

Opponensi vélemény dr. Kiss István „Génexpressziók és allépolimorfizmusok mint a daganatmegelőzés molekuláris epidemiológiai biomarkerei” c. MTA doktori disszertációjáról

A daganatok kialakulásának majd progressziójának molekuláris alapjai egyre inkább ismertté válnak, mivel a molekuláris technológiák alkalmazásával korábban nem ismert gének szerepére nyerünk adatokat. A személyre szabott orvoslás arra a felismerésre alapul, hogy hasonló fizikai és kémiai mikrokörnyezeti hatások a genetikailag sokszínű populációban igen eltérő következményekkel járhat, ami kihat a daganatok keletkezésére, progressziójára és terápiás érzékenységére is. Hazánkban a rosszindulatú daganatok gyakorisága igen magas, amire nem elegendő az a magyarázat, hogy önpusztító életmódot folytatunk, feltételezhető, hogy genetikai sajátosságunk is szerepet játszik a karcinogének iránti hiperérzékenységünkben. Ezért is üdvözlendő, hogy MTA doktori értekezés született molekuláris epidemiológia témakörben, amely a PTE-n zajló csaknem 10 éves kutatásokat foglalja össze.

A disszertációnak 3 fő célkitűzése volt:

1. Onkogének és szuppresszor gének expressziójának elemzése karcinogén hatások alatt, melyből a primer prevenció számára hasznosítható biomarkereket lehet találni,
2. Karcinogén és gyógyszermetabolizáló enzimek, DNS hibajavító gének polimorfizmusainak elemzése daganatos betegpopulációkban, amelyek révén rákhajlamosító genetikai konstellációk azonosíthatók
3. Romapopuláció genetikai sajátosságainak elemzése, amely magyarázatot adhat ennek a népcsoportnak a fokozott karcinogén érzékenységére.
4. A fenti gének polimorfizmusait abból a szempontból is vizsgálni kívánta a jelölt, hogy ezek esetlegesen prognosztikus szereppel is rendelkeznek-e, azaz a betegség biomarkerei lehetnek-e.

A disszertáció 140 oldal terjedelmű, amelynek tekintélyes része 40 o. a Bevezetés, 16 oldal az Anyag és módszerek 50 oldal az Eredmények, míg a Megbeszélés 30 oldal. A Disszertációt bőséges irodalmi hivatkozási jegyzék kíséri, amelynek jelentős része 10 évnél idősebb, óhatatlanul elavultnak tűnhet.

Maga a disszertáció 15 idegen nyelvű és 12 magyar nyelvű közleményre épül, sajnos közöttük sok az IF nélküli folyóiratokban megjelent, és feltűnő, hogy többre nem történt hivatkozás a nemzetközi irodalomban. A daganatos hajlamot sok-sok gén befolyásolja, és a polimorfizmusai változó mértékben járulnak hozzá a rákkockázat emelkedéséhez. Az ilyen hatások kimutatásához nagy beteg- és kontroll populáción történő elemzésekre van szükség. Dicséretes, hogy a tanulmányozott un. fejnnyaki daganatos, vastag- és végbélrákos illetve méhnyakrákos beteganyag hazai viszonylatban is igen jelentős méretű. Ennek ellenére például az un. fejnnyaki daganatos beteganyag esetében sajátosan szelektált beteganyagot használt a szerző, amelybe szájüregi rák gyakran nem szerepelt, aminek a kapott eredmények értékelésekor lesz/lehetett jelentősége. Hasonló a probléma a vastag- és végbélrákos beteganyaggal: 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.

Az alkalmazott módszertan a molekuláris biológia alpmódszerei, sajnálatos módon közöttük nem szerepel a Sanger szekvenálás vagy újgenerációs technológiák. 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 génexpressziós vizsgálatok esetében sem történt igazi kvantitatív elemzés, csak un. szemikvantitatív (géldok formájában). Egy másik jellemző hiányosság az, hogy ma a korszerű és nemzetközileg is elfogadható biomarker vizsgálatok alapvető feltétele, hogy az egy adott beteganyagon talált eltéréseket egy független másik beteganyagon kell validálni. Ez annál inkább érthetetlen, mert, ahogy azt fentebb említettem, a jelölt nagy beteganyagokon dolgozott, egy-egy daganatfőleség esetében több 2-3 különbözőn is, ami megteremtette a lehetőségét az ilyen validációknak.

