

Opponensi vélemény

Dr. Moldvay Judit „ DIFFERENCIÁLDIAGNOSZTIKAI, PROGNOZSTIKAI ÉS PREDIKTÍV SZÖVETI BIOMARKEREK VIZSGÁLATA TÜDŐRÁKBAN” című MTA Doktori Értekezéséről

Formai értékelés

A magyar nyelvű MTA doktori értekezés 221 számozott oldalból áll: Tartalomjegyzék, Rövidítések jegyzéke (1-6. oldal), Bevezetés (7-28. oldal), Célikítűzések (29. oldal), Betegek és módszerek (30-58. oldal), Eredmények (59-142. oldal), Megbeszélés (143-187. oldal), Eredmények összefoglalása (188-189. oldal), Köszönetnyilvánítás, Saját közlemények jegyzéke, Szcientometriai adatok (190-200. oldal) és Irodalomjegyzék 446 hivatkozással (201-221. oldal). A disszertáció jó megértését, az eredmények korrekt áttekinthetőségét 32 táblázat és 75 ábra segíti.

Az értekezés alapjául szolgáló angol nyelvű tudományos közlemények száma 23 (első és utolsó szerzőként 10), melyekben Moldvay Juditnak döntő szerepe volt a vizsgálat megtervezésében, a betegkohorsz kialakításában, az adatbázis felépítésében, a statisztikai értékelésben és a kézirat megírásában. A disszertáció témájában megjelent további közleményeinek száma 47 (első és utolsó szerzőként 30), a disszertáció témájában megjelent könyvfejezeteinek száma 9, egyéb közleményeinek száma 41 (első és utolsó szerzőként 30). Összesített hivatkozás 819, Hirsch index 14, g index 29. A benyújtott MTA Doktori Értekezés tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megfelel az MTA Doktori Értekezésekkel szemben támasztott követelményeknek, szerkezete jól tagolt, könnyen áttekinthető, stílusa választékos, fogalmazása világos, nyelvtani hiba vagy elírás (pl. „peurális”, „pleurális” helyett, 141.o.) gyakorlatilag nincs.

Előzmények és tartalmi értékelés

A tüdőrák világviszonylatban és Magyarországon is vezető daganatos halálok, és a hazai betegek többségét késői, inoperábilis stádiumban (IIIB és IV) fedezik fel. Nagyrészt ennek köszönhetően az 5 éves túlélés még mindig csak 15-20% körül mozog, annak ellenére, hogy a modern képalkotó és egyéb diagnosztikus vizsgálatok, valamint a kombinált daganatellenes kezelések itthon is rendelkezésre állnak. Azonban nem csak a késői felfedezés esetén rosszak a kilátások, mivel a korai (IA) stádiumban operált betegeknek is csupán 70%-a éri el az ötéves túlélést. Ezért mind az operábilis, mind az inoperábilis, de egyéb kuratív (gyógyszeres- és/vagy sugár) terápiára alkalmas nagyszámú tüdőrákos beteg esetében érdemi javulást eredményezhet olyan új prognosztikus és prediktív markerek alkalmazása, melyekkel 1) a tumor biológiai viselkedése, a daganatos kórfejlődés jobban előrejelezhető, azaz kiválaszthatók – többek között - azok a betegek is, akikben a korai stádiumban történt műtét után, a jelenleg érvényes nemzetközi ajánlások ellenére mégis érdemes adjuváns kezelést alkalmazni és így túlélési esélyük javulhat, 2) a rendelkezésre álló terápiás modalitások – beleértve az új és rendkívül drága molekuláris célterápiát és immunterápiát - hatásosabban és költséghatékonyabban alkalmazhatók.

