

Válasz Prof. Dr. Szabó János opponensi bírálatára

Szeretném megköszönni Szabó Professzor Úr véleményét, építő jellegű kritikáját és a doktori értekezés elfogadására tett javaslatát. A különböző témakörökkel kapcsolatos kérdéseire sorrendben a következőket válaszolom:

Szakmai kritikai észrevételek

1. *„A dolgozatban bemutatott vizsgálatokban néhány esetben a betegszám meglehetősen alacsony. Ez nem von le a dolgozat tudományos értékéből, hiszen számos esetben ritka betegségről van szó, de a nagyobb esetszám biztosan növelné a statisztikai analízis pontosságát.”*

A disszertációmban bemutatott vizsgálatokban néhány esetben valóban alacsony a betegszám, de mint Professzor Úr is említi, ritka betegségekről van szó. Az adatok statisztikai pontosságát növelné a magasabb esetszám.

2. *„Az ábráknak a dolgozatba illesztésekor néhány esetben pontatlan szerkesztés látható. Egyebekben az ábrák szöveges értelmezése szépen kidolgozott és részletes.”*

Az olvadási görbe analízist mutató ábrákat a számítógépes program generálja, azokon nem lehet változtatni. Ezek jól néznek ki a monitoron, azonban beillesztéseknél veszítenek minőségükből.

3. *„A dolgozat szövegében néhány elírás és szerkesztési hiba látható, azonban ez érdemben nem befolyásolja a dolgozat értékelését.”*

Az esetenkénti elírásokért is elnézést kérek.

Válaszok a feltett kérdésekre

1. *„A Toxoplasma gondii kimutatására napjainkban világszerte számos PCR technikát használnak, szükségesnek látja-e egy standardizált, univerzális módszer bevezetését a különböző laboratóriumokban és melyik vizsgálati módszert tartja a leghatékonyabbnak és legkönnyebben elterjeszhetőnek?”*

A klinikai gyakorlatba könnyen bevezethető, megbízható, olcsó és gyors módszer alkalmazását én is támogatnám. Fontos lenne, hogy egységes módszerrel készült eredményeket kapjanak a betegek. Erre alkalmas a valós idejű PCR módszerrel

alapulómeghatározás, a legutóbbi irodalmi adatok is ezt bizonyítják (*Filisetti és mtsai 2015*). Még abban sem találtak különbséget a szerzők, ha „házi” és a cégek által tervezett és gyártott kitet használtak az összehasonlításban részt vevő laboratóriumok. Ennek ellenére fontos lenne, hogy CE/IVD jelöléssel ellátott kiteket használják, ami a minőségbiztosítást is elősegítené. Így az egyes reagens váltások által okozott problémák elkerülhetők lennének, és a nyomon követhetőség is megvalósulhatna. Az egyik gyártó termékének engedélyeztetése folyamatban van, hamarosan CE/ICD jelzéssel forgalomba is kerülhet. Ez a kit alkalmasnak látszik a *Toxoplasma gondii* egységes kimutatására Magyarországon.

2. „A polimorfizmusok, mutációk kimutatása kapcsán milyen ritka betegségekben tartaná szükségesnek magyarországi szűrőpanel kialakítását és hogyan definiálná a szűrés célcsoportját?”

A hordozóság szűrésre két fő célcsoportot lehet elkülöníteni, az egyik az átlagos populáció (panethnic), a másik a különböző etnikai csoportok. Az átlagos populációban olyan gének eltéréseinek a kimutatását célozzák meg, amelyek gyakoribbak a populációban. Az egyes etnikai csoportokban a genetikai eltéréseknek két eredete lehet, az egyik az alapító, vagy founder mutációk, a másik pedig zárt populációban az egymás közötti házasodás (genetic drift) miatt egyes genetikai betegségek gyakoribb előfordulása.

Több panelt is ki lehetne alakítani, ezek lehetnének a cisztás fibrózis, neuromuscularis betegségek, anyagcsere-betegségek, haemophilia, mitokondriális betegségek, thrombophilia. Ezek kialakítása és az egyes panelek nagysága az anyagi körülményektől függ, de mindenképpen indokolt olyan családok kivizsgálása célzottan, ahol valamilyen genetikai betegség gyakrabban fordul elő.

