

**Bírálat Dr. Kiss István „Génexpressziók és allélpolimorfizmusok, mint a daganatmegelőzés molekuláris epidemiológiai biomarkerei” című MTA doktori értekezéséről**

A daganatos megbetegedések hazánkban a szív- és érrendszeri megbetegedésekből származó halálozások után a leggyakoribb haláloknak tekinthetők. Így nagy jelentőséggel bírnak azok a vizsgálatok, melyek célja a daganat megelőzéshez kapcsolható biomarkerek azonosítása. Ezt a törekvést jelentősen elősegítik az elmúlt évtized molekuláris biológiai eredményeinek epidemiológiai vizsgálatokba történő integrálása, a genetika és ma már egyre növekvő mértékben a genomika epidemiológiai vizsgálatokban történő széleskörű alkalmazása. Ebbe a törekvésbe kapcsolódott be évekkal ezelőtt Dr. Kiss István. Kutató munkájának eredményeit 2013-ban MTA doktora értekezésben foglalta össze „Génexpressziók és allélpolimorfizmusok, mint a daganatmegelőzés molekuláris epidemiológiai biomarkerei” címmel.

Az értekezés terjedelme 140 oldal, melyet az irodalomjegyzék után az értekezésben felhasznált, a PhD disszertációban nem szereplő publikációk listája követ. Formai szempontból megfelel az MTA doktori értekezés követelményeinek. Alapját összesen 15 nemzetközi és 12 hazai folyóiratban megjelent közlemény alkotja.

A bírálói feladatok megkönnyítése érdekében szívesen vettem volna a közlemények pdf formátumban mellékletként történő csatolását. Hasonlóan hiányoltam a közlő folyóiratok összesített impact faktorát és az eddigi, a dolgot megalapozó közleményekre történt független idézetek számát, melyek az értekezés alapját képező közleményekre az alábbi: IF: 16,058; független idézetek száma: 85. További scientometriai jellemzők az MTMT adatbázis szerint: összesített IF a teljes munkásságra vonatkozóan: 77,862, melyekre a független idézetek száma: 639.

Az értekezés 7 nagy fejezetből áll, összesen 50 ábrával és 17 táblázattal illusztrálva.

**Bevezetés (35 oldal):** a jelölt véleményem szerint túlzott részletességgel ír a különböző daganatos megbetegedések epidemiológiai helyzetéről, ezt a bevezetés fejezetben 10 ábrával illusztrálja. A fejezet részei: a dolgozatban később részletesebben vizsgált metabolizáló enzimek (kissé tankönyvszerű) részletes leírása, az *X-ray Repair Cross Complementing 1 (XRCC1)* DNS- hibajavító enzim, p53 tumorszuppresszor gén, a Mir 146-A mikro RNS, további kockázati tényezők és génexpressziós változások, mint biomarkerek jelentőségének/szerepének bemutatása.

*Megjegyzés:* az irodalmi hivatkozásokból hiányoltam a legújabb eredményeket bemutató közleményeket, irodalmi összefoglalásokat. *A Bevezetésben a p53 gén szerepének elemzése során a cervix daganatok rizikójával kapcsolatban a jelölt által említett irodalmak közül a legfrissebb 2009-ben jelent meg, hogyan módosultak a leírt állítások az elmúlt évek kutatásai alapján?*

**Célkitűzések** fejezetben: 3 fő célkitűzést fogalmaz meg a jelölt, melyek az alábbiak:

1. onko- és tumorszuppresszor gének, mint biomarkerek;
2. az általános populációban (az átlagos populáció helyett ez jobb megfogalmazás) olyan genetikai variánsok populációs szintű vizsgálata, melyek magas rizikójú csoportok azonosítására alkalmasak (kerülném az angol „high-risk” elnevezést);
3. az oláh cigányok daganatok iránti kockázatának elemzése.

