

VÁLASZOK

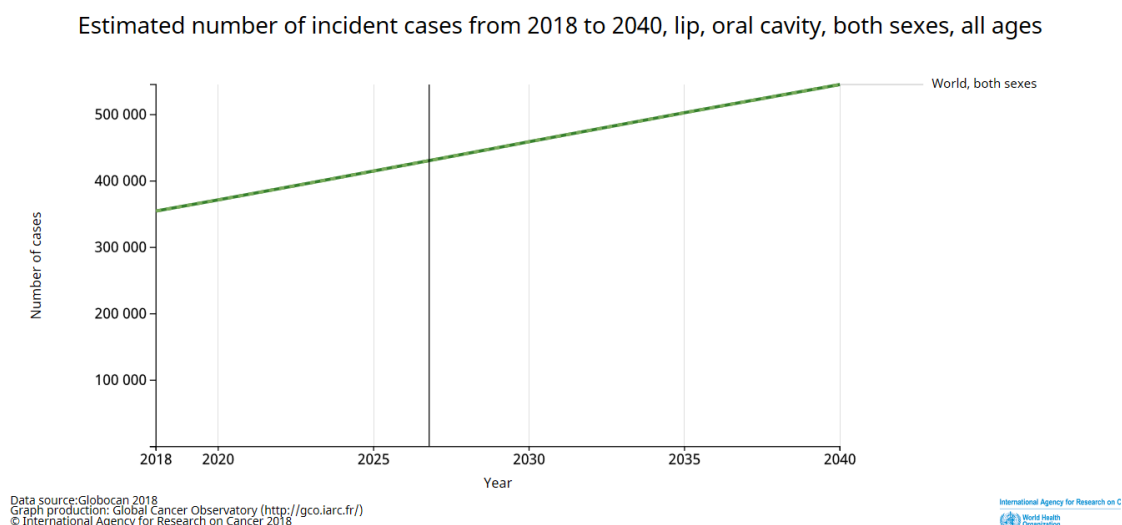
PROF. DR. KÓNYA JÓZSEF EGYETEMI TANÁR, AZ MTA DOKTORA BÍRÁLATÁBAN FELTETT KÉRDÉSEKRE

Hálásan köszönöm Kónya Professzor Úr alapos bírálatát, mely feltétlenül segítségemre volt eddigi munkám mélyebb és kritikusabb értékelésében és jövőbeni kutatásaim irányának meghatározásában. A bírálatban felvetett kérdésekre az alábbiakban válaszolok.

1. A Bevezetésben az incidencia kiugró növekedéséről, valamint a populáció újabb rétegeinek növekvő reprezentáltságáról ír, de ennek számszerű adatai, dinamikája alig derülnek ki az értekezésből.

