

Válasz Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora, egyetemi tanár opponensi véleményére

Köszönöm Kiss Csongor professzor úrnak, hogy doktori értekezésemet részletesen áttanulmányozta, köszönöm méltató szavait és építő jellegű megjegyzéseit és észrevételeit.

Külön köszönöm kérdéseit és felvetéseit, amelyek korábbi munkáinkat új adatokkal bővítették, és köszönöm, hogy az értekezés nyilvános vitára bocsátását és az MTA doktora cím odaítélését javasolta. Megjegyzéseire és kérdéseire válaszaim sorrendben a következők:

Rövidítések jegyzéke: A latinus helyesírással leírt *terminus technicusok* a magyar nyelv szabályai szerinti ragozására jobban fogok figyelni.

Bevezetés, irodalmi áttekintés: Az értekezésben – lehet, hogy nem teljesen egyértelműen - a Hodgkin lymphoma (HL) kezelésére vonatkozó történelmi adatok ismertetése kapcsán jelentem ki, hogy DeVita és mtsai 1970-ben bemutatták az első polikemoterápiát (MOPP). Jól ismert, hogy az első sikeres polikemoterápiás kezelések ALL-ben gyermekhematológusok munkásságához köthető.

Módszerek:

LMP1 – EBNA2 fehérjék kimutatása: A CD15, CD20, CD30, CD45 kimutatásakor (DAKO), EMA kimutatásakor (Biogenex), BCL-6 kimutatásakor (Novocastra), ALK1 esetén (DAKO) gyártó által forgalmazott kitek kerültek alkalmazásra, az eljárás során szigorúan az antitest gyártójának protokollját követték, a szövettani metszetek immunhisztokémiai revideálása minden esetben a DEOEC Patológiai Intézetében történt. Az értekezésben az LMP1, EBNA2 fehérjék detektálása valóban nem került részletezésre, a metodikát a zárójelbe tett DAKO (protokoll) rövidítés jelezte, az Acta Hematologicaban megjelent cikkben is ennyi a vizsgálat metodikai leírása. A részletes leírás az Orvosi Hetilap közleményében szerepel, melyet terjedelmi okokból nem részleteztünk. A kérdésnek megfelelően pótoljuk: Az LMP1, EBNA2 fehérjék kimutatásához biotinált poliklonális antiegér ellenanyagot és streptavidinhez kötött tormaperoxidázt tartalmazó LSAB kitet (DAKO) használtunk. A formalinnal fixált, paraffinba ágyazott anyagból készült metszeteket deparaffináltuk, dehidráltuk, 3%-os hidrogén-peroxidba helyeztük 10 percre, majd PBS-sel öblítettük. Ezután a lemezekre 100 µl primer antitest oldatot pipettáztunk, és 15 perces inkubálás után TPBS-ben mostuk. A metszeteket streptavidin-peroxidáz oldattal fedve újabb 15 perces inkubálás és 2x5 percig tartó TPBS mosás következett. Végül a metszeteket kromogén-szubsztráttal inkubáltuk 5 percig, s desztillált vízben mostuk. A háttérfestéshez metilzöld magfestést használtunk. A vizsgálat pozitív kontrollja olyan paraffinos szövettani blokkból készült, ami ISH vizsgálattal

EBER pozitív, PCR vizsgálattal EBV pozitív volt. Negatív kontrollként olyan anyagból készült metszetet használtunk, melynek esetén a fenti reakciók negatívak voltak.

In situ hibridizáció: E során pozitív kontrollként olyan szövettani blokkból készült metszetet használtunk, ami mind PCR, mind immunhisztokémiai vizsgálattal egyaránt EBV pozitív volt. Negatív kontrollként olyan szövettani blokkból készült metszetet szolgált, ami PCR és immunhisztokémiai vizsgálattal egyaránt EBV negatív volt. (A PCR vizsgálat során negatív kontrollként Burkitt-lymphomából származó EBV negatív DG-75 jelzésű sejtvonal szolgált.)

