

## Válasz Dr. Balázs Margit, az MTA doktora bírálataira

Mindenek előtt tisztelettel köszönöm Balázs Margit Professzor Asszonynak, hogy elvállalta doktori munkám opponensi feladatát, valamint az elért eredményeinkre vonatkozó elismerő szavait.

Válaszok a bíráló kérdéseire:

---

74. oldal „a sejtvonalakban elvégzett igazolás után a legjobb géneket veserákos” mintákban is megvizsgálták és igazolták az LGALS8, a RAB17 és az EPCAM gének összefüggését a sunitinib-rezisztenciával. Ezzel kapcsolatban egy technikai kérdésem lenne: hogyan történt a mintagyűjtés a gyógyszeres kezelés előtt? A betegek hány %-ának a mintáit tudták az analízisben felhasználni?

**A vizsgálathoz a mintagyűjtés a Semmelweis Egyetem Urológiai klinikáján történt valamennyi eltávolított veséből, a daganat miatt elvégzett műtét során a patológiai protokoll részeként. A felhasználható betegszámot csökkentette, hogy célzott terápiás kezelés csak azon betegeknél jött szóba, ahol progresszió következett be, nekünk pedig csak ezekre a mintákra volt szükségünk. Végző soron a gyűjtött minták 38%-át használtuk fel a kutatás során.**

-----

*A melanoma pathogenezisével kapcsolatba hozott génlisták összehasonlítása során 9 génlistát találtak, melyek megfeleltek az analízis feltételeinek. Ezek a közlemények 2002-2005 között jelentek meg. Az analízist követően jelentek-e meg a feltételeknek megfelelő közlemények? Ha igen, mennyiben módosítja a korábbi megállapításokat, ha ezeket az adatokat bevonják az analízisbe?*

**A kilenc génlistát vizsgáló tanulmányunkban (Ref: Győrffy, J Invest Dermatol, 2007) nem próbáltuk meg az eredeti, nyers adatokat újra feldolgozni. Egyrészt úgy éreztük, hogy ez egy fontos hiányosság volt, másrészt számos további közlemény is megjelent, amelyek szintén tartalmaztak génexpressziós mintázatokat. Mindezek alapján három évvel később készítettünk egy újabb tanulmányt, amelyre az értekezésben csak röviden utaltam (Ref: Tímár, Clin Exp Metastasis, 2010). A második vizsgálat az első vizsgálat eredményeit megerősítette.**

-----

*Mi lehet az elsődleges oka annak, hogy a génexpressziós mintázatok alapján a melanoma áttétképző potenciáljával kapcsolatba hozható génlistákat nem tudtak azonosítani?*

Ez nagy valószínűséggel a tumorokon belüli nagyfokú heterogenitásra vezethető vissza. Ezt támasztják alá a következő generációs szekvenálási mérések eredményei is, ahol a melanoma a kolorektális és a tüdőrák után a harmadik legtöbb nem szinonim mutációt tartalmazó tumortípus volt (Ref: Vogelstein, Science, 2013).

A melanoma génexpressziós mintázatok statisztikai elemzése során általunk alkalmazott PAM (Ref: Tibshirani, PNAS, 2002) a t-próba alapján lett kifejlesztve. Ezért ez is azon a koncepción alapul, hogy két csoportot akkor tud egy gén jól megkülönböztetni, ha a csoportok közötti nagy különbség kis csoporton belüli szórással társul. A PAM kiegészül egy „soft thresholding”-nak nevezett lépéssel, amelynek során egy küszöb folyamatos emelésével a két csoportot megkülönböztető génlisták hosszát csökkentjük. Amennyiben a tumoros szövet nagyon heterogén, akkor a csoporton belüli szórás nagyon nagy lesz, és emiatt végső soron nem lesz szignifikáns a vizsgált gén.

-----

*Léteznek-e olyan tanulmányok, melyek a melanoma heterogenitás és a génexpresszió közötti különbséget a tumor különböző részeiből származó minták génexpressziós eltérései alapján bizonyítják be?*

Igen, például jelenleg nyomdában van egy közlemény, amelyben egyes sejtek alapján felállított génexpressziós mintázattal tudták a tumor heterogenitását mérni (Ref: Ennen, Oncogene, 2014). Ennek során a sejteket in vitro felszaporították, majd egy 114 gént tartalmazó panel expresszióját mérték le.

