

Dr. Büki András Professor Úr bírálataiban szereplő kérdésekre adott válaszok

(Klekner Álmos: „Asztrocitómák invazivitásának szerepe a személyre szabott onkoterápiában” című MTA doktori munka vonatkozásában)

Nagy tisztelettel szeretném megköszönni Dr. Büki András Professor Úrnak, hogy doktori disszertációmát elbírálta, számos előrevívő kérdést megfogalmazott és munkámat értékelte. A bírálatra adott válaszaim a kérdéseknek megfelelő pontokba szedve a következők:

1. A bevezetőben az extracelluláris mátrix szerepével kapcsolatban leírtakra vonatkozóan kérdés, hogy mi magyarázza azt a jelenséget, hogy a priméren soliter megjelenésű malignus gliális daganat a későbbiekben nem csak lokálisan terjed, hanem akár szimultán több gócban is megjelenik. Összességében tehát nem csak az ECM komponensének van szerepe agydaganat progresszióban?

A glioblasztóma (GBM) szimultán több gócban való megjelenése valóban ismert jelenség és az ECM szempontjából is érdekes kérdéseket vet fel. A közölt adatok szerint a több gócú GBM gyakorisága relatív szerény (1-3), emellett azonban ismert az a nézet, hogy multiplex megjelenés vagy az egy tumorból elvándorolt gliómasejtek kolonizációjából származik – és ez esetben az invázió jelentősége még inkább felerősödik, vagy *de novo* jelenik meg a glioblasztóma (ami a genetikai predisponáltságnak köszönhető) – ez esetben az ECM szerepe sem pro-, sem kontra nem jellemezhető. Összességében, a bírálónak azzal a megállapításával teljesen egyetértek, hogy nem csak az ECM komponenseknek van szerepe az agydaganat progressziójában. Ezzel együtt véleményem az, hogy a GBM méretbeni progressziójában és recidivahajlamában a tumor invazív jellegének – és ezáltal az ECM-nek – a disszertációban részletezett peritumorális infiltrációnak köszönhetően és természetesen a proliferatív jelleggel együtt valószínűleg döntő szerepe van.

2. Mi a különbség mai tudásunk szerint az agyi metasztázisok és a GBM körüli ECM-ben, mely a gliómák esetében permisszív, a metastasisok esetében non-permisszív jellegűt az infiltráció vonatkozásában?

Az ECM-tumorsejt kapcsolathoz szükséges receptorok és ligandok igen nagyfokú variabilitást mutatnak. Leggyakoribb képviselőik a transzmembrán integrin receptorok és ligandjaik, a lamininek. A különböző alegységek variációiból adódóan több mint 40 féle integrint (18 α és 8 féle β lánc) és kb. 15-féle laminint (5 féle α , 4 féle β és 3 féle γ alegység) ismerünk. A megfelelő peritumorális invázióhoz megfelelő gliómasejt-receptor – ECM-ligand kapcsolat szükséges. A gliómasejteket körülvevő agyállomány ligandjai nem meglepő módon sokkal inkább kompatibilisek a sejtfelszíni receptorokkal, mint az idegen szövetből származó tumorsejtek receptorai. Ezt a különbséget igyekeztünk kutatásaink során objektíven meghatározni. Véleményem szerint amennyiben elfogadjuk azt, hogy az invazív tumor teljes eltávolítására kevesebb az esély, mint a nem-invazív daganat esetében, valamint elfogadjuk, hogy az ECM-nek igen jelentős része van a peritumorális infiltráció kialakításában, akkor ezekből következik, hogy az ECM-nek komoly szerepe van a reszekció radikalitásában.

Kutatásaink során ehhez szolgáltatunk molekuláris szinten kimutatható különbségeket, miszerint a tenascin-C, a CD168, integrin α -1, α -3, α -7, β 1 és verzikan, stb. szignifikáns eltérést mutattak a különböző peri-tumorális szövetminták és az ép agyállomány között.

A bíráló azirányú megjegyzésével, miszerint az invázió az adott tumor enzimeinek degradációs képességétől is függ, teljesen egyetértek. Feltételezhető azonban, hogy az adott tumor rá jellemző enzimeit az idegen környezeti ECM komponensekre nézve kisebb szubsztrátazonosságot találva kisebb hatékonysággal működnek, mint a saját környezetükben, így a peritumorális ECM struktúra ebben az esetben is befolyásoló faktorként viselkedhet.

3. A bevezetéssel kapcsolatos legfontosabb kritikai észrevétel, melyre jelölt válaszát is várja a bíráló, arra vonatkozik, hogy (szinte) kizárólagosnak minősíti a daganat progressziója, illetve kurábilitása vonatkozásában az extracelluláris mátrix invázió jelenségét. Az asztrocitómák genetikai determináltsága és variabilitása nem csak az extracelluláris mátrixra gyakorolt hatásukat, hanem a *de novo*, illetve és/vagy multifokális megjelenésüket determinálja.

A tumorprogressziót valóban nem csak az ECM, hanem a tumorsejtek genetikai faktorai is meghatározzák. A sejtproliferáció, mutációk, klónok kialakulása, stb. legalább olyan fontos tényezők, ezt én magam is elismerem. A mi megközelítésünkben inkább úgy fogalmaznánk, hogy a tumor terjedésében és a lokális recidiva kialakulásában vélelmezhető az ECM az egyik legfontosabb befolyásoló tényezőnek. Ezen én magam is sokat gondolkodtam, és arra a megállapításra jutottam, hogy valóban, úgy tűnik, hogy a *de novo* megjelenő új glióma-manifesztációkat nem tudjuk megelőzni, így a daganat az elvileg teljes reszekció vagy elimináció után is ki fog újulni. Az onkológia mai álláspontja szerint ezt tényleg nem tudjuk elkerülni. Azonban ha az új góccok invázióját újra redukálva ismét teljes tumorelimináció érhető el, akkor egy kezeléssorozatot feltételezve a beteg túlélése jelentősen meghosszabbítható. Valóban, a tumorkiújulást újabb és újabb lokalizációban az anti-invazív terápia nem tudja teljesen megakadályozni. Viszont kezelhetővé teszi a helyzetet és átmenetileg ismét „tumormentessé” a beteget.