Véleményem szerint a disszertáció leggyengébb része a kémiai karcinogének által kiváltott onkogén expressziós változások elemzése kísérleti állatokban és fejnnyaki daganatos betegekben. Elsőként nem világos hogy miért ezen gének elemzése történt: c-myc, p53 és Ha-RAS. A 14-23. ábrák esetében nem világos, hogy milyen értékek vannak az ordinátán, ha % az mihez képest. Ezen ábrák oszlopainak színei annyira hasonlóak, hogy gyakorlatilag értékelhetetlenek az olvasó számára. Ezen vizsgálatok során az 1NP, DMBA és MNU hatásait elemezte különböző szervekben. Az 1NP kezelés a nyirokszervekben okozott cmyc expresszió emelkedést hasonlóan a p53-hoz, míg a HaRAS eltérések nem voltak

szignifikánsak. Ezért is furcsa hogy ezeket a vizsgálatokat fejnyaki daganatos betegekre is kiterjesztették. Ezen populáció perifériás vérsejtjeiben szignifikánsan emelkedett volt a 3 gén expressziója. Egy kisebb betegcsoportban a nem pontosan definiált kezelés után 2 évvel lecsökkent a HaRAS és p53 expresszió.

Kétségtelenül a disszertáció legerősebb része a különféle daganatos betegcsoportokban végzett polimorfizmus vizsgálatok.

Fejnyaki daganatos betegek esetében a CYP1A1,A2, UGT1A1, XRCC1 enzimek valamint a pre-MIR146a polimorfizmusait elemezte. Kimutatta, hogy a CYP1A1 val/val homo- és heterozigóta variánsa gyakrabban fordul elő a daganatos betegekben hasonlóan az UGT1A1-28 homozigóta variánsához. A két gén között kapcsolat van, mert a két HNCC polimorfizmus együttes előfordulása is emelkedett a daganatos populációban. Elsőként vizsgálta fejnyaki daganatosokban a MIR146a C allél variánsának szerepét és igazolta, hogy a daganatos betegekben a C allél homo- és heterozigóta variánsai gyakoribbak. A gond az, hogy a MIR vizsgálat szájúregi daganatokon, míg a többi glottikus daganatokon történt, ezért nem lehet tudni, hogy ezek a másik populációban is hasonló hatásúak. Az XRCC1 esetében azA194Trp és az A399Gln polimorfizmusokat elemezte, az előbbinek nem volt jelentősége, míg a Gln hetero és homozigóta polimorfizmusok emelték a fejnyaki rákok kockázatát.

Vastag-és végbélrákos betegeken megvalósulni látszott szűk körben a független beteganyagon történő validálás, mert a GSTM1, GSTT1, p53 polimorfizmusokat két különböző beteganyagon is elemezte. A GSTM1 és p53 esetében két eltérő beteganyagon is ki tudta mutatni, hogy ezek polimorfizmusai erősen emelik a rákkockázatot (OR=1.8). Egy betegcsoportban a NAT1/2 és XRCC1 polimorfizmusokat is elemezte, és azt találta, hogy a NAT2 gyors acetiláló variánsa, valamint a XRCC1 Gln polimorfizmusa (hasonlóan a fejnyaki rákokhoz) mérsékelt kockázati tényezők. Az egyik beteganyagon 6-7 polimorfizmusra kiterjesztett együttes kockázatbecslést is végzett és igazolta, hogy ezek a genetikai eltérések egyedileg csak kisebb mértékben emelik a rákkockázatot, de együttesen hatásuk már összeadódik, és jelentős tényezőt képeznek, amit a magas OR érték is mutat (OR=6.39).

Sajnos egy harmadik beteganyagon elemzett három másik enzim polimorfizmusainak hatásait: CYP1A1, CYPE1 és EPHX1. (nem igazán világos, hogy miért maradt ki ezek közül a CYP1A2, a fejnyakban elemzett UGT1A1, vagy a MIR146a). A CYP1A1, CYPE1 és az egyik EPHX1 polimorfizmusok enyhe rákkockázat emelőknak bizonyultak, de ismét igazolta, hogy ezek együttes hatás az igazán biológiailag szignifikáns (OR=3.35). Felmerül a bírálóban,

hogy mi történt volna, ha a szignifikáns enzim polimorfizmusokat valamennyit együttesen elemezte volna, akkor elméletileg már igazán jelentős $OR=10$ értékű genetikai konstellációk lennének azonosíthatók a vastagbélrákban? Ezen értékek a familiáris vastagbélrák kockázatot megközelítő erejű genetikai hatások lennének?