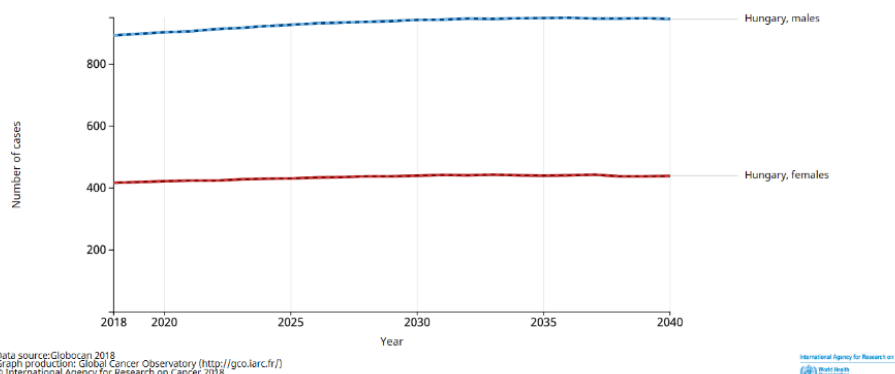
Bírálóval teljes mértékben egyetértek abban, hogy dolgozatom bevezető része nem tárgyalja mélységében az adatok dinamikáját. Ez azért következett be, mert a bevezető részt csupán a téma aktualitásának és fontosságának jelzésére szántam, ekként valóban csak felmutatva a problémát. További magyarázatot adhat, hogy nagy populációkat jellemző, mérvadónak tekinthető összefoglaló adatokat tartalmazó munkák - érthető módon - nem túl gyakran látnak napvilágot, így a témával foglalkozó kutató sokszor kénytelen régebbi forrásokat is figyelembe venni, legalábbis addig, amíg az újabb felmérések eredményei meg nem jelennek. Így pl. Kásler professzor és munkatársai még 2017-ben, az Orvosi Hetilapban megjelent összefoglalójukban (1) is a 2012-es GLOBOCAN felmérésre alapoznak (az ajak és szájüreg daganatai náluk is vezető helyen állnak, halálozás és előfordulás tekintetében is). Disszertációm megírásának idején még nekem sem volt hozzáférésem a GLOBOCAN legújabb adatbázisához, viszont jelen válasz megírása idején a GLOBOCAN 2018 már valóban elérhető, és érdemes is róla beszélni, mert váratlan, de egyben öröndetes változásokról számol be magyar viszonylatban.

Sajnálatos, hogy ezen új adatok alapján sem mondhatjuk, hogy az ajak- és szájüregi tumorok, igen gyakori előfordulása megoldódni látszana, hiszen a 2040-ig felvázolt prognózis világviszonylatban (mindkét nemre vonatkozóan) az incidencia töretlenül emelkedő tendenciáját jelzi:



Ami viszont kifejezetten pozitív fejlemény, hogy Magyarországon az incidencia emelkedése megtorpanni látszik. 2025-ig az előrejelzés már csak elhanyagolható növekedést, azt követően 2040-ig stagnáló tendenciát mutat.

Estimated number of incident cases from 2018 to 2040, lip, oral cavity, males and females, all ages



A javulás valószínűsíthető okaként említhetnénk többek között a dohányzás erőteljes korlátozásaira irányuló törekvéseket, az Egészséges Nemzetért Népegészségügyi Programot, a Nemzeti rákkontroll programot, illetve általánosságban az egészséges életre való nevelés oktatási stratégiai programjait.

Ettől függetlenül szájüregi daganat tekintetében Magyarország ebben a pillanatban még a világ vezető országai közé tartozik, tehát a területen bőven van tennivaló, úgy a gyógyításban, mint a megelőzésben, annak érdekében, hogy a kedvező előrejelzés valósággá válhasson.

Irodalom

(1) Kásler M, Ottó Sz, Kenessey I. A rákmorbiditás és -mortalitás jelenlegi helyzete a Nemzeti Rákregiszter tükrében. *Orvosi Hetilap*. 2017; 158 (3): 84-9.

2. Milyen megbízható adatforrások léteznek a Nemzeti Rákregiszter indítása előtti hazai adatokról? Azok adatgyűjtési módszere és időintervalluma miben tér el a Nemzeti Rákregiszterétől?

Mint ismeretes, a Nemzeti Rákregiszter működtetését egy 1999-ben bevezetett Miniszteri Rendelet írja elő, és az Országos Onkológiai Intézetet jelöli ki annak nemzetközi irányelvek szerinti gondozójaként. Az első adatokat 2001-óta szolgáltatja. A Nemzeti Rákregiszter bevezetése előtti időkből az 1960-as évek elejétől lelhetőek fel olyan publikációk, melyek a szájüregi daganatok kiemelkedő magyarországi gyakoriságával foglalkoznak (Többek között: Bánóczy, Sugár, Orosz, Szabó, Csiba, Rigó és Márton Professzorok tollából). Ezek a publikációk főként regionális jellegűek, tehát Magyarország egészét nem jellemzik (1), illetve jellemzően a rákmegelőző állapotokat (prekancerózisokat) taglalják (2, 3). Összességében tehát azt lehet mondani, hogy a Nemzeti Rákregiszter megindítása előtt is hozzá lehetett jutni hiteles adatokhoz, azonban ezek szintetizálása a kutató feladata maradt, tekintve az adatok regionális jellegét, ezen felül, a tárgyalt állapotok tartománya is szűkebb volt, amennyiben a rákelőző állapotok jelentették a vizsgáldás elsődleges fókuszát. Én magam igen szerencsés helyzetben voltam, hiszen Sonkodi István Professzor Úr jóvoltából 7500 páciens és

