

Szeretném kifejezni köszönetemet Méhes Gábor Professzor Úrnak a disszertációm minden részletre kiterjedő alapos áttanulmányozásáért, az elismerő szavakért és a segítő szándékú kritikai észrevételekért. Külön köszönöm azt a megjegyzést, hogy *„egyes kiváló minőségű mikroszkópos felvételek mérete indokolatlanul kicsi”*, mivel a disszertáció összeállításakor többször is lebeszéltem magam a szövettani képek nagyobb méretben való ábrázolásáról.

Ami az egyes tanulmányok átfedését illeti, az a vizsgálatainknál – a betegekre vagy a tumormintákra vonatkozóan – kevesebb volt mint 10%, így nem volt lehetőség a javasolt keresztbe validálásra. Nagyon hálás vagyok a több vizsgálaton is átívelő összefüggések tanulmányozására vonatkozó javaslatokért. Mentségemül szolgál, hogy a hiányolt elemzések – így például a peritumorális agyödéma és az agyi áttétben detektált immunsejtek denzitása közti összefüggés vizsgálata – a Nemzeti Agykutatási Program keretében jelenleg is zajló projektjeink egyik fő témája, kiegészítve a mononukleáris immunsejtek fenotipizálásával, továbbá az agyödéma patomechanizmusát kutató immunhisztokémiai vizsgálatok (pl. aquaporinok, VEGF[R], tight junction proteinek) elvégzésével.

Köszönöm a 26. ábrára vonatkozó kritikai észrevételt. Valóban, az ábraalírásban felcserélésre került a kék és sárga szín, szerencsére azonban az ábra – színskálára vonatkozó – belső színkód magyarázata egyértelművé tette az adatok értékelését. A 14. Táblázatban olvasható 17 marker és a szövegben később említett 29 marker közti látszólagos ellentmondás könnyen feloldható, mivel a táblázat csak azokat biomarkereket mutatta be, amelyek az egyes vizsgálati csoportok között expressziós különbséget mutattak, tehát a 29-ből 17-et. Erre utaltunk a táblázat címében is.

Az opponensi véleményben feltett kérdésekre válaszaim az alábbiak:

1. *Létezik-e olyan tüdőrák adatbázis, ahol hasonló vizsgálatok eredményei nagy számban elérhetők és ahová a kutatási adatokat feltöltve az értékes eredmények – túl a publikáció adta lehetőségeken – további kutatások számára elérhetők? Mennyire volnának az ilyen adatbázis elemzések hasznosak egy adott biológiai mechanizmus szerepének gyors validálására?*

A tüdőrák-adatbázisra vonatkozó kérdés a transzlációs tüdőrák kutatás kulcskérdése, ami mellett megemlíteném még az archivált fagyasztott tumorminták szerepét is. Tüdőrákban rendelkezésre állnak *in silico* génexpresszió elemzést lehetővé tevő adatbázisok (GEO Database, COSMIC Database), azonban munkacsoportunk kutatásai alapján is elmondható, hogy ezek használata magas szintű informatikai tudást igényel, emellett az adatbázisokban rögzített klinikai adatok mennyisége és minősége nagyban meghatározza az eredmények kiértékelhetőségét [Krzystanek, Biomarker Res, 2016]. A klinikai adat- és szövettani-mintabázis kérdésköre rendkívül nagy jelentőségű a ritkán előforduló tüdőrákok esetében,

gondolok itt elsősorban az adenoid cystikus carcinomára vagy a mucoepidermoid carcinomára. Mindemellett manapság már a ritkán előforduló driver mutáció pozitív esetek is (pl. NTRK, RET, HER2) „ritka tüdőrák” típusnak tarthatók, ezért az ilyen adat- és mintabázisok kialakítása létfontosságú lenne a további kutatásokhoz. Általánosságban elmondható, hogy Európában nincsenek tüdőrákra vonatkozó, nyilvánosan elérhető, nagy volumenű archivált tumormintákkal és részletes klinikai adatbázissal rendelkező centrumok. Ugyanakkor éppen az ilyen adat- és mintabázisok hiánya tette lehetővé számunkra, hogy az Országos Korányi Pulmonológiai Intézet igen nagy betegforgalmát és informatikai lehetőségeit kihasználva bekapcsolódhassunk Charles Swanton londoni professzor kutatási projektjébe, amelynek eredménye a Nature Medicine-ben került publikálásra [Biswas, Nat Med, 2019]. (Ez a munka közvetlenül nem szerepelt a disszertációmban.)

