

Bírálat

Veres Gábor MTA doktori munkájáról

A Jelölt gyermek-gasztroenterológusként több mint egy évtizede elkötelezett az *immunmediált gasztroenterológiai kórképek* kutatása terén. Jelenleg benyújtott MTA doktori értekezésében a colitis ulcerosa, a coeliakia és az allergiás colitis epidemiológiájára, patogenezisére, diagnosztikájára vonatkozó vizsgálatainak az eredményeit mutatja be.

A munka nagy volumenű: 199 gépelt oldalt, 41 kitűnő ábrát, 31 informatív táblázatot és 358 irodalmi hivatkozást tartalmaz. Minőségét pedig jelzi, hogy összesen 41 lektorált dolgozaton alapul, köztük 13 idegen nyelvű, nívós nemzetközi folyóiratban megjelent közleményen, amelyek össz. impaktfaktora 35.404.

Az értekezés egyes fejezeteiről:

Az **I. Előzmények és irányvonal** címmel Veres dr. 2 oldalon arról ír, hogy miként jutott el a három immunmediált gasztroenterológiai betegség értekezésben foglalt tanulmányozásáig.

A **II. Bevezetés** c. fejezet (30 oldal) 1. részében a **colitis ulcerosa (CU)** és **Crohn** betegség (CD) epidemiológiáját, genetikáját, klinikai formáit, extraintestinalis tüneteit, diagnosztikáját és terápiáját foglalja össze, különös tekintettel a gyermekkori esetekre és értekezés eredményeivel való kapcsolatokra.

Új típusú autoantitestek közül a CD-ben felfedezett *pancreas* (proteoglikán) *elleni (PAB)*, és felnőttkori colitis ulcerosában leírt *kehelysejt elleni* antitest (**GAB**) diagnosztikai jelentőségét eddig gyermekkori IBD-ben nagyobb esetszámban, prospektív tanulmány keretében nem vizsgálták. Hasonlóan, a *mannózkötő lektin, (MBL)*, mint fontos mintázat-felismerő molekula és a kórokók fagocitózisában szerepet játszó védelmi tényező szerepét sem tanulmányozták. (Ennek hiánya a fertőzésekkel szembeni fogékonyságra vezet).

Az értekezés szempontjából fontos kérdésként vetődik fel gyermekkori CD-ben a *felső endoszkópia* differenciáldiagnosztikai jelentősége.

A II/2. részben a **coeliakia** patomechanizmusát, makroszkópos és mikroszkópos képét, a mucosalis barrier, a claudinok és a hősokk proteinek jelentőségét tárgyalja.

A II/3 részben a csecsemők **allergiás colitisét** 2 oldalon foglalja össze.

A II/4. részt Veres dr. az immunmediált gastrointestinalis kórképekben jelentős **sejtes** elemeknek szentelte, a *regulátoros T sejtek, (Treg)* *dendritikus sejtek (DC)*, *monocyták*, *NK* és *NKT* sejtek leírásának, továbbá a toll-like receptorok (TLR) és az intestinális alkalikus *foszfatáz (iAP)* védelmi (a lipopoliszaccharidák detoxifikáló) szerepét vázolta.

A **III.** fejezet tartalmazza a **Célkitűzések** felsorolását.

1. **IBD**-ben egy országos lefedettséget mutató *IBD regisztert* kívánt megszervezni, amely valamennyi hazánkban kórismézett IBD-s gyermeket nyilvántartásba vesz és nyomon követ. Ilyen részletes, prospektív országos regiszter nemzetközi szinten sem ismert.

2. A *felső endoszkópos vizsgálat* szerepét tervezte meghatározni gyermekkori CD-ben.

3. A terápia-rezisztens CD-gyermekekben kívánta felmérni a monoklonális TNF- α antitest (*Infliximab*) *kezelés sajátosságait*.

4. Az új típusú szerológiai markereknek (MBL, PAB, GAB) fenotípussal, aktivitás indexszel és extraintestinalis tünetekkel való korrelációját kívánta vizsgálni, és a

5. *Toll-like receptorok* expresszióját meghatározni IBD gyermekek colon nyálkahártyájában.

