

Válasz Prof. Dr. Kulka Janina bírálataira

Tisztelt Professor Asszony!

Szeretném megköszönni értekezésem alapos áttekintését és támogató véleményét. Az alábbiakban válaszolok az értekezéshez kapcsolódó kérdésekre.

1. kérdés: Volt-e átfedés az egyes vizsgálatokban elemzett tüdőcarcinomás betegcsoportok között?

Válasz: Köszönöm a kérdést. Vizsgálataink tervezésekor és azok kivitelezésekor minden esetben külön figyelmet fordítunk az átfedések minimalizálására, valamint esetleges átfedések jelenlétekor az alcsoport elemzések elvégzésére és a különböző tanulmányokból származó eredmények összehasonlítására. Tekintettel arra, hogy a disszertáció alapjául szolgáló tanulmányokban vizsgált tüdőcarcinomás betegek különböző időszakokból és Intézményekből voltak bevonva, nincs átfedés a vizsgálati csoportok között.

2. kérdés: Az NSCLC-k angiogén és nem-angiogén típusokra történő felosztása klinikai szempontból igen jelentősnek tűnik az értekezésben leírtak alapján. Van-e arra irányuló törekvés, hogy ez a felosztás a rutin szövettani diagnosztikában helyet kapjon, mint kiegészítő prognosztikai faktor?

Válasz: Az NSCLC-k angiogén és nem-angiogén fenotípusának feltérképezése egy új fejezetet nyitott a tumorprogresszió és a tumoros terjedés megismerésében. Ennek megfelelően, az elmúlt tizenöt évben számos tanulmány vizsgálta az angiogén fenotípus klinikopatológiai hasznosíthatóságának lehetőségét, valamint az összefüggést a különböző növekedési mintázatok és az angiogén jellegzetességek között. Ezen tanulmányok közül is kiemelendő a tüdődaganatok légúti terjedésének vizsgálata (spread through air spaces, STAS), mely közvetlenül utal az angiogén fenotípusra [1]. Tekintettel a nem-angiogén fenotípus már korábban leírt jellegzetességeire (alveoláris terjedési mintázat az eredeti szöveti szerkezet elpusztítása nélkül [2, 3]), a légúti terjedést mutató daganatok tulajdonképpen nem-angiogén tumoroknak tekinthetők. Ebből adódóan ezek a tüdődaganatok rossz prognózissal rendelkeznek és a STAS jelenléte, mint kiegészítő negatív prognosztikus tényező szerepel a diagnosztikai algoritmusokban [1, 4]. Figyelembe véve, hogy a légúti terjedés elemzése relatíve könnyen megvalósítható, napjainkban a STAS meghatározása már szerves részét képezi a rutin szövettani diagnosztikának. Összességében elmondható tehát, hogy az angiogén fenotípus vizsgálata – közvetve ugyan – már helyet kapott a tüdődaganatok jellegzetességeinek diagnosztikájában és a mindennapi patológiai rutin részét képezi.

3. A két NSCLC tanulmányban, amelyekben adenocarcinomás betegek mintáit is vizsgálták, történt-e bármilyen szempontból (pl. lymphangiogenesis, angiogenezis, angiogén-nem angiogén típus) kísérlet olyan elemzésre, amelyben az adenocarcinomák szövettani altípusait és/vagy grade szerinti felosztását is figyelembe vették?

Válasz: A lymphangiogenesis mechanizmusainak vizsgálata során, a disszertációban már részletezett alcsoport elemzések mellett vizsgáltuk a nyirokér denzitás és kerület, valamint a klinikai jellemzők és szövettani paraméterek közötti összefüggést is. Hangsúlyozandó, hogy

nem találtunk szignifikáns összefüggést a nyirokerek kerülete/denzitása és a szövettani altípus, T-státusz, grade és necrosis között. Ezen eredményeket a disszertáció tömörsége és az összefüggések nem szignifikáns mivolta ($p > 0.1$ minden esetben) miatt nem részleteztem jelen értekezésben. Az apelin expresszió angiogenezisben betöltött szerepének vizsgálatakor – többek között az előbbi tanulmány erre vonatkozó negatív eredményei miatt – nem végeztünk altípus és/vagy grade szerinti elemzést.

4. Mi az oka annak, hogy az adenocarcinomák metasztatizálási mintázatának vizsgálatával foglalkozó tanulmányban a kezelési adatokat figyelmen kívül hagyták? Vajon az adenocarcinomák esetében alkalmazott kezelések (neoadjuváns/adjuváns/first line onkológiai terápia, sebészi kezelés igen-nem, ha igen akkor pulmonectomia vagy lobectomy, stb.) nem befolyásolhatják alapvetően pl. a túlélési adatokat és különösen a metasztázisok kialakulásának idejét, vagy akár számát és lokalizációját?