Áramlási cytometria: Az intracelluláris citokinek meghatározása során a lymphocytákat 25 ng/ml koncentrációjú PMA-val (phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma-Aldrich, Germany) és 1 ug/ml koncentrációjú Ionomycinnel (Sigma-Aldrich, Germany) stimuláltuk 4 órán keresztül, 37°C-on 5%-os CO₂ koncentráció mellett. A Golgi-apparátust 10 mg/ml-es koncentrációjú Brefeldin-A-val (Sigma-Aldrich, Germany) gátoltuk. A sejtek sejtfelszíni és intracelluláris jelöléséhez a Beckman Coulter cég IntraPrep™ (Beckman Coulter, France) kitjét használtuk. A jelölést a gyártó utasításainak megfelelően végeztük. Röviden, ennek során, a sejtfelszíni jelölést követően a vörösvértesteket lizáltuk, majd a lymphocytákat permeabilizáltuk. Ezt követte az intracelluláris citokinek jelölése a megfelelő monoklonális antitestekkel. A sejteket 1%-os paraformaldehidben fixáltuk.

Eredmények:

1. EBV fertőzés és HL asszociációja: Az EBV kimutatását célzó retrospektív vizsgálatunk során azokat a klinikánk által gondozott betegeket vettük be a vizsgálatba, akinek a szövettani blokkja feldolgozásra alkalmas mennyiségben fellelhető volt, semmi egyéb szempont nem szerepelt a kiválasztásuknál. Nyilvántartásunkból kikerestük a gondozott betegek szövettani számát, majd a DEOEC Pathológiai Intézetében ennek alapján megkeresték a szövettani blokkokat. Az általunk megadott szövettani számoknak csak mintegy 50%-nál találták meg a szövettani blokkot. Ennek több oka lehetett. A betegek egy részénél a HL nem a DEOEC Pathológiai Intézetében került diagnosztizálásra, hanem más kórházakban. Korábban, egy másik munkacsoport által végzett lymphomás vizsgálat során HL-es szövettani blokkok is kikerültek a Pathológiai Intézetből, melyek oda nem kerültek vissza, és sajnos nincsenek meg. Másrészt a Pathológiai Intézetben is voltak olyan, korábban készült szövettani blokkok, amelyek már nem voltak fellelhetőek. A debreceni Kenézy Gyula Kórházból és a szolnoki Hetényi Géza Kórházból kértük meg még a szövettani blokkokat. A szövettani blokkokból ezek után metszetek készültek a HL immunhisztokémiai revideálására, mely minden esetben a DEOEC Pathológiai Intézetében történt. Némelyik szövettani blokk olyan kevés tumor szövetet tartalmazott, hogy feldolgozásra alkalmatlan volt, ezek a betegek a vizsgálatból kiestek. A PCR vizsgálathoz a DNS kinyerésére három Eppendorf-csőbe helyezett,

csövenként 3-5 darab, 5-10 μm vastag parafinos metszetet használtunk. A DNS intaktságát β globin gén amplifikálásával ellenőriztük, a további vizsgálatokhoz (így az LMP1 kimutatása immunohisztokémiai vizsgálattal, EBER RNS kimutatása, és az EBV kimutatása PCR vizsgálattal) csak a β globin pozitív mintákat használtuk, így újabb betegek/minták estek ki a vizsgálatból. A Gyermekklinikán gondozott betegeket tekintve, szövettani blokk számokat és beteg neveket kértünk a munkánk során velünk kooperáló Oláh Éva professzor asszonytól, aki akkor a Gyermekklinika igazgatója volt. A kapott adatokhoz mintegy 40%-ban társult feldolgozható mennyiségű szövettani anyag. Emiatt nem is vizsgáltuk, hogy reprezentálják-e a vizsgálatba bevont betegek epidemiológiai adatai a két klinika valamennyi betegét, mivel ez a rendelkezésünkre álló szövettani blokkok mennyiségén és minőségén, vagyis a kivitelezhető vizsgálatokon nem változtatott. A Gyermekklinika betegei közül is azok kerültek be a vizsgálatba, akiknek volt feldolgozható anyagmennyiséget tartalmazó szövettani blokkja, semmilyen más szempont nem szerepelt.

