

Opponensi vélemény

Dr. Damjanovich László “Klinikai és molekuláris vizsgálatok colon tumorok progressziója során” MTA doktori értekezéséről

A doktori értekezés formai szempontból esztétikus megjelenésben, teljes értekezésként megírt munka; terjedelme irodalomjegyzékkel együtt 86 oldal, mely a bíráló számára jól követhető olvasmány. Felépítése követi a szokványosan elfogadott rendszert: összesen 7 fejezet az értekezés érdemi része, mint bevezetés; célkitűzések; betegek és módszerek; eredmények és megbeszélés; összefoglalás; melyet az értekezés alapjául szolgáló közlemények és az értekezéshez felhasznált irodalmak jegyzéke zár.

A célkitűzések fejezet két részre tagolódik.

Az első a HNPCC/LS betegek vizsgálatával kapcsolatban a következők vizsgálatát tűzte ki célul:

- HNPCC/LP adatbázis létrehozása;
- kiszűrt betegek genetikai eltéréseinek vizsgálata;
- családfa és a genetikai eltérések elemzése;
- kiszűrt betegek és mutációt hordozó családtagjaiknak gondozásba vétele és genetikai tanácsadás.

A célkitűzés második része a colorectalis carcinoma (CRC) sejtvonal epithel sejtjeinek és a CRC betegek limfocitáinak plazma membrán vizsgálatát tűzte ki célul a következő vonatkozásokban:

- LS-174-T CRC sejtvonal plazma membránjának vizsgálata IFN- γ □ valamint ICAM-1 siRNS hatására az MHCI és ICAM1-re;
- CRC és Crohn betegek nyirokcsomóiban és perifériás vérében a CD4+ T limfociták plazma membrán összehasonlító vizsgálata;
- CRC betegek primer tumorának és máj metasztázisainak vizsgálata gyors vaporizációt felhasználó ionizációs tömegspektrometriával (REIMS).

A dolgozat első fele (I.) egy klinikai irányultságú rész, melyben a 2003-ban létrehozott HNPCC adatbázisban szereplő, CRC miatt műtéten átesett betegekben az IHC és MS vizsgálatának leírása történik meg. A vizsgálatok során 16 hordozó családot szűrtek ki, akik 12 különböző patogén mutációt hordoztak, melyből 5 *de novo* mutáció volt. Ezekből a családokból 8 került részletesebb bemutatásra. A genetikai vizsgálatok értékelése után az érintet családtagokat gondozásba vették, mely során több, malignus növekedési fázis előtt lévő vastagbél polip került eltávolításra. A genetikai eltérést nem mutató családtagoknak is felajánlották a nyomonkövetést.

A munka második, kísérletes fele (II.) a CRC sejtvonalat (LS-174-T) és betegekből származó CD4⁺ helper limfociták plazma membránját vizsgálta. A vizsgálatok során megállapították, hogy a LS-174-T sejtek esetében az INF- γ hatására az MHCI és ICAM-1 relációjában dinamikus átrendeződés megy végbe, mely ICAM-1 siRNS-el mennyiségileg befolyásolható. CRC és Crohn betegek nyirokcsomóiban illetve perifériás vérében a CD4⁺ T limfociták plazma membrán összehasonlító vizsgálata során arra a megállapításra jutottak, hogy a nyirokcsomókból származó CD4⁺ limfociták szám és mintázatbeli különbségeket mutatnak a kontrol alanyokhoz képest, emiatt célzott molekuláris terápia esetén nem minden esetben elegendő a target molekula megcélzása.

A CRC betegek primer tumorának és máj metasztázisainak REIMS vizsgálatai alapján a módszer a későbbiekben hasznosnak bizonyulhat az intraoperatív diagnosztika fejlődésének elősegítésében valamint plusz lehetőségként szolgálhat a daganat típusának és dignitásának eldöntésénél.

A dolgozat mindösszesen 16 eredeti publikációban közzétett közlemény anyagára épül. A közlemények közül a pályázó kettőben első, tízben utolsó szerző. A dolgozat összesen 23 egyszerű vagy összetett ábrát, illetve 1 táblázat-szerű leírást használ az „MLH1 és MSH2 gének szekvenálása” részben a primer szekvenciák ismertetése kapcsán. Az alkalmazott módszerek alkalmasan lettek megválasztva a vizsgálati célokhoz tekintetében. A módszerek leírása többségében elégséges, a ”valós idejű, in situ tömegspekrometriás mérések (REIMS)” leírása elnagyolt; bíráló ezen mérések eredményeinek ismertetését és interpretálását is hiányosnak ítéli meg.

A munka technikailag kiválóan szerkesztett, jelen bíráló elütést alig talált (kivételként, az ábrák számozásánál egy elcsúszás olvasható: a I.4-es számozás más ábrafelirattal kétszer került kiosztásra), ill. a pár oldal megadása a 6. oldalon hibás (pl. RNS interferencia, tömegspektrometria). Az érdemi részt illetően munkával kapcsolatban a kérdéseim a következők:

- 1., A vizsgálatait során a hagyományos Sanger technika jelentette a standard megközelítést mutációk igazolására. Mi a véleménye, adhat új információt az új generációs szekvenálás (WES vagy WGS) olyan esetekben, ahol az exonok dideoxi szekvenálása nem adott eredmény mozaikosság miatt? (ld. Yamaguchi J Hum Genet 2015;60:227. analógiaképpen)
- 2., CD4+ limfocita vizsgálatokba egyfajta kontrollként Crohn betegek sejtjeit is bevonták. Ez a rendszer elég intenzíven vizsgált molekuláris szinten is IBD-ben. A dolgozatban kiemel jelentős különbségeket, ezek lehetséges funkcionális jelentőségéről tudna további információt adni? Az utolsó citált irodalom 2013-as, talán az eltelt idő alatt további új összefüggés is megvilágításba kerülhetett?
- 3., A tömegspektrometria valóban ígéretes megközelítés lehet, akár egyfajta "systems biology" vagy "systems genomics" megközelítésnek is tekinthetjük a patológiás sejt szintű metabolikus történések karakterizálása terén. Történt-e próbálkozás a daganatos betegek további genetikai startifikálása után az egyes egymástól elkülöníthető molekuláris alcsoportok lehetséges vizsgálata vonatkozásában?

A pályázó eredeti megfigyeléseiként fogadom el:

- 1., HNPCC/LS betegekből addig nem ismert 5 új mutációt írt le.
- 2., Vizsgálta CRC sejtvonal (LS-174-T) és betegekből származó CD4+ helper limfociták membrán lipid kompozícióját az MHCI, MHCII, ICAM-I, IL-2/15 alfa és gamma alegységek, CD44s, CD59 vonatkozásában, melynek során addig nem ismert mintázatokat írt le. Ezek egy részét siRNA befolyásolta.
- 3., Próbálkozást tett daganat specifikus volatilis lipid profil kimutatására tömegspektrometriás megközelítésekkel.

A fentieket összegezve a pályázó doktori habitusa, valamint a benyújtott doktori mű és a doktori mű összefoglaló téziseiben összegzett elért eredményei alapján javaslom a nyilvános vita kitűzését, sikeres védelem esetén a fokozat odaítélését.

Pécs, 2016. február 12.



Dr. Melegh Béla
egyetemi tanár