

BÍRÁLAT DR. NAGY GYÖRGY
„PATHOGENETIKAI TÉNYEZŐK VIZSGÁLATA RHEUMATOID ARTHRITISBEN ÉS SZISZTÉMÁS LUPUS
ERYTHEMATOSUSBAN”
CÍMŰ MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉSÉRŐL

Dr. Nagy György - a Jelölt - az MTA doktora cím elnyeréséért 116 oldalas értekezést állított össze, melyben eddigi pályájának eredményeit összegezte. Az értekezés alapját 29 közlemény képezi, melyek közül a Jelölt kilencnek első és kettőnek utolsó szerzője. Az értekezés alapját képező közlemények összesített impakt faktora 129,85. További 41, az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó saját cikket is felsorol a Jelölt, amelyek közül tizenkettőnek első és további tizenkettőnek utolsó szerzője. Eddigi életpályájának tudományometriai értékei igen kimagaslóak: közleményeinek össz IF értéke 182,6, független citációinak száma 1051, H-indexe 18.

Az értekezés alapját képező közlemények zöme a Jelölt számos neves hazai immunológiai műhelyével való együttműködésének eredményeként születtek. Ez arra utal, hogy az immunmediált humán kórképek - amelyek pathogenezisét a Jelölt vizsgálja - az ún. elméleti intézetek számára is nagyon érdekes kutatási területet jelentenek, és a Jelölt klinikusi hátterére alapozva az értekezés által is jól fémjelzett értékes eredményekhez vezethetnek.

A következőkben az értekezésről kialakult véleményemet mutatom be alfejezetenkénti megfogalmazásban, a felmerült kérdéseket is beleszőve.

IRODALMI HÁTTÉR

Általános észrevételeim:

Ebben a részben a Jelölt a két általa vizsgált betegség szempontjából legfontosabb kóroki tényezőket foglalja össze. 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 (pl. 3.2.4.5. „Monocyták, dendritikus sejtek” bekezdés).

Hiányoltam az Irodalmi háttér részből 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.

Részletezett észrevételeim, kérdéseim:

16-17. oldal:

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

18. oldal:

A Jelölt ismerteti, hogy a citrullinálás folyamatában fontos a peptidil-arginin deamináz enzim⁴ (PAD4). Ismert-e olyan polimorfizmusa a PAD4 génnek amely RA-ban hajlamosít, esetleg protektív?

23. oldal:

A második bekezdésben leírtak szemléltetésül a 4-es ábrára utal a Jelölt, de a 4-es ábrán nem látom ábrázolva a bekezdésben leírtakat.

26. oldal:

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.

27. oldal:

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 hemolítikus aktivitás lett-e diagnosztikai és/vagy klinikai relevanciája?

27-28. oldal:

A Jelölt az SLE különböző humán nagyraszokban 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 nagyraszban magyarázatot ad erre az eltérésre?

28. oldal második bekezdés:

Egy elírás: midkét helyett mindkét.

29. oldal:

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?

CÉLKITŰZÉSEK

Általános észrevételem:

Ez az alfejezet meglátásom szerint talán túl tömörre sikerült. Úgy gondolom, hogy mind a nyolc célkitűzés pont megért volna két-három mondatnyi kifejtést, még ekkor is egy oldalon belül maradt volna a terjedelem.

ANYAGOK és MÓDSZEREK

A Jelölt nem taglalta szerteágazó munkájának minden metodikai részletét ebben a fejezetben, hanem igyekezett átfogó képet adni az általa használt módszerekről.

Részletezett észrevételeim, kérdéseim:

31. oldal:

Itt olvasunk elsőként bizonyos kórképekről, amelyek részét képezték a Jelölt munkájának: juvenilis idiopathiás arthritis (JIA), tüdőrák és arthrosis. Érdemesnek láttam volna az Irodalmi háttér fejezetben is szólni egy-egy rövid bekezdést ezeknek a kórképeknek, és szólni arról, hogy miért tanulmányozta a Jelölt ezeket a betegségeket, hogyan kötődik a munkája ezekhez a humán kórképekhez.

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?

32. oldal:

Az 5.2.2. „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.

34. oldal:

5.5.5. „Extracelluláris vesiculák mérése” alcímet nem tartom elég pontosnak. A vonatkozó bekezdés egyértelműen a vesiculák *méretének* a meghatározásáról szól, akkor viszont szabatosabb lett volna alcímként azt írni, hogy az „Extracelluláris vesiculák méretének meghatározása”.

