

Opponensi vélemény dr. Méhes Gábor „Új módszerek a daganatok genetikai jellegzetességeinek és heterogenitásának vizsgálatára” című MTA doktori disszertációjáról

A disszertáció két évtized patológiai kutatásainak és azok eredményeinek összefoglalása. Igen ritka hazánkban hogy jelentős módszertani fejlesztés eredményeit tudja valaki bemutatni, hiszen a módszertan különösen a műszerfejlesztés sajátosan speciális területe a patológiának, aminek feltétele megfelelő ipari mikrokörnyezet megléte. A transzlációs kutatások hazánkban túlságosan is gyógyszerfejlesztés központúak, ami igen nagy forrásigényű és jóval kisebb a diagnosztikum vagy diagnosztikus eszköz fejlesztési felhasználás, aminek legalább akkora ipari háttere lehet, mint a gyógyszerfejlesztésnek. Ezért is öröndetes Méhes doktor disszertációja és annak tematikája még akkor is, ha ezen fejlesztések döntő része nem hazánkban valósult meg.

A disszertáció az életműből (86 dolgozat, 28 első vagy utolsó szerzős közlemény) 16-ra épül (11 első vagy utolsó szerzős) és 2 szabadalmat is tartalmaz, az össz IF 25%-át és a független idézetek harmadát reprezentálja. Tematikailag a molekuláris patológia fejlődésének korai szakaszaira irányítja a figyelmet, amelyek mára kiteljesedtek és forradalmasították a daganatok diagnosztikáját. Teoretikusan pedig a fő téma a daganatok heterogenitása, ami bár évtizedek óta a köztudatban van, mégis jelentőségét talán csak ma kezdjük igazán felismerni. Formai szempontból a disszertáció 100 oldal terjedelmű, melyben az eredmények fejezetben 18 ábra és 9 táblázat szerepel, ami az olvasó/bíráló számára kissé kevésnek tűnik az eredmények originális adatainak bemutatása szempontjából és inkább a tézisszerű disszertációkra jellemző.

A disszertáció 4 fő célkitűzés köré szerveződik: un. technológiai fejlesztések (mikroszkópos diagnosztikus eszközök és eljárások), az ezek felhasználásával végzett kutatások, mint a cervixhám ploiditásának jelentősége precancerosus állapotokban és a keringésben vagy csontvelőben disszeminálódott un. ritka vagy alacsonyszámú daganatsejtek detektálási módszerei és genetikai sajátosságai. Végül egy ettől elkülönülő kérdéskör, az AuróraB mitotikus kináz expressziójának elemzése emlőrákban és limfómában.

Technológiai fejlesztések

Lézer scanning citometria/mikroszkópia. Az áramlási citometria a patológia, főleg a hematopatológia alapvető technikai eszköze, amely a többes markerjelölési technikával igen szenzitív és specifikus diagnosztikát tesz lehetővé főleg a leukémiák, de bizonyos limfómák esetében is. Kidolgozásával szinte egy időben merült fel az igény hogy a technikát a szolid léziók/daganatok diagnosztikájára is fel kellene használni mivel igen érzékeny objektív kvantitatív méréseket tesz lehetővé. A probléma egyike az, hogy szöveti metszetek esetében sejtszeletekkel dolgozik a patológus, ami a ploiditásvizsgálatok vagy genetikai vizsgálatok esetében egyáltalán nem ideális. Helyes döntés volt, hogy az LSC-t citológiai minták és szöveti lenyomatok elemzésére dolgozták ki, ahol teljes sejtek kerülnek a tárgylemezre, teljes genetikai tartalmukkal. Ehhez eredeti eszközt a CerviSoft szivacsot fejlesztette ki a jelölt, ami a mai un. liquid based citológia kidolgozásának alapja lett. Ezzel a technikával cervikális citológiai mintákban vagy emlőrákos anyagban DNS ploiditás-elemzést párhuzamosan tudott végezni a daganatsejtek marker expressziójával (pl. hormonreceptorok). A technológia fluoreszcens festékekre használatára épül és ezek sokcsatornás detektálására és mérésére, teljesen hasonlatosan az áramlási citometriához.

Ezzel kapcsolatosan kérdezem, hogy tud-e a jelölt az LCS mikroszkópia/citometria mai rutinszerű alkalmazásáról a diagnosztikus patológiában?

