Bírálatra kaptam Dr. Klekner Álmos „Asztrocitómák invazívitásának szerepe a személyre szabott onkoterápiában" című MTA doktori értekezését

A doktori disszertációról alkotott véleményemet a formai, tartalmi és összegző fejezetek alatt kívánom megfogalmazni.

1., Formai megállapítások

A 121 oldalas disszertáció 100 oldalon foglalja össze, illetve részletezi jelölt téziseit, mindezt 15 oldalas irodalomjegyzék és publikációs lista követi. Az átláthatóságot szolgálja a mű elején közzétett rövidítésjegyzék.

Részletes kvantitatív elemzéstől tartózkodnék, az ortográfiára vonatkozó megállapításokat pedig azért nem kívánom közzétenni, mert a potenciális kritikai észrevételeket gyakorlatilag minden magyar akadémiai munkával kapcsolatban elmondhatóak lennének.

Általában az ábrák méretválasztása és a feliratozás könnyen követhető, talán a doktori disszertáció esetében nem lett volna túlzás, ha az oszlopgrafikonok esetében nem a szürke árnyalatait, hanem színezést alkalmaz a szerző.

A dolgozat tagolásában a megfelelő alapinformációkat közvetítő bevezetést a célkitűzések, majd a módszertani ismertetés követi. A számos választható forma közül a bírálóhoz közelebb álló, a doktori művet tudományos közlemények szerkesztési elvei alapján egységbe foglaló módon, az eredmények, majd a megbeszélés és az összefoglalás következik. Ez az egyszerűsített logikai lánc tartja össze az egyébként néhol lazábban összefüggő témacsoportokat. Kifejezetten dicséretes, hogy a szerző megfelelő időt szánt arra, hogy a tudományos tevékenységének eredményeit és publikációit gondolatilag és szerkezetileg is átalakítsa, a doktori műbe építse.

2., Tartalmi elemzés

A munka első fejezete a probléma hátterének összefoglalását képező bevezetés.

A bevezetésben talán érdemes lett volna kitérni a bevacizumáb esetében annak műtéti kezelés lehetőségeit korlátozó hatásra, a TMZ hatásánál pedig érdemes lett volna hangsúlyozni az alacsony mellékhatás profilt, illetve azt a tényt, hogy a mismatch repair enzimdefektusos betegeknél van egyértelműen jelenetős hatása a szernek.

1., A bevezetőben az extracellularis 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 ACM komponensének van szerepe agydaganat progresszióban?

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 jelleget ölt az infiltráció vonatkozásában? Erősen kérdéses állítás az, és legfeljebb hipotézisnek elfogadható az, hogy az extracellularis mátrix határozná meg kizárólagosan, vagy legalábbis döntően a glioblastoma és a tüdőáttét közt tapasztalható különböző rezekábilitást. Az ECM

komponensek degradációs képessége például nem az ECM-től függ, hanem a magától a tumor típustól, továbbá szerepet játszik a különböző viselkedésben a neovascularizációs képesség, az immunválasz kiváltásának különbsége is.

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. Önmagában az extracelluláris mátrixra vonatkozó megfigyelések értelmezése alapján sem a daganatot, sem annak kezelését nem lehet fokálissá tenni.

A következő fejezetben célkitűzéseit foglalja össze. Ezek közül jelentős a tumor és szövetbank létrehozása, a 2-es pontban foglalt genetikai prognosztikai faktorok meghatározása részben a 2016-os WHO klasszifikáció tükrében is fontos, ugyanakkor irodalmilag meglehetősen túlhaladott. A TMZ individuális alkalmazására vonatkozó célkitűzések rendkívül fontosak és gyakorlati jelentőségűek. További célkitűzése a kemoszenzitivitásra tirozin-kimázin hibitorok terápiás szerepére vonatkozó vizsgálatok elvégzése valamint a gliómák és a metastasisok ECM-hez való viszonya különbözőségének elemzése a jelen kemoterápiás eszközök invazivitás csökkentő hatásának vizsgálata, a peritumorális agyállomány invázióval szembeni védekezésének vizsgálata, illetve az ECM alkotóelemeinek tumor sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata.

Az agydaganat bank létrehozása örvendetes példája annak, hogy a külföldről hazajövő klinikai kutató hogyan képes a viszonylag egyszerű, de felbecsülhetetlen adatmennyiséget jelentő innovációt megvalósítani a nemzetközi minta alapján. További érdeme az adat pool-nak, hogy olyan metodikai újdonságokat (darabolás, buborékmentes fagyasztás) tartalmaz, melyek rendkívüli mértékben növelik a szövetminták feldolgozásának validálhatóságát.

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 tartalmat.

A különböző biobankoknak a legfontosabb problémája az adat biztonság kérdése.

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

Az onkoterápiás kezelés hatékonyságának megítélését 104 GBM-ben szenvedő beteg adatainak elemzésével végzi.

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

Hasonlóan definiálatlan a betegek műtét utáni állapota alapján indikált palliatív radioterápia. Az 1p19q vizsgálatának metodikája egyértelmű, a temozolomide esetében az n=2 esetszám meglepően alacsony.

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

A temozolomide intratumorális koncentrációjának meghatározását célzó vizsgálatok során műtét előtt egy órával utolsó 400 mg-os adagját bevett beteg 3 daganat mintájának elemzése és nem daganatos normál agyszövet mintával történő összehasonlítása történt. A tumor mintákat 15 perces intervallummal vették.

8., Kérdés, hogy melyik idő intervallumból származott a normál agyszöveti kontroll, illetve, hogy a szérum minta kontrolloknál mennyire tudták követni, illetve mennyire összehasonlítható a Temodal metabolizmusa.

Az EGFR és integinek (?) köcsönhatásának vizsgálata intraoperatív friss fagyasztott II-es és IV-es grádusú asztrocitómák szöveti metszeteiből történt.

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

A tumorok invazivitásának vizsgálatára az úgynevezett inváziós panel vizsgálatát végezték el. Az onkoterápia hatását vizsgálták az inváziós panel molekuláinak expressziójára 31 betegen összevetve 15 kizárólag sebészeti terápián átesett beteg anyagát 16 sugár és kemoterápiát követően kiújult daganat rezekciója során nyert mintákkal. Peritumorális agyállomány tumorinvázióbeli szerepének vizsgálatára 27 műtét során eltávolított peri-GBM, perimetasztatikus és normál agyszövetet vizsgáltak, illetve vizsgálták az inváziós spektrum prognosztikai szerepét 26 GBM-ben szenvedő beteg esetében.

Az eredmények ismertetése során a 8-as táblázat foglalja össze a 104 glioblastomás beteg klinikai paramétereit, a BSC-ben részesülő betegek kapcsán fontos lenne definiálni a BSC indikációját, hiszen kerek 10 ponttal volt magasabb a BSC KPS, mint a PRT KPS, értelmezhetetlen a preop-postop elnevezés a BSC esetében, illetve a postop KPS érték is nehezen értelmezhető, hogy mire vonatkozik.

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?)

Az 1.A ábrával kapcsolatban megjegyzendő, hogy a TMZ szignifikáns PFS-t növelő hatását helyes lett volna csillaggal jelölni, a szignifikanciát általában is áttekinthetőbb lett volna csillaggal jelölni a diagramokon.

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 (4cm).

Ha a tumor méret nem befolyásolja a túlélést, mely egyébként nem tűnik logikusnak, akkor az infiltráció útján történő tumor növekedésre vonatkozó, a műben kifejtett elmélet helytállósága is kérdéses.

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

A műtéti típus szerinti túlélés osztályozását megtekintve és az adatokat átnézve gyakorlatilag szignifikanciát az eredmények nem mutatnak.

13., Hogy magyarázható ez azokkal a publikációkkal szemben, (Smith, Berger, Duffau esetében), melyek igazolták, hogy a rezekció kiterjedtsége meghatározza mind a low, mind a high-grade gliómák esetében a kimenetelt (túlélést)?

