

Bírálat

Dr. Nagy György

„Patogenetikai tényezők vizsgálata rheumatoid arthritisben és szisztémás lupus erythematosusban”

c. MTA doktori értekezéséről

A disszertáció a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet és a Budai Irgalmasrendi Kórház együttműködésének eredményeként készült, így a jelölt munkája kiemelkedő példája a klinikum és az alapkutatásokkal foglalkozó intézetek közötti kiváló kooperációnak. Az immunpatogenezisű kórképek napjainkban azok a betegségek, ahol a legszorosabbak az összefüggések az alapkutatás, klinikai kutatás és ezek eredményeinek felhasználásával a gyógyszerfejlesztés és gyakorlati alkalmazás között. Ezen betegségek közül emelt ki kettőt a jelölt, az egymáshoz több hasonlóságot, ugyanakkor több különbözőséget is mutató rheumatoid arthritist (RA) és szisztémás lupus erythematosust (SLE). Az alapkutatások egy olyan több évtizedes kiemelkedő kutatómunkával jellemezhető intézetben történtek, ahol gyakorlatilag töretlen a munka folyamata, az egymást váltó generációk megakadás nélkül folytatják a minőségi kísérleteket, fokozatosan beépítve az újabb modern vizsgálómódszereket. A jelölt ebbe a munkacsoportba már több mint 15 éve becsatlakozott és ehhez tette hozzá a klinikai gyakorlati munkából szerzett tapasztalatait.

Általános bírálat

Formai szempontok

Az értekezés formai szempontból megfelel a doktori művekkel szemben támasztott kritériumoknak, a szerző világosan tagolt fejezetekben tárgyalja témájának alapjait, hátterét. A „Célkitűzések” rövid pontokba szedése helyett célszerűbb lett volna egy-két mondattal utalni is arra, hogy miért került az adott vizsgálat kiválasztásra. Így az olvasó már előre átláthatta volna a vizsgálatok összefüggését, nemcsak a „Megbeszélés” fejezetek áttekintésekor. A „Módszerek”, „Eredmények” fejezetekben következik a mű lényegi része, minden egyes „eredmény-fejezet” után aktuálisan a megbeszéléssel. A disszertációt „A tudományos eredmények összefoglalása és azok gyakorlati jelentősége” zárja. A munkához 227 adekvát tételt felsoroló irodalmi hivatkozást használt. Az irodalmi hivatkozások jórészt a megjelent cikkeknek megfelelően említettek, így természetesen a cikk megjelenésének évéig tartó adatokat összegezve. Néhány helyen hiányolom a cikk megjelenését követő eredmények megemlítését az adott témában, ami belefért volna a jelen értekezésbe (pl. természetes antitestek SLE-ben).

A mű magyar nyelven, összesen 116 számozott oldalon készült el (Irodalomjegyzék és „Köszönetnyilvánítás” nélkül), melyet 52 számozott ábra és 1 táblázat illusztrál. Formai szempontból a kifogásom, hogy az ábrák, az ábrákon szereplő tengelyek és feliratok sokszor elmosottak, nehezen láthatóak. Az 1. ábra említése nem szerepel magában a szövegben. Rendszeres, hogy egy adott oldalon szereplő ábra alatt már a következő számú ábra szöveges leírása szerepel (pl. 76, 77, 78, 86, 87. oldal). Célszerűbb lett volna a szöveg és a releváns ábra egy oldalra rendezése a jobb átláthatóság miatt.

A dolgozat nyelvezete egységes, a szöveg jól követhető, csupán néhány elütés maradt dolgozatában melyek részletezésétől eltekintek, ugyanis ezek a szöveg értelmezését nem zavarják.

Scientometriai szempontok

A scientrometria kiemelkedő: A jelölt munkásságának össz-impakt faktora 182,6, összes citációk száma 1280, ebből független 1051. Az értekezés alapjául szolgáló 29 közlemény impakt faktora 129,85, ezek közül a jelölt 9-ben első és 5-ben utolsó szerzőként szerepel. Mindez messze meghaladja az elvárt értéket és egyben azt is jelenti, hogy a szerző többségében minőségi, lektorált folyóiratokban közölt, így az érdemi kritikai bírálat tulajdonképpen a cikkek megjelenése előtt megtörtént. (Megjegyzésem, hogy érdemes lett volna a disszertáció alapjául szolgáló közlemények mellé közvetlenül feltüntetni az impakt faktort). Talán jó lett volna a kiemelkedő eredmények közzlése a nemzetközi irodalom mellett magyarul is a hazai érdeklődők számára.

