

Bíráói vélemény

Dr. Kulka Janina:

„Prediktív és prognosztikai vizsgálatok emlőkarcinómában”

című MTA doktori értekezéséről

Opponens: Szentirmay Zoltán M.D., Ph.D., dr.h.c.

Az utóbbi évtizedekben a patológiai vizsgálat értéke nagyon megnőtt, mert nem csak az adott beteg daganat-diagnózisát adja meg, hanem az elvégzett műtét minőségéről, a daganat várható kórlefolyásáról, a kezelés hatékonyságát befolyásoló morfológiai és genetikai faktorokról ad felvilágosítást és ezek együttesen teszik lehetővé a hatékony személyre szabott célzott kezelést. A fenti adatok szolgáltatása a szövettani kép egyre finomabb elemzésén túl egyre bonyolultabb módszerek alkalmazását ezek fokozatos fejlesztését, továbbá folyamatos értékelését teszik szükségessé abból a célból, hogy új eredmények születhessenek. Ez a problémák sokfélesége miatt nemzetközi összefogás nélkül nem lehetséges. Dr. Kulka Janina ebben a munkában sok éve részt vesz olyan módon is, hogy emlőrakkal foglalkozó nemzetközi munkacsoportok tagjaként saját fejlesztésekkel, új adatokkal és az adatok értékelésével egyénileg is hozzájárult az említett daganat csoport egyre javuló ellátásához, ezen belül egyes emlőrák-alcsoportok fejlődésmenetének jobb megértéséhez, és hatékonyabb egyedi terápiájához. Mindezt azért bocsájtom előre, mert a disszertáció értékelésekor elsősorban azokra a fejezetekre fókuszálok, amelyekben Jelölt és munkacsoportjának kutató munkája megítélésem szerint a betegellátás szempontjából jelentős új eredményekre vezetett.

Ezek után az alábbi 5 fejezetet értékelem részletesebben:

1. Hormonreceptor, cErbB2/Her2 és Ki67 klinikopatológiai paraméterek szerint történő emlőrák prognosztikai osztályozás

Az emlőrák immunhisztokémiai hormonreceptor státusa egyedül az egyik legfontosabb prognosztikai és prediktív faktor. A téves meghatározás ugyanis nagyon súlyosan befolyásolja a daganatos betegség kimenetelét. Az Európai Emlőszűrő Patológus Munkacsoport (EWGBSP), amelynek munkájában Jelölt is részt vett kimutatta, hogy az értékelés laboratóriumonként messze nem egységes. Ezért az EWGPB olyan együttes ajánlást fogalmazott meg, amely egységesíti az értékelést és segíti a technikai hibák elkerülését.

A HER2 státus ez egyik legfontosabb prediktív tényező az emlőrák várható lefolyásának megítélésében. Vizsgálata azért is alapvető fontosságú, mert az orvostudomány történetében ennek segítségével lehetet kifejleszteni az első hatékony célzott daganatellenes kezelést. A HER2 státus meghatározása immunhisztokémiai és FISH módszerekkel történik. Kulka Janina dr. és munkacsoportja több mint 1000 tumor mintán részletesen analizálta és optimalizálta ezeket a módszereket, továbbá összefüggést tárt fel a HER2 amplifikált daganatok súlyossági fokozata és az ER/PR státus tekintetében.

Az irodalom nem egységes a Ki67 immunhisztokémiai proliferációs marker hasznosságának megítélésében. Jelölt és munkacsoportja a kereskedelemben kapható 5 immunhisztokémiai marker összehasonlító vizsgálatát és értékelését végezte el, meghatározták a leginkább szenzitív, és a kórlefolyással legjobban korreláló markert, ami a daganat gyógyszeres kezelésével is összefüggött. A gyakorlati emlőrák diagnosztika szempontjából nagyon fontos Jelölt vizsgálata, amelyben kimutatta, hogy a különböző Ki67 markerek használata egymástól eltérő prognosztikai információval jár.

Mindezek a vizsgálatok összességükben azért nagy jelentőségűek, mert ezeken alapszik az emlőrákok mai legkorszerűbb prognosztikai patológiai beosztása. A 2000-ben közölt újabb emlőrák osztályozás két nagy csoportot, az ER pozitív és ER negatív emlőrákok csoportját különítették el. Gén-expressziós vizsgálatokkal az ER pozitív csoporton belül Luminalis A és Luminalis B típusokat, az ER negatív csoporton belül HER2 pozitív és Bazális (triple-negatív) típusokat különböztettek meg. Ezek a csoportok csak a fent tárgyalt patológiai paraméterek alapján is felállíthatók, sőt finomíthatók, továbbfejleszthetők voltak. Jelölt és munkacsoportja 698 tumor mintán a fent optimalizált paraméterek segítségével vizsgálta e daganat csoportok prognosztikai értékét és összefüggését a TNM státussal. Munkájuk konkluzív eredményekre vezetett, eredményeiket meggyőző Kaplan-Meier túlélési görbéken mutatták be. Jelölt és munkacsoportja vizsgálatainak fő értéke abban áll, hogy megmutatták a fent említett markerek rendszeres felülvizsgálata nélküli használatának veszélyét, ami egyébként hasonló tumorok eltérő megítélésére vezethetnek és a betegek onkológiai ellátása véletlenszerűen döntően különböző lehet.

2. Claudin expresszió normál emlőszövetekben, jóindulatú és rosszindulatú emlő-elváltozásokban

Korábban az irodalomban kevésbé volt ismert, hogy a claudin expresszó milyen mintázatot mutat ép emlőszövetekben és különféle jó- és rosszindulatú emlő elváltozásokban.

Claudin 1 expresszió a jóindulatú emlő elváltozásokban és in situ carcinomákban az ép hámhöz viszonyítva nem csökkent, carcinomákban a gradingtól függetlenül nagyon erősen lecsökken vagy negatívvá válik. Ez a megfigyelés önmagában is prognosztikai jelentőségű, mert a nagyon alacsony claudin-1 expresszió nyirokcsomó metasztázissal rendelkező betegek szignifikánsan rosszabb várható kórlefolyására utaltak. Jelölt és munkacsoportja azonban egy ennél komplexebb és általánosabban használható prognosztikai score rendszert hoztak létre az E-cadherin és claudin 1, 2, 3, 4, 5, 7 expressziós mintázata alapján, amelynek segítségével az emlőrákokat kedvező és kedvezőtlen kórlefolyású csoportra lehetett bontani. Ezt az expressziós profilt tovább egyszerűsítve létrehozták a claudin-2, 4 és E-cadherinből álló, egyszerű és általánosán használható, de ugyanolyan prognosztikai értékű CURIO, vagy másképpen Cadherin-Claudin (CC) csore-t, amelynek validációját 387 emlő tumoros mintán végezték el. Megállapították, hogy a score értékek relapszus-mentes túlélés vonatkozásában szignifikánsan elkülönít egy jobb és kedvezőtlenebb prognózisú betegcsoportot. Vizsgálataikat kiterjesztették különböző daganat-alcsoportokra is, és azt találták, hogy a daganat-fenotípus, az érinvázió jelenléte vagy hiány (kötelező paramétere az emlőrák patológiai leletének) és a CC score együtt független prognosztikai paraméter. Ez a vizsgálatsor teljesen váratlan eredményt is hozott, ami rámutatott a fenotípusos daganat-osztályozás jelentőségére és további vizsgálandó kérdéseket is felvetett. Egyrészt a tumorok

nagy csoportjában CC a magasabb score, vagyis az E-cadherin és claudin-4 adhéziós molekulák kifejezett expressziója rosszabb prognózissal, az expresszió hiánya sokkal kedvezőbb kórlefolyással jár. Másrészt van kivétel, mert a Luminális B tumor csoportban ez a mintázat megfordul, és az alacsonyabb score értékek (a fehérjék expressziójának csökkenése) jártak kedvezőtlenebb kórlefolyással. A claudinok és az E-cadherin expressziós mintázata a primer tumorhoz viszonyítva az áttétekben némileg eltér és prognosztikai információt is hordoz. Ez az adat is azt mutatja, hogy az áttétek genetikailag eltérhetnek a primer tumoroktól és egyre inkább szükségessé válik az áttétek (vagy a vérben keringő daganatsejtek) külön vizsgálata is. Tekintve azt, hogy a claudinok „ősi” molekulák az immunhisztokémiai markerek kutyákon is alkalmazhatóak voltak. Az állatkísérletek elsőként mutatták meg, hogy a claudin expresszió mintázatának változása az emlőrák kialakulásának fejlődésmenetében hasonlóságot mutat az emberével és általános biológiai jelenségnek tekinthető.

3. Génexpressziós prognosztikai vizsgálatok Grade-2 emlőrák eseteiben.

A carcinomák, ezen belül az emlőrások máig egyik legjobb patológiai prognosztikai faktora a grading, ami szorosan korrelál a túléléssel. A grade-2 differenciáltságú tumorok (előfordulási gyakoriságuk 30-40%) hosszabb távú prognózisa, különösen ha koraiabb stádiumú daganatról van szó, nagyon körültekintő és egyedi posztoperatív kezelést igényel. Grade-2 súlyosságú emlőrások esetén ajánlják az utóbbi években kifejlesztett (egyébként rendkívül drága) multigén prognosztikai és prediktív tesztek, amelyek közül a egyesek 21, mások 70 gén expressziójának segítségével ezt a tumor csoportot jó (genomikai grade 1) és rossz (genomikai grade 3) csoportra lehetett szétválasztani. Jelölt és munkacsoportja genetikai adatbázisokban történt összehasonlító vizsgálatok segítségével 9 génre szűkítette a fenti génlistát, és a gének expressziójának mértéke alapján kimutatta, hogy legmarkánsabb hatása három génnek van (Top2A, FoxM1, CLD4), és egyedül e három gén expressziójának vizsgálatával a Genomikai Grade Index-szel (MapQuant Dx, Ipsogen) egyenértékű prognosztikai információt lehet adni ER-pozitív grade-2 súlyosságú emlőrásokban. Ezzel olyan genetikai predikciós tesztet dolgoztak ki, ami a ma rendelkezésre álló eljárásoknál nagyságrendekkel olcsóbb és ezért széles körben alkalmazható.

4. Fiatalkori és terhességi emlőrások.

A fiatalkori emlőrások gyakran már előrehaladott stádiumban, várhatóan kedvezőtlen kórlefolyású tumorként kerülnek felismerésre és közöttük vannak az örökletes emlőrások is. A daganat kialakulás lehetséges okainak tisztázására egyfajta gyakorlati szempontú megközelítésként vizsgálták e tumorok patológiai sajátosságait, összehasonlítva az időskori tumorokkal. A H&E-festett metszetek alapján meghatározott régiókat tekintve és 7 markert használva (ER, PR, HER2^{CB11}, HER2^{FISH}, p53, Ki67, TOP2A^{FISH}) jelentős különbségeket találtak fiatal és időskori emlőrások között. Megállapították, hogy a fiatalkori tumorok intratumorális morfológiai heterogenitása sokkal nagyobb mértékű és ez az ER, PR és HER2 expressziójában is megnyilvánul. Fiatalkori tumoros betegek családja vizsgálatát is elvégezték az örökletes emlőrások kiszűrésére. A tumor-régiók eltéréseinek figyelembe vételével azt találták, hogy pozitív családi anamnézissel rendelkező betegek daganata túlnyomórészt triple-negatív, vagy Luminális B alcsoportba sorolható. Az ilyen háttérrel nem

rendelkező betegeknél pedig az emlőrákok nagy többsége Luminális A altípusba tartozott. A metasztatizáló terhességi emlőrákok esetén kimutatták, hogy ebben a csoportban gyakoribbak a magas Ki67 indexű és PR vagy triple-negatív emlőrákok, és az emlőrákok mellett kiterjedten fordult elő HG-DCIS. Ezt a paramétert azért fontos figyelembe venni, mert megszabja az emlő-eltávolítás kiterjedtségét. Legfontosabb megállapításaik az alábbiak: (a) Fiatalkori emlőrák esetekben nagy prognosztikus patológiai eltérések találhatók az egyes régiók között ugyanazon tumoron belül. Ez a megfelelő patológiai diagnózis felállításához a műtéti minta speciális feldolgozását igényli. (b) A terhességi emlőrákokban elsőként írták le a nagyon kiterjedt HG-DCIS jelenlétét.