2. A betegek „roma” identitását gondozott betegeinknél abban az esetben állapítottuk meg, ha ezzel a besorolással a beteg is egyetértett. Amennyiben már korábban meghalt illetve a gondozás alól kikerült a beteg, a klinikai dokumentációját használtuk fel a „roma” identitás vizsgálatakor. A szociális körülmények megítélése a szociális anamnézis, a családban egy főre jutó jövedelem, s tekintve, hogy éveken keresztül gondozott betegekről van szó, a személyes benyomások (öltözködés, beteggel történő beszélgetés, személyes problémáinak megismerése) alapján történt.

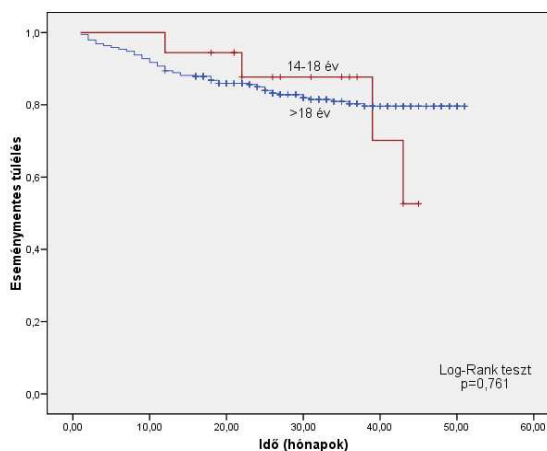
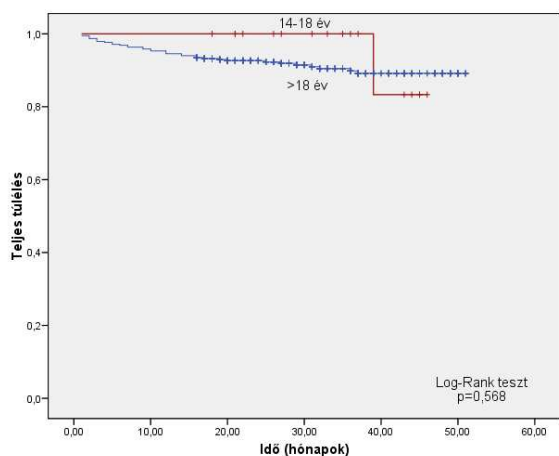
3. Mondatkezdő szóként szereplő számnevet ezen túl helyesen nem számmal, hanem betűvel fogjuk írni.

