

Válasz Prof. Szabó Dóra opponensi véleményére

Köszönöm Szabó Dóra Professzor Nőnek a doktori értekezésem gondos áttanulmányozását, az újdonságok kiemelését és támogatását a doktori cím odaítéléséhez. Az opponensi kérdésekre az alábbiakban válaszolok:

1. Az értekezés 53. oldalán a jelölt beszámol arról, hogy „Összességében 97%-ban (111/114) igazolódott, hogy a teszt valóban jól jelezte onkogén HPV típus jelenlétét. A maradék három esetben a Hybrid Capture HPV teszt a biztonságos oldal felé tévedett, nem onkogén HPV mellett is megjelent a magas kockázatú típust jelző gyenge hibridizációs szignál. A Hybrid Capture HPV teszt későbbi verziójában is kimutatták a kimutatott HPV típusok spektrumának kereszthibridizációból eredő bővülését.” Nem tartja-e reális veszélynek, hogy a HPV Hybrid Capture rendszer az onkogén HPV típust nem onkogén típusnak jelöli?

Azon HPV tesztekben, amelyek külön kínálnak nem onkogén HPV meghatározást is, a gyártói validáláskor megfelelően kizárták az akkor ismert onkogén típusokkal a keresztreakciót. Természetesen az elvi veszély mindig fennáll, hogy a validáláskor még nem ismert onkogén típus hamis laboratóriumi eredményt produkál. Azonban a szűrési algoritmusokkal együtt vizsgálva a kérdést, látható, hogy az ebből eredő következmények veszélye kimutathatatlanul alacsony a következő okokból:

1. Hatékonysági okokból a szűrési algoritmusok csak az onkogén HPV kimutatást támogatják. Nem onkogén HPV jelenlétére utaló eredmény ezért általában nem is születik a szűrés során.
2. Ha mégis születne ilyen eredmény, akkor azt az alapelvet kell figyelembe venni, hogy egyik szexuálisan átvihető fertőzés életviteli okokból fokozottan hajlamosít bármely másikra, ideértve az onkogén HPV fertőzést is. Az ilyen személy a normál szűrési eljáráshoz képest, sűrűbb ellenőrzést igényel, amellyel a lehetséges onkogén HPV fertőzés következtében elinduló kórfolyamat időben észlelhető.

2. Kérem a jelöltet, hogy hasonlítsa össze az általa használt a HPV Hybrid Capture rendszert, a többi széleskörben alkalmazott, forgalomban lévő, Hybrid Capture 2 (HC2), Cobas, CLART és APTIMA rendszerekkel.

A kérdésben említett öt HPV teszt páronként összehasonlítva is számos eltérést mutat az analitikai jellemzők területén. Ezért a prevenció szempontjából értelmezhető diagnosztikus értéküket érdemes összevetni. A különböző méhnyakszűrési algoritmusokban közös, hogy a negatív eredményű HPV teszteknek a betegséget kizáró ún. negatív prediktív értékét használják ki. Ezért a fenti tesztek használhatóságát is a méhnyakszűrési algoritmusok vonatkozásában kell vizsgálni. Történetileg először a citológiai ASCUS (*atypical squamous cells of unknown significance*) elváltozás miatt kiemelt betegek szekunder szűrő eljárásaként vezették be a HPV kimutatást. Az ASCUS betegekben Hybrid Capture HPV negativitás olyan hatékonyan zárt ki onkológiai folyamatot, hogy az FDA már 1995-ben engedélyezte az alkalmazását.

Közben ugyanaz a cég kifejlesztette a HC2 tesztet, amely már nagyszámú minta vizsgálatára alkalmas mikrotiter lemez formátumú volt, analitikailag már lefedte az onkogén típusok ma is elvárt listáját és azok alsó méréshatárát egy nagyságrenddel javította. A Hybrid Capture projektünket már elindítottuk, amikor megszületett a HC2 teszt FDA jóváhagyása még mindig az ASCUS betegekre vonatkozóan, akikben az addig is kiváló negatív prediktív értéket érdemben már nem volt hova javítania az egyébként analitikailag javított verzióknak.