2. EGFR genetikai vizsgálatok (7.3.2. fejezet, 95. oldal): EGFR génrégió FISH vizsgálatai 97/118 esetben vezettek eredményre, melyek között 39 (40%) FISH pozitív minősítést kapott. Az elnevezés nem szerencsés, mert bármely, a normálistól eltérő eltérést magában foglal, ám egyes, lényegtelennek tartott eltérések (pl. a 14% körüli triszómiás eset) ebből a csoportból később kikerültek. A rövid leírásból nem világos, hogy a FISH-pozitivitás a génamplifikáción túl a meggyőző poliszómiát jelenti? Az összehasonlításból látható (52. ábra), hogy a fehérjeexpresszió, a kópiaszám eltérés és a mutációs státusz az amplifikált eseteket leszámítva jelentős összefüggést nem mutat, így érdemes lett volna a poliszómiás, ill. triszómiás eseteket külön is elemezni, fehérje, mutáció szempontjából.

Nagyon köszönöm Professzor Úr kritikai észrevételeit és javaslatait. Fontos hangsúlyozni, hogy erre a vizsgálatra az EGFR diagnosztika igen korai szakában került sor, amikor még számos kérdés tisztázatlan volt. Mi abban az időben a Frederico Cappuzzo által javasolt klasszifikációt használtuk a FISH-pozitivitás megállapításához [Cappuzzo, JNCI, 2005]. Ily módon pozitívnak minősítettük a mintát, ha a sejtek 15%-ában amplifikáció vagy 40%-ában poliszómia volt igazolható. Rendkívül izgalmas, és további vizsgálatokat sürgető kérdés, hogy hol húzzuk meg a „threshold”-ot, mivel elgondolkodtató, hogy a sejtek egy kis részének erős vagy kevesebb mint felének közepes kópiaszám emelkedése meghatározhatja az egész daganat biológiai viselkedését.

3. A 7.3.3.1. alfejezetben az EGFR génvariánsok vizsgálata kapcsán a ritka EGFR variánsok is kimutatásra kerültek, bár ezek egy része minden valószínűség szerint nem releváns anti-EGFR terápia szempontjából. A ritka variánsok esetében a bioinformatikai adatbázisok ráadásul bizonytalan, ellentmondásos megállapításokat tükröznek, így a patogén/onkogén besorolás mellett gyakrabban ismeretlen (unknown), vagy éppenséggel jóindulatú (benign) meghatározás is szerepel. Milyen mértékben sikerült az EGFR génszekvenálás után a ritka variánsok egzakt prognosztikai, prediktív besorolása tanulmányaik során?

Vizsgálatunk során két olyan ritka EGFR mutációt detektáltunk, amelyek szenzitizáló mutációnak tarthatók és irodalmi adatok alapján kedvező prediktív faktorok. Ezek a G719X és az L861Q mutációk. 2015-ben a ritka mutációk pontos prognosztikai és prediktív értéke még

nehezen volt meghatározható, azóta jelentősen bővültek az adatbázisokban (pl. COSMIC) rögzített terápiás eredmények. A közleményünk szupplementumának I. Táblázatában magunk is tételesen felsoroljuk az egyes ritka mutációkat, az alkalmazott EGFR-TKI fajtáját, a terápiás vonalat és a RECIST szerinti terápiás választ, jelezvén azt is, hogy mely mutációk szerepeltek már korábban is a COSMIC adatbázisban (<http://links.lww.com/JTO/A803>).

Az exon 18 G719A mutációval kapcsolatban később újabb saját tapasztalatot szereztünk, mivel egy agyi áttétes betegünknel gefitinib kezeléssel tartós remissziót sikerült elérni [Puskás, Med Thor, 2016].

4. Kifejezetten érdekes kérdés az EGFR aktiváció megközelítése pEGFR IHC alkalmazásával a génmutációs státusz függvényében (7.3.5. fejezet). Vajon vannak-e hasonló eredmények (pEGFR) az EGFR gén amplifikációjával kapcsolatban is? Milyen mértékben járhat a génamplifikáció a pEGFR útvonal aktivációjával? Szóba jöhet-e a pEGFR IHC mint praktikus alkalmazható surrogate marker?

A szakirodalom alapján sem tüdő adenocarcinomában, sem pedig az ugyancsak intenzíven vizsgált colorectalis carcinomában nem figyelhető meg összefüggés az EGFR génkópiaszám és az EGFR protein expresszió között; az utóbbi daganattípusban emellett pEGFR expressziót is vizsgáltak [Hirsch, JCO, 2003] [Lievre, Br J Cancer, 2017]. Ennek egyik fő oka az, hogy a kópiaszám emelkedés mérsékelt, még ha el is éri az amplifikáció szintjét (>4). Másrészt mindkét daganattípusban relatíve ritka a kópiaszám emelkedés. Mindemellett a pEGFR pozitivitás hátterében nemcsak az EGFR konstitutívan aktív mutációja állhat, hanem feed-back aktiválás is, amit nemcsak a RAS/RAF, hanem a HER2 is okozhat, mutáció vagy amplifikáció révén.

