

Opponensi vélemény

*Dr. Nagy Bálint: „A valós idejű PCR módszer alkalmazása
a klinikai genetikai gyakorlatban” c. MTA doktori értekezéséről*

Aligha van a medicinának olyan ága, ahol olyan intenzív fejlődés következett be az utóbbi évtizedben, mint a genetikában: A Humán Genom Program eredményei és a molekuláris genetikai technikák térhódítása, és napról napra való gazdagodása megváltoztatta a humán genomra vonatkozó ismereteinket, új lehetőséget teremtett a genetikai betegségek diagnosztikája terén, közelebb vitt bennünket a betegségek patogenezisének megismeréséhez, s ezáltal új perspektívát nyitott a betegségek személyre szabott gyógyítása és megelőzése terén. Napjainkban is tanúi és részben részesei vagyunk a technikai technológiai fejlődésnek, újabb és egyre finomabb módszerek válnak elérhetővé, amelyek eredményesebbé teszik a kutatást és hatékonyabbá a genetikai betegségben szenvedők klinikai ellátását. A laboratóriumban dolgozók és a klinikai genetikusok feladata és felelőssége ma az új technikai, technológiai lehetőségek minél gyorsabb bevezetése és hatékony alkalmazása a mindennapi klinikai gyakorlatban.

A jelölt ennek az elvárásnak tett eleget akkor, amikor öt éves finnországi tanulmányútját követően hazatérve a 2005 utáni években itthon, a Semmelweis Egyetem I.sz. Nőgyógyászati Klinikájának genetikai laboratóriumában bevezette az akkor úttörőnek számító valós idejű PCR technikát és munkatársaival a világon negyedikként, hazánkban elsőként vezették be a módszert számbeli kromoszóma rendellenességek, majd egyéb, a terhes patológiával összefüggő kérdések tanulmányozására. Az értekezésben a jelölt a valós idejű PCR-rel szerzett tapasztalatait foglalja össze, összehasonlítva azt más módszerekkel, különböző, a várandós anyák ellátása, a genetikai tanácsadás során felmerülő diagnosztikus kérdések tanulmányozásában. Az egyes – egymástól független témájú vizsgálatokat – a közös módszer és a terhességgel való összefüggésük kapcsolja össze.

A dolgozat 146 oldalon, 266 irodalmi hivatkozással, a szokásos szerkezeti felépítésben foglalja össze mondanivalóját. Az *Előzmények és irodalmi áttekintés* c. fejezetet követi a *Célkitűzések* ismertetése, majd az *Anyagok és Módszerek, az Eredmények és a Megbeszélés*, végül az *Új eredmények összefoglalása* fejezet.

Az értekezés legterjedelmesebb része, szöveges részének mintegy fele (111 oldalból 47) az *Előzmények és irodalmi áttekintés* fejezet, amelyben a szerző bemutatja a genetikai laboratóriumi módszerek fejlődését, különös tekintettel az általa alkalmazott fluoreszcens PCR és valós idejű PCR módszerekre. A leírás analitikai szempontból korrekt, didaktikus, jól tükrözi a jelölt metodikákban való jártasságát, az egyes módszerek (készülékek, reagensek, detektálási eljárások, az eltérő típusú próbák) előnyeit és hátrányait. Ugyanakkor a napjainkban már általánosan ismert és széles körben használt módszerek ilyen részletes ismertetése egy doktori értekezésben nem látszik szükségesnek.

Az irodalmi áttekintés fejezetben a módszer főbb alkalmazási területeit is bemutatja: a mikrobiológiai diagnosztika területéről a toxoplazma gondii kimutatását, az egynukleotidos polimorfizmus vizsgálatok közül a 21-triszómia és a VEGF gén polimorfizmusának vizsgálatát, az *F508del* delécia kimutatását cisztás fibrosisban, génexpressziós vizsgálatok példaként a CD24 mRNS expressziót, s végül az anyai szabad DNS vizsgálatot említi. Ahogy a *Célkitűzések* fejezetből később megtudjuk, e témakörök vizsgálata képezi a szerző munkásságának alapját. Az eklektikusan kiválasztott, témájukban egymástól függetlennek látszó vizsgálati területek rövid klinikai és módszertani jellemzőit ismerteti: toxoplazma gondii kimutatása, a várandós anyák fertőződésének lehetséges következményei és a kórokozó kimutatásának indirekt (szerológiai) és direkt, köztük a F-PCR-rel és a kvantitatív valós idejű PCR-rel való kimutatásának lehetőségei; 21-triszómia kimutatása egynukleotidos polimorfizmus alapján; VEGF gén SNP polimorfizmusának vizsgálata HELPP szindrómában; a cisztás fibrosis *F508 del* mutációjának kimutatása, a CD24 génexpresszió vizsgálata s végül az anyai vérben lévő magzati szabad nukleinsav vizsgálata nemmeghatározásra és RhD pozitivitás meghatározására.

