

OPPONENSI VÉLEMÉNY

Dr. Hársfalvi Jolán

„Hemosztázis és trombózis. *In vitro* áramlási- és klinikai modellek”

című MTA doktori értekezéséről.

A hemosztázist és a trombózis kialakulásában részt vevő komponensek szerepét elemző, a szerző által „MTA doktori mű”-nek címzett disszertáció 88 számozott oldalt tartalmaz, melyhez kiegészítésként csatlakozik a dolgozat alapját képező közlemények és előadások listája. Ez utóbbi a 6 kongresszusi előadáson kívül 22 közleményt sorol fel. Ezek összesített impakt faktora 86.9 és 12 olyan közlemény van köztük, melyben a jelölt első, illetve utolsó szerzőként szerepel.

A dolgozat fejezeti beosztása sajátos: egy - egy oldal „Összefoglalás”-sal illetve „Bevezetés és a mű célja”-val indít, mely döntően a fent említett kiegészítő közleményjegyzék publikációira hivatkozik. Az „Irodalmi összefoglalás / háttér” 29 oldalon elemzi a trombus képződés irodalmilag ismert mechanizmusait, a trombociták és döntően a von Willebrand faktor alapvető szerepét. Az „Anyagok, klinikai minták és módszerek” 11 oldalas fejezetben a minta-előkészítés fázisait és a rutinszerűen alkalmazott, illetve speciális laboratóriumi eljárásokat ismerteti. Ezt követi a 26 oldalas „Eredmények” fejezet, amit a 12 oldalas „Eredmények értékelése” diszkutál. A mű végén a „Hivatkozások” 171 közleményt (köztük vegyesen a saját publikációkat is) sorol fel, különállóan a szerző saját scientometriai adatait nem tartalmazza.

Véleményem szerint az eredmények ismertetésénél a saját munkát kihangsúlyozó fejezet elrendezést kellett volna választania. Ugyanakkor a nemzetközi kritikát kiállt közleményekre épülő disszertáció erénye, hogy az döntően az első- és utolsószerzős dolgozatok lényegesebbnek tartott összefüggéseire koncentrált. Ennek megfelelően a bemutatott eredmények az első- és utolsószerzős publikációkban megjelent információk gondosan szelektált összességét képviselik.

Az értekezés nyelvezete általában gördülékeny, bár fogalmazása nem mindenütt precíz. Sajnos a központoszási, nyelvtani és helyesírási hibák esetenként az érthetőséget is zavarják, ezek tételes felsorolásától azonban eltekintek. A bevezetést és eredményeket tartalmazó fejezetek a tudományos munkát nem időrendi sorrendben, sokkal inkább tematikai szempontok alapján mutatják be. A munka háttérét bemutató fejezet jelentős része tankönyvileg tárgyalt, leginkább egy összefoglaló monográfiába illő ismereteket közöl.

A továbbiakban a disszertáció tartalmi vonatkozásaival kapcsolatos néhány észrevételemet szeretném megtenni:

A 22. oldalon a szerző azt állítja, hogy a von Willebrand betegség a populáció mintegy 1 %-át érinti. A von Willebrand betegséget a National Institutes of Health (NIH) alá tartozó Office of Rare Diseases (ORD) ritka betegségként tartja számon. A betegség, vagy valamely altípusa a szervezet adatai szerint az USA-ban 200.000-ből 1 főt érint. Az „Orphanet” nevű, a ritka betegségek előfordulásával foglalkozó európai nemzetközi konzorcium 1-5/100 000 főben határozza meg a betegség gyakoriságát. Ez az adat azonban számos szerző szerint alábecsült, prevalenciája az egyes tanulmányokban jelentősen eltérő, az ott adott becslések alapján 0,1-1,3 % lehet. Az eltérő prevalencia adatok ismertetése, magyarázata hasznos lett volna.

A „Trombusképződést gátló anyagok / inhibitorok” című alfejezetben sajnálatosan nem esik szó a klinikai gyakorlatban alapvető jelentőségű antitrombotikus hatású szerekről és a trombociták aggregációját gátló gyógyszerekről.

A bevezetésben a Bernard - Soulier szindrómát nem említi, noha az eredmények között esetismertetésként egy szerzett Bernard - Soulier szindrómás beteget mutat be.

A módszerek leírásánál nem derül ki egyértelműen, hogy a „Klinikai minták, mintakezelés” alfejezet adatai melyik vizsgálatra vonatkoznak. A módszerek leírásánál

hiányolom, hogy nem tér ki arra: történt-e vizsgálat arra vonatkozólag, hogy a PRP és PPP max. 6 hónapig történő mélyfagyasztása befolyásolja-e a trombociták aggregabilitását. A trombocita aggregabilitás diurnális ritmusa jól ismert jelenség, ezért a jelöltnek arra is ki kellett volna térnie, hogy a vérvételek szisztematikusan adott napszakban történtek-e. Nem részletezi, hogy történt-e vizsgálat arra vonatkozólag, hogy az ún. „poolozás” befolyásolja-e a trombocita aggregációt. A risztocetin indukálta trombocita aggregáció (RIPA) meghatározás leírásánál nem tüntette fel, hogy milyen módszerrel és eszközzel történik a trombocita aggregáció mérése, és csak később kerül említésre, hogy Lumi aggregométerrel történt a trombocita aggregáció meghatározás. Itt csak ennek leírásból derül ki, hogy metodikailag optikai aggregometriás mérésekről van szó. A specifikációk a módszerek leírásánál több helyen hiányoznak (pl. az áramlási kamrák leírásánál), s esetenként pontatlanok.

