

**Válasz Prof. Dr. Széll Mártának**  
Dr. Nagy György MTA Doktori Értekezésére adott opponensi  
véleményére

Köszönöm Prof. Dr. Széll Márta alapos bírálatát, kritikai észrevételeit. A megfogalmazott kérdésekre az alábbiakban válaszolok:

A kórképek egy-egy pathogenetikai aspektusáról csak a legfontosabbakat kiemelve, összefoglalóan értekezik. Egyes alpontokban, bekezdésben azonban olyan alap immunológiai, tankönyvi adatokat ad meg a Jelölt - minimális információval az SLE-re és/vagy az RA-ra vonatkozóan - amelyek talán nem kellene, hogy egy akadémiai doktori értekezés részét képezzék.

Munkám során az SLE és az RA kialakulásában résztvevő különböző patogenetikai tényezőket vizsgáltam munkatársaimmal. A bevezetésben az autoimmunitás patomechanizmusáról írtam, a genetikai, környezeti tényezőktől a betegség tüneteig, illetve a szervkárosodást kiváltó okokig, érintve az értekezésben később tárgyalt témákat. Az eredmények is hasonló sorrendben olvashatóak az értekezésben. A különböző témák közötti összekötő kapocs, hogy valamennyi köthető a két vizsgált autoimmun kórképhez.

Hiányoltam az Irodalmi háttér részéből a tüdőrákokkal kapcsolatos, a Jelölt saját munkája szempontjából releváns alapinformációkat; dolgozatának egy viszonylag terjedelmes része ezzel a kórképpel foglalkozik, véleményem szerint valamennyi terjedelmet ennek a témának is kellett volna szentelnie.

Tüdőrákban fokozott a daganatos szövet citrullinációja, gyakori a paraneoplasziás szindróma, mely jelentkezhet polyarthrititis formájában is. A dohányzás központi szerepe jól ismert mind az RA, mind a tüdőrák kóroktanában, és a dohányzás fokozza a citrullinációt a tüdőben. Mindezek miatt vizsgáltuk tüdőrákban a daganatos szövet citrullinációját, az ACPA és RF antitestek termelődését. A tüdőrákos munka során tehát alapvetően azt vizsgáltuk, hogy a citrullinált fehérjék ellen termelődnek-e antitestek, így ez a munka is az autoimmunitás egyik tényezőjének a vizsgálata, ezért nem szerepel a tüdőrák tárgyalása az autoimmunitás patomechanizmusát bemutató bevezető részben. A citrullináció jelentősége, folyamata az „Irodalmi háttér” részben, az „Autoantitestek RA-ban” 3.2.3.1.c. fejezetben részletesen le van írva.

Az anti-citrullinált protein ellenes ellenanyag (ACPA) jelentősége az RA prognózisában ismert, jelent-e ez terápiás indikációt is? Esetleg már enyhébb klinikai tünetek mellett is megkezdett biológiai terápiát?

RA-ra specifikus, de ritkán más betegségekben vagy egészségesekben is előfordulhat ACPA, a betegség 2010-es klasszifikációs kritériumainak is a részét képezi. Az ACPA-pozitivitás rossz prognosztikus tényező, de önmagában nem jelent betegséget és nem jelent terápiás indikációt. Hazánkban csak kombinált szintetikus bázisterápiás kezelés mellett is kifejezetten aktív betegség esetén indítható biológiai terápia [ha a betegség klinikai aktivitásának mérésére használt *disease activity score* (DAS28) >5,1], de ez alapvetően finanszírozási kérdés, hiszen a biológiai terápiák igen költségesek, évente betegenként 2-3 millió forintba kerülnek. Újabb ajánlások szerint enyhébb betegségaktivitás esetén is indokolt lehet a biológiai terápia alkalmazása [Smolen JS et al. **Ann Rheum Dis.** 2014, Mar;73(3):492-509.]. Jelenleg zajlanak olyan placebokontrollált vizsgálatok, amelyek során azok az ACPA-pozitív arthralgiás betegek, akiknél még nem állítható fel az RA diagnózisa, kapnak CD-20-blokkoló rituximab-, vagy T-sejt gátló abataceptkezelést és azt vizsgálják, hogy így csökkenthető-e a betegség kialakulásának a kockázata.

Milyen mértékben épült be a genetikai információ ismerete az RA diagnosztikai algoritmusába az USA-ban, Európában, illetve nálunk?

Jelenleg az RA klasszifikációs kritériumainak, amelyeket világszerte így hazánkban is alkalmaznak, a genetikai háttér vizsgálata nem képezi a részét [Aletaha D et al. **Arthritis Rheum.** 2010, Sept;62(9):2569-81.].

A Jelölt ismerteti, hogy a citrullinálás folyamatában fontos a peptidil-arginin deamináz enzim<sup>4</sup> (PAD4). Ismert-e olyan polimorfizmusa a PAD4 génnek amely RA-ban hajlamosít, esetleg protektív?

Számos PAD4 polimorfizmus szoros korrelációt mutat az RA-val (padi4\_92; padi4\_94; padi4\_104; padi4\_95; padi4\_97; padi4\_99; padi4\_100; padi4\_101). A padi4\_89; padi4\_90; padi4\_92 és padi4\_104 polimorfizmusok fokozhatják a PAD4 mRNS stabilitását, ami fokozott PAD4-kifejeződéshez vezethet. [Suzuki A et al. **Nat Genet.** 2003, Aug;34(4):395-402.; Vossenaar ER et al. **Arthritis Res Ther.** 2004, 6:1-5.]. Az ízületekben synovitis során citrullint tartalmazó proteinek mutathatók ki, a citrullinált fibrin, a citrullinált vimentin, továbbá a citrullinált alfa-enoláz indíthatja be és tarthatja fenn az ACPA-termelést. A fibrin a sejtekből a nekrosis során kijutó PAD enzimek citrullinálhatják. A citrullinált proteinek feltehetően alapvető szerepet játszanak a saját antigénekkal szembeni tolerancia áttörésében.

A Jelölt az NO-ról mint pro- és antiapoptotikus ágensről ír és egy 2002-es cikket citál ezzel kapcsolatban. Kérdezném, hogy van-e esetleg frissebb közlemény, amelynek adatai közelebb visznek bennünket ennek a kettős szerepnek a megítéléséhez. Ezzel a témával a Jelölt pályájának elején

foglalkozott, de a dolgozatban érdemes lett volna az ezzel kapcsolatos újabb eredményeket is röviden ismertetni.

Az apoptózis folyamata számos ponton befolyásolható nitrogén-monoxiddal (NO), amely proapoptotikus és antiapoptotikus hatásokkal is rendelkezik. Az NO proapoptotikus hatását vizsgálták *in vitro* krónikus lymphocytás leukaemiában (CLL). Az NO-emittáló acetilszalicilsav (NO-ASA) a CLL-sejtek apoptózisát indukálta, az egészséges sejtek viabilitását ugyanakkor nem befolyásolta [Razavi R et al. Clin Cancer Res. 2011, Jan 15;17(2):286-93]. A ciszplatin melanomás sejtekre kifejtett hatása NO-függő. Az intracellulárisan termelődő NO védi a sejtet a ciszplatin által indukált apoptózistól, így az NO befolyásolhatja a kemoterápiák hatékonyságát [Godoy LC et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012, Dec 11;109(50):20373-8].

A 85. sorszámú cikkben leírt, 2000-ben közölt eredménynek, amely szerint az alternatív konvertáz jobb korrelációt mutat az SLE aktivitásával, mint a C3, C4 és az össz hemolitikus aktivitás lett-e diagnosztikai és/vagy klinikai relevanciája?

Korábbi eredményeink alapján a C3, C4 és az összhemolitikus aktivitás értékénél az alternatív konvertáz [C3b(Bb)P] jobb korrelációt mutat az SLE klinikai aktivitásával [Nagy G et al. Lupus. 2000, 9(1):19-25.] Bár számos más munkacsoport is megerősítette ezeket az eredményeinket, a napi rutin diagnosztikában ma is a legtöbb helyen a C3- és C4-szint-mérést alkalmazzák.

A Jelölt az SLE különböző humán nagyrasszokban való előfordulási különbségeit taglalja és rámutat, hogy a fekete bőrűekben az SLE gyakoribb, mint a kaukázusiakban. Vannak-e olyan génpolimorfizmusok, amelyek eltérő ritka allél frekvenciája (minor allele frequency; MAF) a két nagyrasszban magyarázatot ad erre az eltérésre?

Az SLE genetikai hátterében szerepe van többek között a B- és T-lymphocytá-aktivációt szabályozó, a DNS-metilációban résztvevő a citokin-jelátvitelt szabályozó fehérjéknek. A *tumor necrosis factor alpha-induced protein 3* (TNFAIP3) rs5029953 polimorfizmusa fekete bőrűekben SLE-re hajlamosít, a ritka allél frekvencia 0,184/0,123 fekete bőrű betegekben/egészségesekben, míg ez a polimorfizmus irodalmi adatok alapján fehér bőrűekben nem hajlamosít SLE-re [Lodolce JP et al. J Immunol. 2010, Jun 15;184(12):7001-9.]. Néhány polimorfizmus, többek között a *methyl CpG binding protein 2* (MECP2), *mannose binding lectin-2* (MBL2) gyakoribb a fehér bőrű SLE-s betegekben, mint a fekete bőrűekben, míg a *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA4) és a *signal transducer and activator of transcription-4* (STAT4) polimorfizmus mindkét nagyrasszban SLE-re hajlamosít [Sánchez E et al.

**Arthritis Rheum. 2011, Nov;63(11):3493-501.**] Egészséges fekete bőrűekben az egészséges fehér bőrűekénél alacsonyabb két SLE-vel asszociált polimorfizmus: a *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22* (PTPN22) és a *programmed cell death 1* (PDCD1) ritka alléljainak a frekvenciája (2 vs. 8% illetve 3 vs. 13%) [**Mori M et al. J Hum Genet. 2005, 50(5):264-6**]. Ma még nem ismert részleteiben, hogy mely génpolimorfizmusok ritka allél frekvenciája magyarázhatja az SLE gyakoribb előfordulását fekete bőrűekben mint fehér bőrűekben, természetesen a környezeti tényezők szerepe is meghatározó lehet.

A Jelölt ismerteti, hogy a Rituximab RA-ban igen hatékony, SLE-ben pedig „off label” igényelhető, az idézet 115-ös számú cikk szerint lupus nephritis-ben. A szakma jelenlegi álláspontja szerint csak ez képezheti az indikációt, vagy egyéb, SLE-re jellemző súlyos klinikai tünetek fennállása esetén is javallható az „off label” alkalmazás?

A B-lymphocytá-depletáló rituximab RA-ban igen hatékony gyógyszer. SLE-ben két negatív eredménnyel zárult randomizált kontrollált klinikai vizsgálat alapján a rituximab nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket [**Rovin BH et al. Arthritis Rheum. 2012, Apr;64(4):1215-26.; Merrill JT et al. Arthritis Rheum. 2010, Jan;62(1):222-33.**], ugyanakkor a betegek egy részénél hatékony (off label igényelhető) terápiás lehetőség. Irodalmi adatok szerint lupus nephritis mellett más manifesztációkban (többek között: arthritis, bőr, központi idegrendszeri és haematológiai) is hasznos lehet a rituximabkezelés [**Ezeonyeji AN et al. Rheumatology (Oxford). 2012, Mar;51(3):476-81.; Cobo-Ibáñez T et al. Semin Arthritis Rheum. 2014, Oct;44(2):175-85.**]

A Jelölt azt írja, hogy azokat tekintették nem dohányosnak, akik korábban sem dohányoztak. Ezek szerint azokat is kizárták vizsgálatokból, akik évtizedekkel korábban esetleg letették a cigarettát? Tekinthető-e ez kockázati tényezőnek RA-ban?

Valóban azokat tekintettük nem dohányosnak, akik korábban sem dohányoztak. A dohányzás és az RA kapcsolata évtizedek óta ismert, újabb irodalmi adatok szerint a HLA-DRB1 hordozása és a dohányzás együttesen hajlamosíthat ACPA-pozitív RA-ra [**Klareskog L et al. Arthritis Rheum. 2006, Jan;54(1):38-46.**]. A dohányzás RA-ra hajlamosító szerepe tehát a genetikai háttértől is függ, és feltehetően csökken a leszokást követően, ma még pontosan nem tudjuk, hogy ez a rizikó a leszokást követően visszatérhet-e az egészséges nem dohányos egyénekre jellemző értékre.

„Fibroblast” alfejezeben sejttörzseket említ a Jelölt. Mit ért ez alatt? Ezt a kifejezést nem szoktuk használni, esetleg a sejtvonal kifejezést, ha egy sejt

spontán immortalizálódott, vagy virális fehérje transzformációval mi magunk immortalizáltuk.

Mivel a fibroblastkultúra véges élettartamú, ezért használtuk a sejtörzs kifejezést, a régebbi terminológiát alkalmazva. A jelenleg érvényes terminológia alapján véges élettartamú sejtvonálnak tekinthetők a 4-9 alkalommal passzált fibroblastsejtek [Geraghty RJ et al. Br J Cancer. 2014, Sep 9;111(6):1021-46.].

„Citruillint tartalmazó peptidek szintézise” alfejezet: Kérdésem: Hol történt a peptidek szintézise. Maga a Jelölt is részt vett ebben a munkában valamilyen mértékben?

A peptidek szintézise az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport laboratóriumában történt. A beteganyag biztosítása mellett a kísérletes munka megtervezésében, az eredmények kiértékelésében és a publikációk összeállításában vettem részt. A peptidszintézis laboratóriumi munkálataiban közvetlenül nem vettem részt. A peptidszintézist és a peptidek vizsgálatát többek között egy magyar-francia kutatási pályázat biztosította, amelyben a Budai Irgalmasrendi Kórház részéről témavezetőként vettem részt.

Miért kellett a CRP szintet külön mérni turbidimetriával, nem rutin paraméter ez a vérvizsgálatok során?

A CRP valóban rutin paraméter, azért került sor külön CRP-meghatározásra, hogy biztosak lehessünk abban, hogy az anti-GAG antitestek és a CRP-szintek korrelációját egyazon vérvételi időpontban, egyazon mintában vizsgáltuk, továbbá, mert nem állt minden beteg estében rendelkezésre CRP-adat.

Érdemesnek láttam volna feltüntetni az 1. táblázat fejlécében, hogy az egyes minta kategóriáknál (köldökszínórvér, kontroll szérum és RA szérum) hány mintát vizsgáltak?

A természetes antitestek vizsgálata során 66 RA-s beteg, 55 egészséges kontroll mintáit és 11 köldökszínórból nyert mintát vizsgáltunk.

A galektin-8 gén polimorfizmus vizsgálat eredményének ismertetése során a szövegben az kerül hangsúlyozásra, hogy a teljes beteg populáció és az ACPA (+) betegpopuláció között nincs különbség, a vonatkozó 6. ábrán viszont egy teljes beteg populáció/női populáció összehasonlítást mutat be a Jelölt egy nem túl jó minőségű ábrán (alig kivehetőek a grafikon vonalai). Kérem ennek az ellentmondásnak a feloldását.

A teljes betegpopuláció (6.A. ábra) mellett a női betegeket is ábrázoltuk (6.B. ábra), a teljes betegpopulációhoz így hasonló képet kaptunk. Ebben a vizsgálatban 348 RA-s nő és 60 RA-s férfi vett részt, az alacsony férfi betegszám miatt nem kerültek a férfiak külön ábrázolásra.

Az 50. oldalon a bemutatott immunhisztokémiai festések alapján a citrullináció bizonyos fokú betegség specifikus festődési mintázatát ismerteti a Jelölt. Ez mennyire ismert jelenség? Leírásra került-e más szerzők által is hasonló észlelés?

