló közleményekből is kiderül. Hazánkban, így Debrecenben is, nemzetközi színvonalon folyik a HL-ás betegek kivizsgálása és gyógykezelése. Jelölt és mtsainak a rizikó-adaptált kezelésre, a késői mellékhatásokra vonatkozó kutatómunkája része annak a friss nemzetközi trendnek, amely az alapbetegség eredményes gyógykezelésén túl a mellékhatások minimalizálására, a késő szövődmények megelőzésére, korai felismerésére, ezáltal az egykori betegek életminőségének javítására irányul. A gyógyító- és kutatómunka mellett jelölt környezetében felnevelkedett egy középgenerációs és fiatal kutató-klinikusokból álló munkacsoport, amely tagjai közül jelölt négy munkatárs Ph.D. témavezetője volt.

Részletes bírálat

Rövidítések jegyzéke (3. old.): A latinos helyesírással leírt *terminus technicusok* a magyar nyelv szabályai szerint ragozott és képzett alakjai esetében a ragokat és képzőket a magyar helyesírás szabályai szerint írjuk, tehát: haemopoetikus, anaplasia, cardiovascularis, stb.

Bevezetés, irodalmi áttekintés – Az értekezés olvasmányos fejezete. Jelölt magabiztosan tárgyalja, elemzi, mert saját tudásként ismeri a HL valamennyi vonatkozását. Jelen bíráló a fejezet kapcsán egy kiegészítéssel szeretne élni, nem vitatva, hogy HL-ban DeVita és mtsai alkalmazták elsőként sikerrel a polikemoterápiát 1970-ben (14. old. utolsó bek.). Az orvostörténeti mértékkel is jelentős paradigmaváltás, nevezetesen a polikemoterápia bevezetése és sikeres alkalmazása az onkológiában, illetőleg szűkebb értelemben az onkohematológiában gyermekhematológusok munkásságához köthető. A St. Jude terápiás program első érijében, 1962 és 1968 között a négy egymást követő akut lymphoblastos leukaemiás (ALL) terápiás protokoll (Memphis-study I-IV) vezetett a gyermekkori ALL „totális terápiájának” kidolgozásához, egyúttal az első tartós túlélésekhez (gyógyuláshoz) a korábban uniformisan fatális kimenetelű betegségben (George P et al. J Pediatr 1968, 72:399-408).

Az értekezés **célkitűzései** mértéktartóak és világosak. Jelölt hiánypótló feladatra vállalkozott, amikor a hazai HL betegek nemzetközi adatokkal összehasonlító vizsgálatát kívánta elvégezni. Az FDG-PET prognosztikai szerepének meghatározása a betegek tartós követése alapján és a kezelések késői szövődményeink kutatása nemzetközi szinten is jelentős célkitűzés volt.

A **módszerek** leírása tömör, néhány esetben túlságosan is tömör. Jelöltnek meg kell adnia azokat az adatokat, amelyek alapján az eredmények elemző-értékelő áttekintése az értekezés olvasói számára is lehetséges. Így:

Az LMP1 és EBNA2 fehérjék IHC kimutatásának leírása során (28. old) meg kell adni, hogy milyen primer antitest oldatokat használtak a vizsgálat során, és mik voltak a vizsgálat pozitív és negatív kontrolljai.

Az *in situ* hibridizáció módszerét jelentősen terheli az aspecifikus kötődés (fals pozitivitás) lehetősége, különösen deparaffinált metszetek alkalmazása esetén. Ezért ennek a módszernek a leírásánál (29. old.) nélkülözhetetlen a pozitív és a negatív kontrollok megadása.

Hiányzik a negatív kontrollok megadása az áramlási citometriai módszerek leírása kapcsán is, és ismertetni kell a permeabilizálásra alkalmazott módszer(ek)e)t, amelyek segítségével az intracytoplasmátikus antigének jelölését végezték (30-32. old).