Az alkalmazási terület bővítése volt a gyártók következő fejlesztési lépése. Kiterjedt populációs tanulmányokban vizsgálták elsősorban a HC2 és Cobas HPV rendszerek alkalmasságát a „HPV asszisztált citológia” típusú szűrési algoritmusra. Az FDA ugyan óvatosan már 2003-ban jóváhagyta, hogy a normál citológiai vizsgálattal egyidőben lehetett HC2 tesztel HPV kimutatást végezni, 2011-re lett végleges annak a négy onkogén HPV tesztnek (HC2, Cobas, Aptima, Cervista) listája, amelyeket FDA-hez benyújtottak és ott jóváhagytak HPV asszisztált citológiai típusú primer méhnyakszűrésre. A szintén *in vitro diagnosztikai* minősítésű CLART HPV teszt esetében a gyártó nyilatkozott a diagnosztikai teljesítményről, amely alapján a CLART HPV teszt nem rosszabb a HC2-nél.

Összefoglalva, az összehasonlításra kért HPV tesztek együttesen abban különböznek a mi projektünkben használttól, hogy validálták őket egy olyan szűrési algoritmusra, amelyet a mi projektünk megvalósítása után fejlesztettek ki.

3. A jelölt a kísérletek során mélyrehatóan vizsgálta a HPV vírus fertőzés hatását és az IL-10 gén promotorán a metiláció összefüggéseit. Ismert, hogy a cervikális epithel sejtekben a HPV hatására megváltozik a különböző citokinek, mint például: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α és TNF- β termelése. Mi indokolta, hogy a vizsgálatok során az IL-10 szerepével kiemelten foglalkozott a jelölt?

A HPV indukált cervikális léziókban valóban megfigyelhető a fenti citokinek expressziójának-szekréciónak megváltozása, ide értve a progresszióhoz társuló emelkedett IL-10 expressziót is. Ugyan a léziók jelentős részét a megváltozott epithel sejtek alkotják, egyéb biológiailag aktív sejtek (Langerhans sejtek, mononukleáris sejtek) is jelen vannak, amelyek számos limfokint szekretálnak. Az epithel sejtek IL-1 α , IL-6, IL-8 és TGF- β szekréciónak jól ismert.

Az epithel sejtekben az IL-10 expresszió kérdése azért került a figyelem középpontjába, mert a szakterületet hosszú ideig félrevezette az egérsejteken végzett megfigyelések extrapolálása a humán epithel sejtekre. Az utóbbiakon közvetlenül végzett későbbi megfigyelések azonban arra utaltak, hogy a humán epithel sejtekben általánosan hiányzik az IL-10 expresszió, ami felvetette, hogy az epithelialis fejlődési vonalban epigenetikai mechanizmusok tarthatják inaktív állapotban az IL-10 gént. Vizsgálataink során igazoltuk, hogy a papillomavírus jelenlététől függetlenül a cervikális hám eredetű sejtvonalakban valóban általános az IL-10 promoter CpG metilációja, kimutattuk az IL-10 gén inaktív heterokromatikus állapotát, valamint azt, hogy a promoter metiláció ténylegesen gátolja az IL-10 promoter transzkripció aktivitását. Eredményeink közvetve arra utalnak, hogy a léziókban megemelkedő IL-10 expresszió a HPV fertőzött diszplázis/neopláziás hámsejtekkel szemben kialakuló kóros szervezeti válaszreakciók közé tartozik.

4. A jelölt endodonto-patogén baktériumok által kiváltott periodontitis apicalis chronica kórfolyamatban igazolta az EBV vírus szerepét, illetve, hogy az EBV fertőzések mintegy kétharmadában megfigyelhető a transzformáló EBNA gének transzkripció aktivitása. Ismert, hogy a szintén herpes vírus családba tartozó CMV periodontitis apicalis chronica kórfolyamatban szintén szerepet játszhat. Van-e arra vonatkozó adat, hogy a jelölt által vizsgált EBV negatív esetek háttérében esetleg CMV fertőzés állt?

Egyetlen panaszmentes lézióban észleltünk CMV monoinfekciót a 11 EBV negatív lézióból, nem tűnik jellemzőnek, hogy az EBV negatív léziók háttérében CMV fertőzés állna.

5. A periodontitis apicalis chronica háttérében álló EBV fertőzéssel, illetve az EBNA gének transzkripciós aktivitásával hogyan korrelál a ROS termelés, illetve a kapa B nukleáris faktor ligand receptorok expressziója?

