

Válasz dr. Tímár József, MTA doktora, egyetemi tanár opponensi bírálatára

Nagyon köszönöm, hogy elvállalta disszertációm opponensi bírálatát, és örülök, hogy a disszertációt nyilvános vitára alkalmasnak tartotta és az MTA doktori fokozat odaítélését javasolta.

Az opponensi véleményben megfogalmazott kérdésekre és észrevételekre az alábbiakban szeretnék válaszolni.

Nagyon örülök, hogy Professzor Úr is fontosnak tartotta a disszertáció témáját, és bevezetőjében hangsúlyozta e terület jelentőségét.

Professzor Úr megjegyzi, hogy az irodalmi hivatkozások jelentős része 10 évnél idősebb.

A disszertáció megírásakor fontosnak tartottam, hogy bemutassam az általam végzett vizsgálatok irodalmi hátterét, a tudomány állását a vizsgálatok kezdésekor, azt, hogy mi és hogyan vezetett a molekuláris epidemiológia e területére. Mivel a disszertációban szereplő legkorábbi közleményeim a 2000-es évek elején születtek, ezért valóban számos irodalmi hivatkozás datálódik ennél korábbról. Mindazonáltal igyekeztem gondot fordítani az újabb eredmények elemzésére is, ennek megfelelően a legutóbbi két évből (ez az esetemben 2012-t és 2011-et jelenti, mivel a disszertációt 2013 elején nyújtottam be) 78 irodalomra hivatkoztam. Úgy tűnik, szerencsésebb lett volna, ha az idősebb irodalmak terén bátrabban szelektálok, annál is inkább, mivel az irodalomjegyzék Professzor Úr véleménye szerint is bőséges volt.

A disszertáció alapjául szolgáló közleményekkel kapcsolatban Professzor Úr megjegyzi, hogy azok közül sok IF nélküli folyóiratokban jelent meg, illetve többre nem történt hivatkozás a nemzetközi irodalomban.

A 15 angol nyelvű közlemény közül három valóban impakt faktor nélküli folyóiratban jelent meg, ebből egy esetben mentségemre szolgáljon, hogy a közlemény kifejezetten magyarországi daganatos trendekkel és tendenciákkal foglalkozik és ennek megfelelően egy hazai kiadású folyóiratban, a Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine-ben publikáltuk. A konkrét molekuláris epidemiológiai vizsgálati eredményeket közlő publikációk közül egynél sajnos valóban megkérdőjelezhető közlési stratégiát választottunk, és gyorsabb átfutást valamint nyílt hozzáférést ígérő, de impakt faktor nélküli folyóiratba küldtük azt el. Professzor Úr kritikáját természetesen elfogadom. A hivatkozások említett hiányát döntő részben magyarázza, hogy jó néhány közlemény a disszertáció beadása előtt nem sokkal jelent meg. A beadás óta ezeket már elkezdtek citálni (9., 12., 13., 14., 15. közlemények).

„Dicséretes, hogy a tanulmányozott ún. fejnyaki daganatos, vastag- és végbélrákos illetve méhnyakrákos beteganyag hazai viszonylatban is igen jelentős méretű.”

Köszönöm szépen a megfelelően nagy elemszámokra vonatkozó észrevételt.

„...az ún. fejnyaki daganatos beteganyag esetében sajátosan szelektált beteganyagot használt a szerző, amelybe szájüregi rák gyakran nem szerepelt...”

A fejnyaki daganatos betegek esetében a vizsgálati csoportok leírásánál valóban nem emeltem ki, hogy a Pécsi Tudományegyetem Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikájáról származó anyagban szájüregi daganatos betegek mintái nem szerepelnek, csakugyan zavaró, hogy ez csak később, az

eredmények leírásánál (az alcsoportonkénti felbontásban közölt eredményeknél) derül ki. Ez esetben valóban szelektált beteganyaggal dolgoztunk, ahogy Professzor Úr is megállapította. A szombathelyi beteganyag azonban a fej-nyaki daganatok teljes spektrumát felölelte.