6. Az intestinális alkalikus foszfatáz és a TLR4 lokalizációját tanulmányozta IBD-betegek colon nyálkahártyájában.

Coeliakiában a *claudinok*, az *iAP* és a *HSP72* elemzését duodenom hisztológiában, újonnan diagnosztizált és glutenmentes diétát tartó gyermekekben végezte el.

Allergiás colitisben a jellemző laboratóriumi és kolonoszkópiás elváltozásokat, valamint az *immunfenotípus* eltéréseket kívánta vizsgálni.

A IV. fejezetben a **Betegcsoportok és módszerek** részletes leírása található (30 oldalon) a célkitűzéseknek megfelelő sorrendben.

IBD

1. Az **IBD regisztert** illetően, 2007 óta jelenleg 27 intézmény részvételével, országos lefedettséggel működik a Jelölt által elindított prospektív gyermek IBD regiszter. Ennek keretében minden nyilvántartásba vett IBD-s gyermek esetén egy 76 paramétert tartalmazó adatlapot töltenek ki, amelyben epidemiológiai, antropometriai adatok, családi anamnézis, kliniai tünetek, laboratóriumi, képalkotó és endoszkópos leletek, aktivitási indexek és kezdeti terápiás eredmények is szerepelnek. (Az Eredmények c. fejezetben derül ki, hogy összesen 420 IBD-s gyermek, 265 CD-s, 130 UC-ás és 25 nem definiálható-IBD-s gyermek került a programba).

2. A **felső endoscopia diagnosztikus** értékének vizsgálatára 237 IBD gyermek adatait elemezték, a regisztráló orvosok véleménye alapján. Diagnosztikus segítséget jelentett CD-ben az aphta, erosio, ulcus és utcakőrajzolat endoszkópos képe, valamint a hisztológiában a granuloma kimutatása.

3. Az **Infliximab** **terápia** prospektív hatásvizsgálata 23 súlyos, **terápia rezisztens** CD betegben történt, a 6. héten értékelték a kezelés eredményét.

4. A **szérum mannózkötő lektin** (MBL) tartalmának meghatározását 107 CD, és 52 UC gyermek, valamint 95 kontroll egyén esetén végezték el, ELISA technikával.

5. Az IBD-ben diagnosztikus szerepet játszó **autoantitestek**, pANCA ASCA mellett új típusú immunológiai markereket is vizsgáltak, mint a pancreas (PAB) és helyesjelt elleni (GAB) antitesteket, (103 CD, és 49 CU beteg mintáiban), indirekt immunfluoreszens technikával. (Említi, hogy transzglutmináz-, ill endomysium ellenes antitesteket is néztek negatív eredménnyel, de úgy látszik, egyéb antitesteket, pl antinukleáris, vagy anti-aktin ellenanyagokat, vagy reuma faktort nem vizsgáltak).

6. **Toll-like receptor** (TLR 2,3,4) meghatározásokat 35 IBD-beteg colon szövetében végeztek, semikvantitativ és real-time reverz transzkripció-polymeráz láncreakció mérésekkel, valamint Western blot technikával.

7. Az **intestinalis alkalikus foszfatáz (iAP)** tanulmányozására a TLR vizsgálatokhoz hasonló módon került sor, immunfluoreszen technikával nézték az iAP és TLR4 ko-lokalizációt 15 IBD-beteg bélbiopsziás mintákban

8. a peripheriás **vérből immunfenotípus vizsgálatokat** kezeletlen (14), hagyományos terápiára reagáló (10) és nem reagáló, ezért Infliximab kezelésben is részesített (12) CD betegek mintáin végezte. Flow citometriával a Treg sejteket FoxP3+ sejtekként azonosította.

Coeliakia

A összesen 33 újonnan felfedezett coeliakiás gyermekben a duodenum bulbusából, illetve a duodeno-jejunalis átmentből vett biopsziákban a vizsgálta a claudin (CLDN) és az iAP expresszióját (mRNS és fehérje) és a TLR4 ko-lokalizációját, a hősokk fehérje (HSP72) mRNS- és fehérje-lokalizációját, PCR és immunfluoreszens módszerekkel. Ezen kívül áramlási citometriával immunfenotípus meghatározások is történtek.

Allergiás colitisben

Laboratóriumi, kolonoszkópiás és immunfenotipizálási vizsgálatokat végzett.