4. Kérdés, hogy összesen hány betegből, hány mintát tartalmaz az adatbank, mennyi a mintavételtől az ultrafreezerig eltelt idő, történtek-e a mintavételtől ultrafreezerig eltelt időre vonatkozó vizsgálatok a mintaminőség meghatározására, illetve hogy az ultradarabolásra kerülő mintákból rutinszerűen milyen szövettani módszerekkel definiálják a daganat/infiltrációs zóna/normál szövet tartalmát.

A Debreceni Idegsebészeti Agydaganat- és Szövetbank folyamatosan bővül, ezért a pontos válasz hétről hétre változik. Jelenleg az alábbi adatokkal tudok válaszolni a kérdésre:

Tumorbank: 1410 műtétből, kb. 60 szövettani típusban, több mint 6100 katalogizált szövetminta.

Szérumbank: kb. 590 betegből, kb. 40 különböző kórképből, több mint 2580 katalogizált szérumminta.

Teljes vér-bank: kb. 300 betegből, kb. 30 szövettani kórképből, több mint 2500 katalogizált vérminta.

Vizelet: kb. 30 betegből, kb. 6 szövettani kórképből, több mint 180 katalogizált vizeletminta.

A mintavételtől a lefagyasztásig eltelt idő a pár másodperctől a pár percig változik. Ez alatt az idő alatt a molekuláris struktúrák még stabilak, esetleg a funkcionáló molekulák (enzimek) működése károsodhat. Erre vonatkozó minőségi meghatározás még nem történt. A közeli agydaganatbankból azonban rendszeresen történtek ornitin-dekarboxiláz enzimaktivitás-meghatározására épülő vizsgálatok, melyek teljesen megbízható és reprodukálható eredményeket hoztak. Ez alapján azt gondoljuk, hogy a jelenlegi mintagyűjtési módszer elfogadható minőségű mintákat eredményez.

Infiltrációs zóna-határt biztonsággal definiálni nem tudtunk. Vizsgálataink során arra szorítkoztunk, hogy a mintáink tisztán tumorstrómát vagy tumormentes agyállományt tartalmazzanak. Amennyiben ez kritikai megjegyzés a bíráló részéről, el kell fogadnom, és dolgozni fogunk a jövőben ennek a problémának a megoldásán.

5. Milyen akkreditációval rendelkezik a bank és milyen biztonsági berendezésekkel üzemel (telefonos riasztást adó hőmérő, kettős tárolás, kettős kompresszor, széndioxid tartalékrendszer, szünetmentes áramforrás)?

Az Agydaganatbankunk működése első percétől TUKEB engedéllyel rendelkezik, melyet két évente megújítunk. Maga a műszerpark több kettős kompresszoros ultramélyhűtőből áll, melyek mindegyike CO₂ back-up biztonsági rendszerrel van ellátva, ami -60 °C fölött automatikusan bekapcsol. A hűtők helyileg a műtőblokkban találhatók, ahol szünetmentes áramforrás biztosítható. Emellett papíralapú hőmérséklet-regisztráló egységet is beépítettünk, és az eltett papírkorongok 11 évre visszamenőleg igazolják, hogy a minták egyszer sem olvadtak ki.

Végül a legnagyobb biztonságot talán az adja, hogy több (2 db) mélyhűtőszekrényünk van, ill. a szervizzel 24 órás kiszállási szerződésünk van.

A betegek az adatgyűjteményben kóddal szerepelnek, így a minták kezelése során sem a nevük, biztosítási számuk, születési dátumuk, semmilyen személyes adatuk nem publikus, és az adatok idegen kézbe kerülésére reális veszély nem áll fenn.

6. Kérdés, hogy mit jelent az „igen rossz KPS érték”, amely alapján BSC-t indikáltak?

Az „igen rossz KPS érték” széles tartományt takar. A BCS kezelési csoportba eső betegek mindegyike $KPS \leq 60$, a csoport KPS átlaga 56,0 ahogy az a 45. oldalon lévő 8. táblázatban látható.

A palliatív radiotherápiában részesült betegek átlag KPS-e 60. Ezek a betegek 10 x 3 Gy sugárkezelésben részesültek.

7. Kérdés, történt-e bármilyen hatáserősség vizsgálat az elemzés tervezésekor?

Az 1p19q kodeláció prediktív szerepének saját beteganyagon történő meghatározására hatáserősség vizsgálat nem történt.

8. Kérdés, hogy melyik idő intervallumból származott a normál agyszöveti kontroll, illetve, hogy a szérumból minták kontrollkorlál mennyire tudták követni, illetve mennyire összehasonlítható a Temodal metabolizmusa.

A TMZ humán tumormintákban történő direkt meghatározására a nem tumoros agyszövetet a tumor megközelítése során a műtét kezdeti fázisában vettük, és a tumort borító jobb frontális lebenyből származott a gyógyszer bevétele után 105 perccel. A tumormintákat a 135., a 150., és a 165. perben vettük. Szérummintákat is gyűjtöttünk a műtét közben és TMZ-mentes negatív szérummintákat is használtunk kontrollként. Ezekre elsősorban a kapilláris elektroforézis metodikájának alkalmazásához volt szükség, ahol a minták elektroferogramjának összehasonlítása adja a konkrét eredményt.