Részletes bírálat, kérdések

A „Bevezetés” részletes áttekintést ad az alap immunológiai háttérrel. Egy kicsit hiányolom a célkitűzések választásának megfelelő téma részletesebb kifejtését irodalmi háttérrel (pl. lehetett volna kicsit többet írni a természetes autoantitestekről rendelkezésünkre álló adatokról RA-ban, SLE-ben vagy a SLAP szerepét jobban kiemelni, ha már az eredmények jelentős része ezzel foglalkozik). A célkitűzések és az elvégzett vizsgálatok szerteágazóak és csak egy részük történt közvetlenül a választott két betegségben (RA és SLE). Ugyanakkor a munka jelentős része olyan kísérleteket ölel fel, aminek eredménye közvetve vonatkoztatható az autoimmun betegségekre (pl. tumorszöveten végzett vizsgálatok, HDC-KO egér T-lymphocytáinak NO termelése). A módszerleírások pontosak, részletesek megfelelő hivatkozásokkal ellátva, a jelölt jártasságát mindenképpen jelzik. Az eredmények fejezetben minden egyes kísérleti munkát követ megbeszélés, ami nagyban segíti a megértést, tekintettel az igen széleskörű vizsgálatokra. Megjegyzésem, hogy az eredeti

cikkek diszkusszióiban sokkal több felvetés van, a jelen disszertációban ezek időnként csak esetlegesen említettek és nem mindig komplex összefüggésben. Kicsit jobban ki kellett volna hangsúlyozni az eredmények jelentőségét, összevetve az eddig ismert adatokkal, betegség jellemzőkkel, nemcsak a megbeszélésben ismét felsorolni a talált eredményeket.

1. A természetes autoantitestek vizsgálata során RA-ban szignifikánsan emelkedett a szérumban anti-GAG antitestek szintje mind a kontrollhoz, mind az RA-s synovialis folyadékhoz képest. Az eredeti cikk alapján az anti-CS C IgM inverz korrelációt mutatott a betegség aktivitással, a DAS28 értékkel és CRP-vel. Ugyanakkor ez nem szerepel az értekezésben, ami klinikai szempontból fontos lett volna, mivel erre támaszkodik a megbeszélés végén a következtetés is.

Mi lehet a magyarázat az anti-GAG antitestek védő szerepre vonatkozóan, úgy, hogy a szérumban magasabb a titer mint a synovialis folyadékban?

GAG ürül a porcszövetből gyulladáskor a synoviumba illetve kijuthat a szérumba. Van-e különbség a szérumban és synoviumban a GAG szint között?

A természetes autoantitestek szerepére vonatkozóan van-e új irodalmi adat SLE-ben?

2. Érdekes eredmény a galektin-8 TT polimorfizmus RA-ra hajlamosító antagonisztikus pleiotrop hatása (fiatal korban védő, idősebb korban hajlamosító).

Van-e más gén RA-asszociációban a galektin 8 génnel együtt, ami még befolyásolhatja a kettő együttes hatását?

3. A citrullináció immunogenitásának vizsgálata tüdőrákban alapvető kutatás, ahol RA-s minták csak kontrollként szerepelnek. Az alapfolyamat a dohányzás hatására bekövetkező PAD4 aktiváció, majd a fehérjék ezáltal citrullinációja. A PAD4 szérumszintje emelkedett volt a dohányos tumoros betegekben, ugyanakkor nem volt különbség a dohányos és nem dohányos betegek tumorszövetein kimutatott PAD4 és CK7 expresszió között. Hogyan magyarázható a folyamatban a PAD4 szérumszint és szöveti expresszió mértékének szétválása? Vannak-e RA-ban adatok a PAD4 szintre vonatkozóan? Ha igen, lehet-e különbség benne olyan RA-s betegek esetében, akiknél például van vagy nincs pulmonalis manifesztáció az RA-hoz társulva?

A citrullint tartalmazó filaggrin peptidok antigenitásának vizsgálata nagyon jó irányt mutat arra nézve, hogy hogyan lehet az antitest status felmérését finomítani RA-ban, tovább csökkentve a szeronegatív betegek arányát. Klinikailag különbözhetnek-e az RA-s betegek,

attól függően, hogy a szérumaik különböző citrullinált peptidekkel reagálnak (pl. filaggrin, vimentin vagy kollagénnel)?

SLE-ben elsősorban arra van adatunk, hogy polyarthritisz esetén milyen gyakorisággal fordul elő ACPA antitest. A citrullináció folyamatára vonatkozóan van-e más szervi manifesztációra vonatkozó adat SLE-ben?

