

**Dr. Tóvári József: „A tumor környezetének hatása a daganatok progressiójára”**  
című MTA Doktori (DSc) értekezésének opponensi véleménye.

Készítette: Dr. Krenács Tibor, kutatóprofesszor, PhD, DSc

Tóvári József MTA Doktora pályázata a formai követelményekkel összhangban az értekezés témáját a tartalomjegyzékkel, rövidítésjegyzékkel és a scientometriai kiegészítésekkel együtt 162 oldalon tárgyalja. Az érdemi rész 29 oldal, a témához kapcsolódó korábbi eredményeket is bemutató bevezetésből; egy oldalon pontokba szedett célkitűzésekből, a módszerek lényegretörő 23 oldalas leírásából, az eredmények 35 oldalon keresztül történő bemutatásából, 20 oldalon át taglalt megbeszélés részből, egy oldalon összefoglalt következtetésekből, és 6 pontba szedett, a célkitűzésekkel összhangban álló új megfigyelések részből áll, amit 428 hivatkozást magában foglaló irodalomjegyzék, a saját közlemények jegyzéke és a scientometriai adatok táblázata támogat, majd a köszönetnyilvánítás zár le. Jelölt az MTA Doktori pályázat témájában és azok kívül is igen jelentős publikációs aktivitást mutat fel, munkáinak független idézettsége mára bizonyosan meghaladja a 2500-at.

A téma aktualitásához nem fér kétség, hiszen a daganatos áttétképzés a malignomák legjelentősebb halál oka, aminek nagyon komplex mechanizmusát mind a daganatsejt migráció, mind a mikrokörnyezettel folytatott interakciók és azok terápiás befolyásolási lehetőségei szempontjából tanulmányozza a jelölt. 2D és 3D rendszerekben vizsgálja a daganatsejt migrációt közvetítő acto-myosin és adhéziós pakkok szerveződését; *in vitro* tumorsejtvonalakkal, valamint *in vivo* állatkísérleti modellekben a heparinok és oligoszacharid heparinszármazékok potenciális migráció és áttétképző hatásait; a hipoxiás mikrokörnyezet tumorsejt migrációt és áttétképzést, ill. angiogenezist támogató hatását; a csontvelői endoteliális progenitorsejtek (EPC-k) megjelenését a keringésben, szerepét a tumor angiogenezisében és nemkissejtes tüdőrákos esetek (NSCLC) prognózisában; az exogén rHuEPO-kezelés kedvező hatását az endoteliális proliferációra, a tumorok vérellátására, kolóniaképző képességére, valamint a daganatok kemo- ill. radioterápiás válaszképességére; végül ugyancsak klinikai NSCLC-ben a komplementer rHuEPO-kezelés támogató hatását a kemo- ill. radioterápia hatékonyságára előrehaladott, III-IV-es stádiumú betegeknél, a daganatok endogén EPOR expressziójának függvényében.

A disszertációban összegzett kísérletes munkát az izraeli Weizmann, ill. a manchesteri Paterson Intézetből kollaborációs partnerek segítették, aminek eredményei széleskörű módszertani jártasságot tükröznek. A módszerek magukban foglalnak sejtenyészeten genotranszferációval végzett gén felülregulációs ill. géncsendesítési kísérleteket, enzimaktivitási, proliferációs, kolonizációs, apoptózis- és sejtdhéziós tesztek; az érképzésben, hipoxia-indukcióban és sejtdhézióban kulcsfontosságú molekulák kifejeződésének kvantitatív PCR tesztjeit, a sejtmigráció és a sejtvázrendszer időbeli változásainak vidoemikroszkópos tanulmányozását, a sejtmotilitást befolyásoló kezelések kapcsán áramlási citometriai, ELISA, Western blot, immunhisztó-/citokémia/-fluoreszcens és elektronmikroszkópos vizsgálatokat. Emellett a tumor áttétképzés dinamikáját is kiterjedten vizsgálta állatkísérletekben és humán klinikai mintákon is. A kísérletekből nyert adatokat megfelelő statisztikai módszerekkel analizálta. Dicséretes, hogy több esetben a kényelmesebb transzkriptum (mRNS) vizsgálatok mellett, az expressziós viszonyokat a sejtfunkciókat végző fehérjék szintjén is vizsgálta, hiszen ismerjük az epigenetikai, ill. a posztranszlációs szabályozás kritikus szerepét sejtfunkciók érvényesülésében. Ezt jól példázzák jelölt sejtmigrációs kísérleteinek Hif-1 $\alpha$  indukció kapcsán nyert ellentmondásos RhoA, Rac1, Cdc42 mRNS, ill. fehérje expressziós eredményei. *Felmerül a kérdés, hogy a jelölt szerint ilyenkor milyen epigenetikai szabályozási útvonalak aktiválódhatnak?*