A jelölt nem részletezi, hogy honnan származtak a sejtenyészetekben felhasznált humán köldökvéna sejtek. A „Sejtenyészetek, mátrixok és vizsgálatok” című alfejezet végén a „Trombocita adhézió és trombusképződés, aggregáció kísérleti modellje” részre irányít a párhuzamos lemezű kamrák részletes leírásáért, de ilyen című alfejezet a tartalomjegyzékben nem szerepel. Ugyanakkor a 2B típusú von Willebrand betegek fenotípus és genotípus vizsgálatát az eredmények között felsorolja, de a módszerek között nem szerepel a vizsgálat leírása.

Az „Eredmények” között számos értékes, innovatív módszertani eljárás leírását is találjuk, mint pl. a PPC és a CPC összehasonlítását az adhéziós területek, az SPD és a vWF eloszlása szempontjából. A szerző saját fejlesztésű, a vWF multimer kvantitatív meghatározására alkalmas módszere szintén csak az „Eredmények” között került leírásra, csakúgy, mint a VWF és a GPIb receptor közötti kölcsönhatás vizsgálatára alkalmas ugyancsak figyelemre méltó, saját fejlesztésű eljárás.

A trombusképződés és a trombogén felszín vizsgálatát izolált kollagénen, illetve HUVEC és HMEC-1 sejtvonalak által termelt extracelluláris mátrixon vizsgálta francia kollaborációban. Meghatározták a HUVEC és az HMEC-1 ECM prokoaguláns aktivitását.

Megállapítja, hogy magas áramlási sebességnél a szubendoteliumon adhézió és aggregáció a vWF, illetve I-es, III-as és IV-es típusú kollagén nélkül is bekövetkezhet. Leírja, hogy a trombin inhibitor hirudin jelenlétében a trombusképződés elmaradt a HCEM-1 ECM-en, de nem változott a kollagén mátrixon. HUVEC sejtek esetén viszont nem közli a hirudin hatását az adhézióra és a trombus képződésre. Az értékelésben hiányolom a hirudin különböző trombogénitású felszíneken észlelt eltérő hatásának plauzibilis magyarázatát.

Atomerő mikroszkópos vizsgálatok során kollagénhez kötött vWF molekulák morfológiai analízisét végezte el alacsony és magas nyírófeszültség mellett azzal a céllal, hogy a vWF áramlásfüggő kötési kapacitás-növekedését magyarázza. Arra a következtetésre jutott, hogy a nyíróerő nem befolyásolja jelentősen a kollagénnel fedett felszínhez kötődő vWF molekula alakját, azaz ellentétben más szerzőkkel azt találta, hogy a vWF molekula nem mutat áramlási irányba rendeződő fibrilláris struktúrát. Nem részletezi, hogy az eltérő módszertan oka lehetett-e az eredmények különbözőségének.

A vWF ellenes 1C1E7 antitest vizsgálata során megállapítja, hogy az antitest hatására a vWF nagyméretű multimerei kötődtek a trombociták felszínéhez, mely a 2-es típusú vWB-et modellezi. Arra következtet, hogy nagy nyírófeszültség esetén a vWF-t már tartalmazó trombocita nem képes adhézióra.

Pióca nyálából izolált calin specifikus gátló hatását írja le a vWF - kollagén kölcsönhatásra, ami jelentősen hozzájárult a peptid molekula trombózis modellekben való alkalmazhatóságának igazolásához. A vWF konformáció-függő kötőhelyeit ugyanezen kölcsönhatásra specifikus fágokkal és fágpeptidekkel is vizsgálta. A vizsgálat során vWF-kollagén kölcsönhatást gátló peptidet azonosított, melynek a későbbiekben antitrombotikus hatású gyógyszer kifejlesztésében lehet fontos szerepe.

A trombin aktivitás gátlásának a trombus képződésre kifejtett hatását 4-tio-deoxiuridiláttal módosított aptamerrel vizsgálta. A szer, további optimalizációt követően alkalmasnak tűnik új antitrombotikus gyógyszerek kifejlesztésére. Hiánypótló lett volna a

hatásmechanizmus összehasonlítása a már klinikai használatban lévő trombin inhibitorokkal.

A jelölt dolgozata nem tartalmazza az általa újnak tartott tudományos eredményeinek tételes felsorolását, mely egyébiránt formai hiba, így ezek megadását az opponensi válaszban mindenképpen fontosnak tartom.

Összességében megállapítható, hogy dr. Hársfalvi Jolán eddigi kutatói pályafutása alatt jelentős mértékben járult hozzá ahhoz, hogy a trombózis kialakulásának mechanizmusát pontosabban megérthessük. Egyedülálló hazai metodikai fejlesztéseket valósított meg, majd a bevezetett újszerű módszerek segítségével sikeres kutatómunkát végzett. A jelölt nagyszámú, köztük vezető lapokban is megjelent publikációjában részletesen tárgyalt számos celluláris és molekuláris mechanizmust és feltárta azok kapcsolatát különböző kórállapotokkal és gyógyszerhatásokkal.

Mindezek alapján dr. Hársfalvi Jolán MTA doktori értekezésének nyilvános vitára bocsátását és sikeres védelem esetén az MTA doktori cím odaítélését támogatom.

Pécs, 2012. október 4.



Dr. Tóth Kálmán

egyetemi tanár

az MTA doktora