

Válasz Dr. Miseta Attila, egyetemi tanár bírálataira

Ezúton is szeretném megköszönni professzor úr fáradozását, a bírálatra szánt idejét, a részletes értékelést és az MTA Doktori értekezés pozitív bírálatát.

A felvett kérdésekre, problémákra a válaszaim a következők:

21. oldal 2. bekezdés. „Az akut fázis fehérjék a májban termelődnek...” Nyilván nem mind... Erre később a szerző is rámutat pl. a PCT-re.

Válasz: A bíráló megjegyzése teljesen helytálló, az akut fázis fehérjék jelentős része a májban termelődik, de több olyan fehérje is van, amelyek forrása extrahepatikus (is) lehet; elsősorban epitheliális és endothel sejtek, valamint egyes kötőszöveti elemek jelentik az eredetét ezeknek a molekuláknak (S. Jain et al., *J Pharm Bioallied Sci*, 2011, 3:118-127). A teljesség igénye nélkül ide sorolható a Disszertációban említett PCT, de ide tartozhat a szérumban amyloid A (N. Upragarin et al., *Histol Histopathol*, 2005, 20:1295-1307), egyes komplement komponensek (Naughton et al., *J Immunol*, 1996, 156:3051-3056; Naughton et al., *Eur J Immunol*, 1996, 26:2108-2112), valamint a ceruloplasmin és az α_1 -protease inhibitor (J.G. Raynes, *Biochem Soc Transact*, 1994, 22:69-74) is.

1. Mi magyarázza a két sCD14 forma igen jelentős méretbeli eltérését. Ez kizárólag poszttranszlációs módosulásoknak tudható-e be? Milyen funkcionális eltérések vannak emiatt?

Válasz: A szérumban kimutatható két szolubilis CD14 (sCD14) izoforma egyértelműen poszttranszlációs modifikáció eredménye. Három független publikáció is bemutatta *in vitro* kísérletekben a membrán-expresszált CD14 lehasadásával létrejövő kisebb, 48 kDa-os sCD14 keletkezésének mechanizmusát, illetve a poszttranszlációs modifikációt (GPI-farok illesztését) elkerülő 56 kDa-os forma direkt szekrécióját (MO. Labeta et al., *Eur J Immunol*, 1993, 23:2144-2151; JJ. Durieux et al., *Eur J Immunol*, 1994, 24:2006-2012; P. Bufler et al., *Eur J Immunol*, 1995, 25:604-610). A két izoforma arányát szérumban több betegcsoport esetében is tesztelték, de igazán komoly vizsgálat a két variáns funkcionális különbségeinek felderítésére nem történt. A CD14 molekula legfontosabb biológiai tulajdonsága az LPS molekulák kötése. Miután az LPS kötő rész a molekula N-terminális kb. 100 aminosavát felölelő régióban található (SL. Kelley et al., *J Immunol*, 2013, 190:1304-1311), a mCD14 enzimátikus hasítása pedig a CD14 C-terminális végét érinti, így a fő funkciót illetően nem valószínű, hogy nagy különbség lenne a két izoforma között.

Az, hogy a két CD14 variáns nem volt kiterjedt kutatás tárgya, azzal is összefügghet, hogy bár hosszú ideig a legfontosabb LPS kötő receptornak tartottuk, de 1999-ben ismertté vált, hogy az "igazi" LPS receptor a Toll-like receptor 4 (TLR4) molekula, és a CD14 ennek inkább csak koreceptora. Ettől kezdve az innate immunitást érintő kutatások a TLR család felé fordultak, és a korábban sokat vizsgált CD14 molekula kikerült az érdeklődés fókuszából.

Az sCD14 mérésre beállított áramlási citometriás mérés valóban olcsóbb, mint az immunometriás módszerek. Ezzel együtt nehezen hihető, hogy a módszer analitikai képességei összevethetők. Továbbá a FACS módszerek munkaerő igényesebbek is.