Az **eredmények** leírása alapvetően az értekezést megalapozó, *in extenso* közleményekre támaszkodik. Ezek döntő többsége lektorált folyóiratban jelent meg, tehát már átestek a közlemények bírálata során szokásos szigorú szakmai bírálatokon: validitásukhoz nem fér kétség. Jelen bíráló az értekezés „Megbeszélés” fejezete kapcsán kíván néhány megjegyzéssel, illetőleg kérdéssel élni, hiszen ez a fejezet jól elkülöníthető része az értekezésnek, időben valamennyi megjelent cikk közlése után készült, tehát várható, hogy jelölt az eredeti közleményekhez képest más aspektusban, a munka teljességének, valamint a közlemények megjelenése óta napvilágot látott, új szakirodalmi adatok összefüggésében elemzi az eredményeket. Az eredmények kapcsán csupán néhány tény pontosítását tartom szükségesnek tisztázni, döntően a módszerek leírásának szűkszavúsága miatt:

EBV fertőzés és HL asszociációja: 40. old. 1. táblázat:

1. Az elemzésbe bevett gyermekbetegek száma olyan elenyésző, hogy abban a vizsgálati csoportban a szignifikancia számítás nem értelmezhető. Ez a tény magyarázhatja azt a jelentős eltérést, amelyet néhány más munkacsoport figyelt meg, és amely egyúttal az EBV fertőzés etiológiai/kofaktor szerepét erősen aláátmasztja, hogy ti. a gyermekkori HL-ás betegek között nem-random eloszlású EBV fertőzöttségi mintázatot találtak szignifikánsan magasabb prevalenciával, mint az egészséges kortársak között (Preciado MV et al. Leuk Lymphoma 1997, 24:283-90. és Zhou XG et al. Cancer 2001, 92:1621-31.). Kérdésem: a vizsgálatba bevont gyermekbetegek kapcsán miért a DE OEC Gyermekgyógyászati Klinika Genetikai Laboratóriumának a bíráló számára ismeretlen szempontok szerint szelektált adataira támaszkodott és miért nem a klinika Hematológiai-onkológiai Munkacsoportjának, vagy a Nemzeti Gyermektumor Regiszter komprehenzív adataira?
2. Milyen, a személyiségi jogokat tiszteletben tartó módszert alkalmazott jelölt a vizsgált betegek etnikai hovatartozásának és szociális körülményeinek meghatározására?

42. old. utolsó bek.: A mondatkezdő szóként szereplő számnevet nem számmal, hanem betűvel helyes kiírni, tehát: „Száztizenhárom HL-es beteg közül ...” Hasonlóan a 45. old. utolsó bekezdésében: „Negyvenöt HL-es betegünk esetében...” A 70. old. utolsó mondatában: „Huszonhárom beteg szérumban...”

Regulatív T (T_{reg}) sejtek vizsgálata (44-45. old.): Szokatlannak tűnik, hogy míg a „Módszerek” fejezetben jelölt közli a FoxP3 jelölést és ábrán demonstrálja az expressziót, a kvantitatív eredményekre vonatkozó adatsort nem illesztette be az „Eredmények” fejezet vonatkozó részébe. A $CD4^+CD25^{bright}$ populációban ugyanis a FoxP3+ hármask pozitív sejtek reprezentálják a T_{reg} sejteket, hiszen az IL-2R közös alegység (CD25) fokozott kifejeződése, amelyet áramlási citometriai vizsgálatok során a CD25 átlagos fluoreszcencia intenzitásának (MFI) fokozódása („brightness”) jelez, a T_{reg} sejtek mellett az aktivált T-helper/inducer sejteket is jellemzi. Kérdésem: hogyan, milyen MFI értékek alapján jelölték ki a $CD25^{bright}$ és $CD25^{dim}$ „ablakokat” a vizsgálat során? Nem lett volna-e szerencsésebb a CD25-re kapuzott MFI értékek alapján különbséget tenni a vizsgálati csoportok között, mint a $CD25^{bright}$ sejtek abszolút száma alapján, amely, jelentős mértékben függ a kapuzási paraméterek arbitrárius beállításától? Végül: a táblázatban szereplő $CD4^+CD25^{bright}$ sejtek között milyen arányt képviseltek a $CD4^+CD25^{bright}FoxP3^+$ (T_{reg}) sejtek?