Az értekezés logikusan felépített, a nagymennyiségű adat ellenére jól követhető, értelemzavaró fogalmazás, a ragozás egyeztetésének hibája, ill. elütések ritkán fordulnak elő benne. Sajnos a tézisek első mondata, ami disszertációban is ugyanígy előfordul ilyen: „A malignus betegségeket...a daganatsejtek szaporodása és a betegség előrehaladása elválaszthatatlan a tumorsejtek és azok környezetének kapcsolatai nélkül („kapcsolataitól”).

Ahol az angol szónak pontos magyar megfelelője is van, ott helyesebb azt használni. Pl. a fonetikus...”lézer-szkenning”... helyett a „lézer-pásztázó”-t mikroszkóp, vagy a „flow” citometria helyett az „áramlási” citometriát, vagy akár a scrambled” helyett a „hamis” kifejezést.

Fontos a korrelációk taglalásánál az irányultságot megadni, különösen, ha az negatív. Pl. „A keringő EPC-k kezelés előtti száma (negatívan) korrelál a kimenetellel”... Vagy ...”a hipoxiát független (negatív) prognosztikai faktorként írták le”...

Példa elütésekre, pontatlanságokra:

1. old. ...”alapvetőan”; 9. old. ...”aktinban gazdag”; 11. old....”többféle szöveti eredetű daganatok”...(daganat); 84. old. 41. ábraszöveg ...” daganatxenogratok”...; 99. old. ...”boilógiai”...; „PDGF/PDGFRR”...; „TGFβ/TbetaR”...; „TME: szöveti mikrokörnyezete” A „tumor” kimaradt.

Néhány formai és szakmai kritikai megjegyzés:

Előfordul, pl. a 25. oldalon, amikor a heparinokkal kezelt tumorsejtek áttétképző hatását mutatja be (1.5.1. alfejezet), ugyanígy a májkoloziációs eredményeknél a 13-16. ábráig a hozzájuk tartozó szöveget is ideértve, hogy nincs, vagy nincs időben hivatkozás, 1-1 ábrával alátámasztott korábbi eredmény bemutatásánál. Ugyanígy pl. a 4.2-es alfejezetnél bemutatja a 25. és 26. ábrákat hivatkozás nélkül, ezekről viszonylag részletesen beszél, majd csak ezután jön a 188-189-es hivatkozás, amik már nem is ezekre vonatkoznak.

Az ábrák jó minőségűek, bár pl. a 3. ábrán a keringő EPC-k fenotípusánál nem derül ki, hogy a „VE-kadherin” pozitív vagy negatív; a 17. ábrán a belső feliratok nagyon kisméretűek, alig olvashatók; a 27. ábrán az x-tengelyfelirat megtévesztő inkább anti-CD43v3, mint CD43v3; vagy az 54. ábrán a von Villebrandt faktor pozitív „roncsolt” ereket egészen nagy nagyítással is be kellett volna mutatni, hogy megítélhető legyen mit takar az erős pozitívítás. Ugyanakkor, pl. bravúrosak a Boyden-kamrás tumorsejtmigrációs kettős jelöléses, ill. elektronmikroszkópos kísérletek ábrái (19, 21. ill. 22.-es ábrák), ahol lépésről-lépésre lehet követni a sejtek ultrastrukturális változásait, ill. az aktin mint a migrációs erőt biztosító és a vinkulin, mint az adhéziót közvetítő molekulák mozgását és elrendeződését.