Különböző rosszindulatú daganatos betegségekben fokozott lehet a daganatos szövet citrullinációja, [Mohan S et al. *Biochem Res Int. Volume 2012, Article ID 895343, 1-11.*; Baka Z et al. *Joint Bone Spine. 2012, (79):, 431-6.*] ezért vizsgáltuk az ACPA-termelést tüdőrákos betegek szérummintáiban. Ugyanakkor eredményeink alapján a citrullinált fehérjék kifejeződése nem volt specifikus a tumoros szövetre, citrullinált fehérjék jelentős mennyiségben voltak jelen a tumoros szövetekben és azok környezetében is. A PAD4- és a CK7-festődés igen jól korrelált, így a PAD4-festés alkalmas lehet a tumoros szövetek elkülönítésére, ezt más munkacsoport is leírta, a mi cikkünk megjelenését megelőzően [Chang X et al. *Mol Carcinog. 2006, Mar;45(3):183-96*]. Érdekes módon, immunhisztokémiai módszerrel vizsgálva, a citrullináció mértéke nem tért el érdemlegesen a dohányos és a nem dohányos betegek mintáiban.

A Jelölt a 6.4.1. alfejezetben a fokozott C1-inhibitor elleni antitest-termelésről ír SLE-ben. Ismert, hogy az ANCA pozitivitás az életkor előre haladtával az egészséges populációban is emelkedik. Igaz-e ugyanez az anti-C1 inhibitor szintjére is?

Az egészséges populációban az anti-C1-inhibitor-szint korrelációja az életkorral nem ismert.

Nem értem, hogy a 19. ábrán miért került feltüntetésre kétszer is az nNOS, erre vonatkozóan sem az ábraaláírásban, sem a szövegben nem találtam magyarázatot. A bemutatott gélkép szemikvantitatív kiértékelésével kapcsolatosan vannak kétségeim, mivel a gélképen egyes „band”-ek nekem túltelítettnek tűnnek, ahol a denzinometrázás eredménye már kérdéses lehet. Például nehezen látom be azt, hogy az eNOS esetében a kontroll és a négy órás H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelt minták közötti különbség 19-szeresnek adódik, míg az nNOS esetében a kontroll és a négy órás H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelt különbség mindössze 3,5-szeresnek. Ezek az értékek számomra nem tűnnek reálisnak.

Az aktint bemutató bloton valóban, halványan, de kivehető az nNOS-nak megfelelő csík is, ezt nem vágtuk le a membránról, ezzel is igazolva, hogy ugyanazon a membránon történt a NOS- és az aktinmérés is. Az eNOS- és nNOS-értékeket enhanced chemiluminescence (ECL) módszerrel, míg az aktint 4-chloronaphthol alkalmazásával hívtuk elő. Az ECL módszer során a fénykibocsátás mértéke több mint ezerszeresére nő, ami lehetővé teszi a proteinek 1-10 pg mennyiségének kimutatását is. A NOS- és az aktindenzitást is Kodak Image station készülékkel mértük le. Ez a módszer lehetővé teszi az aktinra normalizált denzitásértékek pontos leolvasását, ezek az értékek láthatóak a 19. ábrán. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- és a CD3/CD28-kezelés hatását öt független kísérlet során mértük le, minden alkalommal hasonló eredményt kaptunk, az értekezésben egy reprezentatív western blot eredménye látható.

A 6.5.2. alfejezetben a Jelölt bemutatja, hogy az SLE-s betegek T-sejtjei stimulációt követően eltérő mitokondrium potenciállal és mitokondriális Ca<sup>2+</sup> szinttel reagálnak, illetve magasabb mitokondrium számot is tapasztaltak az SLE betegpopulációban. Itt is az a kérdésem, hogy milyen mintaszámmal dolgoztak.

Az NO szerepét SLE-ben 19 betegen (17 nő és 2 férfi), továbbá 11, nemben és korban illesztett egészséges kontrollon vizsgáltuk.

A jelenség magyarázata a Jelölt szerint a monocitákból kiáramló, fokozott mértékben termelődő NO. Ezt az NO-emittáló NOC-18 mimikálni is tudta in vitro. Tehát ha jól értelmezem, SLE-ben a Jelölt a monociták által termelt, emelt mennyiségű NO T-sejtekre gyakorolt hatásárának következményeként bekövetkező mitokondrium szám emelkedést, a mitokondrium membrán potenciál változást és a Ca<sup>2+</sup> szignált értelmezi pathogenetikai tényezőként. A következő alfejezetben (73. oldal; 6.5.3. alfejezet) viszont maguknak a T-sejteknek a fokozott NO termeléséről mutat be eredményeket RA-ban, tehát itt nyilván autokrin hatást vélelmezett a Jelölt, amelyet végül nem támasztottak alá az adatok, mivel a mitokondrium mennyiség megegyezett a kontroll és az RA betegek T-sejtjeiben. Kérdésem: mi lehet akkor a jelentősége az NO-nak az RA pathogenezisében?