Magyarország népessége nem éri el a 10 milliót, így a ritka betegségek előfordulása is alacsony, ez speciális helyzetet teremt. Gyakorlatilag mára kialakult a ritka genetikai betegségek kimutatásának rendszere. Szinte minden egyetemen létrejöttek a ritka betegségekkel foglalkozó intézetek, amelyekhez még társulnak különböző speciális területre szakosodott intézetek, laboratóriumok. A prenatális diagnosztikával foglalkozó intézeteknél különösen fontos tudni azt, hogy hova lehet küldeni az adott speciális genetikai betegséggel rendelkező házaspárt, vagy a magzati mintáját. Az átlagos populációban a cisztás fibrózis, a neuromuscularis betegségek, az anyagcsere-betegségek, a haemophilia, amelyek leggyakrabban meghatározásra kerülnek. Ezek az esetek saját laboratóriumunkban, vagy a társintézetekkel együttműködve kivizsgálhatók. Ha nagyon ritka betegséggel jelentkezik

valaki, akkor külföldi intézetek segítségét lehet igénybe venni. Például a Centogene cég Németországban több mint ezer ritka betegség meghatározását vállalja. Kisebb országokban, mint Magyarországon, nagyon sok ritka betegség meghatározásához a szükséges laboratóriumi feltételek megteremtése nem gazdaságos.

Az Amerikai Egyesült Államokban több panelt alakítottak ki a hordozó szűrésre az átlagos populációban, ezek a hemoglobinopathiák, a fragilis X szindróma, a cisztás fibrózis és az anyagcsere-betegségek kimutatását célozzák meg. Az elvégzendő tesztek a vizsgálandó személy, vagy család etnikai hovatartozása és családi anamnézise szerint válogatják össze. Ilyen a GoodStart Select teszt, vagy több betegséget vizsgál az Inherigen teszt (160, főleg gyermekkorban megjelenő betegséget), az Inheritest 90 autoszómális recesszív betegséget határoz meg, illetve a Natera One, amely 13 ACMG (American College of Medical Genetics) által javasolt hordozóságot diagnosztizál.

Hazánkban a veleszületett anyagcsere-betegségek újszülöttkori szűrővizsgálata 1968-ban a fenilketonuria vizsgálatával indult, majd 1975-ben a galaktozémiával egészült ki, később a hipotireózis (1985), majd a biotinidáz deficiencia (1989) került be a szűrőpanelbe. A tandem tömegspektrometriás módszer alkalmazásával az újszülöttkori szűrővizsgálat további 22 kórképpel bővült 2007-ben.

3. *„A génexpressziós vizsgálatok során a CD24 expressziós eredményeket a HPRT génre normalizálta. Miért a HPRT gén lett a housekeeping gén, mi alapján választotta ki? Felmerült-e más génre történő normalizálás lehetősége?”*

Meller és mtsai (2005) gyűjtötték össze a placentában expresszálódó háztartási géneket. Ezek közül választottam ki néhányat, így a TATA box-binding protein-t (TBP), a sukcinát dehidrogenáz komplex A alegységét (SDHA), és a HPRT-t. Az utóbbi kifejezetten alkalmas préeklampsziás minták vizsgálatára, mivel a hypoxia és a növekedési faktorok eltérő szabályozása nem befolyásolja az expresszióját (Nagy és mtsai, 2008). Több háztartási génre állítottam be valósidejű meghatározási módszert.

A prosztatával kapcsolatos kísérletek is felhívták a figyelmet arra, hogy mennyire fontos a megfelelő háztartási gén kiválasztása a génexpressziós vizsgálatok során. A foszfolipáz-2A bizonyos szöveteknél jól használható, de érdekes módon a prosztatánál nem, eltérő módon működik tumoros és egészséges prosztata szövetekben. Viszont a β -globin megfelelt erre a célra (Nagy és mtsai, 2009).

4. „Mi a véleménye a valósídejű PCR módszer alkalmazhatóságáról és a PCR alapú diagnosztikai módszerek várható fejlesztéseiről az anyai vérből izolálható szabad DNS kimutatásán alapuló prenatalis vizsgálatokban?”

A valósídejű PCR alkalmazása a jövőben is megmarad a mutációk (Leiden, prothrombin), a deléciók (*F508del*), a mikroorganizmusok (vírusok, baktériumok, *Toxoplasma gondii*), transzlokációk, és génmanipulált növények, állatok vizsgálatában.

