

Vélemény

Dr. Györffy Balázs, PhD

**Transzkriptom szintű adatok alkalmazása a rosszindulatú daganatos betegek várható terápiás válaszána és túlélésének előrejelzésére
c. akadémiai doktori értekezéséről**

A klinikai onkológia egyik nagy kihívása a gyógyszerekkel szembeni rezisztencia – olyan problémák mellett, mint a primer és a metasztázisai közötti különbség (ma már a molekuláris profilok alapján), vagy kombinált kezelésnél az előny helyett fellépő toxicitás. A rezisztencia oka már jelen lehet a kezelés előtt (veleszületett, vagy a tumor növekedése során kialakuló), de lehet, hogy átmeneti javulás után lép fel. Utóbbi háttérében előfordulhatnak farmakológiai okok vagy biológiaiak. Jelölt a szerzett rezisztencia problémáit tűzte ki sokirányú, de mégis összetartó kutatásainak célpontjául, azzal az érthető és dicsérendő igénnyel, hogy a kutatási eredményeit a klinikummal szembesítse, megvalósítva a „bench to bedside” stratégiáját.

Az értekezés adminisztratív részén hamar áteshetünk, előre vetítve, hogy mindenben megfelel az akadémiai doktortól elvártaknak. A 113 oldal jól tagolt, érthető (néha próbára téve a szakmai zsargonhoz szokott bíráló fantáziáját), logikus magyarázatokkal, valamint 276 irodalmi hivatkozással. A saját eredmények színvonaláról tanúskodik a részben külföldi kollaborációban végzett munka előkelő folyóiratokban megjelent cikkei, az MTMT-ben nyilvántartott impakt faktorról, megfelelő számú első, és utolsó szerzőséggel. A

tudományos aktivitás mellett kiemelendő az iskolateremtés egyik legjobb ismérve, a PhD és más hallgatók munkájának igen eredményes támogatása.

Ami pedig az értekezés érdemi részét illeti... megjegyzésekkel, kérdésekkel; a bevezetésnél oldalak szerint, a többi fejezetnél összevonva.

Bevezetés

(6.o.) A bőrrák gyakorisága (itt 11 ezer/év) túl magas – nem szokták beleszámítani a basaliomát, amely semimalignus (csak elvétele ad áttétet)

- A farmakológiai rezisztencia rendszerint azt jelenti, hogy a szer nem jut el megfelelő koncentrációban a célsejtekhez (itt a tumorsejtekhez) (ez pl. alapprobléma az agydaganatok esetében)

(7) Nem említi a jelenleg a klinikumban alkalmazott tumormarkereket (pl. CEA, PSA, CA19-9, CA15-3, CA125, AFP...) és azt a markerekkel kapcsolatos gondot, hogy szenzitivitásuk és specificitásuk alacsony – gondolja a jelölt, hogy az általa talált markerek ettől mentesek? (a kérdést azért említem itt, mert a munka egészére vonatkozik)

(8) A tamoxifen meghatározásával kapcsolatban említi az IHC-t és a microarrayt (utóbbi mellett foglal állást) – megbecsülné a költség/hatékonyságot a két módszer esetében?

(9) "a klinikumban csak negatív biomarkerekkel találkozunk" a jelölt szerint – ezt gondolja pl. tüdőrák esetében a mutáns EGFR1-ről, vagy az ALK-ról? ezek ugyanis pozitívan utalnak a kiválasztandó terápiás szerekre.

(10) Ha a „HER2 pozitivitás mértéke egyenesen arányos a trastuzumab kezelésre várható válasz mértékével” – akkor a HER2 miért negatív biomarker?

- Említhető a HER2 gátlásával szembeni rezisztencia okai között, melyek elég sokan vannak, a HER2/HER3 dimerizáció, mint egy eredményes randevú, sajnos a beteg kárára, mert aktiválódik a PI3K-út.