Válasz: Jogos a Bíráló felvetése a kezelési adatok figyelembevételére kapcsán, azonban jelen tanulmány célja elsősorban a primer tumor lokalizációjának a metasztatikus mintázatra és túlélésre kifejtett hatásának vizsgálata volt. Többváltozós modellünk kapcsán azt találtuk, hogy a primer tumor elhelyezkedése (centrális vagy perifériás) az alkalmazott terápia típusától függetlenül befolyásolja a túlélést (HR 1.699, $p < 0.001$). Tekintettel eredeti célkitűzésünkre, és a primer tumor lokalizációjának független prognosztikus jellegére, a metasztázis mintázatot csak a primer elváltozás lokalizációjának függvényében, valamint önmagában elemeztük. Továbbá kiemelendő, hogy a tanulmány retrospektív jellegéből adódóan csak a bevont betegek 76%-ban álltak rendelkezésünkre a kezelésre vonatkozó adatok, és ezen betegek jelentős hányada (80%) csak szisztémás kezelésben részesült (műtéti beavatkozás nélkül), mely nem okoz jelentős variabilitást a távoli szervi áttétek megjelenését illetően. Ugyanakkor egyetértünk, hogy a műtét ténye, valamint a műtéti megközelítés befolyásolhatja az áttétképzési mintázatot, de az operált esetek összesetszámhoz viszonyított relatív alacsony száma miatt nem gondolom, hogy ez jelentős kihatással lett volna eredményeinkre.

5. Mi lehet a magyarázata annak, hogy az értekezésben idézett, Ito és munkatársai (Lung Cancer 76 (2012) 93– 97) által közölt adatok szerint a centrális, N2 NSCLC-k bizonyultak kedvezőbb prognózisúnak, szemben az értekezésben bemutatott eredménnyel, mely szerint a centrális tumorokat szignifikánsan rövidebb 5 éves túlélés jellemezte?

Válasz: Köszönöm az izgalmas kérdést. Ahogy a doktori értekezés során már hangsúlyoztam, kiemelendő, hogy jelenleg nincs standard meghatározási módszer a központi és a perifériás tüdődaganatok elkülönítésére. Míg a jelen tanulmányban mi a primer daganat lokalizációját elsősorban az endoszkópos láthatóság alapján határoztuk meg, addig Ito és mtsai. [5] a primer elváltozásokat a főhörgőtől való távolság alapján osztályozták (függetlenül a tumortest hörgőtükrözés alatti láthatóságától). Figyelembe véve, hogy a hasonló klasszifikáción alapuló vizsgálatok – eredményeinkkel összhangban – szintén azt találták, hogy a centrális primer tumorok rossz prognózissal társulnak [6], azt feltételezzük, hogy a Bíráló által is említett különbségek főként a különböző metodikai feldolgozásból adódnak. Kiemelendő, hogy két további, független betegpopuláción végzett vizsgálatunk szintén arra a következtetésre jutott, hogy – az endoszkópos láthatóság alapján történő beosztás szerint – a centrális primer daganatok rosszabb túléléssel társulnak a perifériás daganatokkal szemben [7, 8].

6. A mesotheliomás betegek esetében voltak-e adataik esetleges azbeszt expozícióról? Esetleg vizsgálták-e (vagy érdemesnek tartaná-e vizsgálni) ennek az anamnesztikus adatnak és a Cd4, gyulladáshoz kapcsolódó paraméterek és a komplement aktiválódás szintjének összefüggését?

Válasz: Köszönöm a kérdést. Habár már a 1980-as évek közepén leírták, hogy a belélegzett azbeszt részecskék aktiválják a komplement rendszert, a hosszútávú azbeszt expozíció komplement rendszerre kifejtett pontos hatása javarészt mindmáig ismeretlen malignus pleurális mezotelióma vonatkozásában. *Zerva és mtsai.* szintén azt találták, hogy az azbeszt expozíciónak kitett betegeknél jelentősen magasabb volt a C3 szérum szintje, mint az egészséges önkénteseknél, viszont furcsa módon a C4 értékek nem mutattak különbséget [9]. Mindezt figyelembe véve jogos a Bíráló felvetése és mi is kifejezetten érdekesnek tartanánk az azbeszt expozíció és a Cd4 szintek közötti összefüggések vizsgálatát. Ugyanakkor, tekintettel arra, hogy a nem azbeszt-asszociált mezotelