

OPPONENSI VÉLEMÉNY**Dr. Damjanovich László****az MTA doktora**

cím elnyerése érdekében benyújtott,

KLINIKAI ÉS MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATOK COLON TUMOROK**PROGRESSZIÓJA SORÁN**

című pályázatáról

I. ÁLTALÁNOS LEÍRÁS

Dr. Damjanovich László “Klinikai és molekuláris vizsgálatok colon tumorok progressziója során” c. pályázatához tartozó 87 oldalas értekezés illetve a 49 oldalas tézis füzet megfelel a formai kritériumoknak.

A jelölt tudományos közleményeinek száma a dolgozat benyújtásának pillanatában: 62, az értekezés alapjául ebből 16 közlemény szolgál. A jelölt közleményeinek kumulatív impakt faktora: 92,9. Összesített/független citációja: 1686/1508, míg a Hirsch-index: 11.

II. TÉMAVÁLASZTÁS

A jelölt témaválasztása kiemelt jelentőséggel bír a klinikai gyakorlatban, különösen figyelembe véve a sporadikus vastagbélrákok gyakoriságát Magyarországon (a világon a 2. az incidencia). A jelölt az öröklődő vastagbélbetegségek közül kifejezetten a Lynch szindróma vizsgálatára koncentrált. A HNPCC-re gyanús esetekben kiemelten fontos a tünetmentes családtagok időben történő felvilágosítása valamint a szűrővizsgálatok megszervezése. További tanulmányokban az LS-174-T CRC sejtvonal valamint CRC és Crohn-betegek perifériás véréből illetve drenáló nyirokcsomójából izolált CD4+ T limfocitáin elhelyezkedő, az immunválaszban fontos szerepet játszó sejtfelszíni receptorok számának és mintázatának vizsgálata,

mely alapja lehet újabb, célzott molekuláris terápiás lehetőségek felderítésének. A tömegspektometriai módszerrel végzett intraoperatív szövethistológiai eredményei biztatónak bizonyultak a módszer gyorsasága, valamint magas szenzitivitás- illetve specificitásértéke miatt, melynek bizonyos esetekben gyakorlati jelentősége lehet, megspórolható az intraoperatív szövethistológiai vizsgálat.

III. FORMAI ANALÍZIS

A dolgozat 8 fejezetet tartalmaz. A 17 oldalas részletes bevezetést követően a jelölt egy oldalban foglalja össze a célkitűzéseit. Ezt követően 12 oldalban foglalja össze a betegeket valamint a használt módszereket, majd 34 oldalban írja le az eredményeket, melyet 2 oldalas összefoglalás követ. Kritikai megjegyzés, hogy a bevezetésben a jelölt nem ismerteti a világon észlelhető colorectális carcinoma trendeket, sem a magyar adatokat. A megbeszélés és értékelés, az eredmények értékének gyakorlati elhelyezése helyenként kifejezetten rövid.

IV. RÉSZLETES VÉLEMÉNY – KÉRDÉSEK

Az értekezés első részében – ez az értekezés legjobban kidolgozott fejezete - bemutatott HNPCC/LS adatbázisba a Debreceni Egyetem Sebészeti Intézetében colorectális carcinoma miatt ellátott betegek 1997 és 2003 között retrospektív, míg 2004-től prospektív módon kerültek beválasztásra az Amsterdam és a Bethesda kritériumok alapján. Ezt követően pozitív immunhisztokémiai valamint mikroszatellita instabilitás vizsgálatokat követően került sor a DNS szekvenálásra a MSH2 és MLH1 gén mutáció igazolása céljából, mely során 14 mutációt találtak, melyből 5 mutáció eddig még ismeretlennek bizonyult. A családfa vizsgálatok során összesen 14 patogén mutáció hordozó családot azonosítottak, akikben 12 géneltérést találtak.

Az eredmények rávilágítanak a szokásosnál fiatalabb colorectális rákos beteg egyéb lokalizációban előforduló daganatos megbetegedéseire történő rákérdés, illetve a családi anamnézis felvételének fontosságára, a családban előforduló daganatos megbetegedések feltérképezésére. Öröklődő vastagbél-daganatok felismerésénél kiemelt fontosságú a potenciálisan hordozó családtagok tájékoztatása és a szűrővizsgálatok megszervezése.

