Válasz Dr. Tímár József professzor úrnak az

**„Új módszerek a daganatok genetikai jellegzetességeinek**

**és heterogenitásának vizsgálata (1004-15)”**

című MTA Doktori Értekezésem bírálatára

**Tímár József professzor úr kérdéseire adott válaszaim**

1. *Melyek az LSC mikroszkópia/citometria mai rutinszerű alkalmazásai a diagnosztikus patológiában*

A Kamensky testvérek a 70-es évek elejétől kísérleteztek az áramláscitometriához hasonló sejtpopuláció szintű mérési technika kidolgozásával tárgylemezre vitt sejtek vizsgálatára. A számítástechnikai feltételek az 1990-es évek közepétől tették mindezt lehetővé. A mikroszkópra épített LSC módszert nagy izgalommal vizsgálták világszerte számos alkalmazás szempontjából, de ezzel párhuzamosan a mérések technikájában pont az áramláscitometria, a morfológiai analízis szempontjából pedig az átmenő fényes digitális képanalízis, a különféle tárgylemez szkennelési technológiák, ezek fluoreszcens változatai, a precízebb interakciók vizsgálatához pedig a konfokális mikroszkópia irányzatai hatékonyan törtek előre. Mindez azt eredményezte, hogy a cég a készülékét tudatosan nem fejlesztette tovább a diagnosztikában használatos sejtszintű morfometriai vizsgálatok irányába, hanem a hagyományos mikroszkópiától fokozatosan eltávolodva kialakították a folyadékfázisú sejtek fluoreszcens vizsgálatára alkalmas plate-olvasó platformot, mely elsősorban kísérletes és ipari applikációkra alakítható, pl. kromatinkondenzáció, micronucleus, enzimkinetikai, stb. vizsgálatok (Pozarowski P et al, Methods Mol Biol, 2013). Az LSC technológia jelentős átalakuláson ment keresztül, ami a gyártó(k) névváltozásában is megmutatkozik (CompuCyte, iCys, stb.). Véleményem szerint ugyanakkor az LSC kb. 15 éves aktív alkalmazása citológiai/patológiai rutinban nagyot lendített a mintafeldolgozás, a fluoreszcens technikák és a mérési adatok kezelésének megoldásain és a tapasztalatok maradéktalanul beépültek a jelenleg használatos legmodernebb módszerekbe.

1. *LCH esetén, ill. a megvizsgált konkrét esetekben a BRAF mutáció homo- vagy heterozigóta formában volt-e jelen, ami magyarázhatná az egyes esetekben eltérő szintű protein expressziót? LCH-ban a BRAF mutáció homo- vagy heterogén formában van-e jelen a léziókban?*

LCH tanulmányunkban a V600 mutációk kimutatása klasszikus Sanger szekvenálással történt, ami a mutáció specifikus kimutatására alkalmas. A szekvenálás a mutáns és vad genotípus együttes előfordulását már kissé korlátozottan, de lehetővé teszi, de konkrétan a daganatsejtek homo- heterozigótaságának kérdésében nem túlságosan informatív. Betegmintákban számítanunk kell ugyanis a daganatsejteket övező nem-neoplasztikus sejtek teljesen szokványos kontaminációjára, amely nehezen kontrollálható, még mikrodisszekció alkalmazásával is jelentősebb mértékben fennállhat. Ennek megítélésére fő adatforrásunk, a kapilláris elekroforézissel nyert szekvenciagörbe pontmutációt (nukleotidcserét) jelző és a vele egyidejűleg detektált normális csúcsainak hányadosa adhatna némi útmutatást, ilyen mérésekre vonatkozóan a szakirodalomban is megjelentek már statisztikai számítások (mutant-allele specific imbalance – MASI) (Chiosea SI, Mod Pathol 2011; Malapelle U et al, J Clin Pathol 2015). A kérdésen sokat lendít a mutáns BRAF fehérje expressziójának tanulmányozása a tumorsejtekben, mely egy adott LCH esetben meglehetősen állandónak bizonyult, jelezvén, hogy (i) intratumorális heterogenitás a mutáns BRAF-ra nézve nem jellemző, (ii) a fehérjeexpresszió mértéke a daganaton belül esetlegesen megjelenő allélgyakoriság eltérésektől független (amennyiben persze ez előfordul, vizsgálata nem történt meg). Az immunhisztokémiával az egyes esetek között észlelt eltérő intenzitású mutáns BRAF expresszió kérdése bonyolultabb, és minden bizonnyal biológiai/szabályozási és technikai faktorok egyaránt szerepet játszanak.

1. *Cervix citológia LSC: mennyi sejtre alapozva végezték a ploiditás méréseket (10e4?) és miért pont ez volt a határérték, honnan származott a meghatározás?*

A vizsgálatra került cervix citológiai minták folyadékalapú feldolgozást követően, standardizált módon kerültek a tágylemezre, a sejtdenzitás azonban így is nagyon változatosnak bizonyult. A 10e4 vizsgálati sejt valójában egy fluoreszcens paraméterek által meghatározott, előszűrt hámsejt populációt jelentett, melyből számos zavaró tényező, így pl. a granulocyták, piknotikus sejtek ki voltak zárva. A megjelölt sejtmennyiség hosszabb kísérletezést követően tapasztalatilag, a célszerűség figyelembe vételével került meghatározásra: sokkal több sejtet bevonni a mérésbe jelentős időráfordítással lehetett volna, míg kevesebb sejtből a statisztikai eloszlás megítélése lett volna ingatag. A kérdéses sejttípusok (5c ill. 9c aneuploid sejtek) a súlyosabb esetekben olyan mértékben voltak jelen, hogy az illető mintatípust jól reprezentálták. Érzékelem a kérdés kritikai élét, mert lényegében a 10.000-es esetszám jelenleg nem számít különlegesen szenzitív megközelítésnek. Örök kérdés ugyanakkor, hogy ha egy új módszer alkalmazásakor a vizsgálat érzékenységét, energiáinkat nem kímélve, lényegesen megnöveljük, akkor is kapunk-e még klinikailag is értelmezhető adatokat?

1. *Mivel magyarázható, hogy a súlyosabb (HSIL) atípiákban a 9c poliploidia szignifikánsan gyakoribb, míg az 5c atípia nem?*

A súlyos aneuploidiát az atípia részeként cervix citológiai mintákban egyértelműen a HPV fertőzés hatásával hozzuk összefüggésbe. Ezen egyszerű elv szerint minél súlyosabb az atípia, annál több és súlyosabban aneuploid esemény várható. Az aneuploid sejtek fokozatosan, sok hibás sejtciklus következtében, hosszú idő alatt alakulnak ki, melynek rendje szerint a magasabb fokú aneuploidia a hibák (non-diszjunkció, szegregációs zavar, kromoszómavesztés, törés, stb.) ismételt akkumulációiból ered. Logikusan az 5c DNS-tartalomból egyes esetekben fokozatosan lesz 9c, így ezen sejtek száma alacsonyabb. A HPV fertőzés és következményes atípia jelei LSIL és HSIL esetén is jelen vannak, HSIL kapcsán azonban a diszplázia súlyosabb, ami részben óriássejtekkel, hiperkromáziával, stb. másrészt súlyosabb aneuploidiával jellemezhető.

1. *Mivel magyarázható, hogy hr-HPV fertőzésben a súlyos ploidia változása nem minden esetben tapasztalható, azaz miért nem 100%?*

Igen szép eredmény lett volna, ha módszerünkkel a hr-HPV fertőzésre specifikus markert tudunk azonosítani. Sajnos vizsgálataink során súlyos aneuploid sejteket a hr-HPV pozitív esetek 60%-ában találtunk. Ennek magyarázatára nyilván figyelembe kell venni, hogy az atípia kialakulásához, ezen belül pedig a súlyos jelek, mint a már említett kifejezett aneupoid sejtek kialakulásához feltehetően időre van szükség. Világos, hogy a hr-HPV asszociált transzformáció kifejezetten lassú folyamat, a fertőzések nagy része ráadásul regrediál, spontán elmúlik. A módszerünkkel azonosított aneuploid óriássejtek fokozatos megjelenéséhez akár évek is kellhetnek, így a korai formában azonosított esetek ezt a jellemvonást nem feltétlenül mutatják. Szintén nem vizsgáltuk, de különbség lehet az egyes HPV típusok óriássejt indukáló hatásában, az egyéni hajlamban és persze ott van még a mérési pontatlanságok kérdése is.