5. A primer (neoadjuváns) szisztémás kemoterápia preiktív patológiai vonatkozásai.

Az emlőrákok sebészi kezelését megelőző kemoterápiát a mastitis carcinomatosa mellett azokban az esetekben is alkalmazzák, amikor a daganat megkisebbedése várható és így emlő-megtartó műtéti megoldás is szóba jöhet. Jelöltnek és munkacsoportjának az országban elsők között volt módjában core-biopsziás és műtéti mintákban vizsgálni a kemoterápiás kezelés tumorra gyakorolt hatását és a regresszió mértékére vonatkozó prediktív megállapításokat tenni. Tekintettel arra, hogy a daganat stromája a kezelés hatására jelentős változásokon megy keresztül, ennek vizsgálatát határozták el. Ismert, hogy a daganatsejtek a stromával és az abban lévő immunsejtekkel és myofibroblastokkal komplex interakcióban állnak. Ezért választották a tenascin-C és syndecan-1 stromális fehérjék expressziójának tanulmányozását és ennek összefüggését a terápiás válasszal. E fehérjék vizsgálatára immunhisztokémiai módszereket és FFPE metszetekből izolált mRNS-en végzett RT-PCR eljárást is alkalmaztak. Azt találták, hogy a syndecan-1 minden regressziót mutató tumorcsoportban alulregulált, a tenascin-C viszont a regressziót egyre kevésbé mutató csoportokban egyre inkább felülregulált volt. Ez az adat felveti a tenascin-C fehérje sokoldalú szerepét a tumoros folyamat progressziójában és további kutatások kiinduló pontja lehet.

Kérdések

1. Tudna-e a jelölt olyan általánosan használható optimalizált protokollt ajánlani, ami erősen lecsökkenti az emlőrákok fenotípusos osztályozásának különböző laboratóriumokban észlelhető eltéréseit?
2. A TOPFOX-nak nevezett génexpressziós mintázat lehetőséget teremt arra, hogy grade 2 stádiumú (és esetenként II. stádiumú) emlőrákban szenvedő betegek széles körénél a diagnózis pillanatában meghatározható lesz az esetleg szükséges (pl. neoadjuváns) terápia. Bevezették-e, vagy tervezik bevezetni ezen alapuló teszt rutinszerű használatát?
3. Sokszor probléma – főleg core-biopsziás mintában –, hogy a látott differenciált mirigy proliferáció még jóindulatú elváltozás-e, vagy már differenciált carcinoma. Adott esetben a myoepithel sejtek jelenlétének vizsgálata sem ad megfelelő eredményt. Jelölt véleménye szerint ezekben az esetekben a claudin 1 immunhisztokémia segíthet?
4. Az opponens úgy képzelte el, hogy minél kevesebb a daganatsejteket összetartó adhéziós molekulák száma, a tumor sejtek annál könnyebben kiszabadulnak a szöveti kötélekekből és könnyebben adnak áttéteket. A claudin prognosztikus vizsgálatoknál láttuk, hogy ez esetleg csak a Luminális B tumor csoportba tartozó daganatoknál lehet így, más tumor típusoknál biztosan nem ez a helyzet. Kaphatnánk-e a jelenségre valamiféle

magyarázatot? Szerepet játszat-e itt az epitheliális-mesenchymalis transitio (EMT) jelensége?