Az 1p19q kodeléció oligodendrogliómákban való klinikai relevanciának vizsgálata során inverz összefüggés volt az életkor és a kodeléció megjelenése között, illetve a kodeléció elvesztése és a rezekábilitás között, ugyanakkor a kodeléció anatómiailag nem volt lebenyekre jellemző. Ismét, és ez a dolgozat egészére igaz, hiányoznak az áttekinthetőséget segítő, a szignifikanciát jelző csillagok a diagramokról. PFS esetében 3-as grádusú oligodendrogliómák esetében nem meglepő összefüggést találtak a kodeléció és a hosszabb túlélés között, a 2-es grádus esetén a műtéti kezelés, a rezekció mértéke nem befolyásolta statisztikailag a recidivamentes túlélést, **ezt a korábbi rezekció és túlélés közti kapcsolatot elemző műtéti nagy review-k eredményéhez képest hogyan véleményezi? Lsd. korábbi #13. kérdés.**

A kombinált kezelés hatása mind az 1P19Q kodeléciós, mind a negatív esetekben, mind grade 2-es túlélők esetében igazolható volt.

A következő fejezet a temozolomid GBM-ben történő vizsgálatáról szólt. Elegánsan elemzi a TMZ és annak aktív bomlástermékeinek megjelenését. A tumor mintát új liofilizáló módszerrel elemezve tudta a tumor TMZ tartalmát meghatározni.

14. Alapvető probléma ezzel a vizsgálattal, hogy miért pusztán egy betegen történt ez a meghatározás? Elegáns lett volna, ha több beteg esetében is lehet ilyen vizsgálatokat végezni. Akár külön etikai engedélyt is érdemes lett volna kérni és egy ilyen vizsgálatot folytatni, hiszen a TMZ alkalmazása nem befolyásolja a műtéti kimenetelt, nem jelent érdemi műtéti kockázatot.

A 4.4-es fejezet az EGFR és az integrinek kölcsönhatásáról szól asztrocitómákban. Az Erb B1 interakció, valamint az integrin-β1 expresszió szintjének a túlélés előrejelzésére gyakorolt hatását állapították meg.

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

A 4.5. fejezetben metasztatikus, illetve gliális daganatok invazivitását hasonlítja össze MRNS expressziós eredményeket vizsgálva, azaz invazív inváziós panelt elemezve.

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?

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 specificitás bizonyítékai és ha denzitás vizsgálaton alapult a különbség meghatározás, akkor annak mi volt a kontrollja?

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

Az onkoterápia után mindössze két esetben bizonyult szignifikánsnak az RNS, illetve egy esetben az RNS, egy esetben pedig a protein szint változás az MMP9 és a brevikán – előbbi az MMP9, utóbbi a brevikán szintjénél mutatott ilyen eltérést. Peri GBM-ben a tenaszcin és a CD168 expressziója szignifikánsan magasabb volt, mint peri MET-ben.

19., Az inváziós spektrum prognosztikai szerepének vizsgálatánál glioblastómában 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 molekulák vizsgálata során a génexpresszió individuálisan nem mutatott szignifikáns eltérést, ugyanakkor a 20 ECM alkotó expresszióját együttesen vizsgálva lehetett specifikus és szignifikáns eltérést igazolni a két csoport között.

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 fehérjeszinten történt elemzés szintén csak a teljes panel együttes elemzésével hozott szignifikáns prediktív eredményt.

21., Mi a véleménye szerzőnek arról, hogy az RNS szinten meghatározó brevikán és integrin-β1 közül csak előbbi játszik szerepet a fehérje statisztika esetében, illetve, hogy sokkal több fehérjéből áll össze a statisztikát meghatározó csoport.

A megbeszélés során adja meg azokat az adatokat, amelyet talán az anyagok és módszereknél célszerűbb lett volna, azaz a neuroonkológiai labor kutatási teljesítményénél elemzi az összegyűjtött mintaszámot.

Megállapításaival teljesen egyet lehet érteni, az agydaganat és szövetbank létrehozása jelentős teljesítmény. Az onkoterápia effektivitásának meghatározása vonatkozásában a megállapítások, a Stupp protokoll, a komplex kezelés jelentőségének a kiemelése korrekt.

Az alaphiányosság itt is az IDH státusz kiemelése, illetve hogy egyáltalán nem elemez olyan faktorokat, mint az MR morfológia, az MR spektroszkópia, perfúziós MR vizsgálatok, a korszerű MR technikák szerepe a kimenet becslésben.

