

Opponensi bírálat

Kulka Janina: Prediktív és prognosztikai vizsgálatok emlőkarcinómában

című MTA doktori értekezéséről

A Doktori Értekezés témája a nőkben leggyakoribb neoplázia, az emlőrák klinikopatológiai, biológiai sajátosságainak, valamint klinikai összefüggéseinek elemzése. A humán és egy kis fejezet erejéig kutya emlőrák szöveteken végzett kutatói munka szorosan kapcsolódik a szerző diagnosztikus tevékenységéhez, aki az egyik legelismertebb hazai emlőpatológiai centrum vezető patológusa és munkacsoportjával évtizedek óta ezen a területen tevékenykedik. A sok látott eset és nagy klinikopatológiai tapasztalat könnyen kivitelezhetővé teszi a nagyobb esetszámokon alapuló vizsgálatokat, ráadásul megfelelő adatbázis és a szövetminták hozzáférhetősége is biztosított. A dolgozatban említett 2000-2009 közötti időszakban a szerző és munkatársai 1100 feletti esetet katalogizáltak, melyből magától értetődőnek tűnik egy-egy tanulmány számára megfelelő, statisztikailag értékelhető darabszámot kiválasztani. Külön érdek, hogy ritka, de a kezelés szempontjából speciális elváltozások (pl. terhességi emlőrák, fiatalkori emlőrák) is nagyobb számban állnak rendelkezésre és több szempontból elemzésre is kerülhettek.

Az Értekezés további általános érdeme az igen változatos metodikai arzenál, a klasszikus szövettani módszereken túl eredményeiket tissue microarray, FISH, qPCR, RT-PCR, Western-blot, confocalis laser mikroszkópia bevetésével érték el. Mindezeket a szerző igen céltudatosan és professzionális szinten alkalmazza célkitűzései megválaszolására.

A tézisek lényegében az emlőkarcinómák kimenetelét potenciálisan befolyásoló klinikopatológiai és biológiai sajátságokkal foglalkozó 9 különálló részből állnak, mindegyik egy-egy tanulmány eredményein alapul. Néhány témakör az emlőrák mára klasszikusnak számító prognosztikai biológiai sajátságait (hormonreceptorok, Her-2 génműködés, sejtproliferációs index, őrszem nyirokcsomók) elemzi szövettani-technikai aspektusokból, a fennmaradó rész viszont a szövettani rutinban egyelőre nem szereplő innovatív kutatási eredményeket mutat be (claudinok, génexpresszió). A munkák egyik legfőbb erénye, hogy a klinikai adatbázisok használatával a legtöbb esetben a vizsgált szöveti paraméterek és a betegség kimenetele közötti összefüggéseket is részletesen vizsgálják és feltárják.

A dolgozat híven követné az értekezések klasszikus szerkezetét, azonban az egyes témaköröknek megfelelően tördelve, valójában külön bevezetéseket, metodikát, eredményeket és megbeszélést tartalmaz. Mindez igazán jól követhető struktúrát alkot, az olvasó azonban hiányolhat egy átfogó bevezetést az emlőrákok biológiájáról és a kezelés kihívásairól – beleértve a legújabb terápiás célpontokat is. A hormonreceptorok hatásmechanizmusának, a Her2/neu jelátvitel ismereteinek vagy pl. az egyes claudin fehérjék funkciójának a felelevenítését követően jobban lehetett volna utalni az egyes klinikopatológiai észlelések jelentőségére, a kezelés hatékonyságának, vagy éppen a progresszió bekövetkeztének logikájára. A kutatási anyag sorrendje valójában nem különösebben lényeges, azonban a bevezető szintjén elsősorban kissé nehezen érthetően esetlegesen tűnő módon keverednek a klinikai, patológiai és molekuláris kérdéskörök.