Az értekezésben a nem-kissejtes tüdőrák – és azon belül elsősorban az adenocarcinoma – és áttéteinek diagnosztikus, prognosztikus és prediktív markereit elemzi Moldvay Judit az alábbi 9 célkitűzés mentén:

1. A TTF-1 fehérje expresszió differenciáldiagnosztikai értékének meghatározása primer és áttéti tüdő adenocarcinomákban.
2. Egyes claudin fehérjék expressziójának tanulmányozása normál hörgőhamban és a tüdőrák főbb szövettani altípusaiban, továbbá prognosztikai szerepük meghatározása nem-kissejtes tüdőrákban.
3. Nagy betegszámú kohorszban a primer tüdőrák lokalizációja és a távoli áttétek helye, megjelenési ideje és a megjelenéstől számított túlélés összefüggéseinek vizsgálata. Az agyba korán, illetve későn metasztázáló tüdőrákok klinikopatológiai tulajdonságainak jellemzése, különös tekintettel az agyi áttét körül kialakuló ödémára.
4. Protein expressziós különbségek vizsgálata primer tüdőrákokban és azok agyi áttéteiben.
5. Platinabázisú kemoterápia mutagén hatásának vizsgálata tüdő adenocarcinomában, és ennek kapcsolata az áttétképződéssel.
6. Az EGFR státusz vizsgálata tüdőrákban, különös tekintettel a klasszikus és ritka EGFR mutációk közti különbségekre.
7. A KRAS mutáció prognosztikai és prediktív értékének, továbbá a távoli áttét helyével való kapcsolatának vizsgálata tüdő adenocarcinomában.
8. Az immunterápia prediktív faktorainak vizsgálata primer tüdő adenocarcinomában és agyi áttétekben.
9. Platinabázisú kemoterápia szöveti biomarkerekre gyakorolt hatásának vizsgálata tüdőrákban.

A disszertációban bemutatott 23 vizsgálat több mint 4 600, itthon (95%-a az OKPI-ben) kezelt beteg szövettani és klinikopatológiai paramétereinek elemzésén alapul. Kooperációs partnerként az Országos Klinikai Idegtudományi Intézet (távoli – döntően agyi - áttétek eltávolítása) és a SE I. és II. sz. Patológiai Intézet (patológiai kiértékelés, EGFR és KRAS mutáció analízis) szerepeltek. Így a betegek ellátását és patológiai diagnosztizálását illetően relatíve homogén betegcsoportokat alakíthattak ki.

Az immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatok döntő többségében a minták sebészi reszekciójából származtak. Ezzel szemben az EGFR és KRAS mutáció meghatározására a betegek kb. 1/3-ában bronchoscopos mintavételből, transthoracalis tűbiopsziából, vagy malignus mellkasi folyadékgyüleméből származó citológiai preparátumból került sor.

Az eredmények az alábbiak szerint foglalható össze:

1. Elsők között bizonyították, hogy a TTF-1 protein expresszió vizsgálata alkalmas a primer és áttéti tüdő adenocarcinomák elkülönítésére.

2. **Elsőként** írták le tüdőrákban, illetve annak különböző szövettani altípusaiban a claudin-1, -2, -3, -4 és -7 protein és mRNS expressziót. Az egyes szövettani csoportok közt megfigyelt expressziós különbségek felvetik a claudinok differenciáldiagnosztikai szerepét, egyes claudinok overexpressziója pedig terápiás jelentőségű lehet. Ugyancsak elsőként írták le, hogy tüdő laphámrákban a fokozott claudin-1 expresszió kedvező prognózissal társul.

3. **Elsőként** számoltak be arról, hogy a centrális tüdő adenocarcinomákban korábban jelennek meg távoli szervi áttétek, továbbá, hogy míg centrális daganatokban a csontáttét, úgy perifériás daganatokban a tüdőáttét a gyakoribb. Kimutattuk emellett, hogy a pleurális áttétek főként az alsó lebenyekből kiinduló daganatokból származnak. Agyi áttétet adó, 575 tüdőrák vizsgálata alapján megállapították, hogy a peritumorális agyödéma adenocarcinomában a legkifejezettebb, ezt követi a laphámrák, majd a kissejtes tüdőrák. *Brain only* metasztázis esetén a primer tüdőrákok gyakrabban perifériás elhelyezkedésűek, és esetükben szignifikánsan hosszabb az agyi áttét megjelenéséig eltelt idő.

4. Igazolták, hogy nem-kissejtes tüdőrákban az emelkedett kollagén XVII, CD44v6 és caspase-9, valamint a csökkent β -catenin és CAS protein expresszió szignifikáns kapcsolatot mutat a primer tüdőrák agyi áttétképző potenciáljával. Kimutatták, hogy a β -catenin vesztés és delokalizáció a rossz prognózis egyváltozós előrejelzője. Igazolták, hogy tüdő laphámrákok agyi áttéteiben a csökkent CD44v6 expresszió korrelál a fokozott peritumorális ödémával. Kimutatták, hogy a p-mTOR, p-S6 és Rictor expresszió magasabb agyi áttétekben, mint primer tüdőrákokban.

5. Tüdő adenocarcinomában demonstrálni tudták a cisplatin kezelésnek a daganatra gyakorolt mutagén hatását, és ezen információ felhasználásával, továbbá a primer tumor és a különböző szervi metasztázisok genomszekvenciáinak részletes elemzésével meg tudták alkotni a daganatevolúció modelljét.

6. **Elsőként** közöltek Közép-Európából EGFR mutáció gyakoriságra és terápiás válaszarányra vonatkozó átfogó eredményeket, és már 2008-ban hangsúlyozták, hogy önmagában az immunhisztokémia nem megfelelő, hanem DNS szekvencia analízissel kell az EGFR státuszt meghatározni. Nagy betegkohorszon kimutatták, hogy a ritka EGFR mutációk többsége dohányzáshoz kötött, csökkent EGFR-TKI érzékenységgel társul és rövidebb túléléssel jár, mint a klasszikus EGFR mutációk. Tüdő adenocarcinomák szövettani altípusaiban (lepidikus terjedést mutató/nem mutató) igazolták, hogy az EGFR mutáció csak a daganatok töredékében vezet az EGFR autofoszforylációjához. Kimutatták emellett, hogy metodikai módosítások, így például a primer antitest inkubációs idejének megnyújtása, valamint a javasolt proteáz emésztés helyett mikrohullámú sütőben történő antigén feltárás, nagymértékben fokozzák az EGFR immunhisztokémiai reakció szenzitivitását.

7. Igazolták, hogy a KRAS mutáció altípusának prognosztikai és prediktív jelentősége van. Emellett 500 beteg vizsgálata alapján kimutatták, hogy a KRAS mutáció gyakoriság tüdő adenocarcinómában metasztázis helyspecifikus variabilitást mutat, csontáttét esetén pedig független, kedvezőtlen prognosztikai faktor.

8. **Elsőként** írták le tüdő adenocarcinómában, hogy a tumor nekrosis szoros pozitív korrelációt mutat a tumorsejtek és az immunsejtek PD-L1, valamint az immunsejtek PD-1 expressziójával. 208 agyi áttéti minta vizsgálata során **elsőként** mutatták ki, hogy az immunsejt infiltráció és különösen a peritumorális mononukleáris gyűrű jelenléte kedvező túléléssel párosul tüdő adenocarcinómában. Leírták továbbá, hogy a primer tumor sebészi eltávolítása és multiplex agyi áttét esetén az alacsony PD-1/PD-L1 expresszió kedvezőbb túléléssel jár. *Primer tumor-agyi áttét* adenocarcinoma mintapárok elemzése alapján **elsőként** írták le, hogy a tumorsejtek PD-L1 expresszióját illetően szoros korreláció figyelhető meg a primer tüdőtumorkok és agyi áttéteik között, amit érdemben nem befolyásol a kemo-, radio- és szteroid terápia.

9. Kemoterápia előtti és utáni szövetminta párok elemzésével igazolták, hogy nem-kissejtes tüdőrákban a platinabázisú kemoterápiát követően csökken az ERCC1 protein expresszió, és ez a csökkenés kifejezettebb laphámrákban. Emellett primer tüdőrákban **elsőként** írták le komplexen a PD-1 és a PD-L1 expressziót, kiegészítve a stromális immunsejt denzitással, platinabázisú kemoterápia előtt és után, továbbá megerősítették, hogy a kemoterápiát követően a betegek nem elhanyagolható arányában csökken a tumorsejtek PD-L1 expressziója, aminek jelentős terápiás konzekvenciája lehet.

Megjegyzések és kérdések

1. A Bevezetés fejezetben említi, hogy hazánkban a tüdőrák diagnózisa több mint 60%-ban citológiai mintán alapul. Elegendő-e ma a citológia a pontos patológiai diagnózishoz és recidiva vagy progresszió esetén a későbbi összehasonlító elemzésekhez?
2. Szintén a bevezetőben említi, hogy az NSCLC mellett számos más solid tumorban – így tripla-negatív emlőrákban, petefészekrákban, gyomorrákban – is kimutatható az EGFR gén mutációja. Van-e különbség a TKI kezelés hatékonyságában (PFS, OS) ezen esetekben a különböző szervi eredetek között? Igazolható-e az a hipotézis, hogy nem a szervi-szövettani típus, hanem a molekulárgenetikai diagnózis alapján kell a célzott terápiát alkalmazni?
3. A 13. oldalon kedvező prognosztikus faktorként említi a topoizomeráz II enzim magasabb szintjét, mivel az fokozza a DNS hibajavítást. Ugyanakkor kissejtes tüdőrákban a topoizomeráz II gátló etoposid a rutin terápia része. Hogyan oldható fel ez az ellentmondás?
4. Az onkogenezis jobb megértéséhez alapvető lenne homogén betegcsoportok (szövettani altípus, stádium) vizsgálata. A korábban „genom őreként” említett P53 tumor szupresszor génnel kapcsolatos – részben saját (P 53 fehérje IHC pozitivitás kedvezőtlen prognosztikus faktornak bizonyult) - ellentmondó megfigyelések alapján, lehetséges ez? Hogyan tekinthetünk jelenleg a P53-ra?
5. A disszertációban kiemelt helyet foglal el a tüdőrák agyi áttéteinek vizsgálata. Hogyan képzelhető el a nyirokcsomó áttét nélküli „brain only” alcsoport a

daganatos kórfejlődés jelenlegi ismertében? Nem arról van inkább szó, hogy nem találtak nyirokcsomó érintettséget ezekben az esetekben? Van-e összefüggés 1) a primer tumor sejtes mononukleáris infiltrációja és az agyi metastasis között, 2) az agyi metastasis sejtes infiltrációja és peritumorális oedémája között?