36. oldal:

5.8. „Tömegspektrometria” alfejezet második sorában egy elírás van: L-hisztidin helyett I-hisztidint ír a Jelölt. Ugyanabban a bekezdésben néhány mondat megfogalmazása zavaros, nehezen értelmezhető.

5.9 „Western blot” alfejezet: A kezdő mondatban Jelölt azt írja: „A mintákat PBS-ben mostuk...” helyesebb lett volna sejteket írni, mert Western blott-nál minta alatt általában már magát a fehérje lizátumot értjük, mint ahogy a Jelölt is ilyen értelemben használja a bekezdés további mondataiban.

38. oldal:

5.10.2. ELISPOT alfejezetben egy elírás van: ellenanyag helyett ellenanyagot írt. Ugyanerről az oldalról az 5.12.2. RT-PCR cím jól lett volna, ha átkerül a 39. oldalra a vonatkozó alfejezet elé. Ugyanitt a különbözőképpen látjuk írva a módszer nevét (RT-PCR vagy RT PCR?)

40-44. oldal:

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

43. oldal:

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

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

Általános észrevételeim:

A Jelölt szerteágazó munkájának eredményeit a Célkitűzések szerinti bontásban mutatja be, majd közvetlenül az eredmények ismertetését követően a vonatkozó megbeszélést is megteszi.

Eredményeit összesen 47 ábrával szemlélteti, amelyek közül soknak sajnálatos módon igen gyenge a minősége, esztétikuma. Szintén általános megjegyzésem a fejezettel kapcsolatban, hogy a Jelölt nem fordított elég figyelmet az egyes kísérletek eredményeinek bemutatásánál az alkalmazott mintaszám feltüntetésére, illetve, hogy egy-egy kísérletet hány technikai és/vagy biológiai ismétlésben végzett el.

Részletezett észrevételeim, kérdéseim:

45. oldal:

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

46. oldal:

6.2 és a 6.2.1. címek átmehettek volna a következő oldalra a vonatkozó szöveg elé.

47. oldal:

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.

50. oldal:

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? Itt ismét felmerült bennem a kérdés, hogy a Jelölt nem írt semmit a bevezetésben a tüdődaganatokról, holott a bemutatott eredmények szerint ebben a témában is folytatott kutatásokat.

56. oldal:

Az 56. oldalon kerül elsőként említésre az anti-MCV. Természetesen tisztában vagyok vele, hogy a reumatológusok körében ez egy mindennapi használatos rövidítés és körükben nem szorul magyarázatra a jelentése, de sajnos sem a Rövidítések jegyzékében, sem az Irodalmi háttérben nem találtam magyarázatát és ismertetését.

59. oldal:

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?

65. oldal:

Nem értem, hogy a 19. ábrán miért került feltüntetésre kétszer is az nNOS, erre vonatkozóan sem az ábraalírásban, 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 denzinometráls eredménye már kérdéses lehet. Például nehezen látom be azt, hogy az eNOS esetében a kontroll és a négy órás H₂O₂ kezelt minták közötti különbség 19-szeresnek adódik, míg az nNOS esetében a kontroll és a négy órás H₂O₂ kezelt különbség mindössze 3,5-szeresnek. Ezek az értékek számomra nem tűnnek reálisnak.

66. oldal:

A 6.5.2. alfejezetben a Jelölt bemutatja, hogy az SLE-s betegek T-sejtjei stimulációt követően eltérő mitokondrium potenciállal és mitokondriális Ca²⁺ szinttel reagálnak, illetve magasabb mitokondrium számot is tapasztaltak az SLE betegpopulációban. Itt is az a kérdésem, hogy milyen mintaszámmal dolgoztak. 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 hatásának következményeként bekövetkező mitokondrium szám emelkedést, a mitokondrium membrán potenciál változást és a Ca²⁺ 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?

76. oldal:

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

82-85. oldal:

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.

85-100. oldal

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 - megközelítését 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 fedi a valóságot.

89. oldal:

Egy elírás: reverzibilisen helyett helyesen: reverzibilisen.

100. oldal:

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?

112. oldal:

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?

Ezt követően a munkacsoport ízületi betegségekből, RA-ban, arthrosisban és JIA-ban vizsgált néhány paramétert az általuk optimalizált módszerrel. Két szignifikáns eltérést találtak: a CD3+ mikrovezikulák száma RA-ban magasabbnak bizonyult, mint arthrosisban, illetve JIA-ban a CD19+ mikrovezikulák száma szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult mind az arthrosisos, 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.