A szérum-mintákban a már korábban meghatározott koncentráció-változások a TMZ metabolizmusának megfelelően alakultak, de magában a tumormintában a TMZ metabolikus termékeinek AIC (amino-imidazol-carboxamid) és MTIC (metil-triazén-imidazole-carboxamid) koncentrációját nem vizsgáltuk.

9. Milyen genetikai alcsoportba tartoznak ezek a betegek a 2016-os beosztást is figyelembe véve? Milyen prognosztikai csoportba tartoztak genetikai vizsgálatuk alapján?

Az EGFR-integrin kölcsönhatásának vizsgálatához gyűjtött tumorminták még sajnos abból a „pregenetikus” korból származtak, amikor még sem az IDH-1, sem az 1p19q, sem az MGMT metiláció meghatározása nem játszott szerepet a GBM diagnosztikájában.

A kérdésfelvetés teljesen jogos, és utólag is érdemes lenne összehasonlítani az ErbB1-homo- és ErbB1-integrinβ1 heteroasszociációk meghatározásával megállapítható prognosztikai csoportokat a jelenleg már rutinszerűen használatos molekuláris patológiai módszerek eredményeivel.

10. Ezen fenti felvetések kommentálását kérem. (Ha betegek BSC-t kaptak a műtét után, akkor mi indokolta a BSC-t, ha valóban műtéten estek át? Lehet-e BSC-nek nevezni az aktív műtéti kezelést, illetve ez a döntés mennyivel a műtét után született meg?)

A glioblasztómás betegek onkoterápiájának meghatározásakor a legfontosabb meghatározó faktor a Karnofsky Performance Scale (KPS), mely összefoglaló módon és leegyszerűsítve számszerűsíti a beteg életminőségét. A KPS gyakorlatilag magában foglalja a neurológiai státusz mellett a belgyógyászati és pszichiátriai státuszt is. Leegyszerűsítve mondhatjuk, hogy a KPS 70 alatti betegek esetében az aktív onkoterápiának nincs minőségi életet meghosszabbító hatása, ezért ilyen esetben kemo- és sugárterápia helyett csak a panaszokat enyhítő tüneti terápiát, angol rövidítéssel élve Best Supportive Care-t (BSC)-t alkalmazunk. Az általunk vizsgált betegpopulációban a KPS meghatározása a tumor-műtét után történt meg. A KPS 70 alatti betegek esetében csak tüneti terápiát alkalmaztunk. Ennek a betegcsoportnak az átlagos KPS értéke műtét után 56,0 volt. A KPS meghatározásának időpontja egyénenként változott, hiszen a betegek egy része műtét után még javulást mutathat. Legprecízebb úgy megfogalmazni a műtét utáni KPS-t, mint a műtét után elért legmagasabb KPS-értéket – gyakorlatilag függetlenül a műtét óta eltelt időtől, és mi is ezt a módszert követtük, ezért nem fogalmaztunk meg a post operatív státusz meghatározására fix időpontot.

11. Mivel lehet magyarázni, hogy a tumor méret és a túlélés közti összefüggés nem volt megfigyelhető. Magyarázható-e ez az alacsony esetszámmal vagy a kizárási mérethatárral (4 cm)?

A tumorméret és a várható túlélés közötti összefüggés kérdése régóta tartja ébren a glioblasztómás betegek kezelését végző kollégák érdeklődését. Azt az általános megállapítást, miszerint a nagyobb tumor rövidebb túléléssel jár, a klinikai betegadatok is sokszor megerősítik. A mi vizsgálatunk esetében azonban a különböző kezelési módusokon belül hasonlítottuk össze a különböző tumorméret függvényében a túlélést. Mindhárom módus esetében (csak RT, RT + TMZ, RT + TMZ + BC) a 4 cm alatti tumoros betegek átlagos túlélése hosszabb volt, mint a 4 cm feletti betegek csoportjában, de a különbségek olyan szerénynek bizonyultak (1,2 hónap; 1,0 hónap; 3,1 hónap), hogy ehhez képest a szórás és a csoportonkénti relatív alacsony esetszám miatt (20, 35, 25 beteg összesen) semmilyen szignifikáns eltérés nem igazolódott. Emellett azt is figyelembe kell venni, hogy mi az azonos KPS pontszámú és azonos terápiában részesülő betegeket hasonlítottuk össze, ami automatikusan azt eredményezte, hogy a nagyméretű tumoros és rossz állapotú betegek nem is kerültek bele az összehasonlításba, hiszen nem is kaphattak azonos terápiát a kisebb tumor mellett jó állapotú betegekkal. Azoknál a betegeknél, akiknél a tumorprogresszió olyan hamar okoz állapotrosszabbodást, hogy az onkoterápiának egyszerűen nincs ideje kifejteni a hatását, természetesen rövid túlélés látható. Azonban ha ezeket a betegeket kivesszük az összehasonlításból azáltal, hogy kezelési modalitás alapján végezzük a betegcsoportosítást, akkor arra a következtetésre jutunk, hogy az azonos onkoterápiában részesülő betegek esetében nem a tumorméret, hanem a tumor kemo- és radioszenzitivitása válik mérvadó paraméterré.

12. Hogy definiálja a parciális, illetve radikális tumor eltávolítást? A műtét után mennyivel készült az MRI vizsgálat és milyen sajátosságait látjuk?

