



**Dr. Kiss András: „Tight junction alkotórészek és mikroRNS expresszió vizsgálata humán daganatokban, különös tekintettel a májdaganatokra” című MTA Doktora Pályázat bírálata.**

Az értekezés megfelel az MTA Doktora Pályázat formai és tartalmi követelményeinek. Tartalomjegyzék, rövidítések jegyzéke, bevezetés, célkitűzések, anyag és módszer, eredmények és megbeszélés, új megállapítások, saját közleményjegyzék és áttekintő adatai, köszönetnyilvánítás valamint irodalomjegyzék fejezetekre tagolódik, összesen 208 oldal terjedelmű. Az eredményeket kiváló minőségű ábrák, fényképfelvételek illusztrálják, az adatokat táblázatok foglalják össze. A független hivatkozások száma 1510, az összesített impakt faktor 192,9; ami igen impresszív.

Dr. Kiss András a magyar patológus-társadalom, ezen belül is a kutató-patológusok kiemelkedő alakja, nemzetközileg elismert máj kutató-patológus. Diagnosztikus és kutató munkáját a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai Intézetében kezdte, de a kiteljesedés és az eredmények döntő többségének publikálása a II. sz. Patológiai Intézetben történt. A legkorszerűbb metodikákkal végzett kísérletei, melyek eredményei döntően a jobb diagnosztikus munkát segítik elő, lehetővé teszik mind a máj, mind az urogenitális daganatok pathomechanizmusának jobb megismerését, és egyben segítséget nyújtanak a problémás esetek differenciáldiagnosztikájában. A claudinok és az őket szabályozó mikroRNS-ek vizsgálata rámutat a hozzájuk kapcsolódó jelút-rendszerek jelentőségére, valamint a claudinok CPE receptorain keresztül lehetőség nyílik célzott daganatellenes kezelésre, mind elméletileg mind a gyakorlatban. Dr. Kiss András a disszertációban 13 célkitűzést fogalmazott meg, melyek 3 nagy csoportra oszthatók:

- 1) Primer és áttéti hepato-pancreato-biliáris daganatok tight junction mintázatával
- 2) Urogenitális daganatok tight junction expressziós profiljával és
- 3) A hepatitis C, steatosis és HCC asszociált mikroRNS mintázattal kapcsolatos kérdésekre.

A disszertációban és a tézisekben szereplő tudományos eredmények eredetiek, hiteles adatokat tartalmaznak, alkalmasak a célkitűzések megválaszolására. A disszertációban tett új megállapításokat elfogadom.

**A nyilvános vita kitűzését és a disszertáció elfogadását javaslom.**

## **Részletes bírálólat**

### **Rövidítések jegyzéke**

Mind a CC, és a CCC rövidítés is a cholangiocarcinomára vonatkozik. A CCC rövidítés valójában cholangiocellularis carcinomát jelent, amit ma már nem használunk, ezért célszerűbb lett volna az egész disszertációban a CC rövidítést alkalmazni.

### **Anyag és módszer fejezet**

25 oldal; a pancreas endocrin tumorainál benignus, borderline és malignus daganatokat különböztet meg a jelölt, ami végigvonul az egész disszertáción. Mindez a régi nomenklatúrának felel meg, és bár az eredményeket egyáltalán nem befolyásolja, de helyesebb lett volna a neuroendocrin tumor grade I, II, és III-at használni, hiszen ma már tudjuk, hogy mindegyik neuroendocrin daganat potenciálisan malignus.

A 33. oldalon az immunreakciók kvantitatív elemzésének leírását találjuk, mely képanalízissel és szofver értékeléssel történik. Kérdéseim: Mennyiben találta jelölt szenzitívebbnek a képanalízist összehasonlítva a többnyire szokványos „szemi-kvantitatív” elemzéssel (szabad szem és scoring- rendszer)? Volt-e olyan eset, amikor nehezen volt hihető a szoftveres elemzés eredménye összevetve a szabad szemmel történő vizsgálattal?

37. oldal; a referencia miR-ek közül az U6-al szemben a miR-140 bizonyult a legstabilabbnak. Irodalmi adatok szerint és saját tapasztalatunk is az, hogy az U6 igen megbízható referencia miR. Vajon mi lehetett az oka, hogy ezekben a vizsgálatokban az U6 nem volt elég stabil, illetve a miR-140-en kívül használt-e más referencia miR-t, valamint a normál máj mellett volt-e más normál referencia szövet?