A *Célkitűzésekben* megfogalmazottak szerint a jelölt célja az általa alkalmazott módszerek összehasonlítása, optimalizálása és klinikai alkalmazhatóságuk vizsgálata az egyes témakörökben. Az egyes vizsgálati területeket a közös módszer kapcsolja össze.

A Célkitűzéseket követő Anyagok és Módszerek, Eredmények és Megbeszélés fejezetekben újra és újra sorra veszi az egyes témaköröket, a címnek megfelelő mondanivalóval. A témákra való ismételt visszatérés az egyes témák feldarabolódását és elkerülhetetlenül ismétlésekbe bocsátkozást eredményez, az olvasót pedig visszalapozásokra kényszeríti.

A dolgozat egésze, szerkezete szempontjából szerencsésebbnek tartottam volna, ha a bevezető részben a módszerek ismertetése és alkalmazási lehetőségeik csupán általános felvázolása után az egyes témakörök ismertetésére a *Célkitűzéseket* követően került volna sor akár úgy, hogy az egyes témakörök alkottak volna egymást követő önálló fejezeteket, majd egy közös, általános megbeszélés adta volna meg a munka konklúzióját. Jóllehet ez kissé rendhagyó felépítése lenne egy doktori értekezésnek, segítette volna az egyes kérdések folyamatos ismertetését, ugyanazon fejezeten belül ismertetve az egyes témák előzményét, a vizsgálat indokoltságát, a konkrét módszertani vonatkozásokat, az elvégzett vizsgálatokat és azok eredményét sőt a megbeszélés odavonatkozó részét is.

A fenti – döntően formai – megállapításomon túl az egyes témakörökre vonatkozó megjegyzéseimet és kérdéseimet azok sorrendjében teszem fel. Klinikai genetikusként és gyermekgyógyászként gondolataim, kérdéseim elsősorban a vizsgálatok klinikai aspektusait, a kapott eredmények interpretálását és a vizsgálati módszer jövőbeli hasznosításának lehetőségét érintik.

1. A toxoplazma gondii mikrobiális genomjának (122 bp) kimutatása.

A szerző célja a kongenitális toxoplazma infekció megbízható meghatározása, azaz annak vizsgálata, hogy a várandós anyák szerológiailag igazolt toxoplazma infekciója esetén a protozoon átjut-e a placentán, a kórokozó magzatvízben való kimutatása segít-e az anya antibiotikum (spiramycin) kezelése szükségességének eldöntésében, a kongenitális toxoplasmosis megelőzésében. Hetvennégy szerológiailag vagy anamnézis szerint toxoplazma fertőzésen átesett várandós anyát vizsgált először hagyományos PCR, később F-PCR és DNS fragment analízis, majd valós idejű PCR módszerrel, pozitív kontroll alkalmazásával. Az említett módszerek analitikai szempontból egyre érzékenyebb és gyors meghatározást tettek lehetővé, a módszer érzékenysége a protozoon egy kópiájának kimutatását is lehetővé teszi.

Ismert, hogy az IgM pozitivitás friss, illetve nemrégiben lezajlott infekcióra, míg az emelkedett IgG érték korábban bármikor (akár a terhességet megelőzően) átvészelt fertőzésre utal. A magzat veszélyeztetettségét, a valószínű fertőzést és az antibiotikum kezelés indikációját a frissen lezajlott fertőzés kapcsán fellépő viraemia jelenti.

A 74 vizsgált mintából 58 volt IgM pozitív (72. old.-on ez 48), kettő IgG pozitív, egy esetben az ultrahang a betegsége utaló eltérést mutatott, míg a többi anya feltételezett expozíció miatt került vizsgálatra. A vizsgálatra a terhesség 18-34. hete között került sor.

A magzatvíz vizsgálat eredménye szempontjából lényeges kérdés, hogy mennyi idő telt el a fertőződés feltételezett bekövetkezése és az amniocentézis között? Mivel a fertőződés következménye a terhesség egyes fázisaiban klinikailag különböző, fontos, hogy az anya a terhességet közvetlenül megelőzően, a terhesség korai vagy késői fázisában fertőződött-e? (A szerző hivatkozik Hohifeld és mtsai (1994) közleményére, miszerint a kongenitális toxoplazmózis diagnosztizálásában a 18 terhességi hét után végzett UH és magzati molekuláris genetikai vizsgálatot tartják a legmegbízhatóbbnak.

A magzatvíz minta vizsgálata F-PCR-rel és DNS fragment analízissel öt esetben bizonyult pozitívnak a 74-ből: közülük négy IgM pozitív, az ötödik a pozitív UH lelet miatt vizsgált anya mintája. A módszer diagnosztikus előnyeinek elismerése mellett az eredmény klinikai hasznosítása szempontjából számos kérdés merül fel:

1. A szerző adatai szerint hazánkban évente 1-2 toxoplazmózis eset fordul elő.
Hogyan sikerült 58 IgM pozitív várandós összegyűjtése? Mi volt a toxoplazma szerológiai vizsgálat indikációja? (expozíció, tünetek: nyirokcsomó duzzanat stb.?)
2. *Az öt pozitívnak bizonyult anya esetében több olyan kérdés merül fel, amelyek a fertőződés ideje, az IgM titer, a kórokozó kópiaszáma, az antibiotikum kezelés indikációja, a fertőződés klinikai következménye összefüggésére vonatkoznak:*
 - Mi volt a konkrét anamnézise az öt pozitív várandósoknak?
 - Mi volt az ultrahang eltérés az 5. anyánál? Specifikus volt-e a toxoplazmózisra, hiszen esetében sem IgG sem IgM nem volt kimutatható.
 - Volt-e különbség az IgM titerben a pozitív mintájú anyák között? A pozitív esetekben kimutatható-e összefüggés a kórokozó kópiaszáma és az IgM értéke, illetve a kópiaszám és a fertőződés klinikai következménye között?

- Mi lett a sorsa az említett terhességeknek? Kaptak az anyák antibiotikumot? Az antibiotikum adást követően csökkent-e a kórokozó kópiaszáma? Van-e adat a megszületett gyermekek klinikai státuszáról?
3. Mennyiben tekinthető a vizsgálat szenzitívnek és megbízhatónak, ha 54 IgM pozitív esetben a teszt negatív eredményt adott. Mi a magyarázata a többi IgM pozitív várandós anya negatív magzatvíz leletének, hiszen az IgM egyértelműen friss fertőzésre utal (antibiotikum adása, placenta kisebb átjárhatósága, túl rövid vagy túl hosszú idő a fertőződés és az amniocentézis között).
 4. A jelölt megállapítja, hogy a magzatvízben lévő parazitaszám és a fertőzés súlyossága összefüggést mutat, eseteiben azonban – az alkalmazott módszer érzékenysége ellenére – nem tér ki erre az összefüggésre. Van-e kimutatható korreláció a protozoon kópiaszáma és a tünetek súlyossága között? Egyáltalán a szerológiai pozitivitáson túl volt a várandósoknak tünete?
 5. A PCR pozitív és negatív esetekben kimutatható volt-e a kórokozó az anyai vérből is? Érdekes lenne a vér-, és a magzatvíz-kópiaszám összehasonlítása.

Mindezen kérdések megválaszolása fontos annak eldöntéséhez, hogy mennyiben alkalmazható a módszer a kórokozó transzplacentáris átjutásának igazolására, s ezáltal az antibiotikum kezelés szükségességének eldöntésére.

A fenti adatok hiányában elvész a jelölt és munkacsoportjának az úttörő szerepe a transzplacentaris passage meglétét vagy kizárását célzó, a klinikai döntéshozatal szempontjából meghatározó jelentőségű vizsgálat hazai bevezetésében. Jóllehet a jelölt hangsúlyozza, hogy a kvantitatív vizsgálat eredménye segít a spiramycin kezelés elindítására vagy folytatására vonatkozó döntés meghozatalában, e döntésről a pozitív esetekben nem tesz említést. Az adekvát genetikai tanácsadáshoz fontos az alábbi kérdések megválaszolása:

- *A nagyszámú IgM pozitív anya negatív eredménye birtokában mennyiben lehet a döntéshozatalt erre a vizsgálatra alapozni?*
- *Lehet-e megfogalmazni olyan ajánlást, miszerint nincs szükség az antibiotikum kezelés folytatására a magzatvíz toxoplazma PCR negatív eredménye esetén?*
- *Melyek azok az esetek, az ultrahangvizsgálat során igazolható típusos magzati toxoplazma fertőzésre utaló jeleken túlmenően, amikor a magzatvíz vizsgálat eredménye alapján a terhesség 24. hete előtt komolyan mérlegelendő a terhesség befejezése is?*
- *Eredményei birtokában ajánlaná-e a módszer bevezetését más prenatális centrumok számára? Amennyiben igen, milyen indikáció esetében?*

2. Egynukleotidos polimorfizmus vizsgálata 21-triszómia kimutatására és a VEGF SNP polimorfizmus és HELPP szindróma összefüggésének tanulmányozására.

