

Opponensi bírálati vélemény **Dr. Hársfalvi Jolán** „Hemosztázis és trombózis: In vitro áramlási és klinikai modellek” című MTA doktori értekezéséről

A hemosztázis összetett, részleteiben egyre jobban megismert folyamat, melynek kóros működése kiemelten jelentős az orvostudomány szempontjából. Az alapfolyamatok megismerésével és tüneti majd célzott terápiák felfedezésével jelentősen megváltozott számos betegség lefolyása, elterjedtsége és az azokkal kapcsolatos halálozás, azonban dacára az elmúlt évek jelentős haladásának, ez a terület továbbra is számos megoldatlan problémát rejt a területen dolgozó klinikusok és kutatók számára.

Dr. Hársfalvi Jolán 1995-ben önálló munkacsoportot alakíthatott Debreceni Orvostudományi Egyetemen abban az intézetben, amely hazánkban kiemelkedően jelentős klinikai és tudományos aktivitást fejt ki a hemosztázis működésének megismerése és az azzal kapcsolatos klinikai jelenségek diagnosztizálása területén. Önálló csoportja szakterületének a hemosztazeológiát választotta, és korábbi mentorai által felvázolt úton önállóan továbbhaladva jelentős eredményekkel járult hozzá szakterülete fejlődéséhez. Az elmúlt csaknem 20 esztendő eredményeit mutatja be a bíráló bizottság elé terjesztett MTA doktori mű, melynek témaválasztása rendkívül hasznos és megalapozott: olyan vizsgálatok eredményeit olvashattuk, melyek gondos metodikai fejlesztések és új módszerbeállítások precíz klinikai-gyakorlati alkalmazásáról tanúskodnak.

Általános bírálat

Formai szempontok

Az értekezés formai szempontból megfelel a doktori művekkel szemben támasztott kritériumoknak, a szerző világosan tagolt fejezetekben tárja az olvasó elé munkája összefoglalását, konkrét célkitűzéseit, azok háttérét, majd a részletes „Anyagok, klinikai minták és módszerek”, „Eredmények” és „Eredmények értékelése” szakaszokban következik a mű lényegi része. Dolgozatát 171 adekvát tételt felsoroló irodalmi hivatkozási lista zárja. A mű magyar nyelven, összesen 88 számozott oldalon készült el, melyet 34 számozott ábra és 8 számozott táblázat illusztrál. Az ábrák és táblázatok világosan szerkesztettek, pontos feliratokkal és magyarázatokkal egészülnek ki, melyek a mondandó megértését nagyban segítik.

A doktori mű nem tartalmazza azokat a cikkeket, amelyek eredményeire közvetlenül épül, ezekre a cikkekre (és az azokban bemutatott részletekre) utalás található a szövegben. Hiányoltam a dolgozathoz egy olyan önálló fejezetet vagy szakaszt, amelyben a jelölt felsorolja és bemutatja, hogy mely cikkeire épül a doktori mű. Meg lehetett volna ezt a kérdést úgy is oldani, hogy az eredmények rész egyes szakaszainál a címben vagy alcímben feltüntetésre kerül, hogy ezek az eredmények nyomtatásban mikor és hol jelentek meg. A dolgozat ezeket a hivatkozásokat két helyen adja meg: a „Bevezetés és a mű célja” fejezetben, és az „Eredmények” részben, mindkét helyen a folyó szövegbe illesztve. Ráadásul a saját munkákra és az irodalmi ismeretekre történő hivatkozások egy közös listára utalnak. Mindezek a megoldások megnehezítették a bíráló dolgát, és lelassították a jelölt önálló munkásságának pontos körülhatárolását.

A dolgozat nyelvezete egységes, jelölt külön le is írja dolgozatában, hogyan próbálta meg a magyar, latin és angol eredetű szakszavak írásmódját egységesíteni, ill. elfogadott fordítás hiányában jelölni. Törekvése öröndetes, de így is maradt dolgozatában néhány elütés, tévesztés és nem egységes nyelvhasználat, melyek összességükben az értelmet nem zavarják, a megértést nem gátolják. Ugyanakkor több helyen is indokolatlanul rövid mondatokat, töredék mondatokat találhatunk, melyek arra utalnak, hogy egy alapos átolvasás még javíthatta volna a dolgozat nyelvezetét, stílusát.