Ezen a vonalon tovább haladva a rendszer-adta lehetőségeket kihasználva kidolgozta az automatizált immunfluoreszcencia és FISH analízis módszerét. Ennek lényege, hogy a keresett sejteket immunmarkerekkel azonosítja majd ezek genetikai elemzése (pl. HER2 amplifikáció) ugyanazon sejtekben FISH: in situ hibridizációval történik, valamennyi esetben fluoreszcens jelöléseket hasznosítva. Ennek feltétele volt a megfelelő mikroszkópos infrastruktúra fejlesztése és a képanalizáló algoritmus fejlesztése, ami Zeiss és Metasystem kooperációban valósult meg és a Metacyte programban manifesztálódott.

Ezen fejlesztések mai folytatásaként a 3DHistech, hazai KKV-vel együttműködve a *digitális mikroszkópiával kapcsolatos fejlesztéseket* végzett. Ezek egyik része a patológia régi kihívásával foglalkozik. A korszerű molekuláris vizsgálatok feltétele a minták pontos elemzése, a daganat/normál szövet elkülönítése és lokalizálása anélkül, hogy a festésekkel rontanánk a molekuláris elemzés esélyeit illetve feleslegesen használnánk el értékes mikroszkópikus szövetet. Erre igen alkalmas a szövetek/sejtek autofluoreszcenciájának felhasználása. Erre dolgozott ki fluoreszcens mikroszkópos eljárást és módszert a

sokcsatornás detektálásra melyet szabadalmaztatott, amivel a klasszikus szövettani festésekhez hasonlóan el lehet különíteni a fontos struktúrákat. Egy másik fejlesztésben a digitális metszetek képanalízise szempontjából a napi rutinban használható képanalizáló algoritmust fejlesztett, amely nem-fluoreszcens immunhisztokémiai jelölések értékelésére alkalmas.

Diagnosztikumok tesztelése/validálása: marker fázis-elemzések. Két tesztelési folyamatban játszott meghatározó szerepet. Az egyik az IQ-FISH technika alkalmazása a HER2 amplifikáció kimutatására. Itt a DAKO céggel együttműködve egy gyors HER2 FISH teszt összehasonlító elemzését végezte az IVD Hercep-teszt rendszerhez képest és igazolta, hogy az új eljárás nemcsak gyorsabb, hanem legalább olyan érzékeny vagy még érzékenyebb, mint az eredeti IVD eljárás, amivel segítette az új eljárás bevezetését a rutin gyakorlatba. A másik elemzés a BRAF mutáció genetikai elemzésének kiváltása immunhisztokémiával, ami a Ventana céggel együttműködésben valósult meg. Itt az újdonság a V600E mutáns BRAF specifikus antitest tesztelése volt Langerhans Sejtes Histiocitózis mintákon (15 eset). Az elemzés azt mutatta, hogy az IHC 93.3%-os egyezést mutatott a Sanger szekvenálással. Hogy ez sok vagy kevés arra nézve iránymutató az hogy molekuláris patológiai validációkban és minőségellenőrzésekben 95% feletti sikerességet várnak el. Az 1 esetbeli eltérés alacsony daganatsejtszám miatt jött létre. Az elemzésben IHC pozitív daganatsejteket mértek, nem voltak tekintettel a jelölődés intenzitására, így a daganatos populáció gyakorlatilag 100%-os mutáns voltát találták.

Ezzel kapcsolatban kérdezem, hogy van-e adat arra, hogy LCH-ban, vagy a konkrét esetekben a BRAF mutáció homo-vagy heterozigóta formában volt jelen, ami magyarázhatná (technikai okok helyett) az eltérő szintű protein expressziót? Szintén ehhez kapcsolódva kérdezem, hogy LCH-ban a BRAF mutáció klonálisan heterogén vagy homogén formában van jelen a léziókban?

Alkalmazott (patológiai) kutatások

Cervicalis hámsejtek ploiditásának jelentősége precancerosus állapotokban.

A korábban kifejlesztett LSC technikával elemezte a magas (>5/>9) ploiditás vagy aneuploidia az óriássejtek detektálásának prognosztikus/diagnosztikus értékét LSIL és HSIL

korai léziókban folyadékalapú citológiai preparátumokban amikor a HPV státusz is meghatározásra került. Pozitívnak a minimum 2 eseményt tartalmazó mintát tekintették.

Kérdésem mennyi sejtre alapozva (talán 10^4)? Miért ez volt a határérték, honnan származott?

Igazolták, hogy a súlyosabb atípiában magasabb a >c9 jellemzett poliploid esetek gyakorisága, mint a LSIL-ben.

Mivel magyarázható hogy az c5 esetében ez nem nyilvánult meg?