6. Elsőként számoltak be arról, hogy centrális elhelyezkedésű tüdőrákban a csontáttét, míg perifériás tüdőrákban a tüdőáttét a gyakoribb. Mi lehet ennek mechanizmusa?
7. Az onkoterpápia szöveti biomarkerekre gyakorolt hatásának vizsgálata kapcsán felmerül a választott metodikával kapcsolatban, hogy mennyire lehetséges a kemoterápia előtti bronchoscopos excindátumon és a kemoterápia utáni sebészi archivált szövetmintán kapott eredményeket összehasonlítani?
8. A PD-1 és PD-L1 fehérje IHC vizsgálatokban hogyan lehet a vizsgált mintát standardizálni, hogy a tumorsejtek és az immunsejtek adott százalékos pozitivitása valóban reprezentatív legyen?
9. Az EGFR státusz IHC-vel történő meghatározásában az EGFR fehérje expresszió mellett meghatározták a foszforilált EGFR fehérje (pEGFR) expresszióját is? Ez utóbbinak mi a jelentősége?
10. A claudin expressziót mutató 9. táblázat és a 22. ábra ugyanazt mondja, ami redundancia. A szemléletesebb ábra mellett a táblázat elhagyható lett volna. A claudin expresszió ismerete mennyiben ad többletet az egyéb IHC módszerrel végzett tumor differenciáláshoz?
11. Nagy értéke a disszertációnak az 1126 ADC-s beteg távoli áttétei és klinikopatológiai jellemzői közötti kapcsolat elemzése. Meglepő módon gyakoribb volt az áttét a perifériás (61%) és jobb oldali (60%) lokalizáció esetén, pedig ezek mellkas rtg-n hamarabb felismerhetők lehetnek a centrális ill. bal oldali lokalizációhoz képest. Hogyan definiálták a korai és késői metastasist? Mivel centrális tumor esetén gyakoribb volt a korai metasztasis, indokolt-e ilyen esetben eltérő (kiterjesztettebb) met. kutatás)? A perifériás ADC-ben a medián túlélés (OS) kétszer hosszabb volt, mint a centrálisban. Terjedési mintázatban (lepidikus vs nem-lepidikus) észleltek-e különbséget a két lokalizáció esetében?
12. Az agyi áttétek szövettani típusa legtöbbször ADC volt, ami várható volt az egyes szövettani típusok előfordulási gyakoriságának ismeretében. Azt vizsgálták-e, hogy adott primaer szövettani típus milyen gyakorisággal adott agyi áttétet? A teljes túlélésben itt medián és átlag értékeket is megadnak, kb. kétszeres időkülönbséggel (12,0 vs 19,2 hónap, illetve 5,0 vs 11,2 hónap). Helyes-e átlagot vizsgálni nem normális eloszlás esetén? A 13. táblázatban 548 agyi áttétes esetet szerepel és az eredményekben 254 operált és 303 inoperábilis (összesen 557) esetről ír. Miből adódik az eltérő szám? Mivel magyarázható a jobb túlélés jelentős perifokális oedema esetén? Lehet-e ez pozitív prediktív faktor? Indokolt lehet-e teljes remisszió esetén a PCI laphám- és adenocarcinoma-ban?
13. Az EGFR expresszió elemzésében, a 21. táblázatban nem lett volna-e helyesebb a dohányzás szerinti csoportosításban az exsmoker-t inkább a smoker csoporthoz sorolni, mint a nonsmoker-hez?
14. Több helyen előfordul (pl. 82., 86., 112.o) a „bár statisztikailag nem szignifikáns, de klinikailag figyelemre méltó...nem szignifikáns, de

emelkedett...trend..kedvező tendencia” értékelés. Hogy lehet ezt értelmezni? Szerintem ezen esetek klinikai relevanciája erősen kérdéses.

15. Hogyan látja az EGFR mutáció – aktiváció – expresszió jelentőségét a tüdő ADC terápiás befolyásolhatóságának függvényében? Ezek mennyire függetlenek egymástól?
16. Az immunellenőrzőpont-gátló kezelés prediktív faktorainak vizsgálatában azt találták, hogy a tumor nekrosis, bár szignifikáns előrejelzője a PD-1 és PD-L1 expresszióknak, azonban az alacsony R értékek (0,283; 0,215; 0,290) miatt a tumor nekrosis az immunpozitivitás csupán 8%-ért felelős. Mennyire segítheti ez a terápiás döntést?
17. Ha felfedezik, akkor ritka EGFR mutáció esetén is érdemes-e – és ha igen, milyen esetben - TKI kezelést indítani, vagy ilyen esetben nincs túlélési előny a kemoterápiához képest?
18. Mi a véleménye az alábbi megállapításról? „Tüdőrák-kezelés hatékonyságának pontos megítélésében csak a PFS fogadható el, mivel az OS-ben a dohányzás és az előrehaladott életkor miatt a társbetegségek szerepe ritkán pontosítható”

Összegezve Moldvay Judit doktori disszertációja, a mellet, hogy az alapját képező közlemények száma és minősége kiemelkedő, a klinikai gyakorlat szempontjából is igen értékes kutatásokat foglal össze. A felvetett kérdések csupán a megbeszélés kiegészítésére születtek és az opponens érdeklődését jelzik. Mindezek alapján javaslom az értekezés nyilvános vitára bocsájtását és sikeres védelem esetén az MTA doktora cím odaítélését feltétlenül támogatom.

Szeged, 2021. február 2.

Dr. Somfay Attila PhD
egyetemi tanár
SZTE Tüdőgyógyászati Tanszék