

Semmelweis Egyetem, Budapest
Általános Orvostudományi Kar
II. sz. Pathológiai Intézet



Semmelweis University, Budapest
Faculty of Medicine
IInd Department of Pathology

Prof. Dr. Tímár József
egyetemi tanár, igazgató

Jozsef Tímár, M.D., Ph.D., D.Sc.
Professor, Chairperson

Budapest, Üllői út 93., H-1091 HUNGARY – Tel.: (36) 1 215-7300/3430, tel/fax: (36) 1 215-6921
e-mail: jtimar@korb2.sote.hu

Tisztelt Sági Professor Úr!

Hálasan köszönöm Sági Professor Úrnak, hogy elvállalta disszertációm bírálatát és külön köszönöm a részletes bírálatot és az összességében pozitív véleményt.

Megjegyzések, kérdések és a rájuk adott válaszok:

1. *„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.”*

A megjegyzés teljesen megalapozott, ma már valóban a cholangiocarcinoma a használt terminológia és ennek a CC rövidítés felel meg jobban. A régebben megjelent cikkeknel a CCC rövidítést használtuk és mivel az eredmények fejezetben többször ennél a rövidítésnél maradtam, mivel az eredeti közleményekben ez lett használva, de valóban helyesebb lett volna egységesen CC-ként rövidíteni.

2. *„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 megjegyzés ismét megalapozott, mivel az új klasszifikáció szerint a grade-eket kell használni, mely egyben a daganatok prognózisára is nyújt felvilágosítást (*The ENETS and AJCC/UICC TNM classifications of the neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: a statement, Klöppel G, Rindi G, Perren A, Komminoth P, Klimstra DS. Virchows Arch. 2010 Jun;456(6):595-7.; Pancreatic endocrine tumors: improved TNM staging and histopathological grading permit a clinically efficient prognostic stratification of patients, Scarpa A, Mod Pathol. 2010 Jun;23(6):824-33., Prognostic validity of a novel American Joint Committee on Cancer Staging Classification for pancreatic*

Semmelweis Egyetem, Budapest
Általános Orvostudományi Kar
II. sz. Patológiai Intézet



Semmelweis University, Budapest
Faculty of Medicine
IInd Department of Pathology

Prof. Dr. Tímár József
egyetemi tanár, igazgató

Jozsef Tímár, M.D., Ph.D., D.Sc.
Professor, Chairperson

Budapest, Üllői út 93., H-1091 HUNGARY – Tel.: (36) 1 215-7300/3430, tel/fax: (36) 1 215-6921
e-mail: jtimar@korb2.sote.hu

neuroendocrine tumors. Strosberg JR, J Clin Oncol. 2011 Aug 1;29(22):3044-9.). A publikáció idején az angol nyelvű cikk beküldésekor még a régi nomenklatura volt használatban, eszerint lettek csoportosítva az anyagok, illetve az eredmények, melyet a publikáció bírálói sem kifogásoltak. A disszertációban érdeemes lett volna egy mondatban tisztázni ezt a nomenklaturák közti változást, mely azonban az eredmények érdemi részét nem érintette, de az eredmények árnyaltabb és pontosabb interpretációját tette volna lehetővé.

3. *„A 33. oldalon az immunreakciók kvantitatív elemzésének leírását találjuk, mely képanalízissel és szoftver 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?”*

A gyakorló pathologus számára a jelenlegi morfometriai szoftverek és képi információval való feltöltésük, illetve a beállítási paraméterek standardizálása túlzottan időigényes folyamat. A szemikvantitatív kiértékelés viszont magában hordozza nagyobb arányú tévedés lehetőségét, mindazonáltal a vizsgálandó terület kijelölése, illetve a látóterek kiválasztása még ha random módon történik is hordoz magában szubjektivitást. A konkrét mérés maga viszont nem mutat szubjektív elemeket. Olyan eset nem volt, ahol az egyik módszer önmagában nem lett volna alkalmazható, azonban szempont volt, hogy a nekrotikus, illetve bevérzett területek ne kerüljenek elemzésre. A tudományos megközelítés megbízhatóbbnak fogadja el általában a morfometriai eredményeket, ugyanakkor egyes eredmények rutinban való alkalmazhatóságát jobban elfogadják, ha szemikvantitatív módszeren alapul a kiértékelés. Ha mód nyílt rá, mindkét kiértékelést bemutattuk és az eredményeink szerint mindkét módszerrel ugyanarra a következtetésre jutottunk.