Régi forró pont az idegsebészetben a tumor-eltávolítás radikalitásának objektív megítélése. Ezt a problémát sajnos mi sem tudtuk megoldani, hiszen egy eleve infiltratív és éles határ nélküli tumornál a teljes reszekció fogalma is nehezen értelmezhető. Ezért leegyszerűsítve, a műtéti leírás és a posztoperatív 1. napon készült kontrasztos CT-felvétel alapján határoztuk meg – legalábbis a látható tumormassza makroszkóposan teljes, vagy parciális reszekcióját. Elismerem ennek a módszernek a gyengeségeit, sajnos ennél a vizsgálatnál ennél jobbat nem tudtunk alkalmazni. Az irodalom ezt a módszert egyébként elfogadja, és non-volumetriás tumor-meghatározásnak nevezi, így mi is ezt a módszert alkalmaztuk.

13. Ezt a korábbi rezekció és túlélés közti kapcsolatot elemző műtéti nagy review-k eredményéhez képest hogyan véleményezi? Lsd. korábbi #13. kérdés.

Az általunk végzett klinikai adatgyűjtések során azt tapasztaltuk, hogy műtéti radikalitás nem befolyásolta szignifikánsan a túlélést. Valóban ismert számos olyan közlemény, melyek szerint a reszekció kiterjedtsége igazolhatóan befolyásolja a betegek túlélését. Ezek a közlemények azonban még döntően a Stupp-éra előtt gyűjtött adatokra építenek. Az újabb közlemények már sokkal árnyaltabban fogalmazznak, és elsősorban a különböző intraoperatív tumorreszekciós technikák létjogosultságának alátámasztását célozzák (pl. 5-alanin-levulinsav-

festés, intraoperatív funkcionális „mapping-guided” reszekció), és elsősorban alacsonyabb grádusú gliómára vonatkoznak. High grade tumor tekintetében a nagyobb review-k már nem foglalnak egyértelműen állást, sőt úgy fogalmazzak, hogy a reszekció mértéke és a túlélés közötti összefüggésre nincs I.-es szintű evidencia (azaz randomizált klinikai study-ból származó bizonyíték). A legnagyobb review 2012-ből származik (Douglas, Hardesty és Sanai), amelyben 1990 és 2012 között megjelent közleményeket elemezték és összegezték. 32 high grade gliómáról és 11 low grade gliómáról szóló tanulmányt tekintettek át. A 32 high grade studyból összesen 5 tanulmányban használtak 3D volumetriás tumor-térfogat-meghatározást. Ebből az ötből 3 esetben sikerült a teljes tumorreszekció és teljes túlélés között statisztikailag igazolható pozitív korrelációt találni; két studyban az elemzések ilyen összefüggést nem igazoltak. A többi közlemény un. non-volumetriás adatelemzésre épült. Ezek közül 17-ben igazolták a teljes reszekció túlélésre gyakorolt pozitív hatását, míg 11 közlemény cáfolta ezt.

Ezzel cseng össze a mi tapasztalatunk is, miszerint számos olyan GBM-es betegünk van, akikből csak biopszia történt, a túlélés az átlagosnál mégis jóval hosszabbnak bizonyult. Véleményem szerint ennek magyarázata abban rejlik, hogy a kemo- és sugárszenzitív tumorok esetében a tumor-tömeg műtéti reszekciójának nincs döntő szerepe a túlélés tekintetében. Én a saját adatainkat többször ellenőriztem, ezeknek bizton hiszek, és tartom az álláspontomat: nem térfoglaló GBM esetében a túlélést befolyásoló legfontosabb tényező a tumor onkoterápiára adott válaszreakciója.

14. Alapvető probléma ezzel a vizsgálattal, hogy miért pusztán egy betegen történt ez a meghatározás?

A TMZ intratumorális koncentrációjának meghatározása azért csak egy betegen történt, mert az általános kezelési elvek szerint a betegeknek közvetlenül a tervezett műtét előtt kemoterápiás készítményt már nem javasolt adni. Sürgős műtét előtt pedig romló neurológiai státusszal kerülnek osztályos felvételre és műtőbe – mely azonban a TMZ meghatározásához szükséges minimum 1-2 órás időintervallumon már mindig túlnyúlik. A mi esetünk egy ritka véletlennek a megragadásából származott: az osztályra került betegnek a jószándékú hozzátartozók a műtét előtt minden szokásos gyógyszert beadtak és a rapidan romló állapotú betegnél elvégzett sürgősségi beavatkozás még belül esett a TMZ metabolizmus időkorlátain.

15. Az EGFR mutációs szerepének vizsgálatára rekurrens glioblastómában végzett vizsgálatok esetében az a kérdés, hogy ha az esetek több mint 20%-ban az EGFR fehérje fokozott expressziójának eseteiben alig több mint 50%-ban volt az EGFR génamplifikáció, akkor önmagában az EGFR génamplifikációnak milyen jelentősége lehet, ha közben a fehérjeátíródás nem-, vagy csak kis részben igazolható.

Az EGFR gén amplifikációja és az EGFR fehérje fokozott expressziója között valóban az összefüggés nem teljesen direkt és egyértelmű. Ahogy azt az inváziós spektrum vizsgálatánál is több esetben tapasztaltuk, a génexpresszió fokozódását nem követi minden esetben törvényszerűen a protein expresszió növekedése, illetve változatlan mRNS expresszió szinthez is igen jelentős protein-expresszióbeli különbség (akár növekedés is) társulhat. Ezt az eltérést olyan poszt-transzlációs szabályozási mechanizmusok okozzák, melyek pontos meghatározása még várat magára (ld. hivatkozások). Eredményeink elsősorban arra hívják fel a figyelmet,

hogyan az eddig divatos gén-overexpresszió meghatározása mellett – vagy esetleg helyett – a fehérjeszintű analízisre egyre nagyobb hangsúly helyeződik.