A fő célkitűzéseket VIII részletesebben megfogalmazott alpont követ, melyek első IV pontja kísérletes állatmodellekre vonatkozó vizsgálatokat céloz meg (ez a fő célkitűzésekből nem derül ki).

**Kérdés:** Az I. pontban leírt génexpressziós változások vizsgálatához miért a c-myc és Ha-RAS onkogéneket választotta? Milyen más irodalmi adatok vannak a p53 gén expresszió emelkedésére kémiai karcinogén expozíciót követően?

A további alpontok kolorektális, fej-nyaki daganatok és cervix tumorok genetikai polimorfizmusainak vizsgálatával elemzi a daganatok kialakulásának kockázatát, a polimorfizmusok hatását a daganatok prognózisára. Az utolsó pontban a daganatok kialakulásának kockázatát foglalja össze a magyarországi roma népességben (egészen pontosan az oláh cigányok) és hasonlítja az átlagos magyar népesség allélmegoszlásaihoz.

A célkitűzéseket az **Anyag és módszer fejezet** követi, mely 14 oldal terjedelmű. A fejezetben szereplő „Vizsgálati elrendezés, betegek és kontrollcsoportok” bemutatása nehezen követhető, táblázatos formában történő összefoglalás ezt könnyebben áttekinthetővé tette volna.

**Az eredmények** fejezet terjedelme 48 oldal, a jelölt az Anyag és módszer fejezetben ismertetett betegcsoportokon elvégzett vizsgálatok eredményeit mutatja be. Az eredményeket 38 ábrán és 17 táblázatban foglalja össze.

I. Az állatkísérletes vizsgálatok során az 1-nitroporén kezelés hatását 3 gén (c-myc, Ha-Ras, p53) génexpressziójának megváltozására 7 szervben vizsgálta.

**Kérdés:** Az 1-nitropirén kezelést követően mi volt a kontroll a csontvelő mintánál, nincs rá utalás a szövegben és hiányzik az ábráról is ennek magyarázata.

Az MNU és DMBA kezeléseknél a génexpresszióra gyakorolt hatása a 17-23 ábrákon nehezen követhető, a szín választása nem szerencsés az egyes csoportokra vonatkozóan, mivel nem különülnek el szemléletesen a különböző kezeléseknél az ábrákon, a leírás alapján a kezelés hatásai nehezen követhetők. Az eredmények bemutatására szemléletesebb ábrázolási módot kellett volna alkalmazni, az eredeti közleményben valamivel jobban elkülönülnek a kezeléseknél és változások.

II. A fejezet következő része a humán fej-nyaki daganatokban meghatározott génexpresszió eredményeit foglalja össze. Az eredményeket bemutató ábrákról lemaradt a szignifikáns eltérések jelölése. *A 24-es és 25-ös ábra kontroll csoportjában mért génexpressziós értékek jelentősen eltérnek, mivel magyarázható ez? Mennyiben hasonlít ez a kontroll csoport a két évvel korábban alkalmazott kontrollcsoportéhoz?*

*Kérdésem, hogy mennyiben lehetünk biztosak abban, hogy a 2 évvel később mért génexpresszió változások valóban a kezeléseknél állnak fenn? A dolgozatban leírt 3 gén expressziójának eltéréseit mennyiben egészítik ki a microarray alapú génexpressziós vizsgálatok eredményei? A jelölt véleménye szerint a jelenlegi, globális génexpressziós vizsgálatok alapján, melyek lehetnek érzékeny biomarkerek az általa is vizsgált fej-nyaki daganatos betegeknél?*

III. A következő, az eredmények legterjedelmesebb fejezetében fej-nyaki-, kolorektális-, méhnyak daganatokra vonatkozó allélpolimorfizmusok eredményeit foglalja össze a szerző

két génre, a CYP1A1, UGT1A1 génekre, kissé redundáns formában. Eredményei szerint a kettős magas-rizikójú genotípus szignifikánsan nagyobb a daganatos betegeknél, mely azt jelenti, hogy a két gén együttes allélpolimorfizmusa hatással van a daganatok kialakulására. A szerző megállapítása szerint ugyanezek az allélpolimorfizmusok prognosztikus jelentőséggel is bírnak, hatásuk érvényesül a betegek túlélésére is.