-
4. „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?”

A mikroRNS-ek (miR) expresszióját különböző betegcsoportokban, mintacsoportokban vizsgálva a minták úgy válnak összehasonlíthatóvá, ha van egy „housekeeping” jellegű miR vagy kis méretű RNS, melynek expresszióját a legnagyobb mértékben állandónak gondoljuk. A miR-k sejt, szövet szinten is specifikus, mennyiségi és minőségi összetétel szempontjából is egyedi mintázatot mutatnak. A máj vizsgálata során érdemes a májban leírt referencia miR-t választani. Az U6 több nemzetközi publikációban is szerepel, mint referencia miR. Ahhoz azonban, hogy egy adott vizsgálatban valóban elfogadható-e referenciaként, célszerű vizsgálni, hogy a expressziója a minták összességét tekintve valóban a legkisebb standard eltérést vagy standard hibát mutatja-e? A különböző projektjeink esetében nem ez volt a helyzet. A miR expresszió tanulmányozásakor a NormFinder (Andersen C.L. et al.: *Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Res 2004 ;64:5245-5250.*) applikációt alkalmaztuk a stabil referencia megállapításához. A hepatocelluláris carcinomában szenvedő betegek Sorafenib kezelésének tanulmányozása során, valamint a hepatoblastomás betegek vizsgálatánál is a miR-140 bizonyult a legstabilabb expressziójú miR-nek. A nemzetközi irodalomban is közöltek már vizsgálatokat ezzel a referenciával, ahol HCV talaján kialakult HCC-s mintákon alkalmazták (Varnholt H. et al.: *MicroRNAGene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. Hepatology, 2008, 47:1223–1232*). Ezekben a vizsgálatokban normál kenetet, illetve májszövetet nem használtunk kontrollként, mivel elsődlegesen az onkológiai kezelés hatását vizsgáltuk. A transzplantált májokban a HCV rekurrencia kapcsán és a steatosis vizsgálata során alkalmaztunk normál májszövet kontrollokat, a beültetett máj beültetéskor vett kiindulási biopsziás mintáit bevonva a vizsgálatba. A HCV rekurrencia és kezelés kapcsán sem az U6 bizonyult a legstabilabb expressziójú RNS-nek, hanem a miR-23a és miR-34a átlaga volt a legjobb referencia, míg a HCV hepatitisben a steatosis tanulmányozásakor a mintacsoportokban a miR-96 és a miR-125b átlagát találta a

Semmelweis Egyetem, Budapest
Általános Orvostudományi Kar
II. sz. Patológiai Intézet



Semmelweis University, Budapest
Faculty of Medicine
IInd Department of Pathology

Prof. Dr. Tímár József
egyetemi tanár, igazgató

Jozsef Tímár, M.D., Ph.D., D.Sc.
Professor, Chairperson

Budapest, Üllői út 93., H-1091 HUNGARY – Tel.: (36) 1 215-7300/3430, tel/fax: (36) 1 215-6921
e-mail: jtimar@korb2.sote.hu

