

## **Opponensi Vélemény**

**Dr. Nagy Bálint**

### **„A valós idejű PCR alkalmazása a klinikai genetikai gyakorlatban” című értekezéséről**

Dr. Nagy Bálint az MTA doktora fokozat megszerzéséhez a fenti címen nyújtott be a pályázatát. Bírálatomat az MTA Doktori Tanácsa által kijelölt hivatalos bírálóként fogalmazom meg. A jelölt tudományos főmunkatárs, az értekezés intézeti háttérét a SOTE I. számú Női Klinika Genetikai Laboratóriuma biztosította, ahol az orvostudomány, és a betegellátás mellett évtizedek óta magas szintű kutatómunka is folyik. Ez az intézeti háttér garanciát jelent arra, hogy az értekezés tartalma, következtetései megfeleljenek az MTA doktori fokozat követelményeinek.

#### **1. TÁRGY, CÉLKITŰZÉS, TÉMAVÁLASZTÁS**

Az értekezés tárgya és fő célkitűzése a modern PCR alapú vizsgálatok alkalmazása a klinikai genetikában. A disszertáció témaválasztása rendkívül fontos és aktuális, mivel ezen vizsgálatok nélkül ma már nem létezik modern genetikai diagnosztika. Eredményei korszerű ismeretekkel gazdagítják a molekuláris medicinát.

#### **2. FORMAI ÉS STILÁRIS JELLEMZŐK**

A jelölt szakmai és szaknyelvi ismereteit jól mutatja be. Kisebb nyelvi és fordítási hibáktól és hiányosságoktól eltekintve olvasmányos mű.

A disszertáció 111 oldal, ehhez csatlakozik 36 oldal terjedelemben az irodalomjegyzék, a disszertáció témájában megjelent saját közlemények jegyzéke, a főbb scientometriai adatok összefoglalása és a köszönet nyilvánítás. A mondanivalót 16 táblázat, 22 ábra és 3 kép illusztrálja, amelyek jól áttekinthetőek, érthetőek. Sajnos a táblázat, ábra és kép jegyzék hiányzik, ami megkönnyítette volna az olvasó munkáját. A disszertáció 6 fejezetből áll, szerkezete, felépítése jól áttekinthető, az egyes fejezetek terjedelme arányos.

### **3. SZAKIRODALMI HÁTTÉR, PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉG**

Az irodalomjegyzék összeállítása ugyan megfelel a doktori értekezés formai követelményeinek, azonban nincs sorszámozva, de körülbelül 245 hivatkozást tartalmaz, ezeknek túlnyomó része külföldi szerzők munkája. A jelölt az irodalomjegyzékben a saját közleményeit is szerepelteti, azonban az előírásoknak megfelelően azokat külön fejezetben is feltünteti. A folyóiratok rövidítése szabályos, az irodalmi hivatkozások korszerűek és átölelik a témával foglalkozó legrangosabb szakirodalmakat.

A jelölt publikációi szakmailag elismert lapokban jelentek meg. A 18 magyar nyelvű közleményből 11-ben, a 45 angol nyelvűből 12-ben első szerző. Első szerzős közlemények száma, könyvekkel és könyvfejezetek együtt összesen 28. Öt könyvfejezete mind magyar nyelvű, 2 könyv közül egy magyar és egy angol nyelven íródott. A tézisfüzetből kimaradt a disszertációban 22-es sorszámmal szereplő publikáció. A disszertáció témájában megjelent utolsó szerzős közlemények száma a disszertáció szerint 7. Első és utolsó szerzőségű közlemények impakt faktora 48. Az összes hivatkozások száma 1850, független hivatkozások száma 1565, Hirsch indexe 23. Mindezek igazolják, hogy a szerző tudományterületének aktív résztvevője, továbbá a vonatkozó nemzetközi irodalmat is jól ismeri.

### **4. AZ ÉRTEKEZÉS BÍRÁLATÁNAK TUDOMÁNYOS INDOKLÁSA**

A bevezetés részét képezi a tudományelméleti és szakirodalmi háttér elemzése, amelyben ismerteti a modern PCR alapú vizsgálatok alkalmazását a klinikai genetikai gyakorlatban. A jelölt rendkívüli alapossággal tárgyalja, és széles skálán mutatja be a PCR alapú diagnosztikus és kutatási célú módszereket. A dolgozatban a PCR alapú technológiáknak és ezen belül is a valósídejű PCR módszereknek az elmúlt évtizedekben lezajlott fejlődését követhetjük végig úgy, hogy közben a jelölt a téma legújabb fejlesztéseit és kutatási szempontból is releváns kérdéseit is áttekinti. A jelölt által készített dolgozat összességében széles módszertani ismeretekről tesz tanúbizonyságot.