Az értekezés második részében egy CRC sejtvonal epithelsejtjei (LS-174-T) és colon tumoros, valamint Crohn-betegek nyirokcsomóiból és perifériás véréből származó limfociták sejtfelszíni receptormintázatának vizsgálatáról számol be a szerző. A membrán vizsgálatok során áramlási citometriás fluorszcencia rezonancia energiáttranszfert és konfokális lézer pásztázó mikroszkópiát alkalmaztak. A mérések során vizsgált receptorok egy bizonyos típusú lipid tutajban helyezkednek el és fontos szerepet játszanak a szervezet immunfolyamataiban, a tumorelles immunitásban és a metasztázisképzésben. Ebben a fejezetben az összes ábra angolul lett beillesztve, amit szerencsés lett volna magyarra fordítani. A betegek demográfiai adatai, a betegség jellemzői és esetleges gyógyszeres kezelési adatok (Crohn-betegekben) hiányoznak, és nem voltak elérhetők az eredeti publikációban sem, kérem ezek megadását (a vizsgált Crohn-betegek száma, tulajdonságai, betegség jellemzők (betegség lokalizáció, betegség viselkedés), valamint a vizsgált CRC száma, a betegek életkora, a daganat stádiuma hiányoztak).

Vizsgálataik során az LS-174-T CRC sejtvonal MHCI és ICAM1 receptor mintázata hasonlított a korábban limfoid sejteken és más tumoros sejtvonalakon leírt mintázathoz, továbbá IFN- γ hatásra megváltozott mind a receptorok expressziója, mind a mintázata - az MHCI-receptorok száma kétszeresére, míg az ICAM-1 receptorszám tízszeresére növekedett, továbbá az MHCI molekulák heteroasszociációja nőtt az ICAM-1-hez. Ezen hatás ICAM-1 siRNS alkalmazásával blokkolható volt. A fenti vizsgálatok alapját képezhetik új célzott molekuláris terápia területén folytatott kutatásoknak.

További eredményként kimutatta a szerző, hogy a CRC és Crohn-betegek nyirokcsomóiból származó CD4⁺ limfociták sejtfelszíni receptorai jelentős számbeli, illetve mintázatbeli különbséget mutattak a kontroll perifériás vér CD4⁺ limfocitáihoz képest. CRC betegek tumor drenáló nyirokcsomóiból származó CD4⁺ limfocitáin az MHCI, ICAM1, IL-15R α , az MHCII és az IL-2R α csökkenést mutatott, ezzel szemben Crohn-betegekben IL-15/2R α alegységek és CD44 és CD59 molekulák száma jelentősen emelkedett, és ezeknek a molekuláknak mintázata is különbözött a két csoportban, tumoros mintákban az MHCI-gyel való asszociáció csökkent, míg Crohn-betegekben erősebb volt.

Az értekezés harmadik részében a szerző egy, az intraoperatív tumor diagnosztikában potenciálisan alkalmazható új vizsgálómódszerről számol be. A szövetek tömegspektrometriás analízise során, az elektromos kés használata közben keletkező füstöt elvezetve, a lipid komponensek spektrális eltéréseinek elemzése teszi lehetővé a tumoros és tumormentes szövetek elkülönítését, mely segítséget jelent sebészeti beavatkozások közbeni teljes tumormentesség elérésében. A CRC, vastagbél adenoma, IBD és májmetasztázis, valamint tumormentes szövet tömegspektrometriás elemzésében során, egy orvosokból, informatikusokból és matematikusokból álló munkacsoporttal együttműködésben értékelte az adatokat, Kérdés, hogy a műtétek a klinikán történtek-e?

A gyors ionizáló vaporizációt felhasználó tömegspektrometria módszerével végzett intraoperatív szövetanalízis hatékonyságának elemzése során 81 betegből 864 spektrum eredményeit elemezve a módszer szenzitivitása 97,7%, míg specificitása 96,5%-nak bizonyult. A vizsgálómódszer a jövőben az intraoperatív végzett szövetdiagnosztika hasznos eszközévé válhat gyorsasága, valamint magas specificitás-és szenzitivitásértéke miatt.

Ez utóbbi fejezet az értekezés többi részéhez képest kevésbé részletesen került bemutatásra. A vizsgálat menete, betegadatok, az egyes tumorok stádiuma, kiterjedése, az IBD típusa, az IBD jellemzői, a betegség lokalizáció és betegség viselkedés hiányoznak. A beillesztett ábra nyelve szintén angol.