16. Az első fázis eredményeivel kapcsolatban kérdezném, hogy mennyiben korrelált az irodalommal a tumoros invázióban szerepet játszó mRNS-ek – re vonatkozó saját megfigyelés az inváziós panel markerének kiválasztása vonatkozásában és ahol nem volt korreláció, annak oka mi lehetett?

Az inváziós panel meghatározásakor 96 célmolekula RNS expresszióját vizsgáltuk glioblasztómában, tüdő-adenokarcinóma agyi áttéti tumoros és normál agyszövet mintákban. Minden mintacsoport 5 mintából állt, így egészen pontos, szignifikanciaszintet eredményező statisztikai vizsgálatot nem tudtunk végezni. Ezért inkább kizárásos alapon szelektáltunk tovább és a számottevő eltérést nem mutató molekulákkal további méréseket nem végeztünk. A 2., 3., és a 4. fázisban minden alkalommal tovább finomodott a végső panelt alkotó molekulák köre, így alakult ki az egyelőre véglegesnek tekinthető inváziós panel, mely jelenleg már csak 20 elemből áll. Ezeknek főbb képviselői a proteoglikánok, sejtfelszíni receptorok, stb. (névszerint: brevican, cadherin-12, CD168, collagen- α 1, erbB1, erbB2, fibronectin, integrin- α 1, integrin- α 3, integrin- α 7, integrin- β 1, laminin- α 4, laminin- β 1, MMP-2, MMP-9, neurocan, syndecan, tenascinC, tenascin-R, versican).

A kérdésre válaszolva, a 96 molekula esetében kb. 75-80 %-ban ítéltük úgy, hogy a saját méréseink az irodalmi adatokkal egybeesnek. Való igaz, hogy nem minden molekula esetében kaptunk a korábbi irodalmi hivatkozásokban leírt eredményeket, de vizsgálataink ebben a fázisban még csak leíró jellegűek voltak, odáig még nem jutottunk, hogy ezeknek az eltéréseknek a magyarázatát is felderítsük.

17. Az immunhisztokémiai vizsgálatoknál mi az intenzívebb festődési reakció definíció numerikus megfelelője? Mennyiben voltak szignifikánsak ezek az eredmények? Milyen módszerrel mérték ezt? Milyen kontroll vizsgálatok igazolták azt, hogy a kvantifikálás valóban alkalmazható? Más szóval, mik voltak az immunhisztokémiai specifitás bizonyítékai és ha denzitás vizsgálaton alapult a különbség meghatározás, akkor annak mi volt a kontrollja?

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a metszeteket három külön kutató elemezte és négyes, illetve ötös skálán osztályozta a festődési intenzitást, ahol az egyes érték a negatív, a maximális érték a legintenzívebben festődő mintát jelentette. Ily módon szemi-kvantitatívan lehetett számszerűsíteni a festődési reakciót. Az így kapott értékeket a relatív kis esetszám és a kiértékelés semi-kvantitatív jellege miatt szignifikanciaszint-meghatározásnak nem vetettük alá. Az immunhisztokémiai vizsgálat számunkra legfontosabb eredménye az volt, hogy a fehérje-expresszió változás iránya megegyezik-e vagy sem az RNS-szintű változásokéval? Az immunhisztokémiai festődési intenzitások erre a célra teljesen megfelelőnek bizonyultak, és nagyon nagy segítséget jelentettek annak eldöntésében, hogy az invázióban szerepet játszó molekulák esetében a genotípusban vagy a fenotípusban észlelhető eltérések mutatnak-e szorosabb összefüggést a tumor inváziós potenciáljával? Miután egyértelmű eltéréseket észleltünk az expressziós változás irányában gén- és fehérjeszinten, eredményeink megerősítették azt az elképzelést, miszerint a tumor biológiai viselkedését nem elsősorban

genetikai szintű, hanem poszt-transzlációs szabályozási – ha úgy tetszik tumorszuppressziós mechanizmusok határozzák meg.

Az immunhisztokémiai vizsgálatához kontrollként teljesen negatív (üres, antitest nélküli) és olyan metszetek szolgáltak, melyekről ismert, hogy az adott antitestre erősen pozitívak. Ennek alapja más kutatások eredménye, sokszor az antitest leírásában található, hogy mit érdemes használni pozitív kontrollnak. A kontroll sajátosságaiból adódik, hogy sokféle szövet alkalmas lehet – a kimutatandó targettől függően – pozitív kontrollként történő alkalmazásra, és nem is igazán számít, hogy mit használunk addig, amíg specifikusan tud kötődni hozzá az antitest. Vizsgálataink során használtunk állati és humán mintákat, pl. agyat, májat, vesét, tonsillát, colont stb., és csak olyan antitest-reakciókat elemeztünk, melyek során mind a negatív, mind pedig a pozitív kontroll megfelelő minőségű volt.

18. Mivel magyarázza, hogy a proteomikai eredmények és az RNS expressziós eredmények csak részben mutatnak összefüggést a kezelés után?

A proteomikai és az RNS szintű eredmények közötti eltérés nem teljesen szokatlan dolog a tumorkutatásban (ld. hivatkozások), és jöllehet, már számos poszt-transzkripció és poszt-transzlációs regulációs mechanizmus ismert, ezek molekuláris szintű pontos feltérképezése még várat magára. Erre még mi sem tudtunk vállalkozni, eredményeink ezen a szinten elsősorban deskriptív jellegűek.