IV. A vizsgálatok további részében a pre-miR-146a mikro RNS allélmegoszlásait elemezte a jelölt fej-nyaki daganatokra. Igazolta, hogy a mikro RNS rs2910164 polimorfizmus C allél statisztikailag szignifikáns kockázatonövelő hatással van fej-nyaki laphámrákok kialakulására.

**Megjegyzés:** Egyes szerzők szerint a pre-miR-146a rs2910164 polimorfizmus inkább rendelhető a daganat progresszióhoz szájüregi és fej-nyaki daganatokban, mint kialakulásukhoz és más mikro-RNS –ek polimorfizmusai azok, amelyek a kockázatot növelik a HNSSC-re vonatkozóan (Liu Z, Li G, Wei S, Niu J, El-Naggar AK, Sturgis EM, Wei Q. Genetic variants in selected pre-microRNA genes and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 2010 Oct 15;116(20):4753-60.).

**Kérdés:** Mennyiben összevethető eredményei azokkal az adatokkal, melyek 2012-ben jelentek meg „*Impacts of microRNA gene polymorphisms on the susceptibility of environmental factors leading to carcinogenesis in oral cancer*”, figyelembevéve, hogy a környezeti tényezők nagymértékben azonosak a szájüregi- és fej-nyaki daganatok esetén (Y. H. Chu, S. L. Tzeng, C. W. Lin, M. H. Chien, M. K. Chitors leading to carcinogenesis in oral cancer,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 6, ArticleIDe39777, 2012.)

V. Egy újabb vizsgálati csoporton fej-nyaki tumorokon egyrészt az XRCC1 polimorfizmusok daganatos kockázatra gyakorolt hatását, továbbá prognosztikai szerepét vizsgálták. Megállapították, hogy az arg399Gln polimorfizmus statisztikailag szignifikáns hatással fokozza a betegség iránti fogékonyságot a legtöbb genotípus esetén. Véleményem szerint a fejezetben bemutatott több mint 10 túlélési görbe felesleges, ha nincs szignifikáns különbség, a szöveges összefoglalást jobban lehetett volna követni.

**Kérdés:** Miért nem lehetett ugyanannak a betegcsoportnak a mintáin vizsgálni ezeknek a polimorfizmusoknak a hatását, mint a CYP1A1 és UGT1A1 génekét?

Módosítják-e megfigyeléseiket a 2013-ban megjelent meta-analízis alapján elért eredmények, mely analízisben az arg399Gln polimorfizmusát több, mint 1 000 mintán elemezték? (Chen W. et al: Association of XRCC1 genetic polymorphism (Arg399Gln) with laryngeal cancer: a meta-analysis based on 4,031 subjects. *Tumour Biol*. 2013 Nov 6.)

VI. Kolorektális daganatokban a GSTM1, GSTT1 és p53 gének allélmegoszlásait vizsgálva szignifikáns különbséget talált a kontroll és a betegcsoport között a GSTM1 génre és megállapította, hogy a p53 gén Pro-heterozigoták aránya szignifikánsan magasabb a daganatos betegeknél. Ezt követően ismételt Kaplan-Meier görbék sorozatán mutatja be a jelölt a különböző genotípusokhoz tartozó kolorektális daganatos betegek túlélését, ismételt nehezen követhető formában.

VII. A következő két vizsgálati csoportban, ugyancsak kolorektális betegcsoporton, 7 gén allélpolimorfizmusának hatásait és három CYP gén (1A1, 1A2, 2E1) és az EPHX1 enzimek polimorfizmusainak hatásait elemezte, közülük a GSTM1, GSTT1 és p53 gének az előző, fej-nyaki daganatos betegcsoportban is szerepeltek. Statisztikai elemzése alapján megállapította,

hogy a GSTM1, NAT2, p53 és XRCC1 polimorfizmusok fokozzák a kolorektális daganatok iránti kockázatot.