Az 1p19q prediktív szerepének vizsgálatával kapcsolatban a megbeszélés említi, hogy a frontális daganatokban ez gyakrabban észlelhető.

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

Rendkívül fontos, hogy a temozolomid szérum koncentrációjának meghatározására vonatkozó eredményeit a gyakorlati kezelésbe is átültette.

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 véragygát felnyitása mellett adott alkiláló szerek alkalmazásának lehetőségét és szükségességét?

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

3., Összegzés

A dolgozat egyik legfőbb kitétele, mely szerint az inváziós panel alkalmas lehet a célzott tumor lokalizálásra és így a tumor eradikálását célzó terápiák sikerét okozhatja, meglehetősen naív és túllelkesült, ugyanis nem veszi figyelembe a glioblastómáknak azon tulajdonságát, hogy de novo több gócban képződhetnek újra, ráadásul a már korábban említett statisztikai kérdések, a fehérje és MRNS profilok közti diszkrepancia erősen kérdésessé teszik a megfigyelések interpretálhatóságát, továbbá álláspontja erősen megkérdőjelezhető, ha figyelembe vesszük azt a genetikai variábilitást, azt az extrém pluripotenciát, amivel ezek az igen malignus gliális daganatok képesek teljesen megváltoztatni expressziós profiljukat, így bújva ki a kemo, illetve biológiai terápia alól és téve legfeljebb átmenetivé azok sikerét.

A disszertációból új eredményként fogadható el, hogy egy hazai adatbázist hozott létre, amely a személyre szabott terápia magyarországi bázisaként szolgálhat a jövőben, és ennek elemzésével igazolta, hogy a kombinált kezelés, a daganat sugár- és kemoszenzitivitása meghatározza a kimenetelt, illetve, hogy a palliatív radioterápia indikációja erősen limitált.

Ugyancsak fontos eredmény, hogy ezen adatbázis elemzésével az 1p19q kodeléciónak a rezekció kiterjedését forszírozó faktorként való beazonosítását végezte el.

Új tudományos eredménynek tekinthető mindenképpen a temozolomid szérumbeli koncentráció meghatározását célzó rutinszerű eljárás kidolgozása és a TMZ bevétel után 1-2 órára történő időzítése a konkuráló sugárkezelésnek.

Ugyancsak új megfigyelés, hogy a temozolomid lokális intratumorális koncentrációját tudta leírni glioblastomában illetve annak igazolása, hogy az intergrin-β1 expresszió ERBB1-integrin-β1 heteroasszociációk emelkedett aránya asztrocitómák esetében kedvezőtlen prognosztikai faktor, és azon megállapítása is új megfigyelés, mely szerint az EGFR kináz domén mutációja nem jellemző rekurrens glioblastómákra és ez a TRKI mérsékelt effektivitására utal.

A bíráló véleménye szerint a 6,7,8 és 9. pontban összefoglalt új eredmények, amelyek az inváziós panelre vonatkoznak, erősen kérdéses mértékben állhatják csak ki a tudományos próbát. A magam részéről az e pontokat alátámasztó adatokat nem tudom olyan erősnek tartani, hogy azok alapján ezeket nemzetközi jelentőségű, új eredményként fogadhatnánk el, mindazonáltal nagy érdeklődéssel várom e vizsgálatoknak a jövőben történő megerősítését és ezen eredményeknek a hosszú távú validálását, beleértve az addigieknél magasabb impaktfaktorú lapokban való közzétételt is.

Összegezve, Klekner Álmos doktor szisztematikus munkával egy úttörő jellegű. agydaganatbank és szövetbázis összeállításával és annak rendkívül igényes elemzésével a magyar neuroonkológiai ellátás és klinikai kutatás számára fontos fejezetet jelentő vizsgálatokat végzett és eredményei, új megfigyelései alapján, az azokat közzétevő doktori mű minősége okán bíráló véleménye szerint eleget tett az MTA doktori disszertációval szemben támasztott formai, tartalmi, illetve habitusi követelményeknek.

A fentiek alapján a doktori mű nyilvános vitára bocsájtását és az MTA doktori fokozat odaítélését támogatom.

Prof. Dr. Büki András
egyetemi tanár
klinikaigazgató

Pécs, 2017. május 02.