(11) Itt találkozhatunk azzal a problémával, hogy bár ugyanaz a molekuláris hiba különböző tumorokban támogathatja a célzott terápiát, vannak ez alól

kivételek (nem is kevés). Ilyen pl. az EGFR1 mutációja, mely megtalálható a tüdő adenocarcinomában és vastagbélrákokban, de míg előző tirozin-kináz gátlókra, utóbbi gátló antitestekre reagál. Jelölt ezt kivételként értékeli?

- Az 1.3 cím szisztémás terápiával szembeni rezisztenciáról szól, de szerintem az előzőleg tárgyalt szerek (tamoxifen, trastuzumab) is ide tartoznak. Vagy csak az eddigi részletes tárgyalásuk miatt maradtak ki?

(12) Ha egyszer a minták heterogének, ahogy azt a jelölt helyesen említi, akkor hogy lehet, igaz, a zavaró tényezők mellett, a különböző sejtvonalakat összehasonlítani? Vagy közös a „nevező”? Ez elég kritikus pont, amit később a rezisztenciagének progresszióban játszott szerepével próbál bizonyítani. A probléma, és a jelölt ezt jól érzi, a tumorok intra- és intertumorális heterogenitása (ebből következik a metasztázisok kezelésének részbeni kudarca). A kérdés a módszereknél is megjelenik.

- Külön kérdés, amit jó lenne modellezni, hogy a rezisztencia kialakulása után nem egyszer ugyanazzal a szerrel kezelnek, sokszor sikeresen (rechallenge).

- Mit ért tumortípustól független biomarker alatt? Ez a klinikumban alig képzelhető el. Alkalmasak ezek azonosítására az in vitro rendszerek?

(13) A célzott terápia a tumorsejtek egy-egy jellemző génhibáját veszik célba. Ennek egyik problémáját, vagy a hatásmód megismerésének nehézségét jelenti az, hogy a jelenleg használt szerek többsége több támadásponttal rendelkezik – amit a jelölt később említ is, másrészt pedig az, sajnos, hogy a normál sejteket, amelyekben nincs is a célzott génhiba, ugyancsak eltalálják – azaz toxikusak. Ilyen értelemben hasonlítanak a klasszikus kemoterápiára, de a toxicitási profiljuk elég eltérő..

(14) A rezisztenciagének előrejelzésénél fontos említeni az EGFR1 rezisztenciagént (T790M), amit már elég jól ismerünk, és tipikus példáját kínálja annak, ahogy ezt a gént próbálják gátolni. Ez belefér a koncepcióba?

(15) A technológiai részben szívesen olvastam volna arról, hogy a mikroarray hogyan helyettesíti a patológiai diagnózist. Bár az az ilyen törekvések

kétségkívül izgalmasak, és egyetértek azzal, hogy a patológiai alcsoportok és a molekuláris profilok nem mindig egyeznek. Nagy kérdés, hogy a terápia számára melyik a jobban használható. Erre ad majd választ, legalábbis részben, a cézott terápia.

- Megjegyzem, hogy a bevezetés részletesen foglalkozik a módszertannal, amelynek inkább a metodikáknál lenne a helye, és rövidebben, bár területi korlát nincs.

(17) Kissé keveredik a prediktív biomarker és a prognózist jelző. Biztos vagyok abban, hogy a jelölt ezt pontosan tudja. A prognózisnál probléma forrása, hogy a klinikai vizsgálatok során is nehezen megítélhető, főleg ha a kétféle kezelésnél (karnál) a rezisztens betegeket áteszik az érzékenyek közé (cross-over). A predikció a terápia választásánál lehet hasznos. Az előrejelzés egyik nehézségét a kombinációk jelentik. Jelölt számos módszer közül ennek megközelítésére melyik alkalmas?

(18) A jelölt szerint az OncotypeDX-szel sem független, sem reprodukáló vizsgálat nem történt. Tudomásom szerint a klinikai reprodukálhatóság 95% körüli, az eladott tesztek a félmilliót közelítik.