21 triszómia kimutatása

A jelölt hagyományos kariotipizálással, F-PCR-rel és olvadási pont analízissel kimutatott 67 21-triszómiás és 62 normál DNS mintát vizsgált a 21-es kromoszómán

lokalizálódó két SNP markerre (WIAF 899 és WIAF 2643) tervezett primerek és próbák alkalmazásával. A PCR amplifikációt olvadási pont analízis, olvadási görbe alatti területek meghatározása, majd az olvadási görbék fluoreszcencia negatív értékű derivált görbévé való átalakítása követte. A módszerrel a két SNP két allélja az olvadási pont különbség alapján jól elkülöníthető volt. A jelölt vizsgálataiban az egyik SNP marker (WIAF899) közel 42%-ban bizonyult informatívnak, a másik (WIAF 2643) nem adott megfelelő területi arányokat. A jelölt saját konklúziója, hogy több mint két SNP marker vizsgálatára, multiplex PCR végzésére van szükség.

Leírja a szerző, hogy a módszer bevezetése óta mintegy 20000 mintán végeztek F-PCR vizsgálatot magzatvízből. Nyilvánvalóan ezek a vizsgálatok nem a két SNP-n alapuló, 50%-nál alacsonyabb szenzitivitási módszerrel történtek. Tudomásom szerint az F-PCR vizsgálatok során a 13-, 18- triszómiát és a nemi kromoszómák aneuploidiáit is vizsgálták.

- Nem világos számomra, miért látta a disszertáns olyan fontosnak a két SNP-eredményeinek bemutatását.

E témával kapcsolatban azt sem szabad elfelejteni, hogy a módszer előnyei (gyorsasága, nem igényel osztódó sejteket) mellett - komoly hátránya, hogy *nem alkalmas a szerkezeti eltérések detektálására*, ami különösen fontos a kiegyensúlyozott transzlokáció hordozó családok esetében a kiegyensúlyozatlan utód kimutatásában. Mindez azt jelenti, *hogy a G-sávok kariotipizálást e módszer nem helyettesíti. Ugyanakkor egy negatív F-PCR eredmény a 21-triszómia kizárásával fals megnyugtatót jelent.*

Az is figyelemreméltó, hogy az utóbbi évtizedben elérhetővé és egyre szélesebb körben alkalmazott módszerré vált az arrayCGH módszer, amely kitűnő feloldó képességgel, nukleotidszinten képes meghatározni a kiegyensúlyozatlan eltéréseket, a genetikai anyag többletét és hiányát jelentő kópiaszám eltéréseket, a triszómiák mellett a mikroduplikációkat és deléciókat, sőt az SNP-eket is. Szemben a hagyományos kariotipizálással, a kiegyensúlyozott hordozók kimutatására ez a módszer sem alkalmas. egyre inkább előtérbe kerül azonban az anyai vér „szabad” nukleinsav vizsgálata, a parallel szekvenálással történő triszómia meghatározás. Mindezek alapján, kérdéseim a következők:

- Hogyan alkalmazzák a szerző laboratóriumában a G-sávok kariotipizálást és az F-PCR-t? Minden esetben párhuzamosan elvégzik mindkét módszert? Sikertelen kariotipizálás esetén hogyan adják ki a leletet a családnak?
- Mi a véleménye arról, hogy a korszerű módszer ismeretében van-e napjainkban létjogosultsága az F-PCR-nek a triszómiák kimutatásában?

Módszert dolgozott ki a jelölt a VEGF gén SNP-a és a HELLP szindrómára való hajlam összefüggésének vizsgálatára

A laboratóriumi leletek alapján diagnosztizált 75 HELPP szindrómás várandós anyja és 83 egészséges terhes esetében vizsgálta és hasonlította össze a VEGF gén három SNP markerének allél genotípusait. Megállapította, hogy *VEGF T-460T és a C+405C genotípusok fokozott kockázatot jelentenek HELPP szindróma kialakulására*. Valószínű, hogy más genetikai és környezeti faktorokkal együtt szerepet játszanak a betegség