A prenatalis alkalmazás lehetőségét, a technika fejlődését jól nyomon lehet követni a szabad nukleinsavak kimutatása során. *Dennis Lo és mtsai* 1997-ben mutatták ki a magzat nemét és RhD vércsoportját. Erre a valósídejű PCR a legalkalmasabb módszer. Viszont a leggyakoribb triszómiák diagnosztizálását szeretne volna minden ezzel a témával foglalkozó kutató és klinikus megoldani. Ezt az újgenerációs szekvenálók megjelenése, a tömeges paralel szekvenálás tette lehetővé 2010-től (*Palomaki és mtsai 2011*). A leggyakoribb triszómiákat és a magzat nemét 99,9%-os specificitással és szenzitivitással lehet ezzel a módszerrel meghatározni. A kimutatható betegségek sora valószínű, bővülni fog, *Lyn Chitty*, a University of London munkatársa és csoportja egyes génmutációk meghatározását is elvégzi nem-invazív módon vett mintákból (cisztás fibrózis, Fraser syndroma, stb.) (*Mckay és mtsai 2012*).

A jövőben várható az újgenerációs szekvenáláson alapuló módszerek rohamos elterjedése. Nagyon hasznos lenne Magyarországon is néhány olyan egyetemi intézet, ahol a feltételek adóttak a bevezetésre, és nem kellene külföldre szállítani a várandósok mintáit. A hazai meghatározás lehetővé tenné a minták jobb nyomon követését, és feltételezhetően olcsóbb is lenne. Az igény megvan a várandósok részéről. Valószínű a nem-invazív mintavételi eljárásokon alapuló módszerek javallati köre módosul a következő években. A szűrés árában is csökkenés várható. Azt azonban figyelembe kell venni, hogy pozitív eredmény esetén a hagyományos invazív módon vett minta felhasználásával megerősítés szükséges, ahogy ezt a Magyar Humángenetikai Társaság a legutóbbi közgyűlésén (2014) kinyilatkoztatta. A magzatvízsejtek kromoszóma-vizsgálata egyelőre az „arany standard” marad.

Végezetül őszintén köszönöm Szabó Professzor Úr bírálatát, észrevételeit, megjegyzéseit, kérdéseit, és azt, hogy az értekezés elfogadását javasolja. Tisztelettel kérem, hogy opponensi véleményére és kérdéseire adott válaszaimat szíveskedjék elfogadni.

Budapest, 2015. március 16.

Nagy Bálint

Irodalom

ACOG Committee Opinion No. 442: Preconception and prenatal carrier screening for genetic diseases in individuals of Eastern European Jewish descent. Obstet Gynecol 2009;114:950-953.

Filisetti D, Sterkers Y, Brenier-Pinchart MP, és mtsai, Multicentric comparative assesment on the bio-evolution Toxoplasma gondii detection kit with eight laboratory –developed PCR assays for molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis J Clin Microbiol 2015;53:29-34.

Grody WW, Bernard PS, Herrmann MG, és mtsai, ACMG position statement on prenatal/preconception expanded carrier screening. Genet Med 2013;15:482-483.

Magyar Humán-genetikai Társaság X., Jubileumi Kongresszusa, 2014. szeptember 4-6. Budapest, www.mhgt.hu

Mckay F, Barrett A, Fielding S, Lench N, Chitty L, Clinical implementation of non-invasive prenatal diagnosis for single gene disorders 2nd Central-Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids in Non-Invasive Prenatal Diagnosis, 25-26 Oct, 2012. Olomouc Biomedical Papers 2012;156:S112.

Meller M, Vadachkoria S, Luthy DA, Williams MA, Evaluation of housekeeping genes in placental comparative expression studies. Placenta 2005;26:601-607.

Nagy B, Berkes E, Rigó B, és mtsai, Under-expression of CD24 in pre-eclamptic placental tissues determined by quantitative real-time-PCR. Fet Diagn Ther 2008;23:263-266.

Nagy B, Szendrői A, Romics I, Overexpression of CD24, c-myc and phospholipase 2A in prostate cancer tissue samples obtained by needle biopsy. Pathol Oncol Res 2009;15:279-283.

Palomaki EG, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, és mtsai, DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An international clinical validation study. Genetics in Medicine 2011;13:913–920.