„...nem kerül bemutatásra, hogy a jobb és bal kolonfél daganatai milyen arányban vannak az egyes kohorszokban, ami jelentősen befolyásolhatja az eredményeket és azok interpretációját. A bíráló ezért nagyon hiányolja a beteganyagok klinikai vizsgálatokban oly megszokott pontos precíz bemutatását.”

Mivel különbség van a jobb és a bal kolonfél daganatai között egyes epidemiológiai sajátosságokat, klinikai-, pathológiai jellemzőket, prognózisukat illetően, természetesen egyetértek Opponens Úr kritikájával, hogy ezen jellemzők megadása informatív lett volna. A résztvevőket azért nem bontottam további alcsoportokra, hogy nagy elemszámú csoportokkal dolgozhassak, és ezáltal az eredmények megbízhatóságát növeljem, tekintetbe véve azt is, hogy irodalmi adatok alapján a jobb- és a bal kolonfél-daganatos betegek túlélése között kétségtől meglevő különbség nem akkora (Meguid, 2008; Benedix, 2010; Weiss, 2011; Jess, 2013), hogy az így nyert többlet-információ kompenzálta volna a csoportok méretének csökkenését. Mivel lokalizáció szerint nem csoportosítottam, sajnos valóban elmulasztottam feltüntetni is az erre vonatkozó adatokat, amit az alábbi táblázatban szeretnék pótolni:

	Lokalizáció	
	Bal oldali (sigma, colon descendens, rectum)	Jobb oldali (coecum, colon ascendens és transversum)
6. populáció (n=500)	332 (66,4%)	168 (33,6%)
7. populáció (n=500)	319 (63,8%)	181 (36,2%)

Mivel a jelenlegi irodalmi adatok alapján nem tisztázható egyértelműen, hogy a vizsgált GST allélpolimorfizmusok hatása mennyiben tér el a jobb és a bal kolonfél daganatos kockázatát illetően, ez a közeljövő izgalmas kutatási kérdése lehet.

A vastagbélrákra vonatkozó prognosztikus vizsgálatnál (5. populáció) pedig úgy gondoltam, hogy a lokalizáció helyett az általam fontosabbnak tartott stádiumbeosztás alapján célszerű csoportokat képezni, (Dukes' A/B/C stádiumú betegekből 50-50, a D stádiumból pedig 32 képezett egy-egy csoportot) mert ez bír igazán jelentős prognosztikus értékkel.

„Az alkalmazott módszertan a molekuláris biológia alapszereit, sajnálatos módon közöttük nem szerepel a Sanger szekvenálás vagy újgenerációs technológiák”

A módszertant illetően valóban különböző alapszereket alkalmaztunk, minden esetben igyekeztünk olyan, viszonylag egyszerűen kivitelezhető eljárásokat választani, amik költséghatékonyak, de kellően megbízhatóak voltak. Nem tartom magam molekuláris biológusnak, a disszertációban feltett kérdéseket is sokkal inkább epidemiológiai nézőpontból közelítettem meg. Az allélpolimorfizmusokkal kapcsolatos két fő vizsgálati stratégia (hipotézis-vezérelt vagy kandidáns gén megközelítés vs. teljesgenom-asszociációs vizsgálatok) közül az utóbbi igényli az újgenerációs technikák alkalmazását, míg a disszertációban az általam alkalmazott kandidáns gén megközelítés ezt nem teszi szükségessé. Bár e területen is folyamatos a technikai fejlődés, a disszertáció témájához hasonló kérdések vizsgálatával foglalkozó publikációk (allélpolimorfizmusok és daganatok kapcsolatát elemző eset-kontroll vizsgálatok) döntő többsége egyszerű PCR alapú módszereket használ genotipizálásra (Econompoulos, 2010; Liu, 2013). A