A fokozott NO-termelésnek az RA patogenezisében is lehet szerepe, az NO saját eredményeink és irodalmi adatok alapján szabályozza a proinflammatorikus és antiinflammatorikus citokinek termelését [Nagy G et al. *Immunol Lett.* 2007, Jul 31;111(1):1-5.; Guzik TJ et al. *J. Physiol and Pharmacol.* 2003, 54(4):469-87.], és szabályozhatja a T-lymphocytá-differenciálódást is [Niebdala W et al. *PNAS* 2002, 99:16186-91.]. Az SLE-ben és RA-ban is megfigyelhető fokozott NO-termelésnek így eltérő hatásai lehetnek a T-lymphocytákra.

RA-ban magasabb a szérumnitritszint a kontrollokénál, egyes megfigyelések szerint a nitritszint korrelál a betegség aktivitásával és a radiológiai progresszióval. A synovitis során számos sejttípus, így osteoclastok, osteoblastok, makrofágok, fibroblastok, neutrophil granulocyta és endotheliális sejtek is termelhetnek NO-t [Pham TN et al. J Rheumatol. 2003, Dec;30(12):2529-34.; Onur O et al. Rheumatol Int. 2001, May;20(4):154-8.; Nagy G et al. Immunol Lett. 2007, Jul 31;111(1):1-5.]. Eredményeink szerint RA-s betegek T-lymphocytáinak az egészséges kontrollokénál magasabb az NO-termelése, TNF- $\alpha$ -blokkoló kezelés során az NO-termelés csökken. A mitokondriális membránpotenciál és a mitokondriumtartalék az RA-s betegek T-lymphocytáiban az egészséges kontrollokéhoz hasonló.

Hiányosnak találom az ábra feliratozását: Mit reprezentálnak a duplán bemutatott „band”-ek? Technikai ismétlések, vagy esetleg biológiai ismétlések?

A 28. ábrán két HDC-KO és két vad típusú egér lépsejtjeinek IFN- $\gamma$ -termelése látható, RT-PCR módszerrel mérve. A GAPDH kontrollként szolgált.

Ugyanilyen módon hiányosnak vélelmezem a 29. ábrán bemutatott ELISPOT eredmények feliratozását: több egérből származó lépsejt kultúrán végzett kísérletek átlagát mutatja be ezen az ábrán a Jelölt?

A 29. ábra Con-A-val stimulált HDC-KO és vad típusú egér lépsejtjeinek IFN- $\gamma$ -termelését mutatja be, ELISPOT módszerrel mérve. Három független kísérlet eredményeit mutatja az ábra (kísérletenként 3 HDC-KO és 3 vad típusú egér mintáit használtuk), a szórás és a szignifikancia feltüntetésével.

A 6.5.5. megbeszélés részben az SLE-ben és RA-ban végzett, NO pathogenetikai szerepére vonatkozó vizsgálatainak eredményét diszkutálja a Jelölt, és mindeközben számos olyan közleményt citál, amely külföldi kutató csoportok eredményeit ismerteti. Ugyanakkor bennem sajnos nem áll össze a kép, hogy a betegek vizsgálata, illetve az in vitro kísérletek által kapott eredmények arra utalnak-e, hogy a fokozott NO termelés, a mitokondriumok abnormális működése stb. oki tényezői-e az SLE-nek és az RA-nak, vagy következményei, kísérő jelenségei.

A fokozott NO-termelés nem az oka sem az RA-nak, sem az SLE-nek, inkább a két autoimmun betegségben zajló gyulladás kísérő jelensége. Ugyanakkor eredményeink alapján mindkét betegség patogenezisében szerepe lehet a fokozott NO-termelésnek.

