

Válasz Dr. Döme Balázs, osztályvezető főorvos bírálatára

Ezúton is szeretném megköszönni főorvos úr munkáját, a bírálatra szánt idejét, a részletes értékelést és az MTA Doktori értekezés pozitív bírálatát.

A felvett kérdésekre, problémákra a válaszaim a következők:

1. *Tekintettel a rendkívül heterogén beteganyagra, a bevezetőben - vagy még inkább a "betegek" fejezetben - hasznos lett volna az egyes betegségtípusokról jelenleg rendelkezésre álló up-to-date klinikopatológiai ismeretek rövid tárgyalása, majd annak bemutatása, hogy a vizsgált biomarker(ek) miért és hogyan kerültek kiválasztásra az adott betegséggel kapcsolatos jelenlegi ismereteink illetve a legégetőbb diagnosztikus/terápiás kérdések tükrében.*

Válasz: A bíráló által javasolt "Bevezetés" struktúra - a vizsgált betegségek bemutatása, amit ezek biomarkereinek leírása követ - alapvetően egy klinikai, betegség orientált gondolatmenetet tükröz. Laboratóriumban dolgozó orvosként én más megközelítést választottam. Tettem ezt azért is, mert ahogy a bíráló találóan megfogalmazta, a dolgozat "köötanyagát" alapvetően a biomarker kulcsszó jelenti. A Bevezetés részt ezért a biomarkerek általános jellemzésével kezdtem: bemutattam a biomarkerek általános definícióját, történetét, típusait, majd a biomarker fejlesztés, valamint a biomarkerek analitikai és klinikai validálásának legfontosabb lépéseit. Ismertetésre kerültek az analitikai és klinikai teljesítmény jellemzésére alkalmas paraméterek, majd ezt követte végül a Disszertációban szereplő biomarkerek, biomarker csoportok részletesebb jellemzése. Ebben az utóbbi részben már sok adat szerepel a vizsgált biomarkerek jelenleg ismert és potenciális klinikai alkalmazásairól is. Az egyes vizsgált betegségek rövid klinikai jellemzései és a biomarker tesztek céljai a "Betegek" és az "Eredmények" részbe kerültek és kétségtelenül kevésbé hangsúlyosak.

Összefoglalva, tehát a bíráló által javasolt logika valóban segíthette volna a felmerült klinikai kérdések jobb megvilágítását és érthetőbb megválaszolását, azonban elvette volna a helyet a biomarker kérdéskör részletesebb tárgyalásától. Kevesebb hely jutott volna a biomarkerek fejlesztésének, validálásának és alkalmazásának diszkutálására általában és a vizsgált egyedi markerek esetében is, ami hangsúlyos célkitűzése volt ennek a munkának. Másképpen megfogalmazva a Disszertációban nem egy-egy klinikai probléma alapos körbejárása volt a cél. Ehelyett egy-egy klinikai kérdés és annak megoldása a biomarkerek alkalmazásának egy-egy érdekes aspektusát (pl. diagnózis felállítása, analitikai és klinikai validálás, preanalitikai problémák, kompozit score-ok kialakítása) hivatott illusztrálni.

2. Más egységeiben ugyanakkor feleslegesen részletező a dolgozat. Nem világos például, hogy a bevezetőben (2.4.4. alfejezet) miért próbál a jelölt általános áttekintést nyújtani (a klinikai onkológia teljes spektrumában!) már használatos vagy még csak ígéretesnek tűnő tumormarkerekről. Ennek magas színvonalú diszkutálása tankönyvi terjedelmet igényelne, így egy doktori dolgozat bevezetőjében ez természetesen lehetetlen vállalkozás és csak olyan felületes fejezetekhez vezet melyeket például a "hormonok" címszó alatt (2.4.4.3) találhatunk: "Az endokrin szervek tumorai és az egyéb szervekben lévő neuroendokrin szöveteiből kiinduló daganatok jellegzetes hormontermelése is segítheti a tumor diagnosztikát. Az ektópiásan termelt hormonok közül leggyakrabban az ACTH, ADH, β HCG és Calcitonin termelése fordul elő". Ide kapcsoló kritikám, hogy szerencsésebb lett volna, ha a bevezetőben a szerző kizárólag az általa vizsgált (és már eleve túl heterogén) "tüdődaganatok" entitásra fókuszál és nem próbálja meg összefoglalni az agydaganatoktól a prosztata tumorokig a legkülönbözőbb szolid daganattípusokban validált vagy tesztelés alatt álló tumormarkerekkel kapcsolatos tudásunkat.