1. *Mi indokolja, hogy a kromoszomális kiegyensúlyozatlanság vizsgálatára a citológiai mintákban pont a 3-as és a 17-es kromoszómák kópiaszámát határozták meg?*

A nagyfokú ploiditás zavar kromoszomális hátterének elemzését egyszerű, de mégis az egyes sejtek szintjén is informatív módon próbáltuk megközelíteni. Itt is többféle megközelítésből került kiválasztásra a két prominens kromoszóma FISH vizsgálata, fontos szempontként kiemelve, hogy igen gyakran érintett kromoszómákról van szó, melyek azonosítása a jól működő DNS-próbákkal megfelelően elvégezhető. Egy-egy sejt esetében a 2+2 FISH szignál még megfelelően kezelhetőnek bizonyult, bár többes jelöléseket is alkalmaztunk. Az aneuploid sejtekben a 2 jel rendszerint a többszörösére szaporodott, a kiegyensúlyozatlanság mértékéről a legegyszerűbb módon a jelek aránypárba állításával kaphattunk képet. Lehet, hogy a megközelítés minimalista, de a két kromoszómát reprezentáló aránypár ezzel együtt hatékonyan mutatta a sejtosztódási hibák sorozatából adódó egyensúlyvesztést, azaz a DNS mérésekkel már kimutatott súlyos aneuploidia alapjelenségét.

1. *Neuroblasztomában a primer tumor és a csontvelői disszeminált sejtek összehasonlításakor egyetlen esetben sem találtak genetikai különbséget?*

Neuroblasztomában a csontvelői disszemináció kimutatása önmagában is jelentős kihívás volt, mivel igazán specifikus markermolekulát korábban nem ismertek. A gangliozid GD2 sejtfelszíni marker kísérleteink előtt nem sokkal jelent meg a szakirodalomban és még kommerciális antitest sem létezett, tudományos kollaboráció keretében jutottunk hozzá. Eredményeink a disszeminált tumor sejtek a vártnál nagyobb gyakoriságát igazolták. A csontvelői érintettség prognosztikai jelentőségével egy időben kerültek előtérbe a neuroblasztoma kimenetelét befolyásoló genetikai elváltozások, melyeket célzottan, in situ hibridizációval az általunk automatizáció segítségével beazonosított csontvelői daganatsejtekben is ki tudtunk mutatni. A célzott vizsgálatok (N-myc amlifikáció, 1p36 deléció, 17q régió nyerés) a leggyakrabban észlelt és így neuroblasztomában kliniko-genetikai besorolás szempontjából lényegesnek tartott eltérésekre irányultak és nyilvánvalóan nem fedték le a daganat progressziója kapcsán bekövetkező másodlagos genetikai hibák lehetőségeit. Kérdésünket is úgy fogalmaztuk meg, hogy vajon lehet-e összefüggésben az említett eltérések heterogenitása a disszemináció jelenségével. Ebből a szempontból annyit lehet vizsgálataink nyomán kijelenteni, hogy a három megvizsgált citogenetikai markerre vonatkozóan jelentős különbségek a primer tumor és a disszeminált daganatsejtek között nem voltak. A disszeminált daganatsejtek és a primer tumor közötti genetikai különbségeket legjobban a komparatív genomhibridizáció módszerével lehet kimutatni, melyre több daganatfélében sor is került, számomra neuroblasztomában egyetlen ilyen tanulmány ismert 2012-ből, Frank Speleman munkacsoportjából (Vandewoestyne M, Int J Oncol, 2012). És természetesen újabban itt vannak az egysejt szekvenálásra alkalmas platformok is.

1. *Előrehaladott emlőrákos betegek perifériás vérében daganatsejteket tudtak kimutatni. Mi volt az előrehaladottság kritériuma? Hogyan viszonyul mindez a jelenleg széles körben elérhető CellSearch IVD technológia által meghatározott határértékekhez?*

Vizsgálatainkban az előrehaladott stádium meghatározás valójában a nemzetközi klinikai szakirodalomban használatos „advanced stage”, azaz III-IV. stádiumú metasztatikus emlőrákot jelentette. Vizsgálati hipotézisünknek megfelelően a vérből végzett tumorsejt azonosítás technikai részleteinek tisztázása egyszerűbben kivitelezhető viszonylag gyakoribb pozitív események kapcsán. Viszonylag kis esetszámú és csak részben publikált tanulmányunkban egyértelműen megmutatkozott, hogy a perifériás vérben keringő daganatsejtek (CTC) mennyisége a klinikai stádiummal szoros összefüggést mutat, és az irodalomból az is ismert, hogy a tumortömeg csökkentésekor (emlő abláció, metasztatektómia) a CTC mennyisége is visszaesik. Ismert továbbá, hogy a daganatsejt koncentráció bizonyos hatásokra (stressz, hormon, sőt, fizikai terhelés) fokozódhat, változhat, a fellelhető sejttömeg tehát elég dinamikusan alakul. Mindezek mellett igen izgalmas az újabb és egyre érzékenyebb technikai platformokra helyezett tumorsejt kimutatás szűnni nem akaró előre törése. Ennek egy rendkívül ígéretes változata a CellSearch (Janssen Diagnostics) márkenéven forgalomba került műszeres teszt, mely immunomágneses dúsítást követően automatizált fluoreszcens képanalízis módszerével azonosítja a sejteket. A vizsgálat itt 7,5 ml vérből készül és a dúsítás révén hatásfoka minden bizonnyal magasabb lehet, mint az általunk kidolgoztott, 10 ml vérből, pusztán automatizált képanalízist felvonultató technika. Az 5-6 évvel korábban kifejlesztett, teljesen nyitott MetaCyte készülékre épülő módszerünk nem rendelkezett integrált, sejtdúsítást lehetővé tevő funkcióval, a CellSearch rendszer tehát mindenképpen előrehaladottabb platformot képvisel. A széles körben folytatott klinikai vizsgálatok ezzel az emelt érzékenységgel klinikai relevanciát a több, mint 5 CTC-t mutató esetekben tudtak igazolni (177 beteg túlélésének elemzésével)(Hayes DF et al, Clin Cancer Res 2006). Még izgalmasabb, hogy 2011-es adatok szerint (Yu M et al, J Cell Biol) a metasztatikus emlőrákok esetében 5 héttel az eltávolító műtét után még 50%-ban tudtak CTC-t azonosítani. Érzésem szerint a képanalízisen alapuló technikákat hamarosan felválthatják majd az érzékeny molekuláris módszereket alkalmazó tesztek. A keringő daganatsejteknek további fontos klinikai szerep juthat pl. a progresszióra hajlamosító másodlagos mutációk nem invazív kimutatásának, amely egy teljesen más technológiát, az egyes sejtek új generációs szekvenálásának (single cell sequencing) módszerét igényli és az első eredmények már meg is jelentek (pl. a firenzei Pinzani P és munkacsoportja).

1. *A proliferációs index és az AuB expresszió összefüggéseinek ismeretében emlőrákokban a receptor pozitív vagy a tripla-negatív csoportban van-e szerepe az AuB kináznak?*

Munkáink során a magas AuB expresszió hátterében két mechanizmust feltételeztünk: a magas sejtproliferáció esetén értelemszerűen emelkedett a sejtciklus G2/M fázisában fiziológiásan expresszált AuB, mely tehát az AMI index változását nem eredményezte. Ezzel szemben a fokozott AMI az AuB szabályozási defektusát vetíti előre. A sejtciklustól független AuB expresszió a mitotikus hibákat és ezzel az aneuploidia jelenségét valószínűsítik, ennek klinikai jelentősége viszont önmagában, nagy esetszámok alapján még nem bizonyított. A receptor pozitiv emlőrákok proliferációja viszonylag alacsony és itt az AuB expresszió is kiegyensúlyozott, dereguláció jelensége alig fordul elő, ráadásul biológiai kezelésük alaphelyzetben adott. Ismert ugyanakkor, hogy a tamoxifen rezisztens emlőrákokban magasabb az AuB expressziója és ez a jelenség kísérletesen is indukálható (Larsen SL, BMC Cancer, 2015). Ezzel szemben a tripla-negatív tumorok alaphelyzetben is igen agresszívak, proliferációs aktivitásuk általánosságban magas, magas AuB expresszióval. A tripla-negatív emlőrákok terápiás megközelítése jelenleg a legproblémásabb, mivel specifikus terápia nem áll rendelkezésre. A legújabb eredmények szerint az AuB expresszáló triple-negatív tumorok Au-kináz gátlókra csökkentik a sejtproliferációt, és tetra/oktaploidizációt követően sejthalállal reagálnak (Kawai M et al, J Biomed Sci, 2014; Kai K et al, Mol Cancer Ther 2015). A valamely okból jelentős AuB expressziót mutató, egyéb célmolekulával nem rendelkező, vagy rezisztens emlőtumorok ezért kifejezetten jó célpontjai lehetnek egy AuB kináz gátló terápiának.

Debrecen, 2016. április 18. Dr. Méhes Gábor