4. Az anti-C1 inhibitor vizsgálata SLE-ben kissé kilóg az egész munka koncepciójából. Tulajdonképpen egy publikáció anyaga, ahol a szerző társszerző (nem első vagy utolsó szerző). Az eredmény érdekes, de önmagában a munka e nélkül is teljes értékű lenne. A vizsgált autoantitest szintje magasabb títert mutatott hosszabb betegségfennállás és magasabb SLEDAI index mellett, de nem korrelált az SLE szervi manifesztációival. Hova helyezi a jelölt az anti-C1 inhibitor meghatározást a klinikai gyakorlatban?

5. A NO szerepének a vizsgálata igen szépen, következetesen felépített vizsgálat, amely során a jelölt megerősítette, hogy a T-lymphocyták aktivációjában a NO mitokondrium membrán hyperpolarizációt indukál. A kísérletekben az eNOS és nNOS 15x emelkedést mutatott a T sejt aktivációkor, de nem mérhető iNOS aktiváció. SLE-ben vizsgálva a folyamatot azonos nyugalmi NO szint igazolódott az SLE-s és kontroll T-sejtekben, míg RA-ban magas volt a sejtek NO termelése. Emellett az SLE-s T-sejtek több és nagyobb mitokondriumot tartalmaztak a kontrollhoz képest, míg RA-ban nem volt nagyobb a mitokondrium mennyiség. Milyen patogenetikai szerepe lehet ennek a különbségnek a két betegség pathogenezisében? Érdekes az a megfigyelés is, hogy az SLE-s monocytákban magasabb volt a NO szintézis, de nem volt hasonló vizsgálat RA-s monocytákkal. Ismert-e adat ezzel kapcsolatban és lehet a két betegség között ebben is különbség, tekintettel arra, hogy az RA pathogenezisében nagyobb szerepet játszanak a monocyták mint SLE-ben?

Az eltérő NO termelésnek ismert-e szerepe az RA és SLE-hez társuló accelerált arteriosclerosisban?

Infliximab kezelés mellett 6 hét alatt csökkent a betegekben a T-lymphocyták NO termelése. A vizsgálat 5 betegen történt. Van-e azóta több irodalmi adat erre vonatkozóan?

6. A hisztamin szerepének vizsgálata HDC-KO egértörzs T-lymphocytáin történt, ahol a kontroll vad törzshöz képest nem volt különbség a T-lymphocyták eNOS, nNOS és iNOS kifejeződésében, de stimulálásra fokozott volt a sejtek IFN- γ termelése. Az RA és SLE vonatkozásában a megbeszélés rész felveti a hasonlóságokat a kísérleti eredmények és a

betegségek pathogenezeise között. Milyen tényleges adatok állnak rendelkezésre az eredmények megszületése óta az irodalomban a hisztamin illetve a hisztamin receptorok szerepére vonatkozóan arthritisben vagy SLE-ben. A T-sejt subpopulációk között van-e olyan alcsoport, aminek működését fokozottabban befolyásolhatják a hisztamin receptoron keresztüli válaszok (pl. Th-17 sejtek)?

7. A CD3- ζ -expresszió vizsgálata humán T-sejteken és Jurkat sejteken történt, ahol a TNF- α dózisfüggő módon csökkentette a CD3- ζ -lánc expressziót. A folyamatot a SLAP szabályozza, amely a CD3- ζ -lánc proteosomalis degradációját indukálja és kimutatható volt a SLAP + CD3- ζ kolokalizációja. RA-s sejteken csak a SLAP expresszió vizsgálta történt, talán szemléletesebb lett volna itt is együtt nézni a CD3- ζ expresszióval, még akkor is, ha ez RA-ban már volt vizsgálva az irodalomban. A TNF- α mellett van-e szerepe a SLAP expresszió befolyásolásában az RA-ban szereplő más domináns gyulladáscsökkentő citokinnek (pl. IL-6)?
8. Lényeges kérdést vizsgál a glikozidázok szerepére vonatkozó kísérletsor RA-ban. A tesztelt glikozidázok szintje magasabb volt az RA-s synovialis folyadékban, ami megfelelt korábban ismert adatoknak. Emellett igazolódott, hogy a TGF- β és TNF- α gátolta több glikozidáz enzim kifejeződését (a két citokin nem egyforma eloszlásban).
A munkában 31 RA-s beteg mintáit vizsgálták, akiknél a betegség aktivitás közepes/magas volt (átlag We 28 mm/h, CRP 22.16 mg/l). Milyen terápián voltak ezek a betegek – csak DMARD vagy biológiai terápia is? Van-e arra adat, hogy a gyakorlatban alkalmazott TNF- α gátlók befolyásolják-e a glikozidázok kifejeződését?
9. Az utolsó eredmény részben a jelölt igen szép munkáját mutatja meg az extracelluláris vezikulák kimutathatóságára, a vizsgálat érzékenységére vonatkozóan. A betegségekkel kapcsolatos vizsgálatban a CD3+ és CD8+ microvezikulák (MV) száma az RA synovialis folyadékban volt magasabb az arthrosishoz képest, míg nem volt különbség a CD4+ MV számban. RA-ban és arthrosisban pedig magasabb volt a CD19+ MV szám JIA-hoz képest. A T- és B-lymphocytá eredetű MV-k száma korrelált a RF szintjével.
A bevont RA-s betegek átlag DAS28 értéke elég magas volt (5.69). Befolyásolja-e a synovialis folyadék MV tartalmát a gyulladáscsökkentő aktivitás illetve maga a tradicionális vagy biológiai DMARD kezelés?