19. Az inváziós spektrum prognosztikai szerepének vizsgálatánál glioblastomában mi indokolta a 23 hónapos túlélési határ kiválasztását A és B csoport esetére? Meglepő, hogy a 7/12 versus 12/14 arány nem mutat szignifikáns különbséget. Milyen statisztikai módszer volt az, amely egyáltalán ezt a megállapítást lehetővé tette?

Az inváziós spektrum prognosztikai szerepének vizsgálatakor meghatározott 23 hónapos teljes túlélési szelekciós paraméter a glioblasztómás betegek jelenlegi átlagos túlélési értéke. A jó KPS értékkel rendelkező, konkuráló kemo-irradiációban, majd TMZ monoterápiában és végül még bevacizumab kezelésben is részesült betegek átlagos teljes túlélése Klinikánkon 23 hónap, mely más intézetek eredményeihez hasonló. Ezért úgy választottuk szét a betegeket, hogy aki ennél rövidebb túlélést mutatott került az A, aki ennél hosszabbat, a B csoportba. A kiújulás miatti reoperációk arányát statisztikai aránybecsléssel végeztük, melynek alapja az „N-1” khí-négyzet próba (Campbell, 2007 nyomán, MedCalc statisztikai programmal). A teszt nem igazolt szignifikáns különbséget. Itt szeretném megjegyezni, hogy pályázati támogatásainknak köszönhetően volt alkalmunk szakképzett biostatistikust alkalmazni (Steiner László), és az ő tanácsait és számításait követve jutottunk a publikált eredményekre.

20. Az invazivitási panel vizsgálata során nyert adatok epifenomén jellegét csak akkor lehet kizárni, ha kétséget kizárólag igazoljuk, hogy más prognosztikai tényező, elsősorban a WHO 2016-os beosztásában már döntő szerepet kapott IDH státusz nem játszik szerepet. Mi ezzel a helyzet?

A glioblasztómás betegek IDH státuszának meghatározása csak 2016-tól képezi a WHO tumorklasszifikáció részét. A Debreceni Idegsebészeti Klinikán illetve Neuro-patológián ugyan

már több éve lehet kérni IDH-1 mutáció-analízist, és kb. 2 éve ezt rutinszerűen el is végzik, de a disszertáció alapjául szolgáló közleményekben szereplő vizsgálatok még az IDH-éra előttről származnak, így az inváziós panel és az IDH-1 státusz összefüggéséről eddigi eredményeink alapján még nem tudok beszámolni. Ennek ellenére a bírálóval egyetérték, és köszönöm, hogy felvetette a kérdést, mert megerősítette bennem azt az elhatározást, hogy az inváziós spektrumot a jelenleg ismert genetikai prognosztikai faktorokkal összevessük. Ehhez híven az éppen aktuálisan folyó vizsgálatainkhoz már rutinszerűen meghatározzuk az IDH-1 mutációt is és egy Düsseldorf kollaboráció keretében az MGMT-promoter-metiláció meghatározására is lehetőségünk nyílt.

A kérdés tehát élő, ahogy időben a vizsgálatok fejlődése bekövetkezik, így követjük mi is vizsgálatainkkal az aktuálissá váló igényeket.

21. Mi a véleménye szerzőnek arról, hogy az RNS szinten meghatározó brevikán és integrin- β 1 közül csak előbbi játszik szerepet a fehérje statisztika esetében, illetve, hogy sokkal több fehérjéből áll össze a statisztikát meghatározó csoport?

Az RNS- és proteinszintű eltérések különbözőségéről már korábban beszéltünk. Annak magyarázata, hogy a proteomika nem erősítette meg az integrin- β 1 szerepét, teljes biztonsággal nem megállapítható, mint ahogy az sem ismert, hogy miért akadt fenn több fehérje a prognózist meghatározó kulcs-molekula azonosítás során? Bár valószínűsíthető, hogy a PCR-eredmények méréstartományából adódó magasabb, és a proteomikai eredmények szerényebb mértékű szórása miatt utóbbi esetben statisztikailag könnyebben volt igazolható szignifikáns különbség vagy kulcsszerep. Ezért itt most az eredmények feldolgozásának statisztikai megközelítéséről (nem a módszerekről!) szeretnék pár szót ejteni. Sajnos az a tapasztalat, hogy a prognosztikai faktorokat egyenként vizsgálva, azok specifikitása és szenzitivitása nem haladja meg a 70-80%-ot. Ezért mi azt az elvet fogalmaztuk meg, hogy több marker együttes változásának az elemzése hozhat egy olyan spektrum-változást, ami nagyon szorosan korrelálhat a prognózissal. Bioinformatikus bevonásával sokáig fejlesztettük az elemzéseket, egészen a görbe-analízistől a cluster-analízisen át a jelenleg leginkább megfelelőnek tűnő „J48 pruned tree” döntési fa elnevezésű statisztikai osztályozót használva. Ezzel sikerült nagy reprodukálhatósági aránnyal egyes csoportok esetében a 90-100 %-os szenzitivitást és pozitív prediktív értéket elérni. Az általunk használt spektrum-analízisnek további előnye, hogy az invázióban közvetlenül szereplő molekulák mellett (pl. kadherin, neurokin, tenascin, szindekin, verzikin, stb.) az invázióhoz kapcsolódó egyéb targetek is beválasztásra kerültek (pl. EGFR, CD168), így a tumor többirányú funkciója egyszerre tükröződik az inváziós spektrumban. Meggyőződésem, hogy a spektrumot alkotó egyes molekulák, ha egyenként nem is mutatnak nagyfokú eltérést a különböző prognosztikai csoportok között, az együttes változásuk specifikus lesz és nem csak diagnosztikus, hanem terápiát befolyásoló prediktív jelleget is ölthet.