Válasz: A tumormarkerek bemutatása során valóban a teljességre igyekeztem törekedni, ezért ha néhány mondatban is, de szerettem volna minden rutin diagnosztikus markert megemlíteni, hogy teljes vertikumban lehessen látni a jelenleg rendelkezésre álló tumormarker repertoárt. Ezen belül természetesen részletesebben jellemeztem azokat a teszteket, amelyek a Disszertációban bemutatott vizsgálatok (tüdőrák és rheumatoid arthritis) során mi is meghatároztunk. Amit különösen fontosnak éreztem bemutatni a "2.4.4.8. A szérumban tumormarkerek gyakorlati alkalmazásai, nemzetközi guideline-ok" c. fejezetben olvasható. Bár a rutin diagnosztikai gyakorlatban nagy számú tumormarker vizsgálat elérhető, a legaktuálisabb, evidencia-alapú guideline-okat áttekintve a klinikai döntéshozatal során figyelembe vett tesztek száma alacsony. Ezzel azt szerettem volna hangsúlyozni, hogy a jelenleg elérhető tumormarkerek klinikai hatékonysága nem kielégítő, és új, jobban működő markerek fejlesztésére van szükség.

3. Az egyes vizsgálatokban a kontroll csoportok megalkotásakor csak korban és nemben párosított egészséges személyek kerültek beválasztásra. Mi ennek az oka? A betegeknek nem voltak olyan társbetegségei amelyek - a vezető betegség mellett - az adott biomarker szintjét befolyásolhatták volna?

Válasz: A bíráló felvetése teljesen jogos és észszerű, hiszen a mindennapi gyakorlatban valóban túlnyomó részt nem teljesen egészséges és beteg emberek között kell "különbséget tennünk", hanem az adott beteg panaszainak hátterében kell azonosítanunk sok kóros állapot közül egy (vagy néhány) konkrét betegséget. Ennek megfelelően a klinikai kutatás során is szükséges az egészséges kontrollok mellett egy (vagy több) klinikai/beteg kontroll csoportot is tesztelnünk. A gyakorlat az mutatja, hogy az ilyen jellegű kontrollok beválasztása általában a biomarker validálás egy későbbi fázisában történik meg. Az első kérdés az, hogy az adott teszt képes-e egyáltalán különbséget tenni az egészséges és a cél betegcsoport között, és ha az eredmények biztatóak lehet tovább finomítani a vizsgálatot klinikai kontroll csoportok bevonásával.

Az MTA Disszertációmban bemutatott vizsgálatok közül is volt olyan, amelyben nem csak egészséges kontrollok szerepeltek. A májcirrhosisos betegek ANCA vizsgálata során alkalmaztunk beteg kontroll csoportot az egészséges kontrollok mellett. Ebbe a vizsgálatba 385 különböző etiológiájú cirrhosisos beteg került bevonásra, és emellett 119 krónikus hepatitis C fertőzött, illetve 102 primer biliáris cirrhosisos beteg vett részt, akiknél még nem alakult ki cirrhosis. Ezek mellett 100 korban és nemben illesztett egészséges kontroll mintáit is megvizsgáltuk ebben a studyban. A másik májcirrhosis vizsgálatban pedig a fertőzéssel jellemezhető és infekció mentes betegek eredményeit hasonlítottuk össze.

Egy éppen most induló új vizsgálat során a glycoprotein-2 (GP2), mint biomarker alkalmazhatóságát vizsgáljuk az akut pancreatitis diagnosztikájában és a betegség kimenetelének előrejelzésében. Ebbe a vizsgálatba a sürgősségi osztályon akut, hasi panaszokkal jelentkező betegek kerülnek beválasztásra - tőlük veszünk vért a felvételkor. Attól függően, hogy később igazolódik-e a pancreatitis diagnózisa soroljuk két csoportba a betegeket - akut pancreatitis vs. beteg kontroll (Dr. Papp Mária tanárnővel közös munka).

Egy harmadik példa a saját munkáinkból. A QP69/QP300 array-k segítségével egészséges kontrollok és tüdőrákos betegek összevetésével azonosított 21, tüdőrák specifikus markert egy folyamatban lévő vizsgálatban már nem csak tüdőrákos betegeken és egészséges kontrollokon vizsgáltunk meg, hanem egy COPD-s betegpopuláción is (Dr. Takács László professzor úrral közös munka). Ebben az esetben ennek a kontroll csoportnak a vizsgálata azért is jelentős, mert van olyan elképzelés is, mely szerint a COPD a tüdőrák kialakulásának "előszobája". Néhány olyan betegünk is volt, akinél a végső diagnózis penumonia illetve sarcoidosis volt, egy-egy ilyen klinikai kontroll csoport vizsgálatának szintén volna jelentősége.

4. A CD14 expresszió vizsgálatokba bevont mindössze 10 intrinsic és 20 extrinsic AD beteg túl alacsony esetszámoknak tűnnek érdemi konzekvenciák levonásához.

Válasz: A bíráló megjegyzése helytálló, az említett vizsgálatban valóban alacsony különösen az intrinsic atópiás betegek száma. Ennek egyszerű gyakorlati oka van. Általában is elmondható, hogy az atópiás dermatitisek között az intrinsic betegek aránya 10-20% között van populációtól függően. Egy nemrégiben publikált magyar adat szerint ez 12% (G. Ponyai et al., *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2008, 22:1346-1355). Ugyanakkor jelentős mértékben befolyásolja ezt az arányt a betegség fennállásának ideje és a betegség súlyossága, kiterjedtségének mértéke. Minél hosszabb ideig áll fenn az elváltozás és minél nagyobb bőrfelületet érint annál nagyobb az esélye, hogy a megváltozott barrier funkcióval rendelkező bőrön keresztül valamilyen allergénnel szemben szenzitizáció alakul ki. A mi vizsgálatunkba fiatal felnőttek vettek részt, hosszabb betegség fennállás után súlyos bőrtünetekkel. Ebben a populációban nagyon nehéz nem szenzitizált, intrinsic csoportba sorolható betegeket találni. Az extrinsic betegek számát tudtuk volna tovább növelni, de ezek túlsúlya sem lett volna szerencsés a statisztikai értékelések során.

5. *Sem a bevezetőben, sem máshol nem derül ki, hogy a jelölt a sok száz potenciális pulmoonkológiai biomarker közül miért éppen a HE4-el kezdett foglalkozni. Az egyetlen utalás erre a szövegben (6.2.4.1.) így szól: "Az egyik ilyen lehetséges új alternatíva a Human epididymis protein 4 (HE4), amely a petefészek tumor diagnosztikájának viszonylag új eleme, és szórványos adatok szólnak arról is, hogy ez a tumormarker tüdőtumorban is emelkedett lehet."*

Válasz: A rutin diagnosztikai laboratóriumban dolgozó szakemberek számára gyakran a külső, objektív feltételek alakulása befolyásolhatja egy klinikai vizsgálat elindítását. Intézetünkben 2010. decemberében került bevezetésre rutin diagnosztikus vizsgálatként a HE4 tumormarker mérése, mely az ováriumrák diagnosztikáját szolgálta. Ezzel csaknem egyidőben zajlott egy NKTH által támogatott kutatási pályázatunk, melynek keretében nagy számú rákos beteg szérum és plazma mintáiból állítottunk össze biobankot. Rendelkezésünkre állt tehát egy új módszer és egy olyan beteg minta pool, amelyen ezt a markert még nem tesztelték kimerítően; sporadikus publikációk voltak az irodalomban kisebb betegpopulációt tesztelve viszont ígéretes eredményeket bemutatva. Másrészt ismert volt az is az irodalomban, hogy a tüdő adenocarcinoma és laphámrák sejteiben fokozott a HE4 expressziója immunhisztokémiai módszerrel vizsgálva, amit a HE4-t kódoló WFDC2 gén fokozott expressziója magyarázott (MT. Galgano et al., *Mod Pathol*, 2006, 19:847-853; L. Bingle, et al., *Respir Res*, 2006, 7:61-71). Mindezek alapján racionálisnak tűnt a HE4 szint vizsgálata a tüdőrákos betegek szérumában, és ezért indítottuk el ezt a vizsgálatot.

6. *A dolgozatban többször is pontatlanul/helytelenül szerepel a "tüdőtumor" kifejezés. Ezen néhol segítene a szó többes számban történő használata is, máshol viszont (pl. "6.2.4.1. HE4 - a tüdőtumor diagnosztika lehetséges új markere" első mondat: "A tüdőtumor a világon a második/harmadik legnagyobb incidenciájú rosszindulatú daganat") kifejezetten félrevezetően fogalmaz a szerző. Ennél a példánál maradva sokkal szerencsésebb lett volna a "tüdőrák" kifejezést használni, hiszen nem minden tüdőtumor malignus.*

Válasz: Egyet kell értenem a bíráló megjegyzésével. A tüdőtumor elnevezés valóban pontatlanul szerepel a Disszertációban. A tüdőrák elnevezés alkalmazása lett volna helyes.