csaknem 15000 szövettani vizsgálat eredményeihez férhettem hozzá, hiszen Professzor Úr a Szegedi Tudományegyetem Orális Medicina Szakrendelése keretében 1960 óta vezet rendszeres és átfogó nyilvántartást a szájüregi daganatos esetekről. Mélységében ennek az adatbázisnak az adatgyűjtési módszerét ismerem annyira, hogy erről nyilatkozni merjek. Sonkodi István Professzor még az adatgyűjtés kezdetén egyedi adatlapot hozott létre az egyes daganatos páciensek számára, az adatok gyűjtése azóta is ezen az egyedi adatlapon történik. Az adatlap az onkológiai státuszról gyűjthető lényeges információknak és a lehetséges diagnózisoknak tulajdonképpen a teljes körére kiter, és a diagnózist minden esetben szövettani vizsgálat erősíti meg, melynek eredménye a páciens kártyájához kerül csatolásra. Az utánkövetési vizitek adatait szintén ezen az adatlapon rögzítik. Ilyen módon az adatbázis nem csupán regionális makromutatók kiszámítására alkalmas, de az egyéni betegutak, kórlefolyások is nyomon követhetők, igen nagy számú változó függvényében. Minthogy az Orális Medicina Szakrendelés az azóta eltelt idő legnagyobb részében regionális ellátóközpont volt, az itt gyűjtött adatok igen jó képet adnak a Bács-Kiskun-Békés-Csongrád régió helyzetéről, egészen 2010-ig. Erre a következő kérdésre adott válaszómban még visszatérek.

Irodalom

1. Olasz L, Szabó I. [Etiology of tumors of the oral cavity]. *Fogorvosi szemle*. 1989;82(8):233-6.
2. Bánóczy J, Sugár L. Progressive and regressive changes in Hungarian oral leukoplakias in the course of longitudinal studies. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. 1975;3(4):194-7.
3. Bánóczy J, Sugár L. Longitudinal studies in oral leukoplakias. *Journal of Oral Pathology*. 1972;1(6):265-72.

3. Végül is mi emelkedett 40 év alatt 31-szeres mértékben? A szegedi központ teljesítményadata vagy a valódi incidencia? Ha az utóbbi, akkor hogyan lehetett retrospektíven kiküszöbölni a betegutak lehetséges változásából származó torzítást, pl. az incidencia nevezőjét alkotó populációban kialakult esetek más központokban ellátását?

Előző válaszómban már utaltam rá, hogy adataimat csak a 2010-es évig adtam meg, ugyanis 2010-et követően, az újonnan létrehozott Arc-Állcsont és Szájsebészeti Klinika újabb központ bekapcsolódását jelentette a korábbi, teljesen egyirányú, egyetlen központtal rendelkező betegirányítási rendszerbe. 2010-ig a regionálisan előforduló szájüregi daganatos diagnózisok csupán a Fogorvostudományi Kar Orális Medicina Osztályán kerültek felállításra, így okkal feltételezzük, hogy a számok valós incidencia-növekedést tükröznek, ami egyébként az adott időszakra jellemző országos szintű tendenciának is megfelel (1). A konkrét kérdésre válaszolva: a 31-szeres növekedés az elmondottak alapján regionális incidencia-növekedésnek tekinthető, és bár az ellátottak össz-száma is növekedett, a disszertáció 1.sz. Táblázatából látszik, hogy a rosszindulatú daganatok incidencia-növekedése ezzel a növekménnyel nem arányos, így valószínűtlen, hogy pusztán a szakrendelés teljesítménynövekedéséből eredne.