22. Szerző mivel magyarázza a saját, ezzel ellentétes tapasztalatát, jelesül, hogy nincs a kodeléciónak anatómiai predilekciós helye?

Az 1p19q kodeléción anatómiai predilekciós helyét illetően Mueller és munkatársai 2002-ben publikálták, miszerint a frontális lebenyben gyakoribb a kodeléción mint egyéb lebenyek tumoraiban. Való igaz, hogy saját betegeink esetében erre vonatkozó statisztikai

szignifikanciát nem tudtunk megállapítani, de eredményeink azért nem mondtak ellent a nemzetközi tapasztalatoknak. Eseteink közül a fronto-temporalis lokalizációban 55%-ban volt 1p19q kodeléció igazolható, míg más lebeny esetében csak 35 %-ban. Az esetszám miatt (28 beteg) szignifikanciaszintet nem tudtunk megállapítani, de a betegek közötti különbség mégis tetten érhető.

23. A megbeszélés további részében alapvető kérdés, hogy az egy esetben mért eredmények mennyire lehetnek relevánsak, mennyire általánosíthatók a TMZ lokális koncentrációjának alakulásában? Kérdés, felvetik-e szolubilis véragyagát felnyitása mellett adott alkiláló szerek alkalmazásának lehetőségét és szükségességét?

A TMZ meghatározása szérumban biztonsággal kivitelezhető volt, de az intratumorális lokális gyógyszerkoncentráció meghatározása komoly kémiai-fizikai-klinikai kihívást jelentett. Ennek megoldásában a kapilláris-elektroforetikus csapatnak igen nagy az érdeme, hiszen eddig ilyen vizsgálat még nem történt. Az eddig ismert adatok szerint (Baker; Portnow) ötszörös, Kim pedig 10-20-szoros TMZ koncentrációt kalkulált. Előzőek mikrodialízist, Kim egyfajta prediktív farmakokinetikai modellt alkalmazott. Mi ma már tudjuk, hogy valószínűleg túlbecsülték a TMZ intratumorális lokális koncentrációját, mely az általunk elvégzett direkt mérés lapján 0,12 mg/g-nak bizonyult. Jelen eredménynek két jelentősége van. Az egyik, hogy sikerült kidolgozni egy biztonsággal alkalmazható gyógyszer-detektálási módszert, ami ismerve a kapilláris elektroforézis metodikáját, komoly előrelépésnek tekinthető, ugyanis szilárd halmazállapotú anyagban koncentrációt meghatározni nem rutin eljárás. A megoldást egy régi közös kutatásunk adta, melynek során sűrű bronchiális váladékban néztük meg az antibiotikum lokális koncentrációját (azt vizsgáltuk, hogy az idegsebészeti műtét után tartósan intubált betegnél hogyan lehetne elkerülni az aspirációs pneumóniát), és a nem-folyékony mintát először liofilizálva, majd újra feloldva lehetett megbízható méréseket eszközölni. Ennek volt köszönhető, hogy egy kemoterápiás készítmény aktuális intratumorális koncentrációja meghatározható volt.

Különösen nagy eredmény ez agydaganatok esetében, hiszen a vér-agy-gáton való gyógyszerpenetrációt lehet ezzel megállapítani, így objektív eszköz van a kezünkben arra nézve, hogy összehasonlítsuk, melyik készítmény éri el a legmagasabb koncentrációt – és ezzel feltehetően hatékonyságot – az agydaganatokban? Ez jelentősen megkönnyítené a gyógyszerválasztást, és lehet, hogy számos jelenlegi protokoll megváltoztatását idézné elő, valamint az egyes vér-agy-gát penetrációt fokozó technikák (irradiáció, hiperozmózis, stb.) hatékonyságát is vizsgálni lehetne.

Az egyetlen esetben történt mérés magyarázatáról már korábban említést tettem. Teljesen elismerem, hogy egy esetből általánosítani nem lehet, azonban a metodika kidolgozására, ill. ellenőrzésére és gyakorlati alkalmazhatóságának megítélésére megfelelő volt. Így valóban a következő lépés etikai engedélyt szerezni a közvetlenül a preoperatív szakban adható kemoterápiás készítmények alkalmazására és az intratumorális gyógyszerkoncentráció nagyobb esetszámon történő meghatározására.

24. Az inváziós profil összehasonlításában alapvető probléma, hogy az elsősorban szinte kizárólag vascularis eredettel inokulálódó metasztázisokat az „agyszöveti strómában kialakuló” glioblastomához hasonlítja. Mi erről a véleménye?

A metasztázisok kialakulásának jellege, mely szerint a vérárammal jutva az agyállományba eredményeznek új tumormanifesztációt, jelentősen különbözik a glioblasztómára jellemző direkt peritumorális invázió révén való terjedéstől. Ez a különbség veti fel a kérdést, hogy az extracelluláris tumorok agyi áttétképzésében milyen szerepe van az invazivitásban szerepet játszó és általunk vizsgált számos molekulának? A kérdésre adandó válasz abban rejlik, hogy a vérkeringéssel disszeminálódó tumorsejtek kitapadása, lokális infiltrációja, kolonizációja, nest-képzése mind-mind inváziónak tekinthető folyamat révén valósul meg.