A Jelölt a 85. oldalon kezdődő fejezetben azokat az eredményeit ismerteti, amelyekben a TNF-alfa CD3 zéta lánc kifejeződésére gyakorolt hatásait

vizsgálja. A bemutatott kísérletek ismertetése során a 89. oldalon a Jelölt olyan értelemben ír, miszerint a TNF-alfa kezelés a zéta lánc expressziójának csökkentésén keresztül lenne funkcionális hatással a T-sejtekre. Ebben a mondatban éreztem először a Jelölt - véleményem szerint nem helyt álló - megközelítést a „TNF-alfa” – „CD3 zéta lánc” – „T-sejt funkció” meghatározottság kérdéskörében. Erre a szerintem hibás megközelítésre ezt követően a Jelölt a 99. oldalon kezdődő 6.6.2. megbeszélés részben rá is erősít, amikor is a második mondatában a következőket írja: „Munkánk alapján a TNF-alfa által indukált szelektív, specifikus és reverzibilis csökkenés a zéta lánc kifejeződésében funkcionális következményekkel is jár...” Ez a mondat azt sugallja, mintha a TNF-alfa hatása a T-sejtekre kizárólag a zéta lánc expressziójának szabályozásán keresztül valósulna meg, holott - mint tudjuk - ez közel sem fedí a valóságot.

A T-sejt-receptoron keresztüli jelátvitel meghatározó eleme a  $\zeta$ -lánc, expressziójának a csökkenése alapvetően fontos a T-sejt-aktivációban. Eredményeink alapján a TNF- $\alpha$  dózisfüggő módon, reverzibilisen csökkenti a CD3- $\zeta$ -lánc kifejeződését T-sejteken. Ugyanakkor a TNF- $\alpha$  nem befolyásolta a CD3- $\epsilon$ -lánc kifejeződését Western blot módszerrel és áramlási citometriával (39. ábra,) vizsgálva és nem befolyásolta a CD3- $\gamma$  lánc kifejeződését sem. Így a TNF- $\alpha$  a CD3-komplex elemei közül a CD3- $\zeta$ -lánc kifejeződését szabályozza, ilyen értelemben tekinthető hatása szelektívnek. Természetesen a TNF- $\alpha$  számos más hatást is kifejt a T-sejtekre.

Az itt kezdődő 6.7. alfejezetben a Jelölt azokat a kísérleteit ismerteti, amelyekben a glikozidázok szerepét vizsgálta az RA pathogenezisében. Vannak-e kitüntetett proteinek, amelyek glikozilációja és/vagy deglikozilációja specifikusan megváltozik RA-ban?

Az immunglobulinok glikozilációja irodalmi adatok alapján eltér RA-ban az egészséges kontrolltól [Younings A et al. *Biochem J.* 1996, 314:621-30.; Mastrangelo A et al. *J Immunol Res.* 2015, Article ID 712490, in press]. A glikozilált immunglobulinok aktiválhatják a komplementrendszer RA-ban [Malhotra R et al. *Nature Medicine.* 1995, 1:237–43. doi:10.1038/nm0395-237]. 2015 januárjában publikált eredmények szerint az ACPA glikozilációja befolyásolhatja az antitestek kötődését a citrullinált proteinekhez [Rombouts Y et al. *Ann Rheum Dis.* 2015, Jan 13. annrheumdis-2014-206598.]. Az immunglobulinok glikozilációja szabályozza az osteoclast-differenciálódást 2015 márciusában publikált eredmények szerint [Harre U et al. *Nat Commun.* 2015, Mar 31;6:6651. doi: 10.1038/ncomms7651]. Az akutfázis-proteinek glikozilációja szintén megváltozhat RA-ban [Saroja A et al. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011, Jun 15;879(20):1839-43.].

Az EV-kal kapcsolatos 6.8 fejezet nagyon fontos metodikai kérdéseket taglal a témával kapcsolatosan, a munkacsoport a nagyon nagy presztízsű Blood folyóiratban közölte az eredményeit 2011-ben. Milyen visszhangja volt a cikknek, amely nyomán saját munkacsoportjuk is számos korábbi eredményüket revideálta? Megtették-e ugyanezt más munkacsoportok is?