Irodalom

1. Sonkodi I, Boda K, Decsi G, Buzás K, Nagy K. [A clinicopathological retrospective epidemiological analysis of benign tumors and tumor-like lesions in the oral and maxillofacial region, diagnosed at the University of Szeged, Department of Oral Medicine (1960-2014)]. *Orvosi Hetilap*. 2018; 159(37):1516-24.

4. Miért alkalmaztak két olyan módszert, amelyek lényegesen eltérő sarjadzó gomba eredményre vezettek? Az alfejezetben szereplő mennyiségi adatokat melyik „izolálhatósági” megközelítéssel és milyen módszerrel (sorozathígítás, kalibrált kioltás, stb) határozták meg? Melyik érték közelíti jobban az *in vivo* szituációt? A csíraszám adatokat az értekezés hol a transzport közeg ml-ben mért térfogatára, hol a daganatfelszín cm²-ben mért felszínére vonatkoztatja. A mintavételi eljárás alapján hogyan feleltethető meg a két különböző mértékegység egymásnak? Mivel magyarázható, hogy az inváziós enzim projekt 77+/-38 csíraszámával szemben a laktoperoxidáz projekt beavatkozás előtti, analóg adata kb. 5 nagyságrenddel magasabb, azaz kb. 107 csíraszám olvasható le az oszlopdiagramról. Az utóbbiak közül melyik érték közelíti jobban az *in vivo* szituációt? Mivel magyarázható, hogy az aminfluoridos projektben a kiindulási baktérium csíraszámokat 2 nagyságrenddel alacsonyabbra mérték, mint a többiben? Történt-e becslés a csíraszám meghatározás bizonytalanságára vagy a tumorstádiummal összefüggő változásaira?

Mivel ezek a kérdések szervesen összetartoznak, a legcélszerűbbnek azt láttam, ha ezekre együttesen, összefüggő válaszban reagálok.

Fontosnak tartom kiemelni, hogy a szájüregi mikrobiota összetétele számos tényezőtől függ és meglehetősen nagy egyéni, mennyiségi és minőségi variabilitást mutathat, még akkor is, ha a mintavétel, mintaszállítás és mintafeldolgozás (ideértve a minta hígítását is) a legnagyobb mértékben standardizált. Az irodalomban bőven dokumentált tény az is, hogy a mikrobiota még a szájüregen belül sem egyenletes, hiszen a szájüreg egyes részei eltérő fajoknak kínálnak optimális életteret. Ez egészséges egyénekre is igaz, de a szájüreg rosszindulatú daganataiban szenvedőkre különösképpen. Éppen az egyéni eltérések miatt döntöttünk úgy az első vizsgálat során, hogy a beteg tumor felületéről vett mintát ugyanazon egyén egészséges nyálkahártya felületéről vett mintával hasonlítjuk össze (1). Rögtön ennek a vizsgálatnak a kapcsán meg is ragadom az alkalmat, hogy Professzor Úr mértékegységekre vonatkozó kérdését megválaszoljam: a csíraszámot 1 cm²-nyi (tumoros, illetve ellenoldali egészséges) nyálkahártya- felületről vett mintákból határoztuk meg. A mintákat mindkét oldal esetében 1 ml, az anaerob baktériumok túlélését is biztosító pre-redukált transzport levesben szállítottuk a laboratóriumba. Ezért fordulhatott az elő, hogy a csíraszám-adatok bizonyos esetekben a vizsgálatok során a tumor/egészséges nyálkahártya 1 cm²-ére kerültek megadásra, más esetben az 1 ml transzport közegre, melyben a törlés során felvett minta szuszpendálásra került. Ez valóban némileg zavaró lehet, de az értékek gyakorlatilag minden esetben az 1 cm² -nyi nyálkahártyáról vételezett mintából meghatározható csíraszámokat jelentik. Az élő aerob és anaerob csíraszám-meghatározás standard mikrobiológiai módszerrel, 10-es léptékű hígítási sort alkalmazva, minden hígításból 10-10 µl mennyiséget táptalajra szélesztve történt, majd a lemezeket aerob és anaerob körülmények között inkubáltuk. A szájüreg nyálkahártyáján biofilmet képező aerob és anaerob baktériumok tenyésztéssel történő mennyiségi