létrehozásában. Preeclampsziában végzett hasonló vizsgálatok a VEGF szintekre (azaz a génexpresszióra) vonatkozóan ellentmondásos eredményt hoztak. E fenotípusos különbségek hátterében az (az is) állhat, a VEGF-nek több mint 30 SNP-át írták le. Az sem biztos, hogy a megfelelően megválasztott SNP-k vizsgálatára került sor. A vizsgálat mindkét említett betegségben indokolt, hiszen a VEGF expressziója összefüggésbe hozható a placenta kóros fejlődésével. Ismert, hogy a VEGF a placentáris növekedési faktor (PIGF) antagonistája. Megváltozott expressziója endoteliális diszfunkciót okoz, prokoaguláns fehérjék (von Willebrand faktor, endotelin, fibronektin, trombomodulin) termelődését idézi elő. Ebben a folyamatban egynukleotidos polimorfizmusának is szerepe lehet. A pontos mechanizmus tisztázásához a VEGF és más gének további SNP-inek vizsgálata szükséges. E tekintetben is a *GWAS tanulmányok* nyújthatnak újabb információkat.

3. A CF F508del mutációjának kimutatása valósídejű PCR-rel

A CF, e súlyos AR módon öröklődő megbetegedés több évtizedes története ellenére ma is az érdeklődés középpontjában áll. A betegségért felelős *CTRF* génnek máig több mint 2000 mutációját írták le. A legújabb adatok is alátámasztják azonban azt a tényt, hogy a kaukázusi populációban a leggyakoribb az esetek mintegy 70%-át kitevő F508del elnevezésű mutáció. Tekintettel a betegség súlyos, az életminőséget súlyosan rontó és az élettartamot megrövidítő volta, megelőzése, az érintett családokban való ismétlődés megakadályozása közös törekvés a genetikusok és a gyermekgyógyászok részéről egyaránt.

A jelölt valósídejű PCR módszerrel **116**, a SE I.sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika genetikai tanácsadását felkereső személy, 39 férfi és 77 nő DNS mintáját vizsgálta cisztás fibrosis F508del mutáció kimutatására. A minták 14 esetben amniocentézisből, 18 esetben chorionboholy mintavételből és 84 esetben perifériás vérből származtak. A RT-PCR alkalmazásával 67 normál (50 perifériás vérből, 10 chorionboholy mintából, 7 amniocentézisből), **44 heterozigóta** (32 perifériás vér, **5 chorionboholy, 6 magzatvíz**) és **öt homozigóta** (**2 perifériás vér, 3 chorionboholy, 1 magzatvíz**) F508del eredményt kapott.

Az ismertetett vizsgálattal és eredménnyel kapcsolatos általános megjegyzésem, hogy jóllehet a módszer alkalmas a hetero- és homozigóta delécio vagy a delécio hiányának kimutatására, a gén nagyszámú mutációinak és azok lehetséges kombinációinak ismeretében ennek az eredménynek önmagában nincs klinikai relevanciája: a negatív eredmény – egy pozitív klinikai kép/lelet birtokában nem zárja ki a betegséget; a magzati és a chorion vizsgálattal heterozigóta F508del-snak bizonyult magzatok egy nem vizsgált másik mutációval társulva betegek lesznek; homozigóta esetben alátámasztja a CF diagnózist. Ezért napjainkban a mintegy 30 mutációt rutinszerűen vizsgáló centrumok eredményeire kell támaszkodni.

A konkrét vizsgálattal kapcsolatos kérdéseim és megjegyzéseim a következők:

1. Nincsenek adatok arról, hogy a vizsgált 116 személy milyen okból kereste fel a genetikai tanácsadást: már volt beteg gyermekük? volt a családban CF-es gyermek?

2. Nem derül ki, milyen esetben végeztek vizsgálatot perifériás vérből és mi volt az indikációja a prenatális (chorion vagy magzatvíz) vizsgálatnak?
3. Az öt homozigóta eredmény a minta szerinti részletezésben hat: két perifériás vér, három chorionboholy és egy magzatvíz mintából – a hatodik a F508C del). Két esetben a perifériás vérből végzett vizsgálat során igazolták a homozigóta mutációt: a betegség súlyos prognózisának ismeretében (e betegek rendszerint kb. 30 éves korig élnek) meglepő, hogy a homozigóta állapotot terhes anyákon diagnosztizálták.
4. Mi lett a terhesség sorsa a 11 heterozigóta F508del és a 4 homozigóta prenatális diagnózis esetében? Különösen fontos lenne ismerni a heterozigóta magzatok sorsának alakulását: hiszen nem tudhatjuk, nem társult-e mutációjuk egy másik mutációval kettős heterozigótaságot és betegséget eredményezve.