Az Eredmények alfejezetei szemléletesen és bőségesen mutatják be az adott projekt részleteit, és a legtöbb esetben a klinikai kimenetellel való összefüggéseket is látjuk. A sok ábra (összesen 44 darab) és táblázat (47darab) döntő többsége eredeti, saját eredményt mutat, bőséges statisztikával, többnyire szemléletesen, gyakrabban a mű számára újrarajzolva, írva. A Megbeszélés lényegében a Bevezetésben megfogalmazott kilenc megvizsgált kérdéskör rövid összefoglalását, elemzését jelenti, a legfontosabb, azóta megjelent irodalmi hivatkozások, szemléletek, dilemmák felsorolásával kiegészítve. Az Irodalomjegyzék 388 hivatkozást tartalmaz, korrekt módon a legújabb releváns eredmények is képviselve vannak.

A doktori értekezés szövegében igen kevés formai, szerkesztési kifogás emelhető. Helyenként a szerző kicsit előre szalad és saját részeredményeket közöl, pl. már a Bevezető 1.9 alfejezetében. Hasonlóképpen az Anyagok és Módszerek részben is szerepelnek a vizsgálati mintákkal kapcsolatos, eredmények tekinthető adatok (pl. 8., 11. és 19. táblázat).

Az Értekezés tanulmányozása után a következő kérdéseket tartanám fontosnak tisztázni:

1. Emlőrákok hormonreceptor pozitivitása kapcsán a leggyakoribb az ER és a PR ko-expressziója, ehhez képest kedvezőtlen tényezőnek találták a csökkent PR expressziót, ill. negativitást. Ismertek-e a PR reguláció genetikai/epigenetikai aspektusai és ezek mennyiben függnek össze az ER expresszióéval. Mennyire lehet

dinamikus az esetleges szétkapcsolódás és miért javíthatja ez a tumorsejtek túlélését? Mit jelent biológiai értelemben a 20%-os expressziós küszöb?

2. A bevezetőben az általános megítélésnek megfelelően kritikusan említi a Ki-67 index evidenciáit és reprodukálhatóságát a klinikai gyakorlatban, bár a klinikum részéről nyilvánvalóan óriási az igény ezen egyszerű számadat rendszeres alkalmazására. Másokhoz hasonlóan a jelölt saját eredményei (76. old.) is azt mutatják, hogy a magas proliferációs indexű (LUMBp) csoport minden szempontból kedvezőtlenebb kategóriába tartozik. A Ki-67 elleni antitestek – a diagnosztika számára igen fontos - összehasonlító vizsgálatai (4.3 alfejezet) azonban a célfehérje meghatározásával kapcsolatos kételyeket csak tovább erősítik. Bár mára az antitestklón kérdése a korábbiakhoz képest letisztultabb (a MIB1 klón alkalmazása tűnik elterjedni), az ugyanazon antitesttel tapasztalt interlaboratory és interobserver variabilitás továbbra is komoly akadálya a Ki-67 marker jobb klinikai megítélésének. Vajon hogyan lehetne ezeket a hibaforrásokat a napi rutin vizsgálatok során kiküszöbölni? Milyen lehetőségeket lát a sejtproliferáció egzakt vizsgálatára és annak minőségbiztosítására?

3. Her2 kópiaszám vizsgálataikban a 17q poli/aneuszómia előfordulását és jelentőségét is megállapították. A korábbi tanulmányban a Ventana automatizált FISH módszertanát alkalmazták, amely az eredeti változatban kizárólag a HER2 lókuszt specifikus próbát tartalmazta FITC jelöléssel (1158 eset), melyet követett egy CEP17 próbával kiegészített HER2 FISH vizsgálat is (94 eset). Az első tanulmányban kimutatott 40 (3,5%) tisztán poli/aneuszómiás emlőrák után (80. old) a kiegészített FISH ennél jóval nagyobb arányban mutat poli/aneuszómiát (31/98, 31,6%)(85. old). Feltételezem, hogy az utóbbi tanulmány eredménye a mérvadó, bár az arány igen magas. Az esetek pontos megítélése újabban kitüntetett szerepet kap az egyértelmű prediktív szerep mellett annak a fényében is, hogy ezek az esetek potenciálisan hordozhatják a kromoszomális instabilitás (CIN) fenotípust és egyidejűleg természetesen aneuploidiát mutatnak. Lehet-e ennek külön prognosztikai szerepe? Ebből a szempontból azt is érdekes lenne megtudni, hogy vajon mennyi lehetett a HER2 génamplifikáció kíséretében egyidejűleg fennálló poli/aneuszómiás esetek

aránya? Észleltek-e saját anyagukon a HER2 poli/aneuszómia csoportban CIN-re utaló, vagy más agresszív irányú génexpressziós eltéréseket?