meghatározása nehezen megvalósítható, hiszen az ún. aerob és fakultatív anaerob baktériumok egy része is képes az anaerob körülmények között inkubált táptalajokon telepeket képezni. Ezért az adatok interpretálása akként történt, hogy az anaerob módon telepet képző baktériumok számából kivontuk az oxigén jelenlétében telepet képző (aerob) baktériumok számát.

Amint azt disszertációmban is rögzítettem, a 21 egyén átlagában jelentősen magasabb csíraszámot mutattunk ki a daganatos oldalról, mint az egészséges oldali nyálkahártya-felszínről. A tumoros és az egészséges nyálkahártya-felületen kialakuló biofilmet alkotó flóra összetételében lévő különbségét jól mutatja az izolált és identifikált speciemek megoszlása. A disszertációban szereplő 2. és 3. táblázat egyértelműen mutatja, hogy elsősorban az anaerob speciemek gyakrabban voltak izolálhatók a tumor felszínről származó mintákban. Példaként említeném, hogy a *Fusobacterium* speciemek és az egyéb Gram-negatív anaerob speciemek jóval gyakrabban kerültek izolálásra a tumor felszínről származó mintákból, mint az egészséges nyálkahártyáról.

A további, 2000-ben publikált vizsgálatunk arra igyekezett választ találni, hogy hasonló betegpopulációban a Meridollal való rendszeres öblögetés milyen mértékben befolyásolhatja a tumor felszínén kialakuló biofilm mikroflórájának mennyiségi és minőségi összetételét (2). Itt a mintavétel csak a tumorfelszínt érintette, de az eljárás egyébként a korábbi vizsgálattal teljesen megegyező módon történt, ahogyan a minták feldolgozása és elemzése is. A csíraszámok ebben az egyébként kis elemszámú ($n=10$) vizsgálati populációban a munkánk során vizsgált többi betegcsoporthoz képest valóban alacsonyak voltak, mind az aerob mind az anaerob baktériumpopuláció vonatkozásában. A különbséget minden bizonnyal a jóval kisebb számú és óhatatlanul más összetételű betegpopuláció bevonásával magyarázhatjuk.

A laktoperoxidázzal kapcsolatos vizsgálatban (3) egy nagyobb betegcsoport vizsgálatára került sor. Harminc beteget vontunk be, azonban az ő helyzetük a fentebb említett betegcsoportokhoz képest annyiban speciális volt, hogy daganatuk miatt besugárzáson estek át. Ennek következtében más szájnálkahártya-jellemzőkkel, és a korábban elmondottakból következően sajátos szájüregi mikrobiotával rendelkeztek. Így annak ellenére, hogy metodológiai szempontból rendelkező beteg-csoportot alkottak mind a kezelt, mind a kontroll csoportban. A bakteriológiai vizsgálathoz a mintavétel ebben az esetben is 1 cm^2 területről, általában ulcerózus nyálkahártya-felszínről történt. A minta feldolgozása, a csíraszám-meghatározás és az izolált aerob és anaerob baktériumok species szintű meghatározása is az előző vizsgálatokkal megegyező módon történt. Meglepő volt az anaerob speciemek nagyobb sokfélesége, ami a kezeléseket előtt és után, valamint a kontroll csoportban is jellemző volt. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy a tumor miatt radioterápiában részesülő, nyálkahártya-fekélyekkel rendelkező betegekben egy sokkal komplexebb mikrobiota alakul ki a szájüregben. Professzor Úr kérdésére válaszolva szeretnék röviden szólni a *Candida* speciemek nagyságrendekben mérhető eltéréseiről. Kulcsfontossága van itt annak a ténynek, hogy az inváziós projektben részt vevő betegek nem részesültek besugárzásban, míg a laktoperoxidáz projektben részt vevők igen. A különbség okát ebben látom, hiszen az irodalomban ismert, hogy a szájszárazság rendkívül kedvező körülményeket teremt a *Candida*-kolonizáció számára. Mivel pedig a szájszárazság a fej-nyak terület besugárzásának szinte kivéhetetlenül bekövetkező mellékhatása, a besugárzott betegekben jóval jelentősebb kolonizációra kell számítani (4)