HL országos adatainak felmérése (48-53. old.): A 13 év feletti lakosságot nem lehet – még idézőjelben sem – „felnőtt” lakosként aposztrofálni (48. old. 2. bek.), hiszen az ENSZ általánosan elfogadott és hazánkban is törvénybe iktatott definíciója szerint a gyermekkor 18 éves korig tart (Article 1, Convention on the Rights of the Child, 1989). A definíció, illetőleg annak figyelembe vétele azért jelentős, mivel az elemzett betegcsoport kórlefolyása minden tekintetben (KR, OS, EFS) kedvezőtlenebb, mint a gyermekkori HL-ás betegeké. Jelölt és mtsai a SE II. Gyermekgyógyászati Klinika serdülőkorú betegeinek kórlefolyását saját hasonló betegcsoportjával összehasonlítva megállapították, hogy a serdülő (14-18 éves) HL-ás betegek gyógyulási esélyei jobbak a gyermekgyógyászati környezetben, gyermekgyógyászati protokoll szerint kezelt betegek között, mint a felnőttthematológiai osztályon felnőttthematológiai protokoll(ok) szerint kezelt betegek esetében (Müller J et al. Orv Hetil 2008, 149:2221-7). Kérdésem: milyenek voltak a jelen elemzésbe bevont 14-18 éves HL-ás betegek KR, OS és EFS értékei?

Jelölt HL-ás betegek kezelése során szerzett tapasztalatok (56-59. old.): A 20. ábra szerint az ABVD, illetőleg a COPP/ABV protokollok szerint kezelt betegek teljes túlélése között nincs szignifikáns különbség, ami ellentétben áll a szöveges megfogalmazás állításával (58. old. 1. bek. 2. mondat). Kérdésem: egyenletesen oszlott-e meg a KT mellett RT-ban is részesülő betegek száma és aránya a két csoportban?

63. old. 1. bek.: a „kevesebb mint...” összehasonlítás két szava közé nem kell vesszőt (,) tenni. Hasonlóan: 67. old. 10. sor helyesen: „...több mint...”

Refrakter és relabált HL-ás betegek vizsgálata (63-64. old.):

A 63. old. 2. bek. utolsó mondatából nem derül ki, hogy mely betegcsoportok 10 éves teljes és eseménymentes túlélése volt 90% és 74%, illetve, ezen adatot hogyan lehet összevetni a 64. old. 3. mondatával, amely szerint a refrakter betegek átlagos túlélése 34 hónap (< 3év), leghosszabb túlélése 60 hónap (5 év), míg a visszaeső betegek átlagos túlélése 131 hónap (11 év), a leghosszabb túlélési idő 150 hónap (12 1/2 év) volt.

Milyen kondicionáló kezelést kaptak az aHSCT-ben részesülő betegek, mennyi volt a TRM aránya?

Mivel volt a CR-ben lévő betegek haláloka (25/B ábra)?

A myocardium késői károsodása (73-77. old.): A kóros vs. élettani szívizom funkcióval jellemezhető betegek között hogyan oszlott meg az anthracyclin kezelésben részesültek aránya és ebben a csoportban mennyi volt az anthracyclin vegyületek kumulatív dózisa? Kaptak-e a betegek egyúttal cyclophosphamidot (vagy ifosfamidot), amely vegyületek potenciálják mind a mellkasi XRT, mind az anthracyclinek cardiotoxicus hatását? Kaptak-e a betegek dexrazoxane-t?

Jelölt gyógyult HL-ás betegeinek felmérése (86-88. old.): 87. old. 1. mondat: Lehetséges, hogy a DEOEC III. Belklinikán 14 évesnél fiatalabb (11 éves!) beteget kezeltek?

87. old. utolsó bek. első mondata szerint „az összes beteg 35%-a halt meg...”, ami 65% teljes tartós túlélésnek felel meg. Hogyan vethető össze ez az adat az előző alfejezetek lényegesen jobb tartós túlélést tükröző adataival (19., 20., 23. és 25/A ábrák)?