molekuláris biológiai módszerek fejlődésével természetesen számos új lehetőség áll rendelkezésre (pl. nagy áteresztőképességű, újgenerációs technikák a genotipizálásban, real-time PCR alapú módszerek a génexpressziók detektálására), és arra törekszem, hogy olyan kérdéseket is feltehessünk, amelyek megválaszolására intézetünkben e technológiákat is alkalmazhatjuk majd. Természetesen fontosnak tartom a metodikai fejlődést, intézetünkben például már nem a disszertációban leírt, és Professzor Úr által is kritikusan említett módszerrel (slot-blot hibridizáció) történnek a génexpressziós vizsgálatok, hanem real-time PCR alkalmazásával.

A génpolimorfizmusok elemzése gyakran RFLP módszerrel történt, és sehol nem történt említés arról, hogy ezen indirekt módszer eredményeit más módszerrel pl. szekvenálás is megerősítették volna.

A módszerek beállításakor minden esetben törekedtünk arra, hogy azokat más módszerekkel összevetve vagy máshol is genotipizált mintákkal összehasonlítva validáljuk. Ezután már, mivel technikailag viszonylag egyszerű módszereket használtunk, valóban nem végeztünk az egyes vizsgálatoknál szekvenálást további validálás céljából. Kétségtelen azonban, hogy Opponens Úr kritikájának megfelelően, ez mégis célszerű lett volna.

„...egy adott beteganyagon talált eltéréseket egy független másik beteganyagon kell validálni”

A mai, bonyolultabb molekuláris biológiai módszereket vagy komplex bioinformatikát alkalmazó biomarker vizsgálatoknál (pl. teljesgenom-asszociációs vizsgálatok), különösen klinikai vizsgálatoknál az ilyen validálás kucsfontosságú. Az eddigi tapasztalataim és az irodalmi adatok alapján az egyes betegségek kialakulásának kockázatát tanulmányozó eset-kontroll vizsgálatoknál ez még nem volt része a „szokásos protokollnak”. A disszertáció irodalomjegyzékében szereplő, vizsgálataimhoz kapcsolódó nagyobb meta-analíziseket áttekintve sem találtam olyan, kis számú polimorfizmust tanulmányozó eset-kontroll vizsgálatot, amikor is a kapott eredményeket más, független populáción validálták volna. Magának a tényleges összefüggésnek a validálásához/tisztázásához e területen az egyes eredményeket összevető/integráló meta-analízisek járultak jelentős mértékben hozzá. Ezért, ha újabb vizsgálatokra nyílt lehetőségem, én is inkább arra törekedtem, hogy azokban új kérdéseket tehessek fel. Természetesen a Professzor Úr által említett szigorú klinikai/biomarker standardok a molekuláris epidemiológia egyre több területén érvényesülnek, és válnak elengedhetetlenné és szeretném azokat saját vizsgálataimban is érvényesíteni. E tekintetben a független populációkon történő validálást különösen az allélpolimorfizmusok és a prognózis közötti kapcsolatot vizsgáló munkákkal kapcsolatosan szeretném elvégezni.

Opponens Úr véleménye szerint a disszertáció leggyengébb része a kémiai karcinogének által kiváltott génexpresszió-változások elemzése, legerősebb részét pedig a különböző genetikai polimorfizmussal kapcsolatos vizsgálatok képezik. Ennek egyrészt örülhetnék, mert szívemhez jóval közelebb állnak az elmúlt 10 évi munkásságom alapját képező allélpolimorfizmus-vizsgálatok, amelyek a disszertáció döntő részét is adják, másrészt viszont sajnálom, hogy a disszertációt nem sikerült egységes színvonalon elkészíteni.