Scientometriai szempontok

Az MTMT adatbázisban 2012. májusi feltöltöttséggel voltak találhatóak adatok a jelöltre vonatkozóan a dolgozat bírálásának idején, melyekből az derült ki, hogy Dr. Hársfalvi Jolán teljes munkássága során 85 tudományos dolgozat és 2 „Proceedings” mű megírásában vett részt, melyeknek összegzett impakt faktora 172,775, és az összes cikkre kapott független hivatkozások száma 522. Dr. Hársfalvi Jolán 1996-ban szerzett PhD doktori fokozatot, ettől az időtől számítva dolgozik önálló munkacsoport vezetőjeként és a betérjesztett MTA doktori mű alapvetően az 1996 utáni időszak tudományos dolgozataira épül. Összesen 22 saját, válogatott tudományos cikket, 3 absztraktot és 2 folyóirat supplementumot használt fel eredményei bemutatására és az értekezés alátámasztására. Az MTA doktori mű alapjául szolgáló, lektorált folyóiratokban megjelent 22 cikk összegzett impakt faktora 85 és az ezekre kapott összes hivatkozási szám 203. Az értekezéshez felhasználta 22 cikk közül 9 esetben állapítható meg jelölt vezető szerepe (első vagy utolsó szerző), és ezen cikkek között igen rangos folyóiratokban megjelent tételek is szerepelnek (mint pl. Blood, JTH). Mindezen mutatók alapján megállapítható, hogy jelölt tudományos aktivitása imponáló, lényegesen meghaladja az MTA doktori eljárásban elvárt küszöbértékeket. Öröndetes, hogy az MTA doktori értekezéshez felhasználta, primer eredményeket bemutató művek között 3 magyar nyelvű is található.

Részletes bírálat, kérdések

„Irodalmi összefoglalás, háttér”

A 10. oldalon található 2. táblázatnak „Az endotélsejt” cím túlságosan leegyszerűsítő, és nem utal arra, hogy mi került bemutatásra a táblázatban.

Kérdés: A táblázatban feltüntetett molekulákat termelik az endotélsejtek? Miért pont ezeket választotta ki dolgozata bevezetőjéhez?

A 20. oldalon a lap alján a von Willebrand faktorról (VWF) ír, és hangsúlyozza, hogy a molekula működése a vér áramlási sebességének függvényében változik, a trombociták VWF-mediált időszakos rögzülése az érfalhoz nagy áramlási sebesség mellett érvényesül. Itt példaként az artériákat és kapillárisokat hozza fel, azonban ez ellentmond a korábban az 1-es táblázatban [helyesen] bemutatott értékeknek, ahol kiderül, hogy a kapillárisokban a leglassúbb az áramlás az emberi szervezetben.

Kérdés: Van ismert bizonyíték arra vonatkozóan, hogy a VWF kapillárisokban, lassú áramlás mellett hozzájárulhat a trombociták érfalhoz tapadásához?

A 9. ábrán a VWF szintje és a vérzés ill. trombózis rizikó közötti összefüggések kerültek bemutatásra. A vastag folytonos vonal az ábrafelirat szerint „a populáció VWF értékei gyakoriságának eloszlását és az 50-200% közötti 95%-os konfidencia intervallumot mutatja”. Az ábra jobb oldali Y tengelyén nincs skála, valamint nem világos számomra, hogy a 95%-os konfidencia tartomány miként került feltüntetésre.

Kérdés: Kérem mutassa be a populáció VWF értékeit és annak 95%-os konfidencia intervallumát egy pontos ábrán!

A VWF szintézis utáni processzálása során az ADAMTS13 betűszóval jelölt metalloproteáz egy kritikus hasítási lépést katalizál, melyről dolgozatának 17. és 25. oldalán is ír. A két jelölt helyen azonban eltérő aminosav pozíciókat jelöl meg a hasítási hely bemutatásakor.

Kérdés: Kérem ismertesse a VWF ADAMTS13 katalizálta processzálását és annak funkcionális hatását!

„Eredmények”

Az 53-54. oldalakon egy VWF-kötő monoklonális antitest funkcionális hatásairól ír, a szövegben 1C1E7 és 1C1D7 antitestekről olvashatunk, az ábrákon azonban csak az előbbi szerepel.

Kérdés: Kérem pontosítsa, itt egy vagy két anti-VWF antitest vizsgálatáról van szó?

Az eredmények jelentős, előremutató aspektusának tartom, hogy jelölt új módszerek kidolgozásával (áramlási sebesség figyelembe vételét lehetővé tévő vizsgálati rendszer) végzett felfedező jellegű kutatásokat új gyógyszerjelöltek azonosítására. Dolgozatának több szakaszában is leírja az oligopeptid és oligonukleotid alapú inhibítorok felismerését, jellemzését és hatásaikat. Dolgozatának 57-59. oldalain ismerteti azokat a kutatásokat, melyek elvezettek a „multi antigens peptide”, MAP felismeréséhez, amely a vérlemezke adhézió potenciális inhibítora.