Figyelemre méltó megfigyelés az, hogy az RA-s és arthrosisos betegek synovialis fibroblast eredetű mikrovezikuláiban magasabb glükózidáz enzim aktivitást mértek, amely közvetlen kapcsolatba hozható a betegségek pathogenezisével a porcdestrukció elősegítése révén.

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?

A tudományterület szempontjából fontos, annak továbbfejlődését jelentő saját eredménynek a következőket javaslom elfogadni:

1; Metodikai fejlesztésekkel kapcsolatos eredményei közül a következőket javaslom új eredményként elfogadni.

A Jelölt kimutatta, hogy a 19 aminosavból álló citrullinált peptid esetében a biotiniláció nem befolyásolja az ACPA antitest kötődését, míg az 5 aminosavból álló N-terminális biotiniláció hatással volt arra.

Munkatársaival kidolgozott egy emésztési módszert, melynek alkalmazásával a méretükben nagyon hasonló mikrovezikulák és immunkomplexek egymástól megkülönböztethetők.

(III. és VIII. célkitűzések)

2; Elsőként mutatta ki RA-ban a természetes autoantitestek közé tartozó anti-GAG és az anti C1-inhibitor ellenes antitestek magasabb szintjét. Ez utóbbi emelkedett szintjét SLE-ben is bizonyította.

(I. és IV. célkitűzések)

3; A galektin-8 génen egy antagonisztikus pleiotrop hatású polimorfizmust azonosított RA-ban, amely ötven év alatt protektív, e fölött azonban hajlamosító genetikai tényező.

(II. célkitűzés)

4; RA-ban és tüdőrákban vizsgálta a citrullináció szerepét. Utóbbiban nem talált különbséget a vizsgált szövetekben a citrullináció mértékében a dohányosok és a nem dohányosok között, ugyanakkor a Jelölt megállapította, hogy a tumoros szövetekben a peptidil-arginin-deamináz-4 (PAD4) és a citokeratin-7 (CK7) szintjei korrelálnak egymással. Bizonyította a citrullináció szerepét aggregán-indukálta RA egérmodellben.

(III. célkitűzés)

5; A Jelölt részletesen vizsgálta az NO szerepét a T-sejtek aktivációjában, és az RA, illetve az SLE pathogenezisében. Eredményei szerint SLE-ben a monociták által termelt NO hatására a T-sejtek aktivációja megnő, amelyet a sejtek mitokondrium számának emelkedése és emelkedett mitokondriális membránpotenciál is kísér.

Bizonyította, hogy RA-ban maguk a T-sejtek termelnek több NO-t, ugyanakkor ebben a körképben nem mutatható ki emelkedett T-sejt mitokondrium szám, illetve emelkedett mitokondrium membrán potenciál. TNF-alfa blokkoló kezelés hatására az RA-s betegek T-sejtjeinek NO termelése csökken.

HDC-KO egereken végzett kísérleteivel a Jelölt bizonyította, hogy a hisztamin az NO termelés szabályozása révén is hatással van a T-sejtek citokin termelésére és jelátviteli folyamataira.

(V. célkitűzés)

6; A Jelölt kísérleteivel bizonyította, hogy a TNF-alfa kezelés a CD3 komplex alegységei közül kizárólag a zéta láncra van hatással, ezt a hatását a TNF-alfa az src-szerű adaptor fehérje (SLAP) mennyiségének fokozásán és következményesen a zéta lánc proteoszómás lebontásán keresztül fejti ki. A Jelölt kimutatta, hogy az RA betegek T-sejtjeiben az SLAP expressziója emelkedett.

(VI. célkitűzés)

7; RA betegek synovialis fibroasztjainak és fibroblaszt eredetű EV-inak tanulmányozásával bizonyította, hogy glikozidáz aktivitásuk magasabb a kontrollokéhoz képest, amely feltehetően pathogenetikai tényező a betegségben.

(VII. célkitűzés)

Összefoglalóan tehát elmondható, hogy Dr. Nagy György értekezésében alapvetően két immunmediált kórképben, az SLE-ben és RA-ban végzett rendkívül termékeny kutatómunkájának eredményeit foglalta össze. A dolgozat teljes egészében hiteles, a Jelölt saját tudományos kutatásainak eredményeire épül. A doktori művet nyilvános vitára alkalmasnak találom.

Szeged, 2015. március 23.

Tisztelettel:



Dr. Széll Márta
az MTA doktora