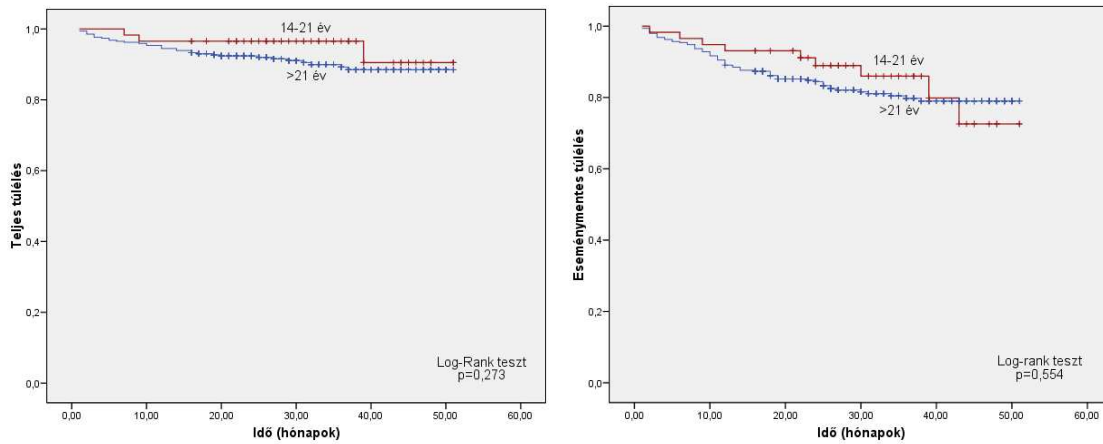
4. Regulatív T (T_{reg}) sejtek vizsgálata: A HL-es betegek $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{bright}}$ T sejtjeinek vizsgálata 2003-ban kezdődött. Az ekkor kapható FoxP3 antitest klón, amelyből mi is alkalmaztunk, sok esetben mutatott nem-specifikus kötődést. Egy ekkoriban beküldött közleményünkben a bírálók kifogásolták is ennek az antitestnek a használatát. Mivel így a HL-es betegek vizsgálatának kezdetén, a megfelelő FoxP3 elleni antitest klón nem állt rendelkezésre, ezért ekkor még FoxP3 jelölést nem tudtunk használni. A későbbiekben megjelent új PCH101-es klón felhasználásával azonban igazoltuk, hogy az általunk kapuzott $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{bright}}$ lymphocyták, jelentős részben (90% fölötti arányban) FoxP3 pozitív sejtek. A kapuzást nagyban elősegíti, hogy a humán $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ sejtpopuláció két részre különül el. A $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{bright}}$ sejteknél CD4 expresszió kicsit kisebb, ezért ez a sejtcsoport kissé balra tolódott a cytometriás képen (amennyiben az X tengely a CD4, az Y tengely a CD25), szemben a CD25^{dim} és CD25^- sejtekkel. Ezen okból, valamint azért, mert a $\text{CD25}^{\text{bright}}$ sejteken a CD25 expresszió fokozottabb, a $\text{CD25}^{\text{bright}}$ és a „normál” helyzetű CD25^{dim} csoportok

között, a cytometriás ábrán, jól észlelhető "árok" húzódik. Méréseink alapján a $CD25^{+bright}$ sejtek 90-96%-a FoxP3 pozitív regulatív T sejtek tekinthetők. Ezt, az újabb méréseink során, a $CD4^{+}CD25^{+bright}$ sejtek CD127 negativitása is megerősítette. A CD127 expresszió csökkent volt, szintén széles körben elfogadott, mint a regulatív T sejtek egyik jellemző sajátága.

Minthogy a cytometriás analízis során a $CD25^{bright}$ és $CD25^{dim}$ populációk jól elkülöníthetők (szemben az egérkísérletekben kimutatott egységes CD25 populációval), hibát követtünk volna el, ha a sejtcsoportokat egy fix átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) értékhez kötve különítjük el, s nem vesszük figyelembe az egyénenkénti variabilitást. A méréseink során egyébként a $CD25^{dim}$ és $CD25^{bright}$ sejteket elkülönítő fluoreszcencia intenzitás értéke nagyjából 100-200 közé esett, Becton Dickinson FACSCalibur típusú áramlási citométert és a CellQuest software-t használva.

HL országos adatainak felmérése: A legalább 14 évet betöltött HL-es betegek 2000-2003 közötti felmérését Magyar Hematológiai és Transzfúziológiai Társaság Lillafüredi Konferenciáján kapta feladatul a Hodgkin-kór Munkabizottság, ezért használtam - lehet nem helyesen - a „felnőtt” jelzőt a 13 évnél idősebbek jelölésére. Ennek a felmérésnek az eredményei is iniciálták azt az összehasonlító tanulmányt, melyet Müller Judit és mtsaival 2006-ban kezdtünk el, melyben összevetettük a gyermek és felnőtt intézmények 14-21 éves HL-es betegeinek kezelési (1990-2004) és túlélési eredményeit. Az Országos Onkológiai Intézet és a DEOEC III. sz. Belklinika 14-21 éves betegek mindkét tanulmányban szerepeltek, de a vizsgált időtartam más. A kérdésnek megfelelően bontva az országos 2000-2003-as adatokat a 14-18 éves, vagy 14-21 éves, valamint az idősebb betegekre, első kezelésre sorrendben 94% és 83% vagy 93% és 83,6%-ban kerültek KR-be. A teljes és eseménymentes túléléseket a fenti korcsoportok szerinti megosztásban a következő ábrákon mutatom be.