Megbeszélés –

HL és EBV fertőzés asszociációja:

A HL és az EBV fertőzés egybeesésének szisztematikus hazai felmérése kétségtelenül hiánypótló vizsgálat, ám a történeti hűség kedvéért meg kell jegyeznünk, hogy *in situ* hibridizáció módszerét alkalmazva Magyarországon elsőként a Pécsi Egyetem Patológiai Intézetének munkatársai mutattak ki EBER oligonukleotid-specifikus RNS-t EBV-asszociált malignoma mintákban, köztük egy HL-ás beteg anyagában (Tornóczy T et al. Pathol Oncol Res 1998, 201-5.). Noha a gyermek- és serdülőkorban halmozódó EBV-pozitív HL esetek tendenciája kétségkívül megfigyelhető jelölt vizsgálatai alapján, az epidemiológiai helyzet tisztázása érdekében statisztikai elemzés céljára alkalmas, reprezentatív populáció vizsgálata még várat magára. Az epidemiológiai alapokon álló ok-okozati összefüggés megállapítására az EBV-fertőzés etiológiai, esetleg kofaktor szerepe és a HL között jelen munka önmagában nem tekinthető bizonyító erejűnek, hiszen az EBV 43%-os prevalenciája a jelölt anyagában elmarad az egészséges, reprezentatív hazai népesség szeropozitivitásának 90%-ot meghaladó arányától a 20 év feletti korcsoportjában (Ternák G et al. Orv Hetil 1995, 136:2727-30.). Ha csak a két csoport közötti korreláció jelentős különbségét vennénk figyelembe, akár arra a következtetésre is juthatnánk, hogy az EBV-fertőzés „véd” a HL kialakulása ellen – hiszen az egészségesek között több mint kétszer gyakoribb a prevalenciája, mint a HL-ás betegek körében. Kérdésem: jelölt esetleges újabb, még nem közölt vizsgálatait, illetőleg a szakirodalmi adatok alapján milyen transzkripcionális és epigenetikai változások kísérik az EBV vírusfertőzést a germinális centrum B-lymphocytaiban, amelyek ok-okozati kapcsolatba állíthatók a HL kialakulásával, illetőleg található-e sajátos HLA-I és -II asszociációs mintázat az eltérő EBV státuszú HL-ás betegek csoportjai között?

HL és reaktív fehérvérsejtek kapcsolata az érintett nyirokcsomókban és a perifériás vérben:

T_{reg} sejtek jelenlétét jelölt és mtsai elsőként vizsgálták HL-ás betegek perifériás vérmintáiban. Mint jelölt maga is megállapítja azonban (93. old. 3. bek.): „... további vizsgálatok szükségesek annak a megválaszolására, hogy a (T_{reg}) sejtszám emelkedése...hajlamosító tényező...vagy...a betegség fennállásának a következménye.” Ezért fontos lenne a T_{reg} sejtek karakterizálása a patológiaszövetmintákban is. Egy ilyen jellegű vizsgálat új megvilágításba helyezhetné a szöveti hízósejtek és eosinophilok etiopatológiai szerepét is, és így az értékes vizsgálatsorozat túlmutatna a jelenleg kimondható negatív megállapításon, amely szerint a hízósejtes infiltráció mértéke biomarkerként nem alkalmazható HL-ban. HL és egyéb granulomatózus folyamatok vizsgálata alapján ugyanis körvonalazódni látszik egy zárt autokrin szabályozó hurok a szöveti hízósejtek, a myeloid-eredetű szuppresszor sejtek, a Th17 lymphocyták és a T_{reg} sejtek között. Ez a többszereplős szabályozó egység a CD30L-CD30 kölcsönhatás révén kommunikálna a HRS sejtekkel ((Fischer M et al. J Clin Invest 2006, 116:2748-56., Sun X et al. J Immunol 2010, 185:7671-80., Yang Z et al. PLoS One 2010, 5:e8922., Glimelius I et al. Eur J Haematol 2011, 87:208-16.).

Klinikai epidemiológiai megfigyelések:

97-98. old.: Jelölt és mtsai vizsgálatában az NLPHL előfordulási arány 3-4%pontos részvételi aránnyal kissé elmarad a nemzetközi adatoktól, így valószínűleg nem az új diagnosztikai entitás bevezetése magyarázza a cHL lymphocytá túlsúlyos altípus előfordulásának 1994 óta megfigyelhető csökkenését.