VIII. Bizonyítottan magas kockázatú HPV - típusal fertőzött nők nyomon követésével vizsgálta, hogy a GSTM1 és T1 allélpolimorfizmusok hogyan befolyásolják a vírus indukálta karcinogenezist. Megállapította, hogy a 0 genotípusú nőkben a kockázat fokozottan érvényesül. Egy külön cervix daganatos betegcsoporton a DRD2/ANKK1 polimorfizmusokat vizsgálva feltételezi, hogy a DRD2/ANKK1 A1 allélt hordozók cervix-daganat prognózisa rosszabb.

IX. Az eredmények utolsó fejezete ismerteti azokat az eredményeket, melyek a Magyar Epidemiológia folyóiratban jelentek meg 2004-ben. Vizsgálataikban a magyarországi roma populációra (oláh cigány) és nem roma népességre vonatkozóan 5 gén (CYP1A1, GSTM1, GSTT1, NAT2, XRCC1, p53 és pre-miR-176a) allél megoszlását elemezte. Megállapította, hogy a daganatos megbetegedéseknél látott halálozási különbségek okai nem genetikai tényezőkben keresendők.

Ugyanakkor 104. oldalon az szerepel, hogy „*A p53 allélmegoszlások tekintetében hatalmas különbséget látunk az indiai és a hazai nem roma csoportok között. ... Ha potenciális daganatos kockázat szempontjából csoportosítjuk ezeket az eltéréseket, akkor a p53 esetén a roma allél megoszlások a kockázat emelkedés, a GSTM1 tekintetében pedig a rizikócsökkenés irányába mutatnak*”.

A megbeszélés fejezetben arra utal a jelölt, hogy olyan allélpolimorfizmusokat választottak, melyek irodalmi adatok alapján egyes daganatok kockázatát befolyásolják: innen hiányoltam az irodalmi hivatkozásokat az értekezésben vizsgált polimorfizmusokra vonatkozóan.

A doktori értekezésben bemutatott a roma népesség allélpolimorfizmusainak a magyar általános populációtól való eltérése a p53 és GSTM1 génekre vonatkozó eredmények 2004-ben jelentek meg a Magyar Epidemiológia folyóiratban. **Kérdésem**, hogy milyen újabb eredmények állnak rendelkezésre a roma népesség betegségek iránti fogékonyságát jellemző polimorfizmusok elemzésére vonatkozóan (hazai és nemzetközi adatok).

A **Megbeszélés** fejezet a bevezetés után az egyik legterjedelmesebb fejezet (22 oldal), melyben a szerző két nagy eredménycsoportot elemez.

Génexpresszió változásokkal kapcsolatos állatkísérletek eredményei  
A genetikai polimorfizmusokra vonatkozó vizsgálatok

A fejezetben az eredmények összefoglalása az irodalmi adatok tükrében történik, jól követhető olvasmányos formában.

A fejezethez kapcsolódó kérdéseimet részben már feltettem a bíráló előző részeiben.

**További kérdések, melyek az előzőeken kívül felmerültek az alábbiak:**

*Melyek azok a legfontosabb mechanizmusok, amelyek tisztázása sürgető az állatkísérletek alapján kapott eredmények verifikálásához?*

*Milyen adatok vannak az irodalomban arra vonatkozóan, hogy a daganatos halálozásért egyéni érzékenység jellegű genetikai tényezők tehetők felelőssé?*

*Az utóbbi időben bevezetésre került genom szintű asszociációs vizsgálatok, melyek nemcsak egyedi gének, vagy néhány génpolimorfizmus szerepét vizsgálják, milyen eredményeket szolgáltattak a tézisekben szereplő betegségekre vonatkozóan?*

*Az allélpolimorfizmusok vizsgálatánál mennyire tekinthető reprezentatívnak a hazai roma és nem roma népesség mintapopulációja? Ezt azért kérdezem, mert az 55. oldalon ez van megnevezve az allél megoszlások összehasonlításának céljaként.*

És végül a dolgozat utolsó részében, külön fejezetben tér ki a gyakorlati alkalmazásokra, távlati elképzelésekre és lehetőségekre, az új eredmények ismertetésére.