Válasz: A sCD14 mérésére alkalmas áramlási citometriás módszer beállítása 2000-2001-ben történt. Ekkor sCD14 ELISA már kereskedelmi forgalomban elérhető volt, ugyanakkor - az akkor rendelkezésre álló kutatási támogatásaimhoz mérten - ez rendkívül költségesnek tűnt, különösen nagyobb számú minta tesztelése esetén. Ezért döntöttünk egy saját módszer fejlesztése mellett, és ezért választottunk kompetitív immunoassayt. Ehhez ugyanis csak egyetlen anti-CD14 antitestre volt szükség, amit a hollandiai kooperáló partnerünk bocsájtott rendelkezésünkre, a mintában lévő sCD14 pedig az izolált monociták felszínén lévő mCD14 molekulákkal versengett az antitesthez való kötődésért. A módszer fejlesztését egy akkoriban egyre népszerűbbé váló új technika is inspirálta. Ebben az időben kerültek az érdeklődés középpontjába a bead alapú, áramlási citometriás immunoassay-k, amelyek szolubilis molekulák koncentrációjának a mérésére voltak alkalmasak. Bizonyos mértékig az általunk fejlesztett rendszer ezekhez is mutatott hasonlóságot.

A teszt analitikai képességei azonban valóban elmaradtak a gyári, sCD14-et mérő immunoassay-kétől, és a munkaigényük is jelentős volt. Így a későbbiek során, a kutatási támogatások bővülésével és az ELISA-k árának csökkenésével mi is áttértünk ezekre a módszerekre, és a későbbi vizsgálatainkban már sCD14 ELISA rendszereket használtunk.

2. Az immunometriás mérések között számos olyan van, melynek a diagnosztikus szenzitivitása és specifitása kívánnivalót hagy maga után. Lásd pl. a CD14 méréseket az atópiás dermatitis és valamint a poly-és dermatomyositis betegekben. Mi a véleménye a cost/benefit arányokról, a mérések alkalmazhatóságának a korlátozásáról?

Válasz: A Disszertációban bemutatott több biomarker klinikai hatékonysága meglehetősen szerény. Leginkább ide sorolható a bíráló által említett membrán-expresszált és szolubilis CD14 mérés atópiás dermatitis (AD-s) és poly-dermatomyositis (PDM-es) betegekben. Az AD-s csoportban az optimális cut-off mellett sem volt magasabb a szenzitivitás mint 70-75%, míg a specifitás 60-80% között mozgott. A PDM-es betegek esetében a szenzitivitás 50-60%, a specifitás 60-80% között volt a tesztelt paramétertől és alcsoporttól függően. Valamivel hatékonyabbnak bizonyult a CD14 mérés az SLE-s betegekben (80% körüli szenzitivitás és specifitás), és különösen a szteroid terápia hatására következett be jelentős változás a mCD14-expressziójában. Igazán hatékonynak tekinthető markerek azonban a CRP és PCT voltak a cirrhosishoz társuló infekció kimutatásában, valamint a tüdőrákos betegek esetében a HE4-ből, CEA-ből és CA125-ből, illetve a QP markerekből képzett composite score-ok (ezekkel akár 90-95%-os specifitás és szenzitivitás is elérhető volt).

Azt, hogy egy új teszt bekerül-e a rutin diagnosztikai vizsgálatok repertoárjába több tényező is befolyásolja. Nagyon fontos a klinikai alkalmazás célja. Például egy olyan betegség esetében, ami súlyos, de jól kezelhető, és a fals pozitív eredmények nem vezetnek komoly fizikai, pszichés vagy anyagi kárhoz/hátrányhoz egy nagyon magas szenzitivitású, de alacsonyabb specifitású teszt is megfelelő lehet, illetve úgy lehet beállítani egy adott teszt