A PCR alapú módszerek széleskörű alkalmazásával a jelölt a következő témakörökben ért el jelentősebb tudományos eredményeket:

- A mikrobiális genom kimutatására irányuló törekvése során a kongenitális toxoplazmózis kimutatására alkalmas PCR alapú diagnosztikai eljárásokat optimalizálta és vizsgálta a gyakorlati alkalmazás lehetőségét.
- A polimorfizmusok, mutációk genotípezálása egy az utóbbi évtizedben igen elterjedt metodikává vált, hiszen a humán genom projekt révén számos gyakori polimorfizmus és ritka betegség háttérben álló kandidáns gén és mutációi is ismerté váltak. Ezen vizsgálati eredmények pedig nagymértékben előre lendítették a polimorfizmus asszociációs vizsgálatokat különböző gyakori betegségben és a ritka betegségek diagnosztikáját a háttérben álló mutációk szűrése révén. A jelölt a dolgozatában a cisztás fibrózis és a HELLP szindróma kapcsán is sikerrel alkalmazza a polimorfizmusok, mutációk genotípezálását és részletesen ismerteti eredményeinek jelentőségét.
- A jelölt tudományos munkájából a génexpressziós vizsgálatai is kiemelendők, amelyek során CD24 koncentráció meghatározást végzett preeklampsiában szenvedő és normotóniás várandósok, valamint prosztata karcinómában és benignus hiperpláziában szenvedő betegek mintáiban.
- A dolgozat tudományos szempontból egyik legjelentősebb része a jelöltnek az anyai perifériás vérmintából izolált anyai és magzati eredetű szabad DNS alapú vizsgálatai, amellyel a magzati nem és RhD státusz meghatározására nyílt lehetősége valósidejű PCR módszer alkalmazásával.
- Mindössze az utóbbi három év eredménye, hogy az anyai perifériás vérmintából izolált anyai és magzati eredetű szabad DNS alapú, újgenerációs szekvenáló platformon végzett vizsgálatok a várandósok számára kereskedelmi forgalomban elérhetőek Magyarországon. Azonban ezeket a vizsgálatokat csak külföldi laboratóriumokban végzik és rendkívül költségesek részben az alkalmazott módszer miatt, ezért a magyarországi várandósoknak csak néhány százaléka engedheti meg magának ezeket a vizsgálatokat.
- Az anyai perifériás vérmintából izolált magzati és anyai eredetű szabad DNS alapú vizsgálatoknak egy alternatív, tehát nem az újgenerációs platformon való elvégzése, például mérföldkő lehet a továbbiakban a várandós-gondozás és a prenatális diagnosztika területén, ahogy a jelöltnek a valósidejű PCR alapú technológia fejlesztésére irányuló törekvései is mutatják..

- A valósidejű és egyéb a dolgozatban felsorolt PCR alapú módszerek széleskörű alkalmazásával a jelölt tudományos munkáját a várandós-gondozás, a prenatális diagnosztika és a ritka betegségek genetikai szűrése és diagnosztikája területén kiemelkedőnek ítélem.

## **5. 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.
2. Az ábráknak a dolgozatba illesztésekor néhány esetben pontatlan szerkesztés látható. Egyebekben az ábrák szöveges értelmezése szépen kidolgozott és részletes.
3. A dolgozat szövegében néhány elírás és szerkesztési hiba látható, azonban ez érdemben nem befolyásolja a dolgozat értékelését.

## **6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK**

1. A jelölt valósidejű PCR módszert vezetett be a *Toxoplasma gondii* genom kimutatására és hatékonyságát további három különböző PCR alapú módszerrel hasonlította össze.
2. A jelölt valósidejű PCR technológiát alkalmazva elsőnek dolgozta ki számos különböző gén polimorfizmusának és mutációinak a detektálási módszerét.
3. Magyarországon elsőként állította be a CD24 expresszió kimutatására a valósidejű PCR metodikát.
4. Magyarországon elsőként kezdte el vizsgálni a valósidejű PCR technológia alkalmazhatóságát az anyai perifériás vérből izolált anyai és magzati szabad DNS vizsgálatára.
5. HELLP szindrómában szenvedő és egészséges terhesek DNS mintáiban a világon elsőként állapította meg a *VEGF C-460T*, *C-2578A* és *G+405C* egynukleotidos polimorfizmusokat. Kimutatta az allélok és a genotípusok előfordulási gyakoriságát HELLP szindrómában szenvedő betegek csoportjában.

6. A világon elsőként határozta meg a *CD24* szintjét préeklampsziás terhesek placenta mintáiban. Megállapította, hogy a *CD24* szintje a préeklampsziások mintáiban az egészséges normotóniás terhesekhez viszonyítva szignifikánsan alacsonyabb.

7. Valósídejű PCR TaqMan típusú kimutatási módszert vezetett be a magzat RhD csoportjának meghatározására.

## 7. KÉRDÉSEK

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?

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

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?

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 prenatális vizsgálatokban?

## 8. JAVASLAT

Dr. Nagy Bálint disszertációja elmélyült kutatás eredményeit összegező értékes és hiteles munka, amely megfelel a Magyar Tudományos Akadémia Doktori Tanácsa által meghatározott szakmai és formai követelményeknek. Eredményei gazdagítják szakmai ismereteinket a molekuláris genetikai diagnosztikában. Javaslom az értekezés nyilvános vitára bocsátását és sikeres védelem esetén a jelölt számára az MTA doktora fokozat odaítélését.

Szeged, 2015. január 23.

Dr. Szabó János  
egyetemi tanár,  
az MTA doktora