(19) A melanoma esetében nyilván hiányzik a ma már alapvetőnek számító génhiba, a BRAF mutációja, amelyet gátló szerrel, a vemurafenibbel szembeni rezisztencia komoly kihívás – de már készülnek a másod- sőt harmadvonalú gátlószerek, nem egy már a klinikai kipróbálás fázisában van.

(20) A petefészekrákkal kapcsolatban említi, hogy klonális eredetű, egyetlen sejtben történő mutációra vezethető vissza – ez minden tumor esetében igaz (akár szolid, akár hematológiai). Nem egyszer fejtörést okoz a multifokális daganatok eredetének magyarázata. Persze egyetlen génhiba még nem eredményez malignus tumort.

(21) Van arra adat, hogy miért nem kezelnek daganatos betegeket – akik így „negatív” kontrollként szolgálnak?

(24) A transzkriptom mennyire veszi figyelembe a mikroRNS-eket?

Összefoglalva – a bevezetés lényegében teljesíti feladatát, bevezeti az olvasót az elkövetkező problémák felé, igaz, stílszerűen, ez elég heterogénre sikerült, néha már tankönyvi szintre emlékeztető részletességgel tárgyalja az ismereteket, máshol inkább jelenidejű, ami jobban tükrözi az értekezés színvonalát.

Célkitűzések

(25) A „személyre szabott terápia” voltaképpen „tumorra szabott terápia” – lásd a szerek okozta toxicitás. Egyébként – szerintem - a két opció (a második a gyógyszerfejlesztés) kiegészítik egymást, sőt, a génexpressziós profil célja éppen az, hogy újabb célpontokat fedezzen fel – ez vonatkozik a rezisztenciagénekre is.

(26) Miért gondolja a jelölt, hogy független rezisztencia-markerek lennének, amikor a tumorok génexpressziós profilja is igen eltérő – vagy csak ebben egyeznek?

- Négy tumortípus vizsgálata elegendő a függetlenség kimondásához?

Összefoglalva –a célkitűzések világosak, a nagy kérdés természetesen a klinikai relevancia.

Módszerek

Néhány kérdés, megjegyzés:

- A microarray rendszer által használt hibridizációs próbák figyelembe veszik-e a tumorképződés során frekvenciátaliban előforduló, de normális esetben is igen gyakori splicing variánsok pontos kimutatásának szükségességét?

- A real-time PCR rendszerek target szekvencia tervezésénél és a microarray rendszerek tervezésénél a funkciók sokszorozódását biztosító alternatív transzkript variánsok specifikus kimutatása és összehangolása kiemelten fontos feladat. Mi biztosítja, hogy ugyanarra a transzkriptomra tervezett oligo-szett és RT-PCR-szett minden tumor minden állapotára használható lesz? Hogyan kezelhető az intra- és intertumorális heterogenitás?

- A human genom array mindenkire alkalmazható? Vagy léteznek egyéni különbségek,
- Ma már elavultak az I. táblázatban a klinikai vizsgálatok fázisjelölései. *Összefoglalva* – a széles metodikai készlet igazolja a jelölt szakmai felkészültségét.

Eredmények

4.1.

Az in vitro végzett vizsgálatokban arra a következtetésre jutottak, hogy sikerült ezzel a rendszerrel tumortípustól független rezisztenciagéneket és jelutakat azonosítani. Ahogy említettem ez elég merész állítás, mert csak egy mutáns gén esetében is (pl. EGFR1, HER2) a rezisztenciához vezető molekuláris változások listáját írták már le. Közöttük számos tumorfüggő típust is. Milyen tanácsot tud adni az in vitro rendszer eredményei alapján a gyógyszeriparnak? Segítenek az in vivo driver gének azonosítására? Amelyek természetesen terápiás célpontok lehetnek.