38. oldal; a statisztikai feldolgozás részben, a homogenitás vizsgálata után jöttek a különböző próbák és tesztek, de előtte még normalitás vizsgálat is szükséges. Megtörténtek ezek a normalitás vizsgálatok?

### **Eredmények**

40. oldal; a 10. ábra ábraalírásában jelzett nyilak nem láthatók.

66. oldal; jelölt a második sorban azt írja, hogy „az immunhisztokémiai vizsgálat eredményeit az 1. táblázatban foglaltuk össze”, ami valójában a 12. táblázat.

81. oldal; Tricellulin pozitivitás sem a normál endocrin pancreasban, sem a pancreas neurendocrin tumoraiban sem volt. Ezen eredmény újnak számít, sok tekintetben teljesen logikus, ugyanakkor a tricellulin definícióját tekintve nehezen elképzelhető, hogy az endokrin sejtek csak kettesével találkoznának és nincs hármass sejtkapcsolat. Nem lett volna-e érdemes a normál pancreas vizsgálata során laser-capture microdiszsekción végezni és úgy határozni meg a Langerhans szigetecik tricellulin mRNS-ét?

91. oldal; a 69. ábrán a tricellulin molsúlyát figyelembe véve a 60 és 50 kDa-os csíkok érthetőek, de mi lehet a 80 kDa-os csík?

97. oldal; a 75. ábra b, c és d képeihez tartozó ábraalírás nem stimmel, mert az ábraalírással szemben a HSA valamint a claudin1 és 2, nem pozitív mind a két komponensben (fetalis, embryonalis).

99. oldal; a beta catenin mutációjának vizsgálata során négy esetből (melyek magi pozitivitást is mutattak) csupán egyben sikerült igazolni mutációt, mely pontmutáció volt. A másik 3 eset nem mutatott eltérést, de kérdésem, hogy nagyobb deléciókat, esetleg teljes exonkiesést vizsgáltak-e más módszerrel mint a Sanger szekvenálás, pl. MLPA-val?

118-119. oldal; a mindennapi gyakorlatban használt CK20-at és Ki67-et a jelölt ugyan olyan jól használhatónak találta az urotheliális papilloma, a PUNLMP, az invertált papilloma illetve a low grade urothelialis carcinoma elkülönítésében mint a claudin 1-et. Érdemes-e mégis használni a claudin 1-et, jelent-e valami plusz információt a mindennapi diagnosztikában?

124-127. oldal; jelölt igazolja a claudinok differenciált expresszióját a különböző dysplasiák és az in situ carcinoma tekintetében. Kérdésem, hogy a claudinok szenzitivitása hasonló-e a manapság használatos P16 érzékenységéhez, illetve képes-e különbséget tenni a gyulladós „atypia” és a valódi atypia között, ahogy ezt a p16 teszi (block pozitivitás)?

145. oldal; a hepatoblastomák microRNS vizsgálata során a magas miR-21 és az alacsony miR-222, 224 expresszió szignifikánsan hosszabb túléléssel társult (függetlenül az epithelialis komponens típusától). Ugyanakkor jelölt csak tisztán epithelialis típusú hepatoblastomákat vizsgált. Minthogy feltételezhető, hogy a kevert epithelialis és mesenchymalis (MEM) típusban is az epithelialis komponens határozza meg a prognózist, és hogy a MEM mintegy 45%-ot reprezentál, nem lett volna-e érdemes néhány kevert mesenchymalis epithelialis hepatoblastomát is megvizsgálni?

184. oldal; az 5-ös pontban ezt a megállapítást találjuk: „A pancreas exocrin ductalis adenocarcinomák és a cholangiocarcinomák tricellulin expressziója a daganatok differenciáltságával együtt csökken”. Minthogy az eredmények alapján egyértelműen dedifferenciációról van szó (magasabb grade), szerencsésebb lenne így fogalmazni: A pancreas exocrin ductalis adenocarcinomák és a cholangiocarcinomák tricellulin expressziója a daganatok dedifferenciálódásával együtt csökken.