Érdemes lett volna a disszertáció elején jelezni, hogy bevezetőben bemutatott saját a témához kapcsolódó eredmények, pl. a PhD disszertációban már szerepeltek-e, vagy miért kerültek a bevezetőbe.

30. ábra. „A videomikroszkópiás mérésekben a hipoxia a normoxiás körülmények közt is mozgékonyabb sejtek további sebességnövekedését hozta” *Igaz ez a megállapítás, itt a C és D ábrán különbséget csak a melanománál látok, a fibrosarcománál nem?*

A 31. ábra szövegében csillaggal jelöli a szignifikanciát, de csillag egyik ábrán sem látszik, pedig a normoxiához képest melanoma és a fibrosarcoma sejtvonal expressziós szintjei egyértelműen szignifikánsnak tűnnek.

A módszerek: 1. Bár a vizsgálatok hosszú időre nyúlnak vissza, megjegyzendő, hogy biotint tartalmazó detektáló rendszerek korszerűtlenek. A biotin a karboxitranszferáz enzimek, mint pl. az acetyl-Coenzim-A kofaktora a széndioxid transzferben játszik szerepet, tehát ubiquiter a mitokondriumokban. Ezért aspecifikus szingálok okozhat, különösen natív, fagyasztott metszetekben.

2. Mi volt a magyarázata, hogy a ...” A Rho-t anti-Rho (-A, -B, -C; clone55, Millipore) antitesteket nagyon magas, 3 mg/ml koncentrációban használták Western blothoz. A legtöbb forgalmazott tömény antitest max. 1mg/ml koncentrációjú, amit általában Western blot alkalmazásokban akár 1:1000-es hígításban lehet használni? A többi antitestnél is magas 1mg/ml alkalmazási koncentrációt említ. Esetleg egyszerű elütésről van szó?

-A 35. ábrán a „scrambled”/hamis Hif gátlás shRNS-el, bár a különbség fennáll a hipoxiás, ill. normoxiás csoportok között, mégis csökkentette a metasztázisok számát mind normoxiában mind hipoxiában is. Mi lehet ennek az oka?

- A 40. ábrán valóban 3 nagyságrenddel nagyobb a relatív VEGF-A expresszió mértéke gazdaszervezetben (B) mint a daganatban (A)?

-A 9. táblázatban csak a HT-1080-as fibrosarcoma reagált erőteljesen a hipoxiára, vagyis szignifikánsan csökkent a sejtek mennyisége. Mi lehet a magyarázata, hogy a többi, epitheliális, ill. melanoma sejtvonal csak kisebb mértékben?

-55. ábra. Egy heterogén NSCLC-t is magában foglaló szövetből a kvantitatív RT-PCR mérések (de ugyanígy esetleg Western blot is) nagyban függ a mintavételtől („sampling”), a heterogén expressziós eredményeket ez is okozhatja. Hogyan történt a „makrodisszekciós” mintavétel, és van-e irodalmi adat arra, hogy ennyire szórhat-e a vizsgált molekulák a normál szöveti expressziója?

#### További kérdéseim:

1. A migrációs kísérleteknél felmerül a kérdés, hogy vajon, más szubsztráton csak a migráció sebessége változik, vagy egyes alapvető jellegek is módosulhatnak, akár 2D akár 3D modellben?
2. A magas EPOR expresszió klinikai daganatokban jobb túléléssel járt. Mi lehet ennek az oka, hiszen a tumorsejt potenciálisan kaphat túlélési jeleket ezeken keresztül EPO kezelés hatására.
3. Hogyan magyarázható, hogy elsősorban az LMWH gátolta mind tüdőben, mind májban a tumorkolonizációt az UHF-hez képes, az inváziós képességet mégis az UHF csökkentette jobban?
4. Hogyan hatott a kiegészítő rHuEPOa, vagy a kobalt klorid kezelés a SCID egerek életminőségére (súlyvesztés, kedélyállapot, mozgékonyosság, állatok elvesztése stb...), ill. végeztek-e túlélési vizsgálatokat ezekben a modelleken?
5. Az 5. táblázatban pro-angiogénként említi egymás mellett az MMP-eket és TIMP-eket, ahol utóbbi, előbbi antagonistája. Mi a magyarázat mégis közös pro-angiogenikus hatásukra?
6. Mik azok az ön által kutatott migrációs molekuláris mechanizmusok, melyek potenciális befolyásolhatók lehetnek terápiásan jelentősebb mellékhatások nélkül a tumor migráció és áttétképződés gátlására?

Az értekezés igényesen alkalmazott módszerek hiteles eredményeit foglalja össze, melyek között potenciálisan klinikailag is hasznosítható tudományos megfigyelések is vannak, melyekből újaknak az alábbiakat tekintem:

1. Kimutatták a HT1080 humán fibrosarcoma-sejtvonal migrációja *in vitro* inkább az epidermis sejtekre és nem a mesenchymális fibroblasztokra jellemző viselkedést mutat. Ez a GRE-moddellel írható le, amit az adhéziós pontok és az azokat összekötő, a mozgást biztosító aktinszálak dinamikája határoz meg. A kétdimenziós modell eredményeit 3D rendszerben is alátámasztották.
2. A heparinok gátolják humán melanómasejtek *in vitro* migrációját, függetlenül véralvadást gátló hatásuktól, *in vivo* kísérletekben pedig a tumor tüdőkolonizációját. Hasonló hatást tapasztaltak 4-20 tagú oligoszacharidokkal is, a daganatsejtek lecsökkent motilitása és kitapadása miatt.
3. A hipoxia eltérően befolyásolja az eltérő szöveti eredetű daganatsejtek migrációját és áttétképzését. Az alapvetően motilisabb sejtvonalak hipoxiában nagyobb *in vitro* mozgási aktivitást mutattak, ami *in vivo* is hatékonyabb áttétképzéssel jár.
4. Hipoxiára az angiogenezis is fokozódik, csontvelői őssejt eredetű endoteliális progenitorsejtek (EPC-k) beépülnek a daganatok érrendszerébe. Igazolták, hogy a perifériás vérben az EPC-k magasabb kiindulási mennyisége meghatározza a daganat prognózisát. Hatékony kezelésre NSCLC estekben az EPC-k száma csökken, de a rossz prognózisú esetekben a kezelés ellenére is megemelkedik.
5. Exogén rHuEPO-kezelés hatására fokozódik az intratumorális endothelsejtek proliferációja, ami nagyobb átmérőjű ereket és jobb terápiás szer perfúziót biztosít, és a hipoxia mérséklése miatt a sugárterápia hatását is kedvezően befolyásolja, fokozva a daganatsejtek *in vitro* apoptózisát és csökkentve azok kolóniaképző képességét *in vivo*.
6. A rHuEPO-kezelés nem jár rosszabb prógnózissal EPOR expressező kísérletes daganat modellekben. Az EPOR+ endotheliális sejtekkel ellentétben nem fokozta a daganatsejtek *in vitro* proliferációját, vagy

*in vivo* növekedését. III-IV. stádiumú tüdő-adenokarcinómás betegeknél igazolták, hogy éppen az alacsonyabb EPOR-expresszió társul rosszabb prognózissal.

Összegezve, Tóvári József értekezése értékes közleményekre épülő munka, melynek tudományos eredményeit megfelelőnek értékelem az MTA doktori cím elnyeréséhez. Ezek alapján javaslom az értekezés nyilvános vitára bocsátását és sikeres védelem esetén az MTA Doktora cím odaítélését.

Budapest, 2023. április 20.



Dr. Krenács Tibor  
MTA doktora