A JIA-ban kapott eltérő eredmények az RA-hoz képest vajon csak annak tudhatóak be, hogy a betegek oligoarticularis formájú JIA-val bírtak vagy egyébként is lehet a MV-nak eltérő patogenetikai szerepe a JIA és RA vonatkozásában?

Az ugyancsak vizsgált RANK, RANKL+ MV jelezhetik-e az erózió folyamat mértékét RA-ban?

Milyen egyéb microvesiculákkal kapcsolatos vizsgálatokat tervez a jelölt a munka folytatásaként?

Az értekezésben leírt számos új tudományos megfigyelés közül az alábbiakat tartom a legjelentősebbeknek:

1. Az anti-GAG természetes autoantitestek szintje magasabb az RA betegek szérumában az egészséges kontrollokhoz képest.
2. A galektin 8 TT genotípus 50 évesnél idősebb egyéneknél hajlamosít RA-ra.
3. A citrullinált proteinek és az emelkedett PAD4 szint nem feltétlenül vezet citrullinált proteinek elleni antitest termeléshez tüdőrákos betegek mintáinak vizsgálata alapján.
4. Megállapította, hogy az SLE-s T-lymphocyták NO termelése nem emelkedett, szemben a RA-s T-lymphocyták fokozott NO termelésével. Ugyanakkor SLE-s betegek monocytáinak NO termelése fokozott. A gyors Ca^{2+} szignál nagyobb, a fenntartott kisebb SLE-s betegek T-lymphocytáiban a kontrollhoz képest.
5. HDC-KO egerekben kimutatta, hogy a lépsejtek $IFN-\gamma$ termelése szignifikánsan emelkedett a vad típusú állat lépsejtjeihez képest és hogy az $IFN-\gamma$ termelés gátolható NOS inhibitorral, ami jelzi, hogy a hisztamin az NO szabályozás révén befolyásolja a T-lymphocyták funkcióit.
6. Kimutatta, hogy a $TNF-\alpha$ dóziszfüggő módon, szelektíven és reverzibilisen csökkentette a CD3- ζ -lánc expressziót humán CD4 T-sejteken illetve, hogy az RA-s betegek SLAP expressziója magasabb a kontrollhoz képest.
7. Elsőként mutatta ki, hogy a synovialis mintákban mérhető galaktózaminidáz-aktivitás jelentős részéért a nem hőérzékeny HexD enzim a felelős.
8. Gyakorlatban is jól alkalmazható módszert fejlesztett ki a microvesiculák kimutatására.

Tekintettel arra, hogy jelölt kiemelkedően sikeres munkacsoport tagjaként végzett önálló kutatómunkát az elmúlt évtizedekben, korábbi tudományos fokozata megszerzése óta végzett önálló munkássága magas színvonalú és kellően bizonyított, valamint új, hiteles és eredeti tudományos megfigyelésekkel járult hozzá elsősorban az RA-val, részben pedig az SLE-vel kapcsolatos pathogenetikai kutatások fejlődéséhez, javaslom az értekezés nyilvános vitára tűzését, és sikeres védés esetén részére az *MTA doktora* cím odaítélését.

Debrecen, 2015. február 15.

Dr. Szűcs Gabriella
az MTA doktora
Debreceni Egyetem
Belgyógyászati Intézet
Reumatológiai Tanszék