„...nem világos hogy miért ezen gének elemzése történt: c-myc, p53 és Ha-RAS”

A bevezetésben próbáltam megindokolni, hogy miért a c-myc, Ha-ras és a p53 gének expresszió-változásait elemeztük, de úgy látszik, ez nem volt teljesen meggyőző. Nehéz lenne minden kétséget kizáróan azt mondani, hogy a több tucat lehetséges gén közül miért pont ez vagy az a három a megfelelő biomarker. Az általunk kiválasztott génekkel kapcsolatban számos irodalmi adat mutatja, hogy kulcsszerepet játszhat a malignus transzformáció során, illetve tumorsejtekben – vagy bizonyos karcinogénekkel történő expozíció

után – expressziója megváltozhat. Emellett mindegyik génexpresszió más aspektusból monitorozza a malignus transzformáció folyamatát, mivel ezek a gének döntően különböző biológiai/biokémiai utakban vesznek részt. Továbbá intézetünkben végzett korábbi vizsgálatok (amelyekre hivatkozom a disszertációban) is azt mutatták, hogy e gének szenzitíven képesek jelezni egyes karcinogén ágensek hatását, és vizsgálataink egyik célja volt a korábbi eredmények kiterjesztése, más kísérleti rendszerben való megerősítése.

14-23. ábrák. „...nem világos, hogy milyen értékek vannak az ordinátán”, „Ezen ábrák oszlopainak színei annyira hasonlóak, hogy gyakorlatilag értékelhetetlenek az olvasó számára...”

Sajnos az ábrákon valóban nem megfelelően választottam meg az egyes oszlopok színeit, és – bár az eredeti közleményben természetesen megtalálható, és a módszerek leírásánál utaltam rá, hogy pozitív kontrollként β -aktint használtunk – nem jeleztem, hogy a génexpressziók a β -aktinnál mért értékek százalékában kerültek feltüntetésre. Ahogy Opponens Úr is korábban megjegyezte, ez egy szemikvantitatív értékelés, ami nem abszolút értékeket mér, hanem az egymáshoz viszonyított eltérések kifejezésére alkalmas.

Az allépolimorfizmusoknak a daganatkialakulás kockázatára gyakorolt hatásának vizsgálatával kapcsolatban mindenekelőtt nagyon köszönöm Professzor Úr megjegyzését, miszerint e területen fontos és értékes megfigyeléseket végeztem.

Ezen vizsgálatokkal kapcsolatban a bíráló többször utal rá, hogy egyes eredményeim nem vethetők össze (illetve nem vonhatók össze) egymással, mert a különböző polimorfizmusok vizsgálata legtöbbször más-más beteganyagon történt. Valóban, a vizsgálatok többsége lényegében egymástól független vizsgálat volt, és az egyes vizsgálatoknál el kellett döntenem, hogy a rendelkezésre álló erőforrásokat milyen mértékben akarom a korábbi eredmények megerősítésére, illetve mennyiben új kérdések megválaszolására fordítani.

„Sajnos egy harmadik beteganyagon elemzett három másik enzim polimorfizmusainak hatásait: CYP1A1, CYP1B1 és EPHX1. (nem igazán világos, hogy miért maradt ki ezek közül a CYP1A2, a fejnyakban elemzett UGT1A1, vagy a MIR146a)”

Ezt a vizsgálatot 2007-ben, a fej-nyaki vizsgálatnál korábban végeztük és publikáltuk, akkor nem került fel az UGT1A1 polimorfizmus vizsgálata (az akkor rendelkezésre álló adatok alapján /van der Logt, 2004; Tang, 2005/ ez a polimorfizmus a vastagbél-daganatok kockázatát illetően kevésbé tűnt érdekesnek, mint az általunk kiválasztottak). A mir-146a polimorfizmust csak 2008-ban írták le (Jazdzewski, 2008), tehát még nem jöhetett szóba, a CYP1A2-t pedig vizsgáltuk, ennek leírása az anyag- és módszer fejezetben és az eredmények között is szerepel, de az alfejezet címében felsorolt polimorfizmusok közül sajnálatos módon valóban kimaradt.