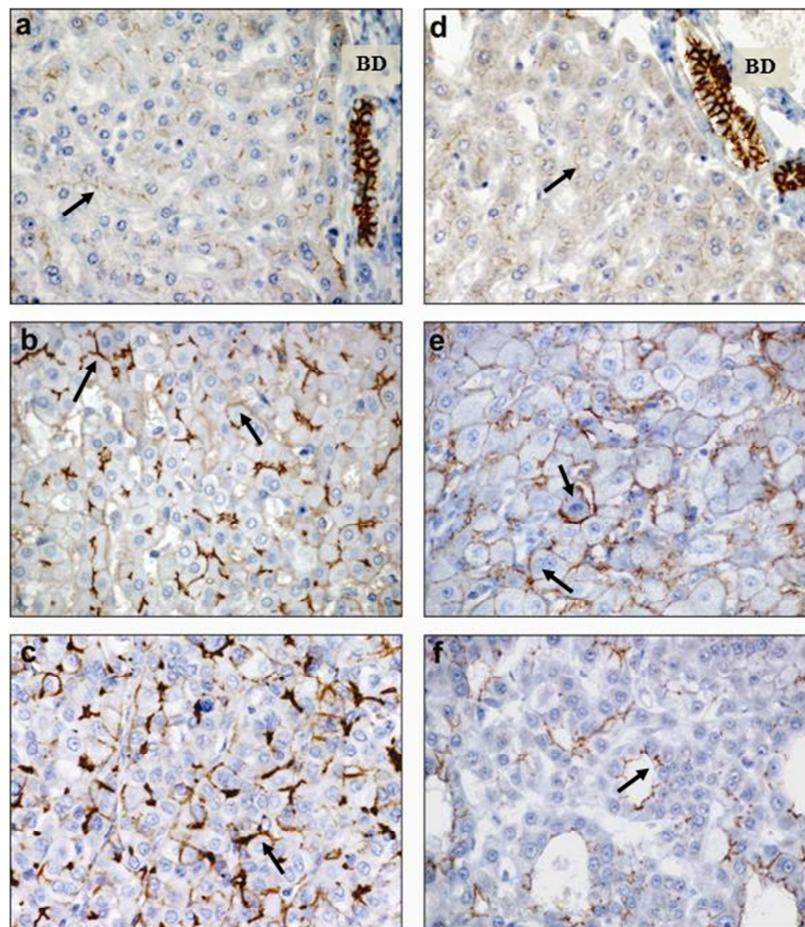
legstabilabb referenciának a NormFinder alkalmazás. Ezen miR-k eredetileg vizsgálandó célpontok lettek volna. A jelenségre egyértelmű magyarázatot nem adható, oka feltételezhetően több tényező: szöveti faktorok éppúgy szerepet játszhatnak benne, mint a relatív expresszió számolási algoritmusok bizonytalansága. Az irodalom szerint számos vizsgálatban az U6 alkalmas referencia volt, de ezt minden projekt esetében egyedileg kell megvizsgálni. Az U6 kis méretű magi RNS. Éppen ezért a megítélése, mint referencia RNS ellentmondásos, mert nem „igazi” miR, génexpressziós szabályozó szerepe a többi miR-hez képest nincs. Az alábbi cikkben sem javasolják, de természetesen sok egyéb közleményben alkalmazták és adott esetben megfelelő lehet. (*Peltier HJ, Latham GJ.: Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. RNA. 2008 May;14(5):844-52.*)

5. „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?”

Igen, ezeket minden esetben elvégeztük, hogy a vizsgált csoportok normál eloszlást mutattak-e és amennyiben nem, akkor az ennek megfelelő statisztikai tesztet végeztük el. Így ha az adatokban normál eloszlás volt tapasztalható, akkor T-tesztet és ANOVA-t végeztünk, míg ha az adatok nem mutattak normál megoszlást, akkor Mann-Whitney U-tesztet, illetve Kruskal-Wallis H-tesztet alkalmaztunk.

6. „40. oldal; a 10. ábra ábra aláírásában jelzett nyilak nem láthatók.”

Elnézést kérek, a nyomtatásban lemaradtak a nyilak, itt pótolom a nyíllal ellátott ábrát.



1. ábra Claudin-1 és claudin-7 fehérje expresszió detektálása immunhisztokémiai vizsgálattal normál májban, cirrhosisban és HCC-ben. a, claudin-1 reakció normál májban, d, claudin-7 normál májban: az epeutakban erős expresszió látható (BD), míg a hepatocyták gyenge festődést mutatnak (nyíl). Nagyítás: 600x. b: claudin-1 expresszió cirrhosisban; e, claudin-7 reakció cirrhosisban: a cirrhotikus nodulusokban a hepatocyták helyenként erős reakciót mutatnak, mely egyes májsejtekben a basolaterális felszín felé is kiterjed (nyilak). c, claudin-1 festődés cirrhotikus májban kialakult HCC-ben. A tumorsejtek claudin-1 expressziója a cirrhotikus nodulusok májsejtjeinél is erősebb (nyíl). f, claudin-7 reakció cirrhotikus májban kialakult HCC-ben. A tumorsejtek claudin-7 expressziója a cirrhotikus nodulusok hepatocytáinál gyengébb, és főleg az alveolaris struktúrák apikális felszínére lokalizált (nyíl). Nagyítás: 600x.



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

Elnézést kérek az elütésért, a 12. helyett elírt 1.-táblázat elnevezés valóban a 12. táblázatra utal.

8. *„81. oldal; Tricellulin pozitivitás sem a normál endocrín pancreasban, sem a pancreas neurendocrín tumoraiban sem volt. Ezen eredmény újnak számít, sok tekintetben teljesen logikus, ugyanakkor a tricellulin definícióját tekintve nehezen elképzelhető, hogy az endocrín sejtek csak kettesével találkoznának és nincs hármasszoros sejtkapcsolat. Nem lett volna-e érdemes a normál pancreas vizsgálata során laser-capture microdiszsekcíót végezni és úgy határozni meg a Langerhans szigetek tricellulin mRNS-ét?”*

Sápi professzor úr felvetése teljesen megalapozott. A fibrolamelláris carcinoma projektben próbálkoztunk kis számú sejt laser capture microdiszsekcíójával, de Western blot analízishez nem volt elegendő mennyiségű izolálható fehérje. A Langerhans szigetek azonban méretüknél fogva alkalmasak lehetnek volna a lézer microdiszsekcíóra és Western blot analízisre, azonban mivel az immunhisztokémiai reakciók nem mutattak protein expressziót, ezért nem végeztük el a professzor úr által felvetett vizsgálatot, de a biztonság kedvéért érdemes lett volna kivitelezni. Az irodalmat átnézve nincs adat a tricellulin normál vagy daganatos pancreas endocrín szövetekben való expressziójára.

9. *„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?”*

A pancreas ductalis carcinomákban 64 kDa mérettartományban detektáltunk tricellulin elleni antitesttel reaktivitást adó fehérjét és ez a HCC-ben és CC-ben is kimutatható volt. Az egyes HCC-kben és a CC-ben megjelenő 80 kDa-s fehérje tricellulin splice variánsként való előfordulása is szóba jön, adott esetben heterodimerként való előfordulása is előfordulhat.



-
10. „97. oldal; a 75. ábra b, c és d képeihez tartozó ábraalírással szemben a HSA, valamint a claudin1 és 2, nem pozitív mind a két komponensben (fetalis, embryonalis).”

Elnézést kérek a 75. ábra aláírásában szereplő helytelen fogalmazásért, a szövegben helyesen szerepelt, hogy a „a CLDN-1 (75. ábra C.) és a CLDN-2 (75. ábra D.) reakciók a hepatoblastoma fetalis komponensében egyértelműen erősebb fehérje expressziót jeleztek a szórványos pozitivitástól eltekintve negatív embryonalis komponenshez képest.” A HSA reakció pedig valóban negatív volt az embryonális komponensben. A helyes ábraalírással a következő mondat lett volna: „A HSA (B) és a CLDN-1 (C) és -2 (D) immunhisztokémiai reakciók pozitivitást mutattak a fetalis sejtekben, azonban a HSA az embryonális sejtekben negatívnak bizonyult és a CLDN-1 és -2 is csak szórványos pozitivitást adott.”

11. „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?”

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) módszert az esetleges deléciók, exonkiesések kimutatására nem használtunk, csak Sanger szekvenálást alkalmaztunk a pontmutációk detektálására. Az irodalom szerint a magi és/vagy erős cytoplasma β -catenin immunhisztokémiai pozitívitas általában beta-catenin pontmutáció miatt tapasztalható (Tanaka Y. et al.: *Frequent beta-catenin mutation and cytoplasmic/nuclear accumulation in pancreatic solid-pseudopapillary neoplasm. Cancer Res. 2001 Dec 1;61(23):8401-4.*; Curia MC et al.: *Sporadic childhood hepatoblastomas show activation of beta-catenin, mismatch repair defects and p53 mutations. Mod Pathol. 2008 Jan;21(1):7-14.*), de egyéb a β -catenin ubiquitinációjában résztvevő fehérjék, így az axin, vagy APC mutációja is okozhatja (Gupta A. et al.: *Multifocal hepatic neoplasia in 3 children with APC gene mutation. Am J Surg Pathol. 2013 Jul;37(7):1058-66*). Emellett poszttranszlációs modifikáció is állhat a lassúbb lebontás hátterében. Újabb irodalmi adatok alapján új generációs szekvenálással még több wnt jelátviteli mutáció mutatható ki hepatoblastomában (Jia D et al.: *Exome sequencing of hepatoblastoma reveals novel mutations and cancer genes in the Wnt pathway and ubiquitin ligase complex. Hepatology. 2014 Nov;60(5):1686-96.*).



-
12. „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?”

A CK20 pozitivitás kevésbé tűnik megbízhatónak az egyes entitások elkülönítésében, bár a LG-UCC-ben a középső sejtrétegekben megjelenő dezorganizált festődés segítséget adhat. A claudin-1 basalis rétegekben való pozitivitása segíthet az invertált papillomák azonosításában. Ezen túlmenően a claudin-1 alacsony expressziója PUNLMP-ben szignifikánsan csökkent recidiva mentes túléléssel járt együtt. Ennek rutin pathológiában való felhasználása a módszer standardizálását igényelné. Ahogy a pathologia más területein is, a ki-67 proliferációs index emelkedése jelzi a rosszabb differenciációt, így a LG versus HG UCC között is (Törzsök P. és mtsai: *Claudins and ki-67: potential markers to differentiate low- and high-grade transitional cell carcinomas of the urinary bladder. J Histochem Cytochem. 2011 Nov;59(11):1022-30.*). Érdekes módon az alacsony versus magas ki-67 index nem jelezte a klinikai viselkedést LG-UCC-ben, azonban az alacsony claudin-4 expresszió hosszab recidiva mentes túléléssel járt együtt. Jelenleg a rutin diagnosztikában a ki-67 index meghatározása rfealitás, adott esetben a claudinok vizsgálata lokalizációjuknál fogva segíthet egyes entitások elkülönítésében, illetve nagyobb mintaszámon igazolva és standardizálva a módszert alkalmas lehet prognosztikai, illetve prediktív markerek.

13. „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)?”

Munkacsoportunk részt vett a közelmúltban egy nagy mintaszámon történő vizsgálatban és validálásban, melynek során a CINTEC-PLUS (kettős jelölés: p16^{ink4a} ciklindependens kinázinhibitor + Ki-67) teszt és a claudin-1/ki67 kettős immunhisztokémiai reakció összehasonlítása történt több mint 1300 liquid based keneten és az az eredmény született, hogy a claudin-1+Ki-67:Specificitása: 84,9 % , míg szenzitivitása:64,9 % volt, a CINtecPLUS: 79,9 %-os specificitásához és 68,5 %-s szenzitivitásához



képest. Összességében tehát az eddigi eredmények alapján a teszt egyenértékű a CINTEC-PLUS rendszerrel.

14. *„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?”*

Köszönöm Professzor úr javaslatát. Ritka tumorról lévén szó, bár nemzetközi vizsgálatok összevetésében is jelentős számú hepatoblastomát vizsgáltunk, de mivel így is relatív kevés számú (20 eset) áll rendelkezésre, ezért nem akartuk a statisztikai kiértékelhetőséget, illetve az eredmények interpretálhatóságát megzavarni. Azonban feltételezhetően a kevert típusokban is az epitheliális komponens a kulcsszereplő. Mikrodisszekcióval és nagyobb számú kevert esettel érdemes lenne a kérdést tovább vizsgálni.

15. *„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.”*

Köszönöm a megjegyzést, egyetérték Professzor úrral, hogy egyértelműbb lett volna ez a megfogalmazás.

Semmelweis Egyetem, Budapest
Általános Orvostudományi Kar
II. sz. Pathológiai Intézet



Semmelweis University, Budapest
Faculty of Medicine
IInd Department of Pathology

Prof. Dr. Tímár József
egyetemi tanár, igazgató

Jozsef Tímár, M.D., Ph.D., D.Sc.
Professor, Chairperson

Budapest, Üllői út 93., H-1091 HUNGARY – Tel.: (36) 1 215-7300/3430, tel/fax: (36) 1 215-6921
e-mail: jtimar@korb2.sote.hu

Még egyszer köszönöm Sági Professor Úr alapos bírálatát és kérem válaszaim elfogadását.

Tisztelettel:

Dr. Kiss András
egyetemi docens
Semmelweis Egyetem, II.sz. Pathológiai Intézet

Budapest, 2016 február 29.