Jelölt fontos és megalapozott ajánlásokat fogalmaz meg a magyar munkacsoportok számára a HL korszerű rizikó-adaptált kezelésére: 99. old. 2. bek., 101. old. 2. bek., 102. old. 2. bek.

Késői mellékhatások:

Jelölt és mtsai nemzetközi szinten is újszerű megfigyelései további fontos vizsgálatok alapjául szolgálhatnak. Ezek a vizsgálatok tisztázhatják az aui. thyreoiditis, a G-B-kór és a HL közötti összefüggéseket, hasonlóan a HL és egyéb aui kórképek asszociációjához (103-105. old.).

Az anthracyclinek kóroki szerepét az „Eredmények” fejezetben közölt adatok nem zárják ki egyértelműen (108. old. 2. bek.).

Jelölt és munkatársai azon kevés munkacsoportok közé tartoznak, akik szisztematikusan vizsgálták az a. carotisok intima-media állapotának, a gyógyult betegek stomatológiai státuszának, valamint krónikus fáradékonyság szindrómájának és a HL/HL-terápia összefüggéseit.

Irodalomjegyzék –

A csaknem 200 tételt felsoroló, igen részletes szakirodalmi áttekintés tartalmazza a szakterület mértékadó publikációit és a jelölt munkacsoportjához hasonló kutatómunkát végző hazai és nemzetközi munkacsoportok fontosabb eredményeit. Az értekezést megalapozó saját közleményeket az „Általános bírálat” kapcsán már érdemben elemeztem. Megjegyezni kívánom, hogy az általánosan elfogadott gyakorlatnak megfelelően találkozhatunk angol nyelvű közlemény párhuzamos, magyar nyelvű közlésével, amelyet jelölt egy opusként jegyez: 11/a. és 11/b. Több más magyar nyelvű közleményt azonban, amelyek jelentős átfedést mutatnak egyes angol nyelven is közölt anyagokkal, külön sorszámmal tüntet fel jelölt az értekezést megalapozó közlemények jegyzékében. Bíráló egyetért jelölttel abban a tekintetben, hogy a magyar orvosi szaknyelv gondozása érdekében szükséges olyan minőségi munkák magyar nyelven történő közlése is, amilyenek a jelölt anyagában bőven megtalálhatók. Számos esetben a hazai és más, közép-kelet-európai folyóiratok szerkesztői ezt az igényt felkérés formájában is megfogalmazzák. Szerencsésebb lenne azonban talán a 11. tételhez hasonlóan egy opus több alpontjaként feltüntetni a jelentős tartalmi és formai átfedéseket mutató közleményeket. Az ilyen módon csekély mértékben, 45 tételre, „szűkülő” közlésszám semmilyen tekintetben sem csökkentené az értekezés érdemeit.

Összefoglalva: Jelölt értekezésében az egyik vezető hazai HL munkacsoport évtizedes eredményeit foglalta össze értékes munka formájában. Hiánypótló, hazai vonatkozásban újszerű megállapításokat tett a HL egyes klinikopatológiai sajátosságainak, EBV, HCV, HGV asszociációjának vonatkozásában. Nemzetközi vonatkozásban elsőként tanulmányozta aktivált T-helper és T_{reg} sejtek jelenlétét HL-ás betegek perifériás vérmintáiban. Nemzetközi összevetésben is az úttörők közé tartozik a HL-ás betegekben végzett FDG-PET vizsgálataival és megállapításaival, valamint a HL késői szövödményeinek tanulmányozásával, a szakterület fejlődéséhez hozzájáruló megfigyeléseivel.

Az értekezés nyílt vitára bocsátását javaslom, jelölt számára az MTA doktora cím odaítélését támogatom.

Debrecen, 2011. december 31.

Dr. Kiss Csongor
MTA doktora, egyetemi tanár
DE OEC Gyermekgyógyászati Intézet
Gyermekehematológia-onkológia Tanszék