-----

*Mi lehet az oka annak, hogy az irodalomban emlőrák vonatkozásában a közölt mintázatok többsége nem volt képes a jó és rossz prognózisú betegeket egymástól elkülöníteni?*

Ennek vélhető oka az alkalmazott technológiák különbségére vezethető vissza. Az egyes mérések RT-PCR, illetve egyszínű vagy kétszínű gén chipek felhasználásával készültek. A különböző technológiák egy-egy génnek különböző szakaszait mérik eltérő érzékenységgel és specificitással. Ezeket az eredményeket eltérő statisztikai módszerekkel értékelték ki. A MIAME (Ref: Brazma, Nature, 2001) bevezetése előtt még a chipek felépítését sem hozták mindig nyilvánosságra, a GEO által használt standardokat pedig csak 2006 óta várják el (Ref: Edgar, Nat Biotechnology, 2006). Mindezek önmagukban már okozhatták azt, hogy a régebbi génexpressziós mintázatok igazolása nem volt sikeres.

Azonban itt ki kell emelnem, hogy van egy további, valószínűleg még fontosabb tényező is. Egy megbízható génexpressziós mintázat felderítéséhez több ezer mintára van szükség (Ref: Ein-Dor, PNAS, 2006), miközben a mintázatok abszolút többségét maximum pár száz betegben azonosították.

Amikor 20-50 ezer gén kifejeződését mérjük egyszerre, akkor ezek az esetszámok rendkívül alacsonyak.

Végezetül ezt még az is állhat a mintázatok alacsony reprodukálhatósága mögött, hogy a többszörös hipotézis tesztre sok esetben nem korrigáltak. Ha 10 ezer gén mérése után egy sima t-próbát csinálunk  $p < 0,05$  mellett, akkor biológiai eltérés nélkül is azt várjuk, hogy 500 gén „szignifikáns” különbséget fog mutatni. A nem megfelelő módszerek alkalmazása miatt nem lehet mindig elkülöníteni a valódi eredményeket a mérési zajtól (Ref: Ioannidis, Lancet, 2005), ezért különösen fontosak az általunk végzett számítások. Amely mintázatok ugyanis nálunk is szignifikánsak voltak, azok esetében ez lényegében egy nagy mintaszámú független igazolást takar.

-----

*Milyen feltételeknek kell megfelelni ahhoz, hogy klinikai döntéshozatalra alkalmas génexpressziós adatok szülessenek?*

Ahhoz, hogy egy klinikailag is alkalmazott teszt bekerüljön a betegellátásba, megfelelő hatékonyságot kell elérnie. A hatékonyság közgazdasági fogalom, és azt veszi figyelembe, hogy mekkora befektetés (vagyis költség) mekkora hasznot (vagyis minőséggel korrigált életévet) tud adni.

Ettől független a hatásosság fogalma, amely nem veszi figyelembe a költségeket, csak az elért hasznot. Mivel az orvosok feladata elsősorban a betegek gyógyítása, ezért elsősorban a hatásosság mérését veszem nagyító alá. Statisztikailag leegyszerűsíti a dolgot, hogy a kimenet szempontjából kettő lehetséges eredmény várható: a teszt vagy azt jelzi előre, hogy a beteg a terápiára rezisztens lesz, vagy azt, hogy érzékeny. Ezután a beteg maga a valóságban vagy érzékeny lesz vagy rezisztens. Ha az előrejelzés és a kimenetel egyeznek, akkor a teszt valóban pozitív (pld rezisztens) vagy valódi negatív (pld érzékeny) előrejelzést ad. Amennyiben a kettő egymásnak ellentmond, akkor fals pozitív (pld a teszt rezisztenciát jelez, de a beteg érzékeny) vagy fals negatív (az előző fordítottja) lesz az eredmény. A valóban pozitív előrejelzések aránya az összes pozitív eredményhez képest egyenlő a teszt szenzitivitásával – ez tehát azt mutatja meg, hogy a rezisztens betegek mekkora arányát találja meg. A valóban negatív előrejelzések aránya az összes negatív eredményhez képest a teszt specificitása. A szenzitivitás és specificitás átlagát nevezzük pontosságnak (accuracy).