4. Kiterjedtebb mRNS expressziós vizsgálataik eredményeként elsősorban a grade 2-es emlőkarcinomák prognosztikai elkülönítésére és az anti-ösztrogén terápia predikciójára vonatkozó 3 génes expressziós panelt állítottak fel. A génexpressziós profilok interpretációját megkönnyítendő, bioinformatikai vagy matematikai formulákat alkalmaztak, amit complex (CJS) és simplified junctional signature (SJS) értékekkel jellemeztek. Szerencsés lett volna a metodika kifejtése kapcsán az értékek tartalmára, a módszer validálására vonatkozó információkat is közölni...
5. A claudinok emlőszöveti expresszióját elemző tanulmány igen értékes és ígéretes eredményekkel zárul. Sikeresen alkalmazták a claudin4/e-cadherin (CC) értéket a daganatok agresszivitásának jellemzésére. A Megbeszélés részben az expresszió változásának, egyes esetekben (pl. claudin 4) fokozódásának potenciális mechanizmusai is megvitatásra kerülnek. Ebből is megállapítható, hogy egyértelmű génelterés, vagy rendszeres mRNS expressziós hatás (stimulus) nem áll fenn az IHC eltérések hátterében, a szerző röviden esetleges poszttranszlációs modifikáció, ill. az egyes claudinok fokozott eliminációja irányában spekulál. Van-e ezen mechanizmusok meglétét alátámasztó adat a vizsgálatok befejezése óta eltelt időből?
6. Nyilvánvaló, hogy munkái során a szerző a claudinok vizsgálatára, mint eszközre tekint az emlő- és egyéb daganatok jellemzéséhez. Pont ezért nem mellékes kérdés azonban, hogy a tight-junction complex egyes alkotóinak megjelenése milyen módon járulhat hozzá a tumorsejtek agresszív viselkedéséhez. Kapcsolódási struktúráról lévén szó, a csökkenést még csak értenénk, de mi a helyzet a fokozott expresszióval? Vannak-e saját megfigyelések, esetleg irodalmi adatok arra vonatkozóan, hogy egy neopláziában az egyes claudinok milyen konkrét hatással lehetnek a sejtek túlélésére, adhéziójára, migrációjára, stb.?
7. A szerzők immunhisztokémiával és mRNS szintjén is foglalkoztak az Aurora kináz A expressziójával. Volt-e lehetőség a gén emlőrákokban is leírt amplifikációját vizsgálni?

Mekkora lehet itt a génamplifikáció szerepe és milyen a viszonya a fehérje, ill. RNS-expressziós eredményekkel?

8. A stromális válasz vizsgálata kapcsán primer szisztémás kemoterápiát követően igen látványos különbségeket mutattak ki az egyes szöveti (matrix) alkotók tekintetében: a kollagén IV kedvező válasz esetén, a tenascin C progresszív esetben mutatott jelentős felszaporodást. Feltehetően nem független mindez azonban a tumorban található sejtes környezettől. Milyen kapcsolat várható a matrix összetétele és a primer tumorban fellelhető stromasejtek, esetleg gyulladásosejtek száma között? Mennyire ismert a tumorsejtek által expresszált fibroblast-stimuláló növekedési faktor, citokin profil prognosztikai/klinikai szerepe?

Dr. Kulka Janina MTA Doktori Értekezésében bemutatott kutatási eredmények a hazai és nemzetközi emlőrák kutatás és diagnosztika élvonalát képviselik, munkájával tevőlegesen hozzájárult az emlőkarcinómák biológiájának megértéséhez és egyes prediktív és prognosztikai jelek, paraméterek gyakorlati alkalmazásához. A kutatómunka és az értekezés magas színvonala alapján az értekezés nyilvános vitára bocsájtását javaslom és ennek sikere esetén részemről az MTA doktori cím odaítélését támogatom.

Debrecen, 2017. március 19.

Dr. Méhes Gábor
egyetemi tanár
az MTA doktora