Napjainkban a korszerű módszerek alkalmazásával mintegy 30 (a 2000-ből) mutációt hazai laboratóriumokban is kimutatnak. E mutációk kombinálódhatnak az F508del-val, magyarázatot adva heterozigóta esetek betegségeire jellemző tüneteire. Hazánkban nemrégiben került kidolgozásra a CF szűréssel és diagnosztikával kapcsolatos szakmai irányelv (VAMAT és az Eü. Szakmai Kollégium Klinikai Genetikai Tagozat). Ennek lényege az újszülöttek immunreaktív tripszinnel történő szűrése, és a pozitív esetek, valamint a verejtéktesztel diagnosztizált betegek mutációanalízise hagyományos szekvenálással a közel 30 mutáció kimutatására. Amennyiben a megszokott tesztekkel mutáció nem igazolható, de a klinikai kép komolyan felveti a CF fennállását, úgy új generációs szekvenálás jön szóba. Az utóbbi évek hazai eredményeiről számos – sajnos a dolgozatban nem citált – közlemény (Balogh és mtsai) számol be.

4. CD24 expresszió vizsgálatok placentából nyert szövetkorongokból, prosztata rákból és benignus prosztata hyperplasiás szövetből izolált mRNS alkalmazásával

A munka és az értekezés legsikeresebb és perspektivikus témájának a CD24 expresszió vizsgálatot és annak interpretációját tartom. 16 egészséges és 16 preeclampsias terhes placenta szövetében vizsgálta a CD24 expressziót. A CD24 sejtfelszíni fehérje, amely szerepet játszik a sejt-sejt közötti kapcsolatokban, a sejtproliferáció és adhézió szabályozásában. Számos tumorban expresszálódik, a P-selectinhez kapcsolódva részt vesz a tumornövekedés szabályozásában, a metasztatizálásban és a tumor vérellátásának kialakításában. Sejten belüli molekuláris mechanizmus ugyan nem ismert, de eredményesen alkalmazták az anti CD24-et gasztrointesztinális tumorok kezelésében. Preeclampsiaiban a placenta spirális artériái kóros volta, csökkent inváziója figyelhető meg.

A téma felvetése eszerint mind a tumoros és hiperplasiás prosztata elváltozás elkülönítésében, mind a preeclampsias placenta vizsgálatában indokolt. A jelölt jó érzékkel ismerte fel e kérdés vizsgálatának jelentőségét. Eredményei igazolják, hogy szignifikánsan alacsonyabb CD24 mRNS expresszió mérhető a preeclampsias terhes placentában a normálissal szemben, ami szerepet játszhat a placenta kóros fejlődésében. Irodalmi adatok igazolják, hogy a CD24/Siglec10 szabályozási út fontos anyai és magzati

felületek immunregulációjában. Olyan potenciális mechanizmusnak tekintik, amellyel a trophoblast sejtek irányítják az immunmechanizmust.

Ellentétes folyamatokra utalnak a prosztata tumoros beteg mintáiból végzett CD24 mRNS meghatározások. Huszonegy prosztata tumoros és 10 benignus prosztata hyperplasiás minta vizsgálata kapcsán szignifikánsan magasabb értékeket mért a jelölt a tumoros mintákban a hyperplasiás elváltozásokkal szemben.

Érdekesnek és megfontolandónak tartom a jelölt azon felvetését, hogy a CD24 mRNS szint vizsgálatára prosztata váladék, vizeletből nyert sejtek, esetleg szabad RNS szintek mérése is lehetőséget nyújthat, s az így noninvazív módszerrel végzett CD24 mRNS koncentráció mérés diagnosztikus markerként lehet használható a jövőben. Amennyiben a CD24 fokozott expresszió szerepe igazolható, a monoklonális antiCD24 terápia lehetősége is felmerülhet.

5. Szabad nukleinsav meghatározások

Egyre nagyobb várakozással tekint a szakma az anyai kimutatható magzati „szabad” DNS vizsgálati lehetőségére, ami napjaink prenatális diagnosztikájában alkalmazott invazív eljárásokat felváltó noninvazív diagnosztikus módszert kínál. A módszer elterjedésével kapcsolatban azonban számos nehézség merül fel: a „szabad” nukleinsavak 94-97%-a anyai eredetű, míg csupán 3-6%-a származik a magzattól (valószínűleg placentasejtek apoptózisából), s ugyanakkor a magzati genom 50%-a anyai eredetű. A nemmeghatározás és az RhD genom meghatározása bizonyult kezdetben sikeresnek, hiszen ezek különböztek az anyában és a magzatban. Az áttörést a masszív parallel szekvenálás bevezetése jelentette 2011-2012-ben. Az anyai és a magzati DNS elkülönítésének alapja a két DNS közötti minőségi különbség: a DNS fragmentumok méretbeli különbsége helyett a méhlepényből izolált epigenetikai markerek (hipometilált *maspin* gén) kimutatása használható az elkülönítésre. Jó lehetőséget kínál a masszív parallel szekvenálás új generációs szekvenálással 99,9%-os specificitással és szenzitivitással a triszómiák meghatározásában.