Az V. fejezet a **statisztika elemzés**, a VI. fejezet az **etikai engedélyek** leírását tartalmazza.

Az **Eredmények összefoglalása** c. VII fejezet, (71-116 old.) 45 oldalon, valamint az azt követő a **VIII. Megbeszélés** c. fejezet (118-148 old) 30 oldalon részletesen ismerteti és elemzi a fenti vizsgálatokkal kapott eredményeket. A szöveges részt 30 ábra (grafikonok, immunhisztológiai és immufluoreszens képek), valamint részletes, de áttekinthető 14 táblázat egészíti ki. Engedtesse meg, hogy az opponens a továbbiakban eltekintsen a nagy számú adat és a diszkusszió részletes tárgyalásától.

Az értekezés **IX.** fejezetének megfelelően, a Jelölt **Összefoglalása** alapján, döntően az abban foglaltakkal egyetértésben, az opponens véleménye szerint az alábbiak tekinthetők a munka eredményeiből levonható legfontosabb, és újnak tartható megállapításoknak:

1. Mindenekelőtt hangsúlyozandó Veres dr. tudományszervezői tevékenységének jelentősége, nevezetesen - az IBD-ben folyó tudományos kutatások alapjául is szolgáló - *országos gyermekkori IBD regiszter* létrehozása és működtetése. Elsősorban ennek is köszönhető az értekezés első megállapítása, miszerint Magyarországon az IBD gyermekkori incidenciája $7,48/10^5$. (CD-ben $4,72/10^5$ míg CU-ban $2,32/10^5$).

A hazai Crohn-betegek tizede fisztulával jelentkezik. Az IBD-s gyermekek fele a diagnózis felállításakor a betegség *középsúlyos* formájába tartozik, egy éves nyomonkövetés után ez az arány a tizedére csökken.

2. A *felső endoszkópia* (fekély, erosio, aphta, granuloma igazolása) CD-s gyermekek harmadában segíti a diagnózis felállítását, perdöntő szerepet azonban ennél kisebb arányban, a betegek egy tizedében játszik.

3. Az országos felmérésben *Infliximabra* a CD-s -gyermekek 82%-a kedvező terápiás választ mutatott, a fisztulák 70 %-a bezárult.

4. A *mannóz kötő lektin* (MBL) szérum koncentrációk a kontrollhoz képest szignifikánsan alacsonyabbak - és az alacsony MBL szintű gyermekek aránya is nagyobb - IBD-betegekben. CD-ben az alacsony MBL szérum szint izolált ilealis érintettséggel társul.

5. A *pancreas antitestek* (PAB) előfordulása szignifikánsan magas IBD-ben, de a teszt érzékenysége alacsony. Antitest-kombinációk esetén, azonban a PAB és ASCA/pANCA együttes vizsgálatával a *szenzitivitás* CD-ben 87.4%, UC-ben 79.6%, ekkor a *specifitás* 89% CD-ben és 93.2% UC-ben.

A *kehelysejt elleni antitest* (GAB) gyakori ugyan UC-ben, klinikai jelentősége azonban nem állapítható meg.

6. A *TLR2 és TLR4 expressziója* IBD gyermekek gyulladt colon mucosájában magasabb, mint az ép nyálkahártyában. A CD aktív szakában a TH1 prevalencia csökkent, az aktivált lymphocyták, a TLR2/TLR4+ dendritikus és a memoria sejtek aránya magasabb.

7. Az *intestinalis alkalikus foszfatáz* (iAP) expresszió IBD-és valamint coeliakiás betegek mucosájában is csökken. Intraepitheliálisan kimutatható volt az iAP és TLR4 együttes lokalizációja. Az alacsony szöveti iAP enzim szint csökkent LSP detoxifikációval jár, ami szerepet játszhat mindkét kórképben.

8. A *claudinok* (CLDN2 és CLDN3) mucosalis expressziója coeliakiában fokozott, aminek jelentősége van a fokozott bélpermeabilitásban és boholykárosodásban.

A HSP72 expresszió coeliakiás gyermekek duodenalis mucosájában magas, glutenmentes diétára azonban normalizálódik.

