

Opponensi vélemény

Dr. Bácsi Attila

A reaktív oxigén származékok szerepe a pollen által kiváltott allergiás reakciók kialakulásában

című akadémiai doktori értekezéséről

Bácsi Attila értekezése tizenegy publikáció eredményeinek összefoglalásával készült, a felhasznált közlemények közül Jelölt háromban első, egyben megosztott első, négyben pedig utolsó szerző. Ezekben a publikációkban Bácsi Attila egy jelentős, innovatív felismerés bemutatása után, a felfedezés igazolását segítő, gyakorlati felhasználhatóságát kereső, az elmúlt 10-12 évet felölelő kutatómunkáját foglalta össze. Értekezésének összeállításakor Jelölt fő vonalaiban követte az akadémiai doktori értekezések formai előírásait, kutatásait fókuszált és világos formában mutatja be.

Jelölt kísérleti munkája elsősorban azt vizsgálja, hogy a pollen allergének hatásához hogyan járul hozzá a pollenbe „beépített” oxidatív stresszor. A tizenegy alfejezet tárgyalja a stresszor (Nox) pollenben illetve annál kisebb méretű, a virágporból származó részecskékben történő csaknem általános megjelenését; különféle, kiemelten pedig immunkompetens sejtekre kifejtett in vitro, és állatokban modellezett in vivo patofiziológiai hatását; a hatás esetleges befolyásolhatóságát, és a hatás molekuláris mechanizmusára (mechanizmusaira) is megpróbál választ adni. Bácsi Attila a komplex mondanivalót lényegében a közlemények egymást követő egységeire bontva mutatja be, így a részletek az olvasó számára is könnyebben áttekinthetők és az összefüggések is könnyebben megláthatók.

A bevezetés igen részletesen foglalja össze az oxidatív stressz alapjait, a légúti gyulladásokkal fennálló kapcsolatát és az antioxidáns rendszer működését. Hasonlóan részletes ebben a fejezetben a dendritikus sejtek típusainak, funkcióinak és specifikumainak bemutatása is. Bár külön alfejezetet nem kapott, ugyancsak ebben a részben történik meg a légúti epitheliális sejtek szerepének tárgyalása amit igen fontosnak érzek, hiszen ezek a sejtek jelentősen reagálnak az oxidatív stresszre, sok kísérletet éppen ilyen típusú sejtekkel végeztek el in vitro, és az in vivo modellben pl. a 8-oxoguaninn-DNS-glikozidáz függő DNS-szál károsodást is ezekben a

sejtekben vizsgálták. A bevezetés rendkívül tömör, Jelölt a dolgozatban citált összesen 343 publikációból 193-at idéz ebben a fejezetben; már ezzel is jelezvén, hogy a témában való jártassága széleskörű.

A kísérletes munka során Jelölt gazdag módszertani repertoárt használt; a primer és megalapozott emlős sejtek izolálást, tenyésztést, differenciáltatást, proliferációt, különféle stimulációkat, esetenként géncsendesítést is magába foglaló manipulálását követően a kezelések eredményét nagyon sokféle analitikai immun-, vagy molekuláris biológiai esszével, valamint különféle mikroszkópos technikát felhasználva elemezte. Két in vivo állatkísérletes modellt: az allergiás légúti- és kötőhártya gyulladás modelljét használta, in vivo gén-csendesítést alkalmazott, az eredmények kiértékelésénél pedig a különféle szövettani mikroszkópos vizsgálatokon kívül élő állatokon elvégzett fiziológiai vizsgálatokat, teljes test pletizmográfiát is felhasznált. A felfedezett jelenség működésével kapcsolatban a molekuláris mechanizmus feltárása érdekében jelentős mennyiségű, korszerű, biokémiai vizsgálatokat végzett (mikroszekvenálás; MS);

A kísérletek elrendezése logikus, esetenként pedig a végső konklúzió meghozatalának érdekében összeállításuk kifejezetten körültekintő és kreatív. A közölt adatok eredetisége meggyőző, Jelölt következtetései logikusak, megalapozottak, mértéktartók.

A műben az alább felsorolt és a bíráló által újnak elfogadott tudományos eredmények kerültek bemutatásra:

1. A hidratálódott pollenszemek, a belőlük készített kivonatok és a szub-pollen részecskék NAD(P)H oxidáz aktivitással rendelkeznek. A pollen NAD(P)H oxidázok által termelt reaktív gyökök percekben belül oxidatív stresszt okoznak az egerek légútjaiban, függetlenül az adaptív immunválaszoktól;
2. A pollen NAD(P)H oxidázok által generált oxidatív stressz fokozza a pollen allergén által kiváltott allergiás gyulladást a légutakban és a conjunctivában;
3. Lokálisan alkalmazott antioxidánsok vagy laktoferrin képesek csökkenteni a polleneredetű oxidatív stressz mértékét a légutakban, így mérséklék az allergiás gyulladást;
4. A környezeti oxidatív hatások által kiváltott mitokondriális károsodásnak a légutakban szerepe lehet a súlyos tünetekkel járó allergiás gyulladások kialakulásában;