7. *A HE4-tüdőrák study populáció túl heterogén (4 különböző stádium, 4 daganat altípus, egyes csoportokban extrém alacsony esetszámmal). A vizsgálatban szereplő daganattípusoknak eltérő a patomechanizmusa, a kezelése és a prognózisa is. Talán még a legnagyobb esetszámú (n=33) laphámrák alcsoport is túl kevés beteget tartalmaz ahhoz, hogy a mérésekből érdemi következtetéseket lehessen levonni. Az 5 ill. 15 beteget tartalmazó nagy-ill. kissejtes betegcsoportok analizésének létjogosultságát pedig végképp nehéz megindokolni.*

Válasz: A bíráló felvetésével ebben az esetben is egyet kell értenem. A HE4 eredményeket bemutató közlemény "Discussion" részében mi magunk is leírtuk ezeket a problémákat, mint a publikáció gyenge pontjait: "Limitations of this study include its relatively small sample size, and heterogeneity of the lung cancer cohort, having a very small set of patients with SCLC". A HE4 study-ba összesen 98 tüdőrákos férfi beteget vontunk be és hozzá korban és

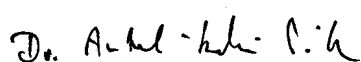
nemben illesztettünk kontrollokat. Ez a közlemény megjelenésekor a második legnagyobb esetszámú vizsgálat volt az irodalomban, mely a HE4 szintjét vizsgálta tüdőrákos betegek szérum mintáiban. A stádiumokra és szövettani alosztályokra való bontás értelemszerűen kisebb csoportokat eredményezett, de úgy gondoltuk, hogy ezeknek az eredményeknek a bemutatása is érdekes lehet az olvasók számára, bár egyértelmű, hogy ezek az eredmények további vizsgálatot igényelnek jóval nagyobb létszámú alcsoportokon.

Ugyanakkor egy relatíve heterogén tüdőrákos populáció vizsgálatának is lehet valamennyire létjogosultsága, hiszen ez modellezi legjobban a klinikai gyakorlatot: egy új beteg vizsgálatakor, vagy egy egészségesnek gondolt egyén szűrése esetében még nem tudjuk pl. a szövettani típust, de már szükségünk lenne egy olyan markerre, amelyik érzékenyen felismeri valamelyik/bármelyik tüdőrákot. Értelemszerűen homogén szövettani csoportok vizsgálata esetében nagyobb az esély specifikus adenocarcinoma, laphámrák vagy egyéb szövettani entitásra specifikus markerek azonosítására.

8. A tüdőrák eredmények diszkussziójának (7.1.2.; 114-117 oldal) csak elenyésző részében (kb 7-8 sorban) foglalkozik a szerző a saját eredményeivel, helyette inkább - egy egyébiránt remek - áttekintést ad a tüdőrák szűrésének lehetőségeiről és a szóba jövő imaging és biológiai markerekről.

Válasz: A bíráló megjegyzése ebben az esetben is helytálló. A HE4 eredményeket bemutató közlemény "Discussion" részében jóval több szó esik a HE4 marker kiválasztásának háttéréről, a HE4 és különböző preanalitikai faktorok - általunk is észlelt - összefüggéseiről, az irodalomban megjelent egyéb HE4-tüdőrák publikációk eredményeiről, a HE4 és egyéb tumormarkerek klinikai hatékonyságának összevetéséről, a marker kombinációk alkalmazhatóságáról, a HE4 potenciális prognosztikai szerepéről és a vizsgálat gyenge pontjairól. Ezek közül több elemet is beemelhettem volna a "Megbeszélés" részbe, de végül oda csak a markerkombinációk jelentőségének diszkussziója került be. Ennek legfőbb oka a Disszertáció kissé heterogén összetétele, amit a bíráló is említ értékelésében. Ha a meglehetősen szerteágazó munka minden elemének diszkussziója követte volna a Disszertáció alapjául szolgáló közlemények analóg fejezeteit, akkor az amúgy sem rövid értekezés még hosszabbá vált volna. Ehelyett a vizsgált markerek legizgalmasabb és legfontosabb potenciális alkalmazásának részletes diszkusszióját készítettem el, az irodalmi adatok áttekintésével. A tüdőrák esetében ez a korai szűrés lehetőségeinek bemutatását jelentette, és ebben a kontextusban értékeltem aztán a saját eredményeinket is röviden, hangsúlyt helyezve az általam legjelentősebbnek gondolt marker kombinációk vizsgálatára.

Még egyszer szeretném megköszönni főorvos úr részletes értékelését és az MTA Doktori értekezés pozitív bírálatát.



Dr. Antal-Szalmás Péter
egyetemi docens

Debrecen, 2017. február 15.