5. Fiatal korban vagy terhesség során jelentkező triple-negatív vagy Luminalis-B típusú emlőrákok esetén indokolt lehet-e a BRCA mutációs vizsgálatok kezdeményezése?
6. Milyen típusú kemoterápiára rezisztens emlőrákokban figyelhető meg a tenascin-C overexpressiójára és erre a jelenségre jelenleg milyen lehetséges magyarázat adható?

Új eredményként az alábbiakat fogadom el:

1. Az emlőrákok osztályozásánál használt különféle markerek rendszeres ellenőrzés nélküli használata eltérő eredményekhez vezetnek, más szóval, különböző laboratóriumokban diagnosztizált egyébkén hasonló típusú emlőrákok egyik helyen megfelelő, a másik helyen nem megfelelő ellátásban részesülnek.
2. A claudin-cadherin expressziós mintázat prognosztikai információt hordoz.
3. Elsőként írták le a claudin expresszió mintázatának az emlőrák kialakulása során bekövetkezett változásait kutyákban.
4. A nagyon drága és kevesek által hozzáférhető genetikai prognosztikai predikciós tesztek kiváltására sokkal olcsóbb és általánosan használható predikciós eljárást dolgoztak ki, ami a Genomikai Grade Index-szel egyenértékű prognosztikai információt ad ER+ grade 2-es emlőrákokban. Ez alapvető fontosságú azon szükséges terápia kiválasztásához, ami a várhatóan rosszprognózisú daganat kedvezőtlen kimenetelét javítja.
5. Jelentős új eredménynek tartom a fiatalkori emlőrákok intratumorális heterogenitásának kliniko-patológiai leírását, ami az emlőrák prognosztikus diagnosztikáját fejlesztette tovább.
6. Jelölt és munkacsoportja elsőként írta le a tenascin-C fehérje expressziójának jelentős fokú felül-regulációját kemoterápia-rezisztens tumorokban.

Összefoglalva:

Dr. Kulka Janina a bevezetésben nagyon jó áttekintés ad az emlőrák kutatás jelenlegi gyakorlati vonatkozásairól és itt veti fel azokat a tisztázandó problémákat, amelyekkel a disszertációban kíván foglalkozni. Az alkalmazott módszerek változatosak. Azokban az esetekben, amelyekben szükséges, hogy egyszerre több szövetmintán azonos körülmények között történjenek a vizsgálatok, szöveti microarray (TMA) mintavételt vezetett be és így végezte az immunhisztokémiai-, kvantitatív immunhisztokémiai, a konfokális mikroszkóppal végzett immunfluoreszen vizsgálatokat. Ezen túlmenően Western blot, FISH, qPCR és mRNS analízishez qRT-PCR technikákat végül állatkísérleteket is alkalmazott. Claudinok expressziós adataikat Relative Expression Software Tool (REST) segítségével is ellenőrizték. Ennek figyelembe vételével is kiemelem Jelölt azon törekvését, hogy az alkalmazott módszereket több oldalról is ellenőrizte és fejlesztette. Mindezek eredményeként módszerei alkalmasak voltak a kitűzött vizsgálati célok elérésére, amit teljesített. Jelölt munkássága a fent kiemelt, öt különböző problémát felölelő területen bíráló véleménye szerint jelentős új eredményekre vezetett, amelyek azonban egymással is szorosan összefüggenek, mert együttesen mutatják meg, hogy az emlőrákos betegek jelenlegi onkológiai ellátása lényegesen hogyan javítható. Jelölt a disszertáció két további fejezetében, vagyis a sentinel nyirokcsomók vizsgálata és a

primer tumorok és áttétek összehasonlítása során szintén értékes munkát mutatott be és új adatokat is közölt, amelyek azonban megítélésem szerint a fentieknél kisebb jelentőségűk.

Dr. Kulka Janina munkássága hatással van a magyar onkopatológia fejlődésére és teszi őt az ország első számú emlőrák specialistájává.

Az elbírált munka és annak összefoglalója alapján az elért tudományos eredményeket elegendőnek tartom az MTA doktori cím megszerzéséhez és a nyilvános védelem kitűzését javaslom.

Budapest, 2017-04-08

Szentirmay Zoltán
bíró