A korcsoportok szerinti túlélések között nincsen szignifikáns különbség, a fiatalabbak mégis „kedvezőbb” túlélése nem meglepő. Megjegyzem, hogy a Müller-féle 14-21 éves HL-esek felmérésében a gyermek intézetekben kezelt betegek között a 14-16 évesek, a felnőtt intézetben kezeltéknél a 17-21 évesek voltak többen. Nem vitatom, hogy nemzetközi adatok is ismertek, amelyek az adolescens HL-es betegek kedvezőbb kezelési eredményeiről számoltak be, ha gyermek KT-s protokollokat alkalmaztak.

HL-es betegek kezelése során szerzett tapasztalatok: A 20. ábra alapján valóban a túlélések között a különbség nem szignifikáns, de jól észrevehető, ezért használtam a szöveges megfogalmazásban azt, hogy az ABVD kezelés előnyösebb volt. A túléléseket 2006-ban vizsgáltuk, most az opponensi bírálóat kapcsán a beteg adatokat frissítettük és ez alapján újraszámoltuk a túléléseket. A különbség megmaradt, de továbbra sem szignifikáns, de jobb az ABVD-t kapóknál. A COPP/ABV mellett a betegek 62,3%-a, míg az ABVD mellett 63%-a kapott RT-t is, tehát hasonló arányban. Megjegyezendő, hogy a COPP/ABV mellett nagyobb volt a kiterjesztett mezős RT aránya.

Refrakter és relabált HL-es betegek vizsgálata: Az adott szövegkörnyezetben azt gondoltam, hogy egyértelmű, hogy az 1997-2006 között felismert és kezelt összes HL-es beteg teljes- és relapszusmentes túlélése volt 90% és 74% (25A ábra), mely túlélést lebontva refrakter, relabált és a remisszióban maradó csoportra (25B ábra) látható - és így bontva összevethető is-, hogy a refrakter betegeinknek a legrosszabb a prognóza. A refrakter és relabáló betegek átlagos túlélési idejét nem érdemes ezzel összevetni, hiszen az összes beteg túlélési görbéje csak azt mutatja, hogy az ebben az időszakban kezelt betegeink 90%-a van életben 10 év múlva, de nyilván a kezelés kezdetekor ma még nem tudjuk megmondani, hogy az adott beteg ebbe a 90%-ba fog-e kerülni.

Az aHSCT-ben részesült betegeinknél BEAM kondicionáló kezelés, egy esetben TBI is történt. Transzplantációval összefüggő halálozás betegeink között eddig nem volt.

A remisszióban lévő, de egyéb okból meghalt 4 beteg halálukai a következők voltak: 1 postirradiációs fibrosarcoma, 1 mesopharynx tumor, 1 pneumonia és 1 beteg 81 évesen otthonában „elaludt”.

A myocardium késői károsodása: A vizsgált 76 HL-es közül 42 esetében észleltünk perfúziós és/vagy metabolikus myocardialis károsodást DISA vizsgálattal, 34 betegnél nem találtunk szívizom károsodást ezzel a módszerrel. A DISA pozitívak között összesen 25 (59,5%) beteg kapott anthracyclin tartalmú KT-t az első- vagy másodvonalbeli kezelések során, akik közül 21 betegnél alkalmaztunk cyclophosphamidot is. Ifosfamidot nem kaptak. A kumulatív anthracyclin dózis 75-300 (átlagosan 156,25) mg/m² volt. A 34 DISA negatív beteg közül összesen 23 (67,6%) beteg kapott anthracyclin tartalmú KT-t, 20 beteg cyclophosphamidot is, ifosfamidot ezek a betegek sem kaptak. A kumulatív anthracyclin dózis 50-390 (átlagosan 140,75) mg/m² volt. A két csoport között a cardiotoxikus citosztatikumok arányát illetően eltérés nem volt. Dexrazoxane-t a betegek kezelése során nem alkalmaztunk, sok betegünk kezelése során még nem is volt elérhető.