Az onkogén HPV pozitív esetekben szintén magasabb volt a poliploidia foka és a ritka onkogén HPVk esetében is magasabb volt a nem onkogén HPV fertőzött esetekhez képest. A HPV16 fertőzött esetekben az 5c 56% a 9c 42% volt.

Mivel magyarázható hogy nem 100% az ilyen ploidia változás gyakorisága?

Fontos az, hogy az ASCUS bizonytalan léziókban amellet hogy 27% oHPV pozitivitás van, 7%-ban c9 aneuploidia mutatható ki bizonyítva egy al csoport egyértelmű precancerous jellegét. Megjegyzendő hogy a 2-3. táblázat gyakorlatilag olvashatatlan. Fontos megfigyelés szintén hogy a 9c esetek incidenciája nő a CIN fokozatokkal (sajnos a statisztika nincsen bemutatva). Megállapításra került, hogy az aneuploidia érzékenysége magasabb a morfológia vagy az onkogén HPV-nél, de specificitása alacsonyabb. Ugyanakkor a pozitív prediktív érték a morfológiánál vagy a oHPV-nél magasabb volt. Sajnos irodalmi hivatkozás nem kísérte az ábrát vagy a szöveget, ahogy más esetekben is ez előfordult.

A továbbiakban az aneuprolidia és a kromoszómális kiegyensúlyozatlanság kérdését elemezte LSC-mel DNS festés és 3/17 kromoszóma FISH-el HSIL esetekben ahol az onkogén HPV volt jelen.

Mi volt az indoka hogy a 3 és 17 kr-t választották?

Igazolódott (ismeretlen számú esetben) hogy az aneuploidia összefügg a kromoszóma kópiaszám emelkedéssel. A két kromoszóma kiegyensúlyozatlan változásai alapján feltételezték, hogy klonális jelenség észlelhető a carcinogenezis progressziója során.

Keringő vagy csontvelőbe jutott izolált daganatsejtek kimutatása és genetikai elemzése

A keringő daganatsejtek kimutatása a mai korszerű onkológia forró témája mind prognosztikus szempontból mind a minimális reziduális betegség kimutatása szempontjából. Neuroblasztomás esetekben vérből vagy csontvelőből szeparált sejtszuspenzió készítményein (10^6 sejt) analizálta a daganatsejtek jelenlétét illetve jellegzetes genetikai sajátosságait automatikus képanalízissel Metasystem/Metacyte/RCDetect. A NBL sejteket GD2 IF jelöléssel azonosította, majd a genetikai eltéréseket FISH módszerrel többes elemzéssel kutatta (NMYC amp, 17qgain, 1p36 vesztés.) A módszerrel a NBL diagnózisa idején a morfológiailag megállapított 47%-nál gyakrabban (87%) igazoltak szisztémás disszeminációt. A kombinált AIPF elemzés a kezelések utáni MRD kimutatásában is hatékonyabbnak bizonyult a morfológiával szemben. ($1/10^4$ daganatsejt) Igazolódott továbbá hogy a csontvelői daganatsejtek genetikai jellemzői a primer tumoréval voltak megegyezők.

Kérdés: a közel 200 eset elemzése során tehát egyáltalán nem találtak genetikai eltérést a csontvelői sejtek és a primer tumor összehasonlításakor?

A módszert előrehaladott emlőrákos betegekben is tesztelték ahol 19 esetet vizsgáltak. 10 ml vérből nyert 10^6 sejtes citospin preparátumokon a daganatsejteket immunfluoreszcensen jelölték CK és MUC1 markerekkel, és 42%-ban igazoltak daganatsejtet, amelyek száma azonban igen széles skálán mozgott (1-128/10 ml vér? vagy 10^6 mononukleáris sejt?). Ez a magas arány nem meglepetés korábbi elemzésekhez képest.

Kérdés mi volt az előrehaladás klinikai/patológiai kritériuma? A talált szintek hogy viszonyulhatnak a CellSearch ivd technológia által meghatározott határértékekhez?

A TUNEL reakcióval kombinált elemzésekben kimutatták, hogy a keringő emlőráksejtek között nagyszámú apoptotikus sejt van és 15%-ban csak ilyeneket tudtak kimutatni. Kíváncos volna a kérdést tovább vizsgálni, hiszen a CTC kimutatásának klinikai jelentősége van, ahol kérdéses, hogy az apoptotikus sejtek egyenlő értékűek-e az intaktakhoz képest.