9. Coeliakiás gyermekek peripheriás vérében a *Th12* és *NK sejtek* aránya alacsonyabb, az aktivált CD4⁺ T sejtek, myeloid- valamint a TLR2⁺ és TLR4⁺ dendritikus sejtek aránya magasabb. Glutenmentes diéta után a legtöbb eltérés normalizálódott, bár a veleszületett immunitás sejtjes elemeinek az eltérései megmaradtak, egyedül a dendritikus sejtek TLR4 expressziója normalizálódott.

Kérdések

1. Megfelelő infrastrukturális feltételek és etikai engedélyek birtokában nem lenne-e lehetőség az IBD-regisztert **génbank** (vagy legalább **szérum bank**) létrehozásával összekapcsolni?

2 Megállapítható-e pl. az IBD regiszter adatai (IBD betegek hasi ultrahang vizsgálata) szerint - a májba történő magas LSP beáramlás alapján - a **steatosis** gyakorisága IBD-ben?

3. A **pancreas antitest (PAB)-pozitív** IBD-gyermekek esetén nem vetődött-e fel annak az indokoltsága, hogy ezeket a betegeket, illetve családtagjaikat megvizsgálják autoimmun pancreatitis, illetve I-típusú diabetes irányában? Van-e adat arra, hogy a PAB autoimmun pancreatitisben előfordul-e? PAB-pozitív betegekben más autoantitesteket, pl ANA, anti-aktin vagy parietalis sejt ellenes antitesteket vizsgáltak-e?

4. A **mannózkötő lektin** (MBL) meghatározásának IBD-ben lehet-e prognosztikai jelentősége, lehet-e a MBL a terápiás válasz prediktora? Ajánlható-e bevonni ezt a markert a „immunológiai panelbe?” Milyen a teszt „rutinban” való kivitelezhezősége és költség-vonzata (cost/benefit?)

5. **Anti-TNF** kezelés hatására CD-ben változott-e a TLR4 expresszió?

6. Az **intestinalis AP** tabletta (iAP) LSP-szint csökkentő kedvező hatása fokozható lenne-e az antibakterialis *rifaximin* együttlátásával IBD-ben?

7 CU-ban a **pANCA-pozitív** és pANCA-negatív betegekben különbözött-e az IBD klinikuma, aktivitás, prognózis stb? A **pANCA-pozitív** gyermekekben vizsgálták-e a szerum GGT és ALP értékét (primer sclerotizáló cholangitis, PSC irányában)? PSC-vel szövődött IBD esetekben történt-e májbiopszia, és az igazolt PSC-betegekben az IBD lefolyása, prognózisa eltért-e a PSC nélküli betegektől?

8. **Coeliakiás betegekben** milyen gyakran találták az *autoimmun hepatitisszel* való társulást? Ezzel kapcsolatban érdemes lenne-e nézni coeliakiában az anti-aktin és anti-SLA (máj-specifikus solublis antigen elleni antitest) előfordulását?

9. A **regulátoros Tsejt** (regT) **alacsony** prevalenciájával járó IBD-esetekben nem figyelték-e meg más *autoimmun kórképek* prevalenciájának a megnövekedését?

Összefoglalva

Veres Gábor MTA doktori értekezésének témaválasztása indokolt, tartalmi és formai kivitelezése példaszerű, nagy volumenű, magas szintű klinikai immunológiai kutatás eredményeit, hiteles adatokat tartalmaz, számos eredeti megfigyeléssel. Az alkalmazott módszerek korszerűek, alkalmasak a feltett kérdések megválaszolására.

Az eredményekből levont következtetések megalapozottak.

Az értekezés alapját képező dolgozatok lektorált, színvonalas hazai és nemzetközi folyóiratokban jelentek meg.

A munka sok ismerettel gazdagította tudásunkat az immunmediálta gasztrointesztinalis kórképek epidemiológiáját, patogenezisét és diagnosztikáját illetően. Az új adatok jelentősen gyarapították a tudomány szakot, hozzájárultak a tudomány fejlődéséhez.

Mindez indokolta teszi a Pályázó kérését az MTA doktori cím elnyerésére.

Javaslom az értekezés nyilvános vitára bocsátását, és sikeres védelem esetén Veres Gábor számára az MTA doktori cím odaítélését.

Pécs, 2013. augusztus 6.

Pár Alajos
az MTA doktora