Az eredményeink újraértékelésére szerencsére saját műhelyünkön belül azt megelőzően került sor, hogy eredményeinkből kézirat született volna. 2011 óta a Blood folyóiratban megjelent, a detergens módszert leíró cikkünket több mint 100 közlemény idézte. Közleményünkre nem csak highlight cikk hívta fel a figyelmet, hanem munkánk nyomán elvégezték többek között akut coronaria szindrómában a microvesicula-méréseket, és módszerünket univerzális kontroll-eljárásnak javasolták az extracelluláris vesicula vizsgálatai során. **[Amabile N et al. Blood. 2012, 119(9):2174-5.]**. A detergens módszert ma már számos, az extracelluláris vesiculákkal foglalkozó munkacsoport alkalmazza. Munkacsoportunk a közelmúltban igazolta a különböző extracelluláris vesicula-alpopulációk eltérő detergensérzékenységét is **[Osteikoetxea X et al. Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. ISEV Meeting, Washington, 2015]**.

Ezt követően a munkacsoport ízületi betegségekből, RA-ban, arthrózisban és JIA-ban vizsgált néhány paramétert az általuk optimalizált módszerrel. Két szignifikáns eltérést találtak: a CD3+ mikrovezikulák száma RA-ban magasabbnak bizonyult, mint arthrózisban, illetve JIA-ban a CD19+ mikrovezikulák száma szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult mind az arthrózisos, mind az RA-s mintákhoz viszonyítva. Az eredmények bemutatását követően azonban nekem hiányérzetem maradt az értelmezés tekintetében: a 112. oldal mindössze kilenc soros bekezdése véleményem szerint nem magyarázza kellő mértékben ezeket az eredményeket. Például JIA-ban a Jelölt hivatkozik a betegségben alkalmazott kezelésre, amely felelős lehet az alacsony CD19+ EV számért. Ugyanakkor sem a Módszerek fejezetben, sem az Eredmények és megbeszélés fejezetben nem kapunk arról információt, hogy hány JIA-s beteg került bevonásra, ezek közül mindenki kapott-e kezelést, milyen kezelést, és hogy az hogyan hozható összefüggésbe a kapott eredménnyel. Nekem ezek az információk itt nagyon hiányoztak.

Munkánk során a gyulladásos betegségek körében az elsők között igazoltunk betegségspecifikus extracelluláris vesicula mintázatot. RA-s (n=8), arthrosis (n=8) és juvenilis idiopathiás arthritisben (JIA, n=10) szenvedő betegek synoviális folyadékában mértük a microvesiculák (MV) mennyiségét az általunk kifejlesztett differenciál detergens lízis alkalmazásával. Ebben a munkában nem minden esetben rendelkezünk részletes adatokkal a gyógyszeres kezelésre vonatkozóan. Az RF szintje szoros korrelációt mutatott a T- és a B-lymphocytá-

eredetű MV-k számával ( $p=0,002$ ;  $p=0,001$ ). A klinikai aktivitást jelző DAS28 érték és az ACPA-antitest-szint nem korrelált az MV-számmal.

Az utóbbi években számos közlemény jelent meg arról, hogy az EV-k lehetnek a szállítói a nem-kódoló RNS-eknek; adatok elsősorban miRNS-ekre vonatkozóan vannak, de hosszú nem-kódoló RNS-ek EV-mediált transzportjáról is van már adat. Van-e a Jelölt munkacsoportjának adata RA-ban vagy SLE-ben erre vonatkozóan, vagy más munkacsoportok ilyen jellegű vizsgálatairól van-e tudomása?

Az EV-k miRNS-vizsgálata napjaink egyik izgalmas kutatási területe, RA-ra, vagy SLE-re vonatkozóan érdemi eredményeket ebben a témában eddig nem közöltek. Munkacsoportunk vizsgálatai jelenleg az egészséges extracelluláris vesicula-alpopulációk miRNS-vizsgálatára irányulnak. Későbbiekben tervezzük RA-s és SLE-s betegekből izolált vesicula-alpopulációk ilyen irányú vizsgálatát is.

Ismételten köszönöm Prof. Dr. Széll Márta bírálatát és kérem a válaszaim elfogadását.

Budapest, 2015. május 2.

Tisztelettel:



Dr. Nagy György  
egyetemi docens