Kérdés: Történtek az elmúlt években további vizsgálatok ezzel az inhibítorral in vitro, in vivo vagy egyéb tesztrendszerekben? Használhatónak bizonyult a molekula állatkísérletek során?

A 69. oldalon cukorbetegség körében végzett klinikai tanulmányt ismertet, melyben alvadék lízis rezisztenciáját vizsgálták. A leírás szerint plazminogén aktivátort alkalmaztak a kísérletek során, azonban annak rövidítését PAI-1-ként jelöli, ami annak inhibítorát jelenti. Később ugyanebben a bekezdésben a felülúszó PAI-1 aktivitásáról ír, holott legfeljebb gátló aktivitást vizsgálhatna erre vonatkozóan.

Kérdés: Kérem ismertesse ezeket a kísérleteket részletesen! Történtek további saját vagy irodalmi vizsgálatok ebben a témában?

A 69-70. oldalakon ADAMTS13 aktivitás mérést és VWF multimer szerkezet analízist ír le, melyet májbetegség körében végeztek. Ezek a megfigyelések absztrakt formában kerültek publikálásra, és a dolgozat nem tartalmazza a részletes eredményeket.

Kérdés: Kérem mutassa be a májbetegség körében végzett vizsgálatokat részletesen!

Új megállapítások

A fenti kérdésekre adott válaszoktól függetlenül a jelölt új tudományos eredményeinek fogadom el a következőket:

- Új vizsgálóeljárást dolgozott ki és hasonlított összes más módszerekkel, amellyel vénás és artériás áramlási körülményeket modellezve lehet a hemosztázis egyes elemeit vizsgálni az áramlási sebesség függvényében.
- Kvantitatív adatkiértékelési eljárást dolgozott ki a VWF multimer szerkezetének megállapításához
- Részletesen jellemezte a trombociták kollagénhez és endothelsejt mátrixhoz való adhéziójának folyamatát, különös tekintettel a VWF áramlási sebességtől függő funkciójának jellemzésére
- Molekuláris mechanikai méréseket végzett a VWF molekula doménszerkezetének funkcionális jellemzéséhez, hangsúlyosan a kollagén-, VWF- és trombocita interakcióra, melyhez kifejezetten modern vizsgálóeljárásokat is alkalmazott (mint pl. atomerő mikroszkópia, áramlási citometria energia transzfer).
- Funkcionálisan jellemzett anti-VWF monoklonális antitestet, és megállapította, hogy az a VWB 2B típusához hasonló molekuláris eltéréseket okoz annak az A1-es doménjéhez kapcsolódva.
- Feltárta a pióca nyálából izolált calin VWF-kollagén kölcsönhatásra gyakorolt gátló hatását artériás áramlási körülmények között.

- Bakteriofágok segítségével végzett peptid-térképezés során azonosított olyan inhibitorokat, melyek képesek a trombus képződés gátlására
- A trombin aktivitásának gátlására alkalmas oligonukleotid szerkezetű aptamereket vizsgált és bizonyította azok trombus képződést gátló aktivitását
- Klinikai vizsgálatokban alkalmazta a VWF és trombocita funkció jellemzése során beállított metodikákat. Egy beteg kivizsgálása során GPIb ellenes autoantitesteket azonosított, és kardiovaszkuláris betegségekben (stroke, krónikus szívelégtelenség, preeclampsia), ill. májcirrhosisban értékes adatokat szolgáltatott a VWF faktorra és annak processzálasát végző metalloproteázra vonatkozóan.

Összefoglalás, javaslat

Tekintettel arra, hogy jelölt kiemelkedően sikeres munkacsoportot vezetett az elmúlt csaknem 20 évben, korábbi tudományos fokozata megszerzése óta végzett önálló munkássága magas színvonalú és kellően bizonyított, valamint a fent felsorolt pontok vonatkozásában új, hiteles és eredeti tudományos megfigyelésekkel járult hozzá a hemosztazeológia fejlődéséhez, javaslom az értekezés nyilvános vitára tűzését, és sikeres védelem esetén részére *az MTA doktora* cím odaítélését.

Prohászka Zoltán

Budapest, 2012-08-21

MTA doktora

Semmelweis Egyetem, III. Sz. Belgyógyászati Klinika, Kutatólaboratórium

Tel.: (1)-3551122/7379 vagy 06-20-8250962 FAX: (1)-2129351

e-mail: prohoz@kut.sote.hu