Optimális esetben a pontosság értéke 1-hez közelít. Onkológiában ez nagyon ritka eset, talán csak az ösztrogén receptor az, amelyik már 0,9 körüli értéket el tud érni. A kereskedelmi forgalomban kapható többgénes tesztek ma 0,7 körüli pontosságot tudnak felmutatni. Talán egy egyszerű ökölszabályként lehetne azt definiálni, hogy minden 0,7 feletti teszt alkalmas lehet klinikai döntéshozatalra, minden 0,8 feletti tesztet célszerű valóban bevezetni és minden 0,9 feletti tesztet a felmerülő költségekkel nem törődve azonnal be kell vezetni.

-----

*Irodalmi adatok szerint az ösztrogén receptor fokozott kifejeződés inkább az alacsony malignitású daganatokra jellemző, ugyanakkor a jelölt által vizsgált mintákban és alkalmazott kiértékelés során sikerült három olyan gént találni – köztük az ösztrogén receptor 2-t-, melyek a túléléssel szoros korrelációt mutattak. Mennyire alkalmas ez a három gén a túlélés előrejelzésére petefészekrákoknál?*

**Valóban azt találtuk, hogy a hormonrendszerrel kapcsolatba hozható több gén is összefüggött a túléléssel. Az ESR2 (más néven ösztrogén receptor béta) az ösztrogén receptorok egyik típusa, amelyik az ESR1-el ellentétes hatást fejt ki, a progeszteron receptor pedig egy, az ösztrogén receptor által szabályozott gén. Mindez arra utalhat, hogy a hormonterápia a petefészekrákok esetében is hatásos lehet.**

Sajnos azonban az eddigi terápiás próbálkozások nem hoztak eredményt. A platina rezisztens petefészekrákok esetében alkalmazott szelektív ösztrogén receptor modulátor tamoxifen kezelésre a betegek 13%-a (Ref: Markman, Gynecol Oncol, 1996), a nem szteroid aromatáz gátló letrozolra a betegek 0-15%-a (Ref: Ramirez, Gynecol Oncol, 2008; Papadimitriou, Oncology, 2004; Bowman, Clin Cancer Res, 2002), anasztrozolra pedig 0%-a (Ref: del Carmen, Gynecol Oncol, 2003) reagált.

Ezek alapján az lehet valószínű, hogy bár ezek a gének alkalmasak prognosztikus biomarkernek, azonban egyelőre prediktív biomarkerként nem alkalmazhatóak. Valószínű, hogy a későbbiekben további markerek egyidejű alkalmazásával még fogunk tudni olyan alcsoportokat azonosítani, amelyekben a hormonkezelés is hatásos lehet.

-----  
*Egy most megjelent közleményben 1525 petefészekrák meta-analízisének eredménye mennyiben hasonlítható a jelölt eredményeihez? (Riester M et al.: Risk prediction for late-stage ovarian cancer by meta-analysis of 1525 patient samples. J Natl Cancer Inst. 2014)*

**A Riester és munkatársai által elvégzett vizsgálat nagyban hasonlít az általunk kettő évvel korábban elvégzett tanulmányhoz. Nagy adathalmaz meta-analízisével kezdték, majd az eredményeket RT-PCR-el és IHC-val igazolták.**

Azonban a megválaszolt kérdések terén eltért a két elemzés: a mi vizsgálatunkban a túlélést előrejelzését az összes beteg esetében néztük, a betegek csoportba osztása során pedig a hisztológiai altípusok elkülönítésére fókuszáltunk. A gének vizsgálatához mi a „Significance Analysis of Microarrays” statisztikai algoritmust használtunk (Ref: Tusher, PNAS, 2001), amelyet nem arra fejlesztettek ki, hogy egy génexpressziós mintázatot hozzon létre, hanem hogy minden egyes génre megvizsgálja, hogy az a gén szignifikánsan eltér-e?

Ezzel szemben Riester-ék az első génexpressziós mintázatukban a túlélést csak az előrehaladott szerózus petefészekrákok esetében vizsgálták, a második mintázatukban pedig a debulking státusz, vagyis tulajdonképpen a

**sebészet sikerességének az előrejelzésére hoztak létre génexpresszió alapú mintázatot (amely tehát több gén egyidejű mérését felhasználva ad előrejelzést). Bár más géneket azonosítottak, azonban a fentiek miatt nem is várhatjuk, hogy a két vizsgálat eredménye egymással megegyezzen.**

---

Végezetül még egyszer köszönöm Dr. Balázs Margit alapos bírálatát és azt, hogy a doktori cím odaítélését javasolja.

Budapest, 2014.10.21.

Gyórfy Balázs