Az egyes fejezetek (pl. limfocita markerek illetve tömegspektrometriai vizsgálatok értékelése) megbeszélése helyenként igen rövid, így ennek gyakorlati haszna az értekezésből nem teljesen világos.

Az részletes bírálat során az alábbi kérdések merültek fel:

1. Tervezik-e a HNPPC/LS adatbázis szélesebb körű, esetleg országos szintű adatbázissá történő fejlesztését?

2. Összesen hány CRC/Crohn-betegtől, valamint kontroll betegtől történt mintavétel a CD4+ limfocitáinak sejtfelszíni receptoraink vizsgálata céljából?
3. Milyen volt a betegség fenotípusa (betegség lokalizáció, viselkedés, aktivitás, kezelés) azon Crohn-betegek körében, akiktől CD4+ limfociták vizsgálata céljából mintavétel történt? Ezen tulajdonságok befolyásolták-e a receptorszámot illetve a receptor mintázatot? Mi az eredmények gyakorlati haszna a jelölt szerint?
4. Crohn-betegek esetében kizárólag nyirokcsomóból történt mintavétel CD4+ limfociták vizsgálata céljából? Milyen volt a kontrollcsoport életkori megoszlása?
5. Milyen volt a daganat stádiuma, illetve a betegek életkora azon CRC betegek körében, akiktől CD4+ limfociták vizsgálata céljából mintavétel történt? A demográfiai jellemzők és tumor stádium befolyásolták-e az eredményeket, a receptorszámot illetve a receptor mintázatot?
6. Milyen volt a sporadikus illetve a családi halmozódást mutató CRC betegek aránya azon betegek körében, akiktől CD4+ limfocita vizsgálat céljából szérum-illetve nyirokcsomó mintavétel történt?
7. Az értekezés utolsó fejezetében leírt tömegspektrometriás tanulmány során a vizsgált daganatok milyen stádiumúak voltak? A vizsgálat IBD betegek közül hány Crohn-beteg és hány colitis ulcerosás beteg szerepelt és milyen betegségjellemzőkkel (betegséglokalizáció, betegség viselkedés) rendelkeztek?
8. A tömegspektrometriás vizsgálatban az intézetben végzett műtétekből származó szövetmintákat vizsgálatok?

A bíráló által elfogadott új megállapítások:

- HNPPC/LS adatbázis létrehozása fontos és segítséget nyújt a sporadikus illetve családi halmozódást mutató vastagbél tumorok elkülönítésében, valamint a nagyobb rizikóval rendelkező családtagok azonosításában és szűrésében

- LS betegekben 5, eddig ismeretlen génmutáció igazolása a MSH2 és MLH1 gének vizsgálata során

- LS-174-T CRC sejtvonal MHCI és ICAM1 receptor mintázata hasonlított a korábban limfoid sejteken és más tumoros sejtvonalakon leírt mintázathoz, továbbá IFN- γ hatásra megváltozott mind a receptorok expressziója, mind a mintázata. Ezen hatás ICAM-1 siRNS alkalmazásával blokkolható volt.

- CRC betegek tumor drenáló nyirokcsomóiból származó CD4+ limfocitáin az MHCI, ICAM1, IL-15R α , az MHCII és az IL-2R α csökkenést mutatott, ezzel ellentétben Crohn-betegekben IL-15/2R α alegységek és CD44 és CD59 molekulák száma jelentősen emelkedett, és a fenti molekulák mintázata is különbözött a két csoportban

- megerősítette, hogy a tömegspektrometria kiválasztott esetekben lehetséges és pontos intraoperatív szövethatározó módszer

Damjanovich doktor akadémiai doktori értekezése új ismeretekkel szolgált a vastagbél daganatok patogenezise, genetikája és progressziója területén. Az értekezés teljesítette a formális és szakmai igénypontokat. A nagydoktori dolgozat sikeres előadása, bírálatainak megválaszolása és eredményeinek megvédése esetén az akadémiai doktori cím odaítélését javaslom.

Tisztelettel: **Dr. Lakatos Péter László**

az MTA doktora

Levelezési cím: Semmelweis Egyetem

I. sz. Belgyógyászati Klinika

1083 Budapest

Korányi Sándor utca 2/A

e-mail: kislakpet99@gmail.com