Gyógyult HL-es betegek: A 11 éves beteg először a Radiológiai Klinikán mantle típusú irradiációban részesült, majd relapszus miatti CVPP kezelése 16 évesen már a mi klinikánkon történt. Esetét a „Rare, late complications in a patient with Hodgkin’s disease. Haematologia, 2002, 32: 509-518.” közleményünkben ismertettük

Tekintettel arra, hogy itt gyógyult (tehát legalább 10 éve komplett remisszióban lévő, betegség- és tünetmentes) betegek vizsgálata volt a cél, ezért az 1975-1994 között kezelt betegeket vizsgáltuk. Természetesen az így kapott összesített túlélési adatok rosszabbak, mint a 1995-2004 (19, 20. ábra), 1990-99, 2000-2008 (23. ábra), 1997-2006 (25A ábra) közötti időszakokban. Azonban ha a 23. ábrán bemutatott 3 időszakkal hasonlítjuk össze látható az is, hogy 1980-89 között a betegek 10 éves teljes túlélése mindössze 42% volt, mely időszak felöleli a gyógyult betegek jelentős részének a kezelési időszakát is. Nemzetközi adatok szerint az 1960-63 között kezelt betegek 5 éves túlélése is csak 40% volt, mely a kezelési lehetőségek fejlődésének köszönhetően 1989-1993 között már több mint 80%-ra emelkedett (Quddus F, Armitage JO: Cancer Journal 2009; 15: 161-163). Saját anyagunkban 1990-1999 között a 10 éves teljes túlélés 76% volt. Gyógyult betegeink vizsgálata során ebből a két időszakból adódott össze ezen betegek 65%-os túlélése.

Megbeszélés

HL és EBV fertőzés asszociációja: Az egészségesek szeropozitivitása során különböző EBV ellenes antitestek mutathatók ki, amely arra utal, hogy az egyén átfertőződött már az EBV-vel, A népesség mintegy 90%-a átesik ezen az infekción, valószínűleg a később HL-essé váló betegeknél az EBV infekció mellett egyéb HL-re hajlamosító tényezők is szerepet játszanak a