cut-off értékét, hogy 90-95% szenzitivitást biztosítson alacsonyabb specificitás mellett. Természetesen az alkalmazott cut-off változtatásával javítható az adott teszt szenzitivitása a specificitás rovására és vica-versa. Értelemszerűen komoly előny lehet egy teszt kiválasztásánál, ha a magas szenzitivitás magas specificitással is társul. Egy új teszt favorizálásánál és rutin diagnosztikus bevezetésénél fontos szempont az is, hogy a már meglévő és széleskörben használt teszteknel hatékonyabb legyen. Az egészségügyi ellátás anyagi forrásai is jelentenek jelenleg egy szűk keresztmetszetet, így fontos elvárás az is, hogy az új teszt olcsóbb legyen, mint a már meglévők.

Mindezek alapján egy új teszt akkor kerülhet be a napi klinikai gyakorlatba, ha az adott diagnosztikai feladat megvalósításában a hatékonysága jobb, és nem kerül számottevően többbe a jelenleg alkalmazott vizsgálatoknál, vagy ha a hatékonysága hasonló, de szignifikánsan olcsóbb. Ez a gondolatmenet befolyásolja az utóbbi időben egyre népszerűbbé váló composite score-ok alkalmazásának elterjedését is, amit a laboratóriumi diagnosztika fejlődésében én magam is egy fontos útnak tartok. A két-három-négy markerből képzett score-ok megalkotásának költsége többszöröse lehet egy-egy egyedi marker mérésének, és csak akkor van létjogosultsága a rutin diagnosztikában, ha ezekhez képest számottevően nagyobb a klinikai információtartalma.

3. A sclerostin és egyéb paraméterek korrelációi meglehetősen laza összefüggéseket mutatnak, melyek statisztikailag gyakran mégis szignifikánsak. Mivel magyarázza ezeket?

Válasz: Az említett munkában egy oszteociták által termelt, csontképződést gátló fehérje, a sclerostin szérumban szintjének változásait és összefüggéseit vizsgáltuk meg 50 év feletti férfiak mintáiban. Jó néhány változóval kaptunk szignifikáns összefüggést - Pearson-féle lineáris korrelációs analízist használva -, melyek közül a legjelentősebbnek az életkorral, eGFR-rel és a kreatininnal, illetve cystatin C-vel való korreláció bizonyult. A teljes populáció esetében ezek az összefüggések valóban alacsonyabb korrelációs koefficiens értékeket mutattak ($R=0,160-0,250$). Az életkorral való változást figyelembe véve 2 csoportra osztottuk a vizsgált egyéneket (59 év feletti és alatti populáció), és az idősebbek esetében már jóval erősebb összefüggéseket kaptunk a sclerostin és a fent említett paraméterek között ($R=0,39-0,52$). A sclerostin szint és a vese funkció közötti összefüggés már ez alapján is egyértelmű volt, de amikor egy lineáris regressziós modellbe építettük be a cystatin C-t és az életkort, akkor csak a cystatin C bizonyult a sclerostin szint független előrejelzőjének. Ez az analízis is már magasabb standardizált regressziós koefficiens mutatót ($\beta=0,487$, $p<0,001$). Mindezek alapján a publikáció fő üzenete az, hogy a szérumban sclerostin szintet a vese funkció ismeretében kell értékelnünk, és erre ideális a cystatin C mérése, hiszen ez független a nemtől, az életkortól és az izomtömegtől. A sclerostin és az egyéb csontmarkerek összefüggése is leírásra került a közleményben és a Disszertációban, de ezeknek a relevanciája - részben a lazább összefüggések miatt - egyértelműen nem volt megítélhető, nagyobb populáción kell a méréseket megismételni.

