

Hivatalos bírálói nyilatkozat

NAGY GYÖRGY

Patogenetikai tényezők vizsgálata rheumatoid arthritisben és szisztémás  
lupus erythematosusban

című doktori munkájáról.

A doktori munka tudományos eredményeit elegendőnek tartom az MTA doktora cím  
megszerzéséhez, a nyilvános védés kitűzését javaslom:

igen

nem

Dátum: Budapest, 2015.03.30.

  
KACSKOVICS IMRE

## Bíráli vélemény

### Nagy György: „Patogenetikai tényezők vizsgálata rheumatoid arthritisben és szisztémás lupus erythematosusban”

című MTA doktori értekezéséről

Nagy György MTA doktori értekezésében az autoimmun betegségek talán két leggyakoribb és legfontosabb betegségének, a rheumatoid arthritisnek és a szisztémás lupus erythematosusnak olyan kóroki tényezőit vizsgálta, amelyek jelentős szerepet töltenek vagy tölthetnek be e betegségek kialakulásában és súlyosságuk alakulásában. Autoimmun folyamatot a „saját” elleni tolerancia megszűnése indít el. Az autoantitestek és a „saját” sejt- vagy szövetkomponens-ellenes reaktív T-sejtek jelenléte azonban nem szükségképpen okoz klinikailag detektálható betegséget. Ismert, hogy kis mennyiségben alacsony affinitású, nem patogén autoantitestek, vagy autoreaktív T-sejtek kimutathatók egészséges egyéneknél is, azok szerepe sok esetben fiziológiásnak tekinthető. Az autoimmun betegségek kialakulásában genetikai faktorok, saját antigéneket módosító fertőző ágensek, hormonális hatások és egyéb külső tényezők igen összetett módon vesznek részt. A rheumatoid arthritis (RA) elsősorban a végtag kis ízületeinek krónikus, hegesedő és deformációval, majd állandó mozgáskorlátozottsággal járó autoimmun gyulladás. A szisztémás lupus erythematosus (SLE) egyidejűleg több szervet érintő multiszisztémás betegség, amely klinikailag kiszámíthatatlan akut és krónikus, vissza-visszatérő periódusokból álló kórkép. Nagy György és munkatársainak klinikai-immunológiai, valamint felfedező immunológiai kutatásai értékes felfedezésekkel gyarapítják ismeretünket e két rendkívül bonyolult, az immunhomeosztázis megbomlásával járó kórfolyamatok kialakulásával kapcsolatban, amelyek új diagnosztikai és terápiás lehetőségek felismerését katalizálhatják.

A doktori értekezés – nem számítva az irodalomjegyzéket – 116 oldalon keresztül tárgyalja a tudományos eredményeket. A disszertáció alapjául 29, a Ph.D. fokozat megszerzése (2003) után született közlemény szolgál. Jelölt ezek közül 9 publikációban első, 5 publikációban pedig utolsó szerző. Az értekezés alapját képező közlemények impakt faktora 129,85; az MTMT adatbázisa alapján ezekre a bíráló napjáig (2015. március 25) összesen 1011 független hivatkozást kapott. Ehhez járul még további 34 magyar és idegen nyelvű közlemény, könyvfejezet, amelyek közvetlenül nem kerülnek tárgyalásra a dolgozatban. Nagy György a disszertáció benyújtásakor összesen **182,6 impakt faktoral, 1051 független hivatkozással rendelkezett, Hirsch index mutatója 18** volt (a bíráló elkészítésekor 200,846 impakt faktoral és 1380 független hivatkozással rendelkezik, Hirsch index mutatója 19). Megállapítható tehát, hogy *a jelölt*

*tudományos munkássága - közleményeinek szcientometriai mutatói alapján - jelentős mértékben meghaladják az MTA által támasztott követelményeket.*