- A melanomával kapcsolatban a kérdés ugyanez.
- A doxorubicinnel szembeni rezisztenciagén használata beteganyagon, mit prognosztikai markerek, igen meggyőző. A betegek osztályozása a monoterápia (ami igen ritka) előtt történt, vagy retrospektíven? Hogy magyarázza az ábrán a plató kialakulását?
- A proteaszóma-komplex PSMB7 alegységének a vizsgálata érdekes ötlet. Szerepel ez a gén az előzőekben prognosztikai képességekkel rendelkezőnek kimutatottak között? Ha nem, miért nem? Egyébként mi a sejtek „relatív viabilitása”?
- A parallel evolúciós modell érdekes lehetőség a rezisztenciához vezető mechanizmusok azonosítására. Ez a modell is jól illeszkedik a tumortípustól való függetlenségre?

- A sunitinib-reizisztencia valóban komoly klinikai probléma. Tudjuk, hogy a sunitinib több támadásponttal rendelkezik. Ezekről mennyire függnek vagy függetlenek a feltételezett rezisztenciagének?

4.2.

Ez a rész különböző tumortípusokkal foglalkozik.

- A melanoma patogenezisével kapcsolatban a tumorok nagyfokú heterogenitását mutatja ki. Azt is megállapítja, hogy a génexpressziós mintázatokat generáló experimentális és klinikai vizsgálatok reprodukálhatósága alacsony. Vonatkozik ez az előbbieken kimutatott rezisztenciagénekre is?
- Az emlőrákok esetében szignifikánsnak tartott génlistákat állítottal össze, amely alkalmas egy új osztályozáshoz a klinikai paraméterek ismeretében. A redundáns génlisták eltávolításával a klinikai adatok is jelentősen megváltoznak. Felvethető az a kérdés, hogy a génekhez keresünk klinikai adatokat, vagy fordítva?
- A petefészekrákokkal kapcsolatban visszaköszön az a kérdés, hogy a progressziót jelző géneknek lehet-e klinikai haszna. A prognosztika mellett, vagy inkább előtt, a prediktív biomarkerek iránt nagy az igény – beleértve a várható rezisztenciát is. Milyen esélyt lát utóbbiak azonosítására? Nyilván a terápia megkezdése előtti mintákban.

4.3.

Igen jelentős kutatómunkát végeztek a bioinformatikai eszközök fejlesztése terén, amelyek a biomarkerek vizsgálatának optimalizálását tűzték ki célul.

- Hasznos algoritmusnak értékelték a PLIER+16-ot és MASS5-öt.
- Az on-line rendszerben kapott eredmények biztatóak a statisztikailag vizsgálatokra. Kérdés lehet, hogy cél lehet-e az, hogy az ilyen típusú adatok az egyes betegek számára is hasznosak legyenek e? Vagy elégnek bizonyulnak a jelenlegi terápiát meghatározó, befolyásoló tumormarkerek?

- A világhálón elérhető rendszerekkel kapcsolatban kerül emítésre, hogy génchippek segítségével „direkt tumordiagnózis” készíthető. Megmagyarázná ezt a definíciót a jelölt?

Megbeszélés

Ez a rész értelemszerűen az előzőeken alapul, azok számos kérése kerül ismét terítékre. Ezeket jórészt sikerült már részletesen elemezni. A jelölt végigmegy az eredményeken, azzal a dicsérendő gesztussal, hogy a prok mellett hangsúlyt kapnak a kontrák is, ami nagyban emeli a munka színvonalát, értékét.

Összefoglalás

A daganatsejtek gyógyszer-rezisztenciája napjaink klinikai onkológiájának kulcsfontosságú problémája. Az in vitro és in vivo módszerek és hihető adatok széles skálájával jelentősnek ítéltető megállapításokat tesz, sok eredeti tudományos eredménnyel a PhD fokozat megszerzése óta. Meggyőződésem, hogy az értekezés nem csak a jelölt nemzetközi szintű munkáját bizonyítja, hanem hasznos olvasmány és forrás a fiatal kutatónemzedék számára. Kell ennél több? Mindezek alapján javasolom a mű nyilvános vitára bocsájtását, és annak elfogadását.

Budapest, 2014. szeptember 15.

dr. Kopper László

professzor emeritus