A disszertáns 80 amniocentézisre került várandós anya véréből izolált „szabad” DNS felhasználásával *SRY* gént és RhD genotípust határozott meg valósídejű PCR segítségével. A 80 terhes közül 38-ban fiú magzat jelenlétét igazolta. Az eredményt amniocentézisből nyert magzati sejtek kariotipizálásával és F-PCR-rel is megerősítették.

Kérdéseim:

1. Milyen indikációval került sor e vizsgálatokra? A módszer megbízhatóságának ellenőrzése, tapasztalatszerzés, vagy X-kromoszómához kötött recesszív betegség fokozott kockázata indokolta a vizsgálat elvégzését? Ha az utóbbiról is szó volt, ismert volt az anya hordozó volta? Milyen betegségek esetében került sor a nemmeghatározásra és mi lett a terhesség sorsa?
2. Az anyai anyai vérből nyert „szabad” DNS vizsgálatával két RhD negatív apa és anya magzatának RhD negativitását erősítették meg. Ez azt jelenti, hogy a 80 terhességből 38 esetben igazolt fiúmagzatok közül egy esetben sem volt az anya Rh negatív? A szerző szerint a kaukázusi populáció 80%-a RhD pozitív. Hogy

lehet, hogy csupán két RhD negatív szülő esetében kaptak értékelhető eredményt?

3. A magzat Rh genotípusának meghatározása ma már néhány országban az Rh negatív terhesek gondozásában rutinszerűen ajánlott. Az anti-D immunprofilaxisra vonatkozó hazai ajánlás azonban valamelyest eltér ezen országok gyakorlatától. Hazánkban ugyanis a harmadik trimeszterben nincs rutinszerű immunprofilaxis.
 - Van-e a szerzőnek adata arra vonatkozóan, hogy Magyarországon is költséghatékony lenne-e elvégezni anyai vérből a magzati RhD genotípus meghatározását minden Rh negatív anyánál? (persze, ha az apa RhD pozitív) Amennyiben ennek ismeretében kimondható, hogy nálunk a módszer nem lenne költséghatékony, van-e a jelölt szerint a vizsgálatnak egyéb indikációs területe a terhes gondozásban, mint az Rh negatív anya szérumában az antiD titer emelkedés, ami a szenzibilizált terheseknél gyakran akkor is jelentkezik, ha a magzat Rh negatív?
 - A jelölt megítélése szerint megközelítően milyen összegből lehetne egy magzati Rh genotípus vizsgálatot elvégezni, ha nagyobb tételben történének a vizsgálatok?

Áttekintve a disszertáció anyagát megállapítható, hogy a jelölt az ezredforduló második felétől eltelt 10 esztendő alatt igen szerteágazó és jelentős munkát végzett. Legfőbb érdeme, hogy az elsajátított korszerű módszert meghonosította hazai munkahelyén és szisztematikusan kezdte vizsgálni annak alkalmazhatóságát különböző – a terhespatológiával – összefüggő állapotokban. Vizsgálatai módszertani szempontból precízen kivitelezettek, körütekintően végzettek és dokumentáltak.

Mint láttuk, a vizsgálatok egy része *diagnosztikus* célú (toxoplazma gondii genom kimutatása, a 21-triszómia detektálása, a cisztás fibrosis leggyakoribb F508del mutációjának kimutatása, valamint az anyai vérből végzett nemmeghatározás és RhD genom kimutatása), míg más esetekben a genetikai eltérések patogenetikai összefüggését vizsgálja (VEGF SNP polimorfizmus és HELPP szindróma, a CD24 expressziója és a preeclampsia, a prosztatatarák és a benignus prosztata hyperplasia összefüggése).

A diagnosztikus vizsgálatok esetében a gyors és megbízható diagnózisra van szükség. Ezért fontos a legkorszerűbb, gyors és pontos eredményt adó, megbízható módszer alkalmazása. A genetikai módszerek folyamatos és rapid fejlődése ezért folyamatos újítást, alkalmazkodást igényel. A jelöltnek át kell gondolnia, van-e helye a valós PCR technikának a jövőben a 21-triszómia kimutatásában, az F508del izolált vizsgálatának a CFTR gén számos további mutációjának ismeretében. Mi a F-PCR és a valós idejű PCR helye ma a módszertani palettán, a korszerű molekuláris genetikai módszerek birtokában?