A disszertáció felépítése megfelel az előírásoknak, ugyanakkor áttekinthetősége, értelmezhetősége és kivitelezése jelentős mértékben elmarad a bíráló várakozásaitól. A dolgozatban az „Irodalmi háttér” bemutatására csupán 17 oldalt szánt a szerző. Ebben ismerteti az autoimmunitás kialakulásának alapfolyamatait, az RA és SLE betegségeket kiváltó ismertebb faktorok felsorolását, valamint a saját munkájával kapcsolatos legalapvetőbb ismereteket. A terjedelmet azért is keveslem, mert a doktori disszertációban feldolgozott 8 kutatási téma – *Természetes autoantitestek vizsgálata RA-ban; Genetikai polimorfizmusok tanulmányozása; A citrullináció szerepének vizsgálata a tolerancia elvesztésében; C1-inhibitor elleni antitestek SLE-ben; az NO szerepének vizsgálata a T-lymphocyta aktivációban; A CD3 $\zeta$ -lánc mennyiségi szabályozásának vizsgálata; A glikozidázok szerepének vizsgálata RA-ban, végül az Extracellulláris vesiculák karakterizálása* – rendkívül szerteágazó klinikai-immunológiai, ill. felfedező-jellegű kutatási irány, bemutatásuk nem könnyen integrálható és a túlzott tömörségből következően csupán mérsékelt módon alapozza meg a kutatási célok, eredmények értelmezését. A „Célkitűzés” fejezet az előbbi kutatási célkitűzések felsorolását tartalmazza. A „Módszerek” fejezetben 14 oldalon ismerteti röviden az alkalmazott nagyszámú és sokféle eljárást, a részletes ismertetések helyett az eredeti publikációkra hivatkozik, amely koncepciót a bíráló is elfogadja. A bemutatott klinikai vizsgálatok, állatmodelleken történő elemzések, valamint a széleskörű sejtbiológiai, molekuláris biológiai és analitikai eljárások imponáló tárházat jelentik a mai kísérletes orvosbiológiai kutatásoknak. Az első három fejezetben csak kisszámú betűhibát vagy nyelvtani, stilisztikai hiányosságot találtam.

Az eredményeket a szerző, tekintettel azok sok esetben egymáshoz nem kapcsolódó jellegére, témánként mutatja be és értelmezi az „Eredmények és megbeszélés” fejezetben, ami ebből fakadóan 8 alfejezetre tagolódik összesen 70 oldalon. Általános megállapítása a bírálónak, hogy egyes alfejezetek túlságosan kevés információt tartalmaznak, azok értelmezhetősége ebből fakadóan mérsékelt, vagy csekély, az eredmények megértését rossz minőségű ábrák nehezítik, így különösen a 6., 21., 26. és 51. ábra felbontása nem teszi lehetővé azok teljes körű értelmezését. Az dolgozat szerkesztése, tördelése is kritizálható.

Az első alfejezetben a *Természetes autoantitestek vizsgálata RA-ban* témakörben a *glükózaminoglikán (GAG) specifikus antitestekkel* kapcsolatos eredményeit mutatja be és tárgyalja a szerző. Megállapítja, hogy az RAs betegekben a GAG-specifikus IgM és IgG koncentrációk is emelkedettek, bár az nem derül ki, hogy a különbség szignifikáns-e (általános problémája a disszertációnak, hogy a vizsgálati esetszámot, ismétlés számot nem tünteti fel, bár azok az eredeti publikációkban megtalálhatók). Ismerteti továbbá,

hogyan a szérumban és a szinoviális folyadékban GAG-specifikus IgM szintjei korrelálnak egymással, GAG-specifikus IgG szintjei viszont nem. Az eredmények megbeszélése mindössze két paragrafus, nem derül ki belőle, hogy más kutatócsoportok vizsgálták-e ezt a kérdést, ill. milyen eredményekre jutottak, vagy hogyan illeszkedik a szerző eredménye az irodalmi adatokhoz, ha vannak olyanok. *Kérem (K), hogy ezt a hiányosságot pótolja a jelölt (K1).* A szerző felveti továbbá, hogy a nagyobb mennyiségű GAG-specifikus antitest RA-ban védő szerepű lehet. *Kérem, magyarázza meg ennek a következtetésnek az alapját, hiszen a saját struktúrák ellen, ebben az esetben a porcszövetből az ízületi gyulladás során nagy mennyiségben felszabaduló GAG-ok ellen termelődő ellenanyagok egy krónikus ízületi gyulladásban károsító hatásúak is lehetnek (K2).*