AuroraB mitotikus kináz expresszió patológiai szerepe

Kisebb emlőrákos kohorszon (50 beteg, sajnos nem homogén szövettanú csoport) elemezte a ki67-hez viszonyítva az Aurora B expressziót IHC-vel és egy (AMI) aránypárt határozott meg. Ez az arány összefüggést mutatott a G2M sejtek arányától (is). Emlőrákban a klasszikus prognosztikus faktor ki67 összefüggött az Aurora B expresszióval, de a tumorokat nagyon

széles spektrumban jellemezte. Fontos megfigyelés volt, hogy a HER2+ emlőrákok alcsoportjában az emelkedett volt az AuroraB a többi alcsoportéhoz képest. Ugyanakkor az AMI aránypár a tumorok 40%-ban volt emelkedett, azonban ez már nem függött a molekuláris (HER2) alcsoporttól. Legalább olyan érdekes az hogy a 17 poli- vagy aneusomiás esetek gyakoriak. Ez azért érdekes, mert a 17p13 régióban van a p53 és az AuroraB génje is. Bár a 17 polisomia gyakori a kromoszóma-hiba is: a 17p13 régió elvesztése áll ezzel kapcsolatban, tehát a p53 vagy az AuroraB veszteség, míg Aurora B amplifikációt vagy polisomiát nem észleltek. Mindazonáltal az AuroraB protein expresszió csökkenése a 17p13 veszteségekkel mutatott kapcsolatot.

Kérdésem hogy az ER/PR+ vagy a triplanegatív csoportban van-e szerepe az AuroraB kinázoknak?(mivel a ki67 szerepe itt is kitapintható)

Nyirokcsomók centrum germinatívumaiban a Ki67 expresszió magasabbnak bizonyult, mint a limfómákban. Ugyanakkor ezen területeken az AuroraB expresszió is igen magas. Limfómákban az AMI arány emelkedettségét >50%-nál határozták meg, ilyen esetek 26%-ban fordultak elő és erősen emelkedett érték is 16%-ban volt jelen. Elemzéseik szerint az emelkedett AuroraB szint a survivin emelkedett szintjével állt kapcsolatban. A 17p13 lokusz elemzése alapján az ezt érintő veszteségek nem álltak kapcsolatban az AuroraB expresszióval szemben az emlőrákokkal.

A bemutatott eredmények közül nagyra értékelem és originálisnak tartom az LSC technológia kidolgozását, amely elsősorban a többes jelölési módszerek alkalmazását teszi lehetővé. Hasonlóan originális technológia az immunfluoreszcencia és FISH technológia kombinálása és értékelő algoritmusok kidolgozása. Igen előremutató az autofluoreszcencia patológia felhasználásának kidolgozása, ami előtt nagy jövő áll. Igen hasznos munkát végzett újonnan kifejlesztett diagnosztikumok IQ-HER2FISH és mutáns BRAF specifikus antitest tesztelésében/validálásában.

Transzlációs kutatásai közül eredeti megfigyelés a cervix precancerosus lézióiban a poliploidia és óriássejtek jelentőségének tisztázása és ennek kapcsolata az onkogén HPV fertőzésekkel. Igen értékes a neuroblasztómás vizsgálat, ahol a csontvelői érintettség és MRD kimutatását az általa kidolgozott LSC alapú immunfluoreszcencia és FISH technológia kombinálásával végzett, amely érzékenyebb a klasszikus citológiai/morfológiai elemzéseknél.

Előremutatónak tartom az emlőrákos betegeken folytatott keringő daganatsejt vizsgálatokat ahol a legizgalmasabbnak az a kérdés tűnik, hogy ezen sejtek élnek e vagy halnak (saját eredményei alapján ezek jelentős százaléka apoptotikus) ami a ma bevezetett ivd-s technikák értékelési algoritmusainak megváltoztatását kellene, hogy magukkal vonják. Végül originális megfigyelés az emlőrákok egyes alcsoportjaiban az emelkedett AuroraB kináz expresszió, amely mögött nem áll genetikai változás (tehát epigenetikus?), azonban ez esetleg az aurora kináz inhibitor kezelés számára képezhetne értelmes alcsoportot.

Összefoglalva, Méhes doktor MTA doktori disszertációját és az abban bemutatott kutatásokat értékes munkának tartom, amely számos új eredményt tartalmaz, amelyek elegendőek az MTA doktori cím odaítélésére. Mindezek alapján a disszertáció nyilvános vitára tűzését javaslom.

Budapest 2016. április 12.

dr. Tímár József

az MTA doktora