Ugyancsak fontos az eredmények klinikai hasznosításának biztosítása: ehhez ismerni kell a vizsgált betegek klinikai adatait (az anamnézist), a vizsgálatok indikációját, fontos az eredmények helyes interpretálása, a terhesség sorsának eldöntése

és a döntés helyességének ellenőrzése, sőt a megszületett újszülött klinikai státuszának követése is (l. a kérdéseket a toxoplasma kimutatásánál). Ez klinikai genetikussal, szüléssel való együttműködést igényel. E nélkül a vizsgálatnak csupán analitikai értéke van.

Ugyanakkor előremutatónak, perspektivikusnak tartom a genetikai eltérések és betegségek összefüggésének tanulmányozását: a VEGF SNP polimorfizmus és a HELPP szindróma kockázata, a CD24 expresszió és a preeclampsia, illetve prosztata problémák izgalmas kérdéseket vetnek fel, amelyek tanulmányozása a betegségek hátterének megismerése mellett a kezelés szempontjából is új eredményeket hozhat.

A jelölt új eredményeiként az alábbiakat fogadom el:

1. Elsőként vezette be hazánkban a valós idejű PCR módszert a toxoplasma gondii genom magzatvízben való kimutatására. Négy módszer összehasonlítása alapján az egyetlen parazita kimutatását is lehetővé tevő FRET módszert találta legérzékenyebbnek.
2. A WIAF 899 és WIAF 2643 SNP-k felhasználásával hazánkban elsőként vizsgálta a valós idejű PCR alkalmazhatóságát 21-triszómia kimutatására. Megállapította, hogy két SNP alkalmazása nem nyújt megbízható eredményt, több SNP bevonása és multiplex PCR alkalmazása szükséges a 21-triszómia kimutatásához.
3. Kidolgozta, optimalizálta és elsőként alkalmazta a módszert a VEGF gén SNP-nak vizsgálatára HELPP szindrómában. Kimutatta, hogy a VEGF T-460T és a C+405C genotípusok fokozott kockázatot jelentenek HELPP szindróma kialakulására.
4. A világon elsőként határozta meg a CD24 expressziót preeclampsias várandós anyák esetében, amit szignifikánsan alacsonyabbnak talált egészséges terhesek értékeivel összehasonlítva. Ezzel ellentétében magasabbnak bizonyult CD24 expresszió prosztata rákos betegekben a benignus hyperplasiában szenvedőkkel szemben. Felveti a vizeletből, prosztata váladékból nyert mRNS CD24 szint mérése diagnosztikus markerként való alkalmazásának lehetőségét.
5. Próbálkozott az anyai vérből nyert „szabad” DNS vizsgálatával nemmeghatározás és RhD genom kimutatása céljából. A ma még világszerte kísérletes stádiumban lévő módszer várhatóan tovább tökéletesedik a jövőben, ami a disszertáns munkájára is vonatkozik. Vizsgálatai és kezdeti eredményei a jelölt új módszerekkel való lépéstartásra való törekvését igazolják.

Az értekezés alapjául szolgáló in extenso közleményeinek száma 63, ebből 18 magyar nyelven (11 első, 2 utolsó szerzős), 45 angol nyelven (12 első, 2 utolsó, egy önálló szerzős) jelent meg, utóbbiak összesített impakt faktora: 112,398, hivatkozások száma: 653.

Teljes tudományos tevékenységét 163 in extenso közlemény, Összesített Impakt faktor: 235,1 (PhD értekezés óta: 201,3), első szerzős közlemények száma: 42, utolsó szerzős: 18, összes hivatkozás: 1850, Hirsch index: 23). A közlemények döntő része

külföldi tanulmányútja alatt vagy külföldi kollegákkal való kollaborációban született, de hazai tudományos tevékenysége is elismerésre méltó tudományos aktivitást tükröz.

Összefoglalóan: A precíz és a munka kezdeti fázisában korszerű módszer hazai bevezetése, és sokrétű alkalmazásának bemutatása a jelölt ambícióját és a hazai genetika fejlődését szolgáló törekvését tükrözi. A dolgozat mind tartalmilag, mind formailag megfelel a doktori értekezésekkel szemben támasztott előírásoknak. Az általam felvetett kérdések az eredmények klinikai alkalmazhatóságának javítását és a munka jövőbeli folytatásának segítségét célozzák. Megelőző tudományos tevékenysége kiemelkedő. Sikeres védést és a kérdések adekvát megválaszolását követően a doktori cím odaítélését javaslom.

Debrecen, 2015. január 26.



Dr. Oláh Éva
professor emeritus