A második alfejezetben, a *Genetikai polimorfizmusok tanulmányozása* kapcsán mutatja be a *galektin-8* és a *HCgp-39* gének polimorfizmusait és azok RA-t kiváltó, vagy fenntartó hatásával kapcsolatos eredményeit. Vizsgálatai kapcsán új eredményként (ÚE) megállapítja, és ezzel bíráló is egyetért, hogy **„A galektin 8 rs2737713 TT genotípus az 50 évesnél idősebbek körében RA-ra hajlamosít, míg a fiatalabb populációban védő szerepe van”** ÚE1. Témával kapcsolatos másik eredményük volt, hogy a *HCgp-39* rs4950928 és rs10399931 polimorfizmusai nem asszociálnak az RA-val. Mivel a dolgozatból nem derül ki, hogy miért pont ezt a polimorfizmust elemezték, hogyan értékelhető ez az eredmény az irodalmi adatok tükrében, a bíráló nem tudja megítélni ennek újdonság tartalmát és jelentőségét.

A harmadik alfejezetben, *A citrullináció szerepének vizsgálatai* kapcsán először a *citrullináció immunogenitásának vizsgálatát tüdőrákban mutatja be* és tárgyalja. Ez a szakasz megfelelően felépített, jól érthető és az ábrák tartalmi szempontból kielégítőek. A Bevezetőben arról írt, hogy a dohányfüst stimulálhatja a tüdőben is kifejeződő *2-es típusú peptidil-arginin-deiminázt* (PAD), mely a tüdőben proteinek citrullinálódásához vezethet. Jelölt arra keresett választ, hogy a dohányos tüdőrákosok esetén egyfelől fokozódik-e a citrullináció, másfelől megjelennek-e citrullinált fehérje-specifikus antitestek (ACPA) a szervezetükben. Megállapították, hogy a vizsgált betegek közül csupán két esetben lehetett magas ACPA szintet mérni, és nem találtak különbséget a citrullinált és nem-citrullinált fehérje specifikus ellenanyagok arányában, ill. a betegek nem mutattak RA és SLE tüneteket. Kimutatták, hogy dohányzó tüdőrákos betegek szérumban magasabb volt a szérumban PAD4 szintje a nem dohányzó kontrollokhoz képest. Kimutatták továbbá, hogy a CK7 pozitív tumoros sejtek és környezetükben lévő leukocyták nagymértékben fejezték ki PAD4-et. Ugyanakkor, a citrullinált fehérjék nemcsak a tumoros sejtekben jelentek meg, így a PAD4 kifejeződés és a citrullináció nem korrelált egymással. Szöveti elemzéseik nem mutattak különbséget a dohányos és nem-dohányos betegek CK7, PAD4 és citrullináció kifejeződése között. A

dolgozatban ez a vizsgálati eredmény alapvetően jól értelmezhető. Egyetlen felvetése a bírálónak, hogy a PAD4 ismertetése, amelyet az irodalom valóban a citrullináció egyik felelősének tart, miért nem került a Bevezetőben ismertetésre. A citrullinált fehérjék elleni antitestek hiányát, ahogy azt a jelölt is felveti, okozhatja a tumor-specifikus terápia is, számos egyéb faktor mellett. A bíráló új eredménynek fogadja el, hogy **„A dohányzó tüdőrákos betegek szérumában magasabb a szérum PAD4 szintje a nem dohányzó kontrollokhoz képest”** ÚE2.

Ehhez az alfejezethez kapcsolódó másik témájaként *egér RA modellben vizsgálta az immundomináns T-lymphocyta epitóp citrullinációját*. Ennek során citrullinált (ATE-X) és nem-citrullinált immundomináns egér aggregátum (ATE-R) peptidokkal oltottak egereket, majd ráoltást követően a nyiroksejteket *ex vivo* stimulálták az adott peptiddel. Ezt követően meghatározták a IFN $\gamma$  pozitív sejtek számát. A vizsgálat egyik eredményét a bíráló is új eredménynek fogadja el, azaz **„Egér citrullinált aggregátum peptidok szignifikánsan több IFN $\gamma$  termelő nyiroksejtet eredményeztek, mint a nem-citrullinált egér aggregátum peptidok”** ÚE3.