betegség kialakulásában. HL-es betegek 43%-os EBV prevalenciája, nem erre a szérumból kimutatható szeroprevalenciára vonatkozott, hanem vizsgálatainkban a Hodgkinos nyirokcsomókban, a daganatos Hodgkin/Reed-Sternberg sejtekben IHC és ISH módszerrel mutattuk ki az LMP1-et és EBV RNS-t. Az EBV genom a HRS sejtekben klonálisan van jelen, amely arra utal, hogy a tumorsejtek egyetlen EBV fertőzött sejtől származhatnak. Korábban -1997-ben - ezek alapján az Agency for Research on Cancer kimondta, hogy „az EBV szerepet játszik a HL kialakulásában”. Ez betegek 43%-nál volt valószínűsíthető. Az EBV asszociációt HL-ben mi is csak akkor fogadtuk el, ha a HL-es szövettani mintában az EBV infekció kimutatható volt. Irodalmi adat szerint (Jarrett RF: Leuk Lymphoma 44: Suppl3, S27-32, 2003; Andersson J: Herpes 13:12-16, 2006) az EBV pozitív HL-es betegeknél az EBV a vérben, a memória B sejtekben is nagyobb mennyiségben van jelen, mint az EBV negatív HL-eseknél ill. az átlagpopulációnál, emellett az oropharynxban is kimutatható. Szabadon levő EBV DNS-t is leírtak EBV pozitív HL-esek plazmájában 91%-ban, HIV és EBV pozitív HL-esek plazmájában az EBV DNS 100%-ban volt jelen (Musacchio JG: Sao Paulo Med J 3:154-157, 2006). Vrzalikova és mtsai munkája alapján (Blood, 117: 5790-91, 2011) az EBV infekció hatására (LMP1 hatása a TNF receptorra) a PRDM1 gént kódoló BLIMP1 α transzkripció faktor down-regulációja jön létre a primer germinális centrum B-sejtjeiben. A PRDM1 gén a sejtciklust gátolja, s a B-sejtek plazmasejteké váló differenciálódását irányítja. A gén gátlásával az EBV fertőzött sejtek terminális differenciálódása károsodik. A BCR negatív sejtek életképesek maradnak az EBV infekció nyomán (Lindsay C: Adv. Hematol., 2011), mely több tényezőnek köszönhető. Főként az LMP1 hatásának tulajdoníthatóan bcl2 homológ protein termelődik, az apoptózisban közrejátzó BAX ill. BAK mitokondriális membrán proteinek gátoltak, a p53 p21-et indukáló hatása blokkoltá válik. Huang X és mtsai szerint (Blood, 118: 5211-7, 2011) a HL-eseknél az átlagpopulációhoz képest szignifikánsan gyakoribb volt a HLA-A68, HLA-DR11 előfordulása. Az EBV negatív HL-eseknél a HLA-DR15 gyakoribb, a HLA-DR4 és a HLA-DR7 ritkább volt. Az EBV pozitív HL-eseknél a HLA-A1, HLA-B37, és a HLA-DR10 szignifikánsan gyakoribb volt, míg a HLA-A2 szignifikánsan ritkábban fordult elő mint az átlagpopulációban. Az EBV pozitív ill. negatív HL-eseknél a HLA-A*01 és HLA-A*02 antigének tekintetében találtak szignifikáns különbséget, nem az egyedi nukleotidoknál. Összességében elmondható, hogy az apoptózis számos formában megvalósuló gátlásával (egyéb tumorok keletkezéséhez hasonlóan) a genetikusan károsodott sejtek tovább élnek, a mutációk akkumulálódnak, megfelelő táptalajt nyújtva a tumor, jelen esetben a HL kialakulásához.

HL és reaktív fehérvérsejtek kapcsolata a nyirokcsomókban és a perifériás vérben:

Köszönöm a felvetést és kiegészítést. A Hodgkinos nyirokcsomóban az elmúlt évtizedben számos olyan sejt, sejtalkotórész, fehérje, solubilis receptor, citokin, kemokin biomarkert azonosítottak a HRS vagy környezeti sejtekben, melynek szerepe lehet a HRS sejtek túlélésben, apoptózis gátlásában, a hatékony immunválasz gátlásában és a betegség kimenetelében. Az opponens által említett autokrin szabályozó hurok egyik ilyen tényező lehet a HRS és környezeti sejtek kommunikációjában és szabályozásában. A sejtes háttér és daganatos mikrokörnyezet összetételének vizsgálata nemcsak prognosztikai jelentőségű, és újabb biomarkert jelenthet, hanem újabb célzott terápiák megismeréséhez vezethet (Aldinucci D és mtsai: JPathol, 221:248-263, 2010)

Késői mellékhatások: Az adatok valóban nem zárják ki, mi is úgy fogalmaztunk, hogy egyértelmű anthracyclin toxicitásból eredő cardiomyopathiát, szívelégtelenséget nem találtunk.

Irodalomjegyzék: Néhány témájában átfedő, de nem azonos magyar és angol nyelvű cikket valóban lehetett volna egy opus két alpontjaként is feltüntetni, de erre a hivatalos listákban és más tudományos értekezésekben is ritkán láttunk példát.

Végezetül elnézést kérek a hosszabb válaszért (amennyiben lehet, rövidíteni fogom a szóbeli válasz kapcsán, esetleg a módszertani részeket az opponens engedélye esetén kihagynám), de a kérdések jellege ezt igényelte, másrészt még egyszer köszönöm Kiss Csongor professzor úr munkáját, érdeklődéséből eredő kérdéseit és elismerő összegző véleményét.

Debrecen, 2012. január 11.

Dr. Illés Árpád