HPV-pozitív nőgyógyászati anyagon elemezte a GSTM1 és GSTT1 polimorfizmusok szerepét, ami érdekes kérdés, mert az onkogén tényezőként a HPV van elkönyvelve a méhnyakrák vonatkozásában. Emellett egy genetikailag determinált pszichológiai tényezőt is vizsgált a DRD2, acetilkolin receptort. A két más daganatban is kockázat emelő GSTM1 és GSTT1 polimorfizmus méhnyaki preblastomatosisek kialakulásának kockázatát emelte, ha nem is nagyon nagy mértékben.

Végezetül nagyszámú oláh cigány populáció esetében elemezte számos enzim polimorfizmusának gyakoriságát keresve az emelkedett daganatos incidencia okait. (CYP1A1, GSTM1, GSTT1, NAT2, XRCC1, p53 és MIR146a). Az egyértelmű volt, hogy a roma populáció genetikailag eltérő a hazai kontrolltól, azonban a genetikai eltérések egy része emeli, míg mások csökkentik a rákkockázatot, így feltett kérdést nem sikerült megválaszolni.

Enzimpolimorfizmus vizsgálatait kiterjesztette a különféle daganatok progressziójára gyakorolt hatások elemzésére is.

Fejnyaki daganatok esetében a CYP1A1 és UGT1A1 polimorfizmusok kedvezőtlen prognosztikai tényezőnek bizonyultak hasonlóan a XRCC1 Arg polimorf variánst hordozókhoz. Ezen vizsgálatok legnagyobb problémája a heterogén beteganyag egységes kezelése: a stádiumra tekintet nélkül ezeket az adatokat nem lehet kritikusan szemlélni és a multivariáns analízis nélkül nem ítéltető meg, hogy ezek a genetikai tényezők valóban lehetnek-e prognosztikus értékűek.

Vastag- és végbéldaganatos betegekben a GSTM1 és GSTT1 illetve p53 polimorfizmusok prognosztikus szerepét is elemezte. Itt már tanult a fejnyaki daganatos beteganyag problémáiból és a Dukes stádiumhoz illesztetten elemezte a marker szerepeket és igazolta, hogy csak az alacsony B stádiumban van kedvező prognosztikus szerepük a vizsgált polimorfizmusoknak, ami arra utal hogy ezek a genetikai tényezők gyengén befolyásolják a daganatprogressziót, a stádiumnak erősebb a szerepe. Alacsony stádiumban kicsi az esély a progresszióra, magas stádiumban igen nagy, és ezek esetében a gyengébb hatású génkonstellációk elvesznek.

Méhnyakrákosok esetében a DRD2 polimorfizmus (A1 allél) bizonyult kedvezőtlen prognosztikai tényezőnek: a probléma itt is a stádium szerinti stratifikáció és a multivariáns analízis hiánya.

Az egész enzimpolimorfizmus elemzés kapcsán merül fel alapvető kérdésként, hogyan lehet értékelni egy egy enzim polimorfizmus rákkockázat emelő és negatív daganatprogressziós hatásait. 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?

Összefoglalva: a disszertáció egyértelműen bizonyítja, hogy a jelölt nagy és úttörő munkát végzett a különféle hazai daganatos betegségekben, hogy rákhajlamosító genetikai tényezőket találjon. Ezen kutatásai során sok fontos és értékes megfigyelést tett, amivel közelebb kerültünk a hazai populáció karcinogén érzékenységének megértéséhez. A vizsgálatok egy részében a biomarker kutatások ipari standardjait betartotta, és ezek a vizsgálatai és eredményei a legértékesebbek. A hazai epidemiológiának nagy szüksége van sok jól képzett molekuláris epidemiológusra, hogy még jobban megértsük, hogy miért tudunk oly sok mással szemben pont ezen a területen a világ élvonalába kerülni. Minden gyarlósága ellenére ezért javasolja a bíráló a jelölt disszertációjának vitára tűzését és a MTA doktori fokozat odaítélését.

dr. Tímár József