Ugyancsak ehhez az alfejezethez, ill. témához tartozik a *citrullint tartalmazó filaggrin peptidok antigenitásának vizsgálata*. Ezek kapcsán megállapította, hogy az N- és C-terminális biotinizáció nem befolyásolja a 19 aminosav hosszúságú citrullinált filaggrin epitópok (aa 306-324) ACPA antitest kötődését, ugyanakkor az 5 aminosav hosszúságú (aa 311-315) epitópok N-terminális biotinizációja gátolta azt. Vizsgálták további filaggrin, vimentin és kollagén peptidok alkalmazhatóságát RA és SLE betegek szérumából történő antitest kimutatás céljából, amelyek a kereskedelmi forgalomban lévő reagensekhez hasonló eredményt mutattak. A disszertáció nem tartalmaz információt arra nézve, miért pont ezeket az oligopeptideket, ill. azok citrullinált változatait választották a kísérletekhez. *Kérem magyarázza meg ennek alapját (K3)*.

A negyedik alfejezet a *C1-inhibitor elleni autoantitestek SLE előfordulásával kapcsolatos elemzést mutatja be*. Eredményük szerint az anti-C1-inhibitor szérumszintje magasabb volt az SLE-s betegek mintáiban, mint az egészséges kontrollokéban, de ez nem járt C1-inhibitor hiány klinikai tüneteivel. Ennek az eredménynek a bemutatására és elemzésére szánt mintegy fél oldal információ alapján, ill. az irodalmi adatokkal történő összehasonlítás hiánya miatt, bíráló nem tudja eldönteni ennek újdonság tartalmát, klinikai relevanciáját.

Az ötödik alfejezet a jelölt azon vizsgálati eredményeit mutatja be és tárgyalja, amelyek a nitrogén-monoxid (NO) szerepét elemzik a *T-lymphocyta aktivációban egészséges, SLE és RA betegek esetén*. Jelölt e kutatásai a Ph.D. témájának szerves folytatását jelentik, szerepe ezekben a tudományos eredményekben meghatározó, a rangos publikációk első, vagy utolsó szerzője. A dolgozatban ezek a vizsgálati eredmények alapvetően jól értelmezhetőek, sajnos az ábrák minősége ebben a fejezetben is alacsony. Eredményeiket

a bíráló is új eredménynek fogadja el, azaz „**Humán T-lymphocytákban az NO-szintetizáló eNOS és az nNOS expresszálódik, a T-lymphocyta aktiváció az eNOS- és nNOS-protein-szinteket többszörösére növeli, amelynek révén NO termelődik és ez hozzájárul a sejtaktivációhoz és a mitokondriális membránpotenciál növekedéséhez.**” ÚE4

Ugyancsak új és értékes eredményként fogadja el a bíráló azt a megállapításukat, hogy „**Több és nagyobb mitokondriumot tartalmaznak az SLE-s betegek T-lymphocytái, mint az egészséges kontrollokból nyert sejtek. Az SLE-s betegek monocytái lényegesen több NO-t termelnek, míg a T-sejtek NO termelése nem fokozott lupusban az egészséges kontrollokéhoz képest. A gyors Ca<sup>2+</sup>-szignál nagyobb, a fenntartott Ca<sup>2+</sup>-szignál kisebb SLE-s betegek T-lymphocytáiban. A Ca<sup>2+</sup>-szignál megváltozásához hozzájárul a monocytákból származó NO-termelés és a következményes mitokondrium-bioszintézis.**” ÚE5, illetve azt, hogy „**Az RA-s betegek T-lymphocytáinak NO-termelése fokozott az egészséges kontrollokból szeparált T-lymphocytákhoz képest és ez TNF- $\alpha$ -blokkoló kezelés hatására csökken.**” ÚE6

Ugyanennek a fejezetnek a második részében a hisztamin termelésért felelős enzim hiányának T-lymphocyta polarizációs hatását génkiütött egérmodellben (HDC-KO) vizsgálta. Megállapította, és ezt bíráló új eredménynek fogadja el, hogy „**Hisztamin hiányában a HDC-KO egerek lépsejtjeinek IFN $\gamma$  termelése nagyobb mértékű, mint a vad típusú állatoké.**” ÚE7, valamint azt, hogy „**A hisztamin az NO-termelés szabályozása révén is hatással van a T-lymphocyták citokintermelésére és jelátviteli folyamataira.**” ÚE8 Bíráló megjegyzi továbbá azt is, hogy a jelölt ezen publikációira nagyszámú független hivatkozást kapott, ami jelzi ez eredmények jelentőségét.