5. A 7.3.6. fejezetben a szerző a KRAS mutációk kérdését elemzi tüdőrák mintákban. Megállapítja, hogy a vizsgálat érzékenysége 10% tumorsejt arány alatt nem megfelelő, ilyen esetek eredményei talán nem is szerepelnek. A KRAS mutáns tüdő ADC-k aránya tanulmányukban 32,1% bizonyult, ami mai szemmel nézve kissé alacsony, jelen technológiai platform alkalmazásával a KRAS variánsok aránya 40% körüli. Vajon mindez az alacsony allélfrekvenciával jelentkező esetek a korábbinál (Sanger szekvenálás) jobb kimutathatósága következtében alakult így? Mi a véleménye a jelöltnek a fokozott érzékenységgű módszerekkel kimutatott, nem domináns (alacsony VAF) mutáns allél jelentőségéről, prognosztikai, klinikai szerepéről?

A KRAS mutációkat elemző első vizsgálatunk 2014-ben jelent meg. Ekkor még a 12-es és 13-as kodon mutációinak a detektálása először KRAS RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) módszerrel történt, majd a pozitív minták kerültek Sanger szekvenálásra. Ennek megfelelően a KRAS egyéb mutációit és az alacsony allélfrekvenciájú eseteket nem tudtuk kimutatni.

Bizonyos esetekben allél-specifikus kompetitív gátlás mellett zajló PCR-rel detektálni lehet KRAS mutációt olyan mintákban is, ahol a legtöbb szekvenálási eljárás nem tudja a mutációt

kimutatni [Myers, Per Med, 2015]. Lehetséges, hogy ezek a nem domináns KRAS mutáns szubpopulációk is hozzájárulnak a célzott terápiával szembeni rezisztenciához. Ezt erősíti az a preklinikai vizsgálat is, amelyben tüdőrákokból indított szferoid- és organoid-tenyészetek (ex vivo) erlotinib kezelése során a kezdetben alacsony allélfrekvenciájú KRAS mutációk frekvenciájának növekedését figyelték meg [Banda, Plos One, 2020].

A mutáns allél frekvencia (MAF) klinikai jelentőségét magunk is fontosnak tartjuk, és az EGFR esetében vizsgáltuk is. A jelen disszertáció beadását követően publikáltuk azon eredményeinket, melyek szerint EGFR mutáns tüdő adenocarcinomában a $\geq 70\%$ EGFR MAF a független prediktora a hosszabb PFS-nek [Gieszer, Transl Lung Cancer Res, 2020 in press]. Fentiek alapján a fokozott érzékenyséű módszerekkel kimutatott néhány %-os MAF klinikai szerepe még nem kellően tisztázott, mindemellett nem szabad figyelmen kívül hagyni a tüdőrákban gyakran megfigyelhető tumor heterogenitást sem.

6. A 7.4.2. és 3. pontban a PD1 és PD-L1 expresszió viszonyai kerültek a középpontba. Új markerek bevezetése kapcsán mindig felmerül a kérdés, hogy a hazai betegösszetétel milyen mértékben felel meg az első nemzetközi (elsősorban amerikai) közléseknek. Sajnos az értekezésben bemutatott adatokból a valós statisztikai eredmények (pozitív esetek %-ban) számomra nem derültek ki, igaz, a betegösszetétel nem feltétlenül alkalmas a célcsoport nagyságának a felderítésére (randomizáció). Rendelkezésre állnak-e a magyarországi tüdőrákok PD-L1 pozitivitására vonatkozó, saját, vagy más forrásból származó statisztikai számadatok és mik az ebből levonható tanulságok?

Nagyon köszönöm Professzor Úrnak ezt a kérdést, mert pontosításra ad lehetőséget. Valóban, sem az agyi áttétes munkánkban sem pedig a primer tüdőrákok elemzése során nem közöltük a PD-L1 pozitivitásra vonatkozó százalékos megoszlást. A 208 adenocarcinoma agyi áttétében a tumorsejtek PD-L1 expressziós aránya (TPS) az alábbi volt: $<1\%$: 35,2%, 1-49%: 43,0%, $\geq 50\%$: 21,8%. A 268 primer tüdő adenocarcinoma szövetmintában a TPS a következő volt: $<1\%$: 26,0%, 1-49%: 59,0%, $\geq 50\%$: 15,0%. Fontos hangsúlyozni, hogy saját vizsgálatainkban csak adenocarcinomákat tanulmányoztunk és a legkevésbé szenzitív SP142-es antitestet alkalmaztuk.