Azt, hogy egy R érték milyen erősségű korrelációt mutat több tényező is befolyásolhatja. Konvencionálisan ha $R>0,8$ nagyon erős, ha $0,8>R>0,6$ erős, ha $0,6>R>0,4$ közepes, ha $0,4>R>0,2$ gyenge míg ha $0,2>R$ nagyon gyenge összefüggésről beszélünk (KH. Zou et al., *Radiology*, 2003, 227:617-628). Ugyanakkor az R értékét és a korreláció szignifikanciáját

befolyásolja többek között pl. a korreláltatott adatok mennyisége, azok fajtája, megoszlása, variabilitása, illetve kieső értékek jelenléte. Ha pl. 10 adatkör között vizsgáljuk meg az összefüggést az R értéke akkor lehet szignifikáns ha nagyobb, mint 0,63; míg 100 pár esetében már $R > 0,20$ esetén lehet szignifikáns az összefüggés. Az adat típus hatására jó példát jelentenek a pszichiátria vizsgálatok (pl. depressziós állapot súlyossága vs. vizsgált marker), ahol a nagy individuális variabilitás miatt 0,5-nél nagyobb R érték már nagyon jónak számít. Végül minél nagyobb - pl. a mérés bizonytalansága miatt - valamelyik adatsor szórása ez szintén eredményezheti az R érték csökkenését, annak ellenére, hogy a két adatsor közötti összefüggés valójában szoros. (LD. Goodwin et al., *J Exp Educat*, 2006, 74:251-266; <http://www.healthknowledge.org.uk/e-learning/statistical-methods/specialists/linear-regression-correlation>; <http://blog.minitab.com/blog/adventures-in-statistics-2/regression-analysis-how-do-i-interpret-r-squared-and-assess-the-goodness-of-fit>).

4. A QP300 kit vizsgálata kapcsán, de általában is felmerül, hogy a kutató nem végzett igazi alapkutatásokat, általában megelégedett a rutin vagy bevezetés előtt álló paraméterek összeméréseivel és ezek statisztikai analíziseivel. Miért nem haladt tovább az ok okozati összefüggések elemzésével legalább néhány a számára érdekesebb esetben?

Válasz: A bíráló észrevétele az MTA doktori disszertációban bemutatott eredmények alapján valóban helytálló. A teljes tudományos munkásságomat általában is dominálják a klinikai jellegű kutatások, de a disszertáció anyagának összeállításakor különösen azokat a tanulmányokat szedtem csokorba, ahol valamilyen biológiai marker klinikai alkalmazhatóságát vizsgáltuk; ez jelentette a dolgozat egyfajta "kötőanyagát"-t.

A Disszertációban bemutatott projektek között is van ugyanakkor olyan, ahol próbáltunk bizonyos alapkutatási kérdésekre is választ adni. A *Journal of Hepatology*-ban megjelent közleményünkben (M. Papp et al, *Journal of Hepatology*, 2013, 59:457-466) például, a cirrhosist kísérő anti-neutrophil citoplazmatikus antitestek (ANCA) kimutatásán túl az IgA ANCA-k kialakulásának mechanizmusát is vizsgáltuk. Az IgA molekulán jelenlévő szekretoros komponens és az IgA2 izotípus arányának növekedése ezen antitestek mucosalis eredetére utalt. Ezt a vizsgálatot azóta már folytattuk is. Egy nemrégiben elnyert OTKA pályázat (szám: 115818, témavezető Dr. Papp Mária) keretében cirrhotikus betegek bélbiopsziás mintáiban immunhisztokémiai vizsgálattal értékeljük az IgA-t szekretáló B és plazmasejteket, illetve izolált B limfociták *in vitro* IgA ANCA termelését teszteljük különböző bakteriális termékekkel (LPS, FimH, CpG-ODN) történt stimulálást követően.