Igen fontosnak és lényegesnek tartom Professzor Úr felvetését arról, hogy ha még több polimorfizmust elemeztem volna egyidejűleg, akkor vajon már akár a familiáris vastagbélrák kockázatát elérő mértékű hatást találhattunk volna-e.

Meggyőződésem – vagy mondhatjuk úgy, hogy feltételezésem – szerint számos, önmagában kisebb hatású genetikai tényező együttesen már elérheti azt a nagyságrendet, amikor akár a familiáris daganatok kockázatával összemérhető hatást találunk. Véleményem szerint a sporadikus daganatok kialakulásában a környezeti, életmódi tényezőkkel kölcsönhatásban az ilyen fajta fokozott genetikai érzékenység jelentős szerepet játszhat. Úgy gondolom, hogy vizsgálataim jövőbeli gyakorlati hasznát egyik oldalról az jelentheti,

hogy ha az alapfeltételezés helytálló, és sikerül is majd ilyen, jelentősen fokozott kockázatú személyeket azonosítani, az ő esélyeiket lehet számottevően javítani a primér prevenció, kemoprevenció eszköztárának személyre szabottan aktív és széleskörű bevetésével, illetve célzott és gyakoribb szűrővizsgálatok alkalmazásával.

E kérdés kapcsán szeretném megemlíteni, hogy a hasonló molekuláris epidemiológiai vizsgálatok másik kulcskérdése véleményem szerint, hogy vajon a jelenlegi álláspont szerint „kemény végpontként” tekintett OR (vagy RR) = 10 alatti genetikai jellegű kockázatokkal is érdemes-e foglalkozni, és indokolhatnak-e ezek a kockázatok valamiféle intervenciót? Meggyőződésem szerint igen, hiszen az életmódi, környezeti tényezők daganatos kockázatot befolyásoló hatása terén (de más betegségek kockázatát illetően is) számos megállapítás alapul olyan összefüggéseken, amelyek statisztikailag szignifikánsak, de a hatás mértéke a fent említettélnél gyengébb, az OR (vagy RR) 1,5-5 tartományba esik. Ilyenek többek között a passzív dohányzás és számos daganat kapcsolata, az erősen átsütött húsok fogyasztása és a vastagbél-daganatok kockázatának összefüggése vagy az energiabevitel és a daganatok kockázatának kapcsolata, amelyekkel kapcsolatban mégis határozott életmódi, táplálkozási ajánlások ismeretesek. Logikusnak tartanám, hogy hasonló erősségű genetikai különbségeket is figyelembe vegyünk, és intenzívebb daganatmegelőző tevékenységet (pl. a táplálkozási kockázati tényezők szigorúbb kerülését és a védő faktorok fokozottabb igénybe vételét) javasoljunk az ilyen személyek számára.

Lehetségesnek tartja a jelölt, hogy a karcinogén metabolizáló enzimek a kemoterápiás szerek metabolizmusában fontos szereplők, és egyes polimorfizmusaik fokozzák a karcinogén hatásokat, valamint egyúttal kemoterápiás rezisztenciához is vezethetnek?

Igen, Professzor Úr felvetését irodalmi adatok is alátámasztják, több metabolizáló enzim tekintetében is. Mivel ezek az enzimek részt vesznek a kemoterápiás szerek metabolizmusában polimorfizmusaik befolyásolhatják azok átalakulását és ezáltal hatását is. A CYP1A1 enzimről például ismeretes, hogy egyes policiklusos aromás szénhidrogének metabolizmusán keresztül befolyásolja több daganat kockázatát is, ugyanakkor az aminoflavon átalakításán keresztül annak daganatellenes hatékonyságát is (Zheng, 2010). A disszertációmban is tárgyalt GST enzimek is befolyásolják egyes citosztatikumok metabolizmusát (Lien, 2002; Bolt, 2006) és ezáltal a hatékonyságon, prognózison kívül a mellékhatások, illetve toxicitás mértékét is (Zielinska, 2005).