A tumorsejt-endothél kitapadáshoz szükséges adhezív molekulák, sejtfelszíni receptorok, a környezetet bontó enzimek szintén inváziós lépések, és az invázióhoz szükséges és ismert, általunk is vizsgált molekulacsoportok részvételével történik. A glioblasztómában leírt inváziós folyamatokhoz képest azonban az a nagy különbség, hogy az extracelluláris tumorok a kapillárisok falán ugyan meg tudnak tapadni és ott lokális tumorproliferáció ki tud alakulni, de az agyparenchymába való infiltráció nagyságrendekkel kisebb mértékű, mint a gliómák esetében. Ezt a funkcionális különbséget igyekeztünk mi kutatásaink során molekuláris szinten meghatározni. Eredményeink alapján az a pre-hipotézis látszik bebizonyosodni, hogy a tumor-host kapcsolatban a receptorok-ligandok és enzimek-szubsztrátok megfelelősége, kompatibilitása határozza meg az invázió mértékét. Véleményünk szerint, ha ezt a folyamatot részleteiben megismerjük, akkor lehetőséget teremtünk arra, hogy abba beavatkozva a gliómák invazív aktivitását is mérsékelni tudjuk és ezáltal a glioblasztómák kezelhetőségi esélyeit és a betegek túlélését növelni tudjuk.

Összefoglalás

A glioblasztóma teljes gyógyítása ma még utópia, és ezt mi sem tudtuk megoldani. Kutatásaink hozományaként azonban, ha sikerül a gliómák invazivitását redukálni, akkor a teljes tumoreltávolítás vagy irradiációs tumorelimináció esélyei javulhatnak. Igaz ugyan, hogy a *de novo* tumorképződést nem oldottuk meg, de újra és újra tumorentessé tehető a beteg, aki a teljes gyógyulásban ugyan nem, de életének akár jelentős meghosszabbodásában bízhat.

Az is igaz, hogy az extrém módon pluripotens daganat megváltoztatva az expressziós profilját az anti-invazív terápiában is újra és újra rezisztenssé válhat. Mi pontosan ezért gondoljuk, hogy az újra és újra meghatározott inváziós spektrum minden alkalommal azonosítani képes az új targetmolekulákat, és így a kezelést módosítva az mégis mindig effektív lehet. Hisszük, hogy ezzel megvalósulhat a személyre szabott kemoterápia, melynek egy betegben való „tumorkövető” korrigálása magának az individuális onkoterápiának mutathat fejlődési perspektívát.

Végezetül szeretném ismét megköszönni Búki Professzor Úr értékes és minden részletre kiterjedő bírálatát, mely munkám megértéséhez, interpretációjához és jövőbeni feladataink megfogalmazásához is igen nagymértékben hozzájárult.

Debrecen, 2017.06.12.

Dr. Klekner Álmos

Hivatkozások

1. Barnard RO, Geddes JF.: The incidence of multifocal cerebral gliomas. A histologic study of large hemisphere sections. *Cancer*. 1987 Oct 1;60(7):1519-31.
2. Patil CG, Yi A, Elramsisy A, Hu J, Mukherjee D, Irvin DK, Yu JS, Bannykh SI, Black KL, Nuño M.: Prognosis of patients with multifocal glioblastoma: a case-control study. *J Neurosurg*. 2012 Oct;117(4):705-11. doi: 10.3171/2012.7.JNS12147. Epub 2012 Aug 24.
3. Showalter TN, Andrel J, Andrews DW, Curran WJ Jr, Daskalakis C, Werner-Wasik M.: Multifocal glioblastoma multiforme: prognostic factors and patterns of progression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 Nov 1;69(3):820-4.

Hivatkozások a tumor-reszekció és túlélés vizsgálatára

1. Chang EF, Clark A, Smith JS, Polley MY, Chang SM, Barbaro NM, Parsa AT, McDermott MW, Berger MS. Functional mapping-guided resection of low-grade gliomas in eloquent areas of the brain: improvement of long-term survival. *Clinical article. J Neurosurg*. 2011 Mar;114(3):566-73.
2. Douglas A. Hardesty and Nader Sanai: The Value of Glioma Extent of Resection in the Modern Neurosurgical Era. *Front Neurol*. 2012; 3: 140.
3. Duffau H: Long-term outcomes after supratotal resection of diffuse low-grade gliomas: a consecutive series with 11-year follow-up. *Acta Neurochir (Wien)*. 2016 Jan;158(1):51-8.
4. Nader Sanai and Mitchel S. Berger: Operative techniques for gliomas and the value of extent of resection. *Neurotherapeutics*. 2009 Jul; 6(3): 478–486.
5. Sanai N, Berger MS. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery*. 2008 Apr;62(4):753-64; discussion 264-6.
6. Smith JS, Chang EF, Lamborn KR, Chang SM, Prados MD, Cha S, Tihan T, Vandenberg S, McDermott MW, Berger MS. Role of extent of resection in the long-term outcome of low-grade hemispheric gliomas. *J Clin Oncol*. 2008 Mar 10;26(8):1338-45.

Hivatkozások az RNS-protein expresszió eltéréseire

1. Antonis Koussounadis, Simon P. Langdon, In Hwa Um, David J. Harrison, and V. Anne Smith: Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci Rep.* 2015; 5: 10775.
2. Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardia SL, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics.* 2002 Apr;1(4):304-13.
3. Christine Vogel and Edward M. Marcotte: Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet.* 2012 Mar 13; 13(4): 227–232.
4. Maier T, Güell M, Serrano L: Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* 2009 Dec 17;583(24):3966-73.