A másik Disszertációban is szereplő projekt, amelyhez további jelentős kísérletes anyag is társult már a QuantiPlasma kitek fejlesztése. A betegpopulációk vizsgálata mellett a kitekben szereplő antitestek antigénspecifitása is karakterizálásra került. Immunprecipitációt követő gélelektroforézis után az antitest által megkötött fehérje(ék) azonosítása tömegspektrometriával történt. Fág-display technika és az ellenanyagok variábilis régióinak szekvenálásával pedig epitóp szinten is sikerült ezeket az antitesteket karakterizálni. Nagyon érdekes megfigyelésünk, hogy a chipeken jelenlévő, ugyanazon fehérje különböző epitópjait felismerő antitestek eltérő módon viselkednek. Bizonyos antitestek jól használhatók egyes betegek és az egészséges kontrollok megkülönböztetésére, míg ugyanazon antigén másik

epitópját felismerő antitestek nem hatékonyak. Ez azt jelzi, hogy a plazma proteom feltérképezése mellett a plazma epitom vizsgálata még hatékonyabb biomarkerek azonosítását eredményezheti. Ebben az esetben a technológia fejlesztése ami jelentős, és fontos az is, hogy hipotézis nélküli vizsgálatokról van szó; ez is tekinthető bizonyos szempontból alapkutatásnak, de az említett célzott hipotézisvezérelt vizsgálatok is elkezdődtek. Fontos azt is megjegyezni, hogy ezen vizsgálatok finanszírozása kifejezetten ipari jellegű. A QP kitek szabadalmi bejegyzése egyébiránt rövid időn belül megtörténik, és reményeink szerint, ezt követően több jelentős publikációban tudunk majd beszámolni ezekről az eredményekről.

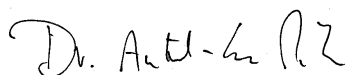
Ugyanakkor a Disszertációban bemutatottakon túl több olyan kutatási témám is volt, ahol nem deskriptív jellegű klinikai kutatást végeztem, hanem bizonyos sejt szintű alapfolyamatok mechanizmusát kutattam. A teljesség igénye nélkül ide sorolható pl. a monocitákon belül a CD14-kötött LPS internalizáció folyamatának vizsgálata (*P. Antal-Szalmás et al., Cytometry, 2000, 41:279-288*) vagy a sejtfelszíni CD14 receptorszám és a sejtaktiváció közötti összefüggések tanulmányozása (*P. Antal-Szalmás et al., Immunology Letters, 2004, 93:11-15*).

Külön fejezet volt a kutatómunkám során a legkülönbözőbb autoimmun betegségek kialakulását befolyásoló Th1/Th2 egyensúly változásának vizsgálata, amely alapvetően betegség patomechanizmus vizsgálatot jelentett (*B. Irinyi et al., Acta Dermatology and Venereology, 2002, 82:249-253; M. Aleksza et al., British Journal of Dermatology, 2002, 147:1135-1141; E. Bodolay et al., Journal of Rheumatology, 2002, 29:2136-2142; A. Szegedi et al., Immunology Letters, 2003, 86:277-280*).

Az alapkutatói projektek közé sorolható még egy innovatív munka is, ahol mintázatfelismerő receptorok (CD14, RNase7) és az IgG molekula Fc részét fuzionáltattuk molekuláris biológiai módszerekkel, és az így kapott fúziós fehérje tulajdonságait (kötődés baktériumokhoz, fagocitózis és a baktériumok elpusztításának segítése) vizsgáltuk, mely potenciális antimikrobiális molekulák létrehozását eredményezte (*A. Vida et al., Immunology Letters, 2012, 146:31-39*).

Összegezve tehát, a Disszertációban bemutatott munkák valóban alapvetően biomarkerek azonosításának és klinikai alkalmazásának különböző aspektusait mutatják be, azonban jónéhány olyan projekt volt és van jelenleg is folyamatban, ahol alapkutatás jellegű vizsgálatokat végzünk.

Még egyszer szeretném megköszönni professzor úr részletes értékelését, és az MTA Doktori értekezés pozitív bírálatát.



Dr. Antal-Szalmás Péter
egyetemi docens

Debrecen, 2017. február 15.