5. A 8-oxoG DNS-ből való kivágódásakor keletkező egyszálú DNS-törések felerősítik az allergiás légúti gyulladást;
6. Mind a parlagfű pollenszemek, mind a szub-pollen részecskék -legalább részben - a NAD(P)H oxidázaik révén képesek aktiválni a DC-eket;
7. A gyulladásos sejtek által termelt oxigéngyökökkel reagáló pDC-knek a gyulladást csökkentő, illetve tolerogén hatása lehet az adaptív immunválasz során;
8. Az extracelluláris, oxidált mitokondriális DNS erősebb immunmoduláló hatású, mint a natív változata;

A disszertáció nyelvezete szabatos, stílusa a tudományos mondanivalóhoz igazodik. Néhány elírás (pl.: Quinacrin vs. Quinancrin; hipoklórossav vs. hipoklórsav;), egy pontatlan leírás az ábrát magyarázó szövegben (11. ábra F. panel, 41-42. oldal) illetve viszonylag csekély számú gépelési hiba előfordul a dolgozatban, de ezek a dolgozat egészét tekintve jelentéktelenek. Néhány esetben észlelhető az angol nyelvről magyarra történő fordítás, amelyek előfordulása azonban a megértést nem nehezítette. Jelölt összesen 73 ábrán mutatta be eredményeit amely ábrákat rendkívül nagy körültekintéssel helyezett el a szövegen belül, így ezek nagymértékben segítették az olvasót a megértésben. Ezért külön dicséret illeti.

A dolgozat kapcsán az alábbi, a bíráló szubjektív érdeklődését tükröző, részben technikai részben tudományos kérdéseket illetve megjegyzéseket teszem:

1. A munka során vendortól származó, vagy saját gyűjtésű intakt pollenszemeket is használtak, különféle kísérletekhez. Többek között az ezekkel kezelt dendritikus sejtek T-sejt proliferációs és T-sejt polarizációs képességét vizsgálták meglehetősen hosszú sejttenyésztést igénylő kísérletekben. Kíváncsi lennék rá, hogy okozott-e ez valamilyen nehézséget, vagy igényelt-e valamilyen speciális kezelést a sterilitás fenntartásában?

2. A légúti gyulladás in vivo modelljében számos alkalommal használtak intranazális kezelést nemcsak az allergén, hanem inhibitorok és siRNS bejuttatására is. A módszertani leírásban és az eredeti publikációkban is csak nagyon kevés részlet található ennek technikai lebonyolításáról (térfogat, anesztézia említésre kerül pl.: Ogg1 kifejeződésének gátlása leírásakor a dolgozat 28. oldalán, vagy ugyanitt az eredeti cikkben; DNA Repair 12:18-26(2013) de más esetekben nem nagyon). Szeretném tudni mi volt a maximális térfogat amelyet intranazálisan adagoltak, illetve valóban végeztek-e ilyen típusú kezelést éber állatokon?

3. Számos inhibitor, illetve stimulatort használtak a munka során in vitro és in vivo is. Ezek közül néhány esetben nekem az alkalmazott koncentrációk viszonylag magasnak tűntek (in vitro DPI kezelések [pl. 58.ábra], vagy in vivo pl. a [JCI 115:2169, 2005]-ben leírt 12 μ M GSSG vagy 75 μ M 4-HNE per egér = 29,2 g GSSG/80 kg ember, illetve 46 g 4-HNE/80 kg ember dózissal;). Az lenne a kérdésem, hogy az inhibitorok illetve a kémiai anyagok alkalmazott koncentrációinak kiválasztása előkísérletek alapján dózis-hatás összefüggések felhasználásával, vagy pedig irodalmi adatok alapján történt?

4. Lát-e arra reális esélyt, hogy a pollen NAD(P)H oxidázokat specifikusan gátló inhibitor lehessen fejleszteni: elképzelhető-e (esetleg már ismert) különbség a pollen és a humán NAD(P)H oxidázok (1) szerkezete (2) szubsztát felhasználása, illetve (3) ismert inhibitorokkal (pl. flavoprotein-, hem ligand-, bipiridil-, vagy benzimidazol típusú inhibitorok) való gátolhatósága között?

5. Sikerült-e előbbrejutni az adjuvánssal kiegészített vakcinálás kérdésében; nevezetesen lehet-e már tudni, hogy a szintetikus CpG szekvenciákban a G $\rightarrow$ 8oxoG csere milyen hatással van az oligonucleotid adjuváns aktivitására?

Összefoglalva: Bácsi Attila dolgozata amely a virágpor egyik normál összetevője által generált reaktív oxigén származékok szerepét vizsgálja a pollen által kiváltott allergiás reakciók kialakulásában a szerző és munkatársai által felfedezett és széleskörűen jellemzett felismerés kapcsán, egy olyan innovatív, kiemelkedő munka, amely mind formailag mind pedig tartalmilag egyértelműen eleget tesz az akadémiai doktori disszertáció követelményeinek.

Fentiek alapján javaslom Bácsi Attila akadémiai doktori értekezésének nyilvános vitára bocsátását és a disszertáció elfogadását.

Budapest, 2017. február 20.



Kurucz István

az MTA doktora