Végezetül: a fajösszetétel, illetve az aerob és anaerob baktériumok csíraszámja a tumorstádiummal nem mutatott összefüggést és a tumorok stádium-besorolása nem befolyásolta szignifikánsan a mért csíraszámot, ilyen összefüggéseket nem találtunk. Ez nem jelenti természetesen azt, hogy ilyen összefüggés nem is létezik, az eredmény valószínűleg

mindössze arra utal, hogy vizsgálatainkban az egyes tumorstádiumok nem voltak elégséges számban képviseltetve ahhoz, hogy a különbség kimutatható legyen. Erre utal az, hogy Yang és munkatársai nemrég megjelent tanulmányukban, 197 beteget vizsgálva már ki tudtak mutatni ilyen összefüggést (5).

Irodalom

1. Nagy KN, Sonkodi I, Szoke I, Nagy E, Newman HN. The microflora associated with human oral carcinomas. *Oral oncology*. 1998; 34(4):304-8.
2. Nagy K, Szoke I, Sonkodi I, Nagy, E, Mari A, Szolnok G, Newman HN. Inhibition of microflora associated with oral malignancy. *Oral Oncology*. 2000; 36: 32-36.
3. Nagy K, Urban E, Fazekas O, Thurzo L, Nagy E. Controlled study of lactoperoxidase gel on oral flora and saliva in irradiated patients with oral cancer. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2007; 18: 1157-1164.
4. Leung WK, Dassanayake RS, Yau JY, Jin LJ, Yam WC, Samaranayake LP. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(6):2219-26.
5. Yang CY, Yeh YM, Yu HY, Chin CY, Hsu CW, Liu H, et al. Oral Microbiota Community Dynamics Associated With Oral Squamous Cell Carcinoma Staging. *Frontiers in microbiology*. 2018; 9:862.

5. Az eredményeket szintetizálva milyen általános érvényű következtetéseket lehet levonni a candidák szerepéről az egészséges szájüregben?

A különböző gombafajok, egészséges szájüregben játszott szerepéről sem tudunk sokat. A szakirodalom számos alkalommal mutat rá arra, hogy az egészséges mikroflóra egyénenként is eltér, mi több, egy dinamikusan változó közösség, aminek összetételét és a fajok egymáshoz viszonyított arányát is különböző környezeti hatások formálhatják. Ez különösen érvényes a gombapopulációra (1). (*Hallen-Adams, et al.: Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. Virulence, 1-7 (2016)*). Ezek a tényezők nehezítik az általános érvényű következtetések levonását. A gazda és a mikrobiota közötti homeosztázist számos tényező befolyásolja, közöttük, a gazda egészségügyi állapota, immunstátusza, és életvitele. Azzal kapcsolatban, hogy a *Candida* fajok milyen hatást gyakorolnak a gazdaszervezetre egy egészséges szájüregben, kollaborátorunkkal, Dr. Gácser Attilával az MTA-SZTE Lendület Mikrobiom Kutatócsoportjában jelenleg is kutatásokat végzünk. Eddigi eredményeink alapján a különböző gombafajok által kiváltott immunválasz nem egységes, hanem fajonként eltérő lehet. Jó példa erre a *Candida albicans* és a *Candida parapsilosis* esete, amely fajok közül a *C. albicans* erős gyulladásos válasz kiváltására képes, míg az utóbbi faj esetében inkább egy tolerogén választ feltételezünk. Egy egészséges szájüregben, mindkét faj előfordulhat, azonban az, hogy ezek

mennyiségének megváltozása hogyan hathat a fiziológiás alapállapot megváltozására, avagy bizonyos kórok kialakulására/progressziójára, még nem ismert.