A teljes EBNA expresszióval járó látens állapotban az EBV fertőzött gazdasejt környezetében inflammatorikus környezet alakul ki. Ennek egyik meghatározó mediátora a TNF-alfa, amely hatására emelkedik a reaktív oxigén gyökök szintje, amelyek fokozzák RANKL szintet a sejtek közötti interakcióban. A csont reszorpcióért felelős oszteoklasztokat aktiválja a RANKL-RANK kölcsönhatás. Természetesen a polimikrobiális elváltozásban az endodontopatogén baktériumok jelenléte önmagában is jelentős ROS termelést indukál a fenti következményekkel. Az EBV, ha jelen van, akkor a TNF-alfa expresszió fokozásán keresztül súlyosbítja a folyamatot.

6. Van-e arra vonatkozó adat, hogy a periodontitis apicalis chronica háttérében álló EBV fertőzések esetében melyik EBV-nuclearis antigén szerotípusok játszottak szerepet?

Az EBNA antigének expressziója koordináltan történik a látensen fertőzött gazdasejtben. Az amplifikált cDNS szakasz két különböző mRNS-ből származhat, az egyik az EBNA-2 és az EBNA-LP, a másik teljes EBNA repertoár expressziójáért felelős. Ugyanakkor az EBNA-2 és az EBNA-LP izolált expressziója átmeneti, mert a fő funkciójuk a többi látens géntermék expressziójának biztosítása, amelyek összességében a III. típusú EBV látenciát okozzák. Az általunk kimutatott EBNA expresszió a szakirodalmi adatok alapján a teljes EBNA repertoár expressziójával járó III. típusú látenciának feleltethető meg a *periodontitis apicalis* krónikus folyamatában.

7. A legfrissebb irodalmi adatok (Clin Implant Dent Relat Res. 2015 Feb;17(1):199-207) alapján az EBV asszociált periapicalis periodontitis összefüggésbe hozható a retrograd infekciós peri-implantitis-sel. Van-e arra vonatkozó klinikai adat, hogy a jelölt által kimutatott EBV pozitív esetekben retrograd infekciós peri-implantitis alakult ki?

Amennyiben fog implantáció történik, a panaszos periapikális lézió vagy annak reziduuma hajlamosít az állcsontba ültetett tartószerkezet körül kialakuló peri-implantitisre. Az általunk vizsgált betegcsoportban nem történt fog implantáció, így annak komplikációi sem fordultak elő. Az EBV jelenléte mind a lézióban, mind a nyálban társítható a panaszt okozó periapikális

lézióval, ezért a fog implantációban ígéretes biomarker lehet retrográd infekciós peri-implantitis kockázatának becslésére.

- 8. Ismert, hogy a morbillivírus sejtekhez történő kötődésében jelentős szerepe van a CD46 receptornak. Van-e szerepe, illetve jelentősége a CD46 receptor isoformáinak a morbillivírusnak az otosclerosis által okozott stapes fixációhoz?**

Az *otosclerosis* által érintett szövetekben morbillivírus genom és a CD46 receptor izoformák megváltozott expressziója együttesen fordul elő, a CD46 változások a transzmembrán és citoplazmatikus doméneket érintik. A morbillivírus és a CD46 izoformák közötti szignifikáns kapcsolat felveti, de önmagában nem igazolja a CD46 izoformák kórfolyamati szerepét, jelentőségét.

- 9. A jelölt a vizsgálatai során bizonyította, hogy a TNF-alfa mechanizmus aktiválódása jellemzően a stapes ankylosis morbillivírus pozitív, otosclerosisos formájának aktív stádiumában jelenik meg. Az interleukin 1 β és az osteoprotegerin szerepe is ismert az otosclerotikus csont átalakulásban. Hogyan alakul az interleukin 1 β és az osteoprotegerin szintje a stapes ankylosis morbillivírus pozitív, otosclerosisos formájában?**

Az aktív stádiumban megfigyelhető az oszteoklasztokat aktiváló TNF-alfa és IL-1béta proinflammatorikus citokinek szekréciója, amelyek emelkedett szintje együtt jár a oszteoprotegerin szint erőteljes csökkenésével. Az inaktív stádiumba jutás együtt jár a RANKL hatást gátló osteoprotegerin szint emelkedésével.

Debrecen, 2017. március 29.

Dr. Kónya József