Az összefoglaló értékeléssel kapcsolatban köszönöm Opponens Úr véleményét, miszerint „nagy és úttörő” munkát végeztem e területen, és ezáltal „közelebb kerültünk a hazai populáció karcinogén érzékenységeinek megértéséhez”.

Végül ismételtelen köszönöm Professzor Úr bírálatát, észrevételeit, kritikai megjegyzéseit melyek ahhoz is segítséget nyújtanak, hogy a jövőben néhány hibát ne kövessek el. Legfőképpen természetesen azt köszönöm, hogy Professzor Úr pozitívan értékelte, vitára alkalmasnak tartotta disszertációmát és javasolta az MTA doktori cím odaítélését.

dr. Kiss István

Pécs, 2014. május 19.

- Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la Chapelle A. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 7269-7274.
- Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H. Colon/Rectum Carcinomas (Primary Tumor) Study Group. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis Colon Rectum*. 2010;53(1):57-64.
- Meguid RA, Slidell MB, Wolfgang CL, Chang DC, Ahuja N. Is There a Difference in Survival Between Right-Versus Left-Sided Colon Cancers? *Ann Surg Oncol*. 2008; 15(9):2388–2394.
- Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES, King J, LoConte N, Kennedy G, Smith M. Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results--Medicare data. *J Clin Oncol*. 2011;29(33):4401-4409.
- Jess P, Hansen IO, Gamborg M, Jess T. Danish Colorectal Cancer Group. A nationwide Danish cohort study challenging the categorisation into right-sided and left-sided colon cancer. *BMJ Open*. 2013;3(5).
- Economopoulos KP, Sergentanis TN. GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and colorectal cancer risk: a comprehensive meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2010;46(9):1617-1631.
- van der Logt EM, Bergevoet SM, Roelofs HM, van Hooijdonk Z, te Morsche RH, Wobbes T, de Kok JB, Nagengast FM, Peters WH. Genetic polymorphisms in UDP-glucuronosyltransferases and glutathione S-transferases and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis*. 2004;25(12):2407-2415.
- Tang KS, Chiu HF, Chen HH, Eng HL, Tsai CJ, Teng HC, Huang CS. Link between colorectal cancer and polymorphisms in the uridine-diphosphoglucuronosyltransferase 1A7 and 1A1 genes. *World J Gastroenterol*. 2005;11(21):3250-3254.
- Liu L, Wu G, Xue F, Li Y, Shi J, Han J, Zhang X, Na Y, Zhang H, Tang X, Pu H, Yuan Q, Zhang L, Yang M. Functional CYP1A1 genetic variants, alone and in combination with smoking, contribute to development of head and neck cancers. *Eur J Cancer*. 2013 Jun;49(9):2143-51
- He XF, Wei W, Liu ZZ, Shen XL, Yang XB, Wang SL, Xie DL. Association between the CYP1A1 T3801C polymorphism and risk of cancer: evidence from 268 case-control studies. *Gene*. 2013 Oct 24. [Epub ahead of print]
- Zheng Q, Sha X, Liu J, Heath E, Lorusso P, Li J. Association of human cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) and sulfotransferase 1A1 (SULT1A1) polymorphisms with differential metabolism and cytotoxicity of aminoflavone. *Mol Cancer Ther*. 2010 Oct;9(10):2803-13.
- Lien S, Larsson AK, Mannervik B. The polymorphic human glutathione transferase T1-1, the most efficient glutathione transferase in the denitrosation and inactivation of the anticancer drug 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochem Pharmacol*. 2002 Jan 15;63(2):191-7.
- Zielińska E, Zubowska M, Misiura K. Role of GSTM1, GSTP1, and GSTT1 gene polymorphism in ifosfamide metabolism affecting neurotoxicity and nephrotoxicity in children. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2005 Nov;27(11):582-9.
- Bolt HM, Thier R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Curr Drug Metab*. 2006 Aug;7(6):613-28.