Ami a hazai adatok nemzetközi adatokkal való összevetését illeti; Velcheti és mtsai 2018-ban közölték 6024 IIIB/IV stádiumú, nem-kissejtes tüdőrákos beteg PD-L1 immunhisztokémiai adatait az Egyesült Államokból [Velcheti, Plos One, 2018]. A 22C3 és 28-8 antitestekkel végzett immunreakciók eredményei összhangban voltak egymással, azonban az SP142 szenzitivitásban elmaradt a többitől. A legnagyobb esetszámmal ($n=3799$) a 22C3 antitestet vizsgálták, és a következő TPS megoszlást találták: $<1\%$: 38,7%, 1-49%: 28,6%, $\geq 50\%$: 32,8%. A hazai PD-L1 expressziós adatok összesítése és közzétevése jelenleg folyamatban van, erről Dr. Tóth Erika Osztályvezető Főorvos (Országos Onkológiai Intézet) szóban tájékoztatott. Ugyancsak tőle származik 593 hazai nem-kissejtes tüdőrákos beteg tumorminta PD-L1 TPS% elemzésének eredménye is 2019-ből, 22C3 antitesttel: $<1\%$: 33,7%, 1-49%: 34,7%, $\geq 50\%$: 31,5%. Összességében tehát elmondható, hogy a hazai tüdőrák PD-L1 expressziós eredmények

összhangban állnak a nemzetközi adatokkal, ugyanakkor fontos a további adatgyűjtés és adatfeldolgozás szövettani és molekuláris altípusok, továbbá az alkalmazott immunterápia hatásossága szerint is. Az eredmények örömtelinek mondhatók abból a szempontból, hogy az immunterápia kedvező prediktív faktorának tartható PD-L1 TPS $\geq 50\%$ a betegek egyharmadában kimutatható, és még további közel egyharmaduknál is igazolható kisebb mértékű PD-L1 expresszió a tumorsejtekben.

7. Ugyanebben a fejezetben meglepően stabil összefüggést tudtak kimutatni primer tumor/metasztázis PD-L1 expressziójának viszonylatában. Ez felveti azt a gyakorlati kérdést, hogy metasztatikus folyamatban esetleg valóban elégséges lehet-e a primer minta IHC tesztelése immun-checkpoint terápia indikációjára?

A felvetett kérdés megegyezik a mi vizsgálati célkitűzésünkkel. A tüdőrákban megfigyelhető 30-40%-os agyi áttét gyakoriság – de említhetném a hasonló gyakoriságú csontáttétet is –, a klinikum oldaláról kényszerítette ki a kérdésfelvetést. A betegek jelentős részénél ugyanis nincs lehetőség a távoli hematogén áttét biopsziát követő immunhisztokémiai vizsgálatára. Azon esetekben, ahol a primer tumor szövettannal – különösen pedig sebészi szövettannal – lett verifikálva, a későbbi PD-L1 immunhisztokémiai vizsgálat könnyen elvégezhető. Egyes esetekben pedig akár fordított is lehet a kérdés, amikor a tüdőrák gyanúja azáltal merül fel, hogy pl. agyból vagy csontból eltávolításra került egy TTF-1 pozitív adenocarcinoma áttét. A vizsgálatunk során észlelt igen szoros pozitív korreláció támogatja azt a feltételezést, miszerint a primer tumor és annak metasztázisa igen hasonló PD-L1 expressziós szinttel rendelkezik, ugyanakkor éppen saját vizsgálataink intenek bennünket óvatosságra, hiszen kemoterápiát követően egyes betegeknél megváltozott PD-L1 expressziót detektáltunk [Rojkó, *J Cancer Res Clin Oncol*, 2018].

Összefoglalásképpen úgy vélem, hogy minden olyan esetben, amikor az áttétnek – vagy akár a primer tumor recidívájának – a lokalizációja és a beteg állapota lehetővé teszi a rebiopsziát, akkor éljünk ezzel a lehetőséggel, ha azonban erre nincs mód, akkor használjuk fel a korábbi archivált szövetmintát.

Végezetül ismételten megköszönöm Méhes Professzor Úr részletes és alapos bírálatát, az elismerő szavakat és további kutatásokat inspiráló megjegyzéseit, és kérem, hogy fogadja el a kérdéseire adott válaszaimat.

Budapest, 2021. 03. 21.



Moldvay Judit