A hatodik alfejezet a jelölt azon vizsgálati eredményeit mutatja be és tárgyalja, amely a *T-lymphocyták CD3 $\zeta$ -lánc kifejeződésének szabályozásával* kapcsolatosak. A CD3  $\zeta$ -lánc alapvető szerepet játszik a T-lymphocyták jelátvitelében. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a TNF $\alpha$  hatására csökken az egér T-sejtek CDR3  $\zeta$ -lánc kifejeződése. Ismert volt továbbá az is, hogy RA-ban és SLE-ben magas a TNF $\alpha$  szint és ezekben a betegségekben is alacsony a T-sejtek  $\zeta$ -lánc kifejeződése. Mindezek alapján jelölt és munkatársai azt vizsgálták, hogy milyen hatása van a TNF $\alpha$ -nak a humán T-lymphocyták CD3  $\zeta$ -lánc kifejeződésére. Eredményeik szerint, amelyeket bíráló is új eredménynek fogad el „**a TNF $\alpha$  hatására vérből izolált lymphocytákon (PBMC) és a humán T sejt vonal Jurkat sejteken dóziszfüggően, szelektíven és reverzibilisen csökken a CD3 $\zeta$ -lánc kifejeződése, valamint csökken e sejtek aktiválhatósága. A jelenség oka az Src-szerű adapter fehérje (SLAP) mennyiségének növekedése, ami fokozza CD3 $\zeta$ -lánc proteozómális lebomlását.**” ÚE9 Kimutatták továbbá, hogy „**RA-s betegek T-sejtjeiben a SLAP expressziója nagyobb az egészséges kontrollokénál. A TNF $\alpha$ -blokkoló kezelésben részesülő betegek CD4 T-lymphocytáinak TNF $\alpha$  kezelése nem fokozza a SLAP kifejeződését.**” ÚE10

E témakörrel kapcsolatban kérdezem, hogy az általuk is vizsgált CD4<sup>+</sup> T-helper sejteken kívül milyen más T lymphocytá sejt populációk lehetnek érintettek? (K4) Ismert-e más proinflammatorikus citokin hasonló hatása a T-sejtek SLAP mennyiségére, és a ζ-lánc ezt követő csökkenésére? (K5) Terápiás szempontból, milyen módon lehetne a SLAP termelődését, mennyiségét befolyásolni? (K6)

A hetedik alfejezet tárgyalja a glikozidázok szerepének vizsgálatát RA-ban. Megállapították, hogy arthrosisban és RA-ban az általuk vizsgált citokinek (TGFβ, TNFα, IL-1β, IL-17), kismértékben gátolják, vagy nem befolyásolják a synovialis fibroblastok glikozidáztermelését, és ezek az enzimek önmagukban nem meghatározók e két betegség pathomechanizmusában.

A nyolcadik alfejezetben a szerző az extracelluláris vesiculák karakterizálásával kapcsolatos eredményeit összegzi. Ez a kutatómunka igen értékes eredményekre vezetett. Szerzőtársaival együtt új módon elemezte a mikrovezikulumokat, és különítette el azokat pl. az immunkomplexektől. Eredményeiket a rangos Blood folyóiratban közzétették, amelyre jelentős számú (83) független hivatkozást kaptak. E téma folytatásaként vizsgálták az extracelluláris vesiculák szerepét RA-ban. Megállapították, amelyet bíráló is új eredménynek fogad el, hogy **„Az RA-s betegek synovialis mintáiban nagyobb mennyiségben található CD8<sup>+</sup> mikrovezikula, mint az arthrosisos betegek esetében, ugyanakkor a CD4<sup>+</sup> mikrovezikulumok számában nem találtak különbséget a két betegcsoport között.”** ÚE11 Hangsúlyozandó, hogy a jelölt szerzőtársaival együtt a témával összefüggésben összefoglaló tanulmányt jelentetett meg az igen rangos Nature Review Rheumatology folyóiratban (2014). Kérem válaszoljon néhány mikrovezikulákkal kapcsolatos lehetőséget, amely klinikailag is releváns lehet az autoimmun kórképek elemzése és esetleges terápiája szempontjából (K7).

Összefoglalva, Nagy György jelentős eredményekkel járult hozzá az RA és SLE betegségek pathomechanizmusainak megértéséhez. Tudományos teljesítménye messze meghaladja az MTA doktori fokozathoz elvárt követelményeknek, ezért **javaslom a nyilvános vita kítűzését és az MTA doktori cím odaítélését.**

2015. március 30.



Kacs Kovics Imre  
egyetemi docens  
az MTA doktora