6. Amikor a *Candida* inváziós enzimeredményeket daganatokozó szempontból interpretálja a szöveges fejezetben (32. o) említett gyengítés is és a tézispontban szereplő cáfolás is helytelen, mert tercier prevenció megközelítéssel megbízhatóan nem lehet etiológiai tényezőt vizsgálni, még kevésbé kizárni. Legfeljebb a tudományos közleményekben gyakran használt „nem támasztja alá” értékelés alkalmazható.

Bírálom jogosan kifogásolja, hogy a *Candida* inváziós enzimeredményeket félreérthető módon „daganatokozóként” interpretáljuk az értekezésben. Jelen kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy az egészséges szájüregből izolált gombák hidrolitikus enzim termelése szignifikánsan eltér-e egy már tumorosan transzformálódott epithel felszínéről izolálható gombaétól. Eredményeink alapján ilyen különbség nem volt detektálható. Jelen esetben csupán azt a kérdést tettük fel, hogy a tumoros közeg, milyen hatással van a gomba szekretált enzim-aktivitásra, ami alapján az mondható el, hogy a daganatos közeg nem indukál nagyobb mértékű enzim szekréciót. Bírálom megjegyzése helytálló, amely alapján helyesebb lett volna óvatosabban fogalmazni a tumor iniciációra gyakorolt hatással kapcsolatban. A szakirodalom alapján ismert, hogy a gombák által szekretált hidrolitikus enzimek képesek az immunológiai mikrokörnyezet befolyásolására, így nem zárható ki, hogy bizonyos betegségek esetén azok lefolyását is meghatározhatják. Vizsgálataink erre azonban nem tértek ki, így Bírálom kifogásával teljesen egyetértve ez a feltevés is csak hipotézisként kezelendő.

7. A laktoperoxidáz projektben történt-e becslés az "eltűnő" ill. "megjelenő" taxonómiai egységek csíraszámának detektálhatósági küszöbére ill. az értekezés szerint "nehezen magyarázható" változásokat lehet-e mennyiségi és ökológiai szempontok ill. az endogén mikrobiota alapján magyarázni?

Opponensem kérdésére, hogy mi lehet a magyarázata egyes „eltűnő” és „megjelenő” taxonómiai egységeknek, a válasz igen sokrétű lehet. Lehet spontán vagy kezelésre történő változás a szájüregi mikrobiota összetételében. De lehet egyes speciesek olyan mértékű csíraszám csökkenése, mely már a kimutathatóságot lehetetlenné teszi. Egy nagyon komplex baktérium flóra tenyésztéséről van szó, amikor egy-egy táptalaj felszínén akár 10-15 különböző telep morfológiájú baktérium populáció lehet jelen. Egy ilyen komplex flóra vizsgálatánál elkerülhetetlen, hogy egy-egy kisebb csíraszámú jelenlévő species telepe nem kerül izolálásra. A domináló flóra változását azonban ez a vizsgálat jól mutatta az igen jelentős csíraszám csökkenéssel a Gram-negatív anaerob genusok speciesei és a *Candida* törzsek esetében a 4 hetes laktoperoxidáz kezelést követően a kontrollhoz viszonyítva.

Végül ismételtelen megköszönöm Kónya Professzor alapos és részletekbe menő értékelését, kritikai megjegyzéseit és tisztelettel kérem válaszom elfogadását.