**Összefoglalva:** Az értekezésben dr. Kiss András igen alapos és számos korszerű metodikát felmutató vizsgálatot végzett a tight junction alkotórészek és a hozzájuk kapcsolódó mikroRNS-ek tekintetében. A vizsgálat fő iránya a különböző májelváltozások/tumorok és az urogenitális daganatok voltak, de az eredményeket figyelembe véve ezen munka továbbvihető szinte bármely egyéb területre. Az új megállapítások igen értékesek, további kutatásokhoz felhasználhatók, és a mindennapi rutin diagnosztikában alkalmazhatók. Mindegyik új megállapítást elfogadom, kiemelve megítélésem szerint a legjelentősebbeket:

1. A cirrhotikus átalakulás a normál májhoz képest a claudin-1 és -7 szint emelkedésével jár. Az emelkedett claudin-1 fehérje, mint a HCV egyik sejtfelszíni receptorának fokozott expressziója elősegítheti a vírus eredményesebb behatolását a májsejtekbe, fokozhatja a reinfekciót és egyben hozzájárulhat a malignus transzformációhoz.

2. Elsőként mutatták ki, hogy a humán epeúrendszer különböző szakaszaiból származó biliáris epitheliumban és ezen lokalizációjú cholangiocarcinomákban a claudin-4 erősen expresszálódik, viszont ezzel ellentétben a hepatocelluláris carcinoma nem mutat claudin-4

expressziót. Ezen eredmények alapján a claudin-4 immunhisztokémiai kimutatása alkalmas új diagnosztikai eszköz lehet a máj primer daganatain belül az epeúti rendszer carcinomáinak és a hepatocelluláris carcinomának az elkülönítésére.

3. A tricellulint a normál exocrin pancreas, a hepatocyták és az epeúti sejtek termelik, azonban az endocrin pancreas Langerhans szigetének sejtjei nem expresszálják. A pancreas exocrin ductalis adenocarcinomák és a cholangiocarcinomák tricellulin expressziója a daganatok dedifferenciálódásával együtt csökken.

4. A tricellulin eltérő kifejeződését a fetális és embryonális hepatoblastoma altípusban elsőként mutatták ki. Elsőként detektálták, hogy a tricellulint magas mértékben termelő hepatoblastoma esetek szignifikánsan jobb teljes túlélést mutatnak az alacsony expresszióval rendelkező tumorokhoz képest, mely megállapításnak így prediktív jelentősége lehet.

5. Az epitheliális hepatoblastomában a szubtypustól függetlenül a magas miR-21 vagy az alacsony miR-222 és miR-224 expresszió a betegek szignifikánsan hosszabb teljes túlélésével asszociált.

6. A krónikus hepatitis C, a krónikus HCV-asszociált steatosis, és a metabolikus eredetű steatosis mikroRNS expressziós mintázata jellegzetes különbségeket mutat és eltér a normál májban találtaktól. A krónikus hepatitis C talaján és egyéb metabolikus okok miatt kialakuló steatosis nem mutatott lényeges eltérést a mikroRNS expresszióban, ami arra utal, hogy a normál májhoz képest talált miR expressziós változások egy, a steatosis miatt alapvetően megváltozott biológiai helyzetet tükröznek.

7. A sorafenib kezelt HCC-s betegek esetében a kezelés előtt vett tumormintában kimutatott magas miR-224 expresszió szignifikánsan jobb tünetmentes és teljes túléléssel társul, így a kezelés előtt vett tumorminta mikroRNS expressziós profiljának meghatározása a sorafenib kezelt HCC-s betegek predikcióját javíthatja.

8. A PUNLMP (Papillary Urinary Neoplasia of Low Malignant Potential) húgyhúlyag tumorok esetében az alacsony claudin-1 fehérje expresszióval rendelkező daganatokat rövidebb kiújulás mentes túlélés jellemzi a magas claudin-1 expresszióval rendelkezőkhöz viszonyítva, míg a húgyhólyag LG-UCC-ben a magas claudin-4 expresszió rövidebb kiújulás mentes túléléssel társul az alacsony claudin-4 expresszióval rendelkező tumorokhoz képest. Az invertált papillomákat jellemző szignifikánsan nagyobb claudin-1 expresszió segíthet ezen patológiai entitásnak a klasszikus papillomáktól, PUNLMP-ktől és a nem invazív LG-UCC-ktől való elkülönítésében.

**A nyilvános vita kitűzését és a disszertáció elfogadását javaslom.**

Dr. Sápi Zoltán  
egyetemi tanár, az MTA doktora

Budapest, 2016. február 16.