***A dolgozatban ismertetett eredmények közül tudományos szempontból új eredményeknek az alábbiakat emelem ki:***

Igazolták, hogy állatkísérletben a kémiai karcinogén anyagokkal (MNU, DMBA, 1-NP) történő kezelés karcinogén-/szerv specifikus expresszió változásokat okoz a Ha-ras, c-myc és p53 gének expressziójában. Ezek a gén expressziók a karcinogén expozíció biomarkereiként felhasználhatók.


A fenti gének expresszióváltozásainak alkalmazhatóságát humán vizsgálatban, a tumoros állapot markereként is demonstrálták: fej-nyaki daganatos betegek perifériás fehérvérsejtjeiben a fenti gének expressziója magasabb volt, mint nem daganatos kontrollokban.

1. Megállapították, hogy a magyar népességben a pre-miR-146a allélmegoszlások a török népességével mutatnak erős hasonlóságot.
2. Igazolták, hogy a hazai népességben a GSTM1 0 genotípus, a NAT2 rapid acetiláló genotípusok, a p53 Pro allél, az XRCC1 Gln allél, a CYP1A1 Val allél, a CYP2E1 c2 allél és az EPHX1 exon 3 His/Hisgenotípus statisztikailag szignifikánsan növeli a kolorektális daganatok kockázatát
3. Bebizonyították, hogy a vizsgált allélpolimorfizmusok között kölcsönhatások vannak, és a több különböző high-risk allélt hordozókban a kockázat jóval magasabb szintet ér el.
4. Igazolták, hogy a GSTM1 és a GSTT1 allélpolimorfizmusoknak szignifikáns szerepe van a magaskockázatú HPV-fertőzés indukálta cervix-karcinogenezisben. A 0 genotípusú személyekben statisztikailag szignifikánsan gyakrabban alakultak ki cervix-preblasztomák a perzisztens HPV-fertőzött nők körében.
5. Igazoltuk, hogy a DRD2 A1/A2 polimorfizmusa statisztikailag szignifikánsan befolyásolja a cervix preblasztomák kialakulásának kockázatát, az A1 allél jelenléte kockázati tényezőnek bizonyult.
6. A terciér prevencióban felhasználható prognosztikus markereknek bizonyultak a GSTM1, a GSTT1, az XRCC1 és a p53 gének allélpolimorfizmusai, amelyek a kolorektális ill. a fej-nyaki daganatos betegek túlélését szignifikánsan befolyásolták. Ugyancsak terciós prevenció biomarkereknek bizonyult a DRD2 allélpolimorfizmus amélnyakrak progressziójára nézve (A1 allél–rosszabb prognózis).

7. Kimutatták, hogy a magyarországi romák egy csoportja (oláh cigányok) több allélmegoszlás tekintetében is eltér a hazai kaukázusi népességtől, és az indiai populációkban leírt allélmegoszlásokhoz hasonlít (GSTM1, p53, kisebb mértékben NAT2).

A disszertáció megállapításai összesen 27 közleményen alapul, melyek nagy részében a szerző első vagy utolsó szerző. A közlemények közül 15 nemzetközi folyóiratban jelent meg, ami azt is jelenti, hogy kiállta a szakmai bírálatok próbáját. Ezek és a fenti értékelés alapján a dolgozat nyilvános védés kitűzését javaslom és a doktori tézisekben szereplő eredményeket elegendőnek tartom az MTA doktora cím megszerzéséhez és sikeres védés esetén támogatom.

Debrecen, 2014. január 30.

  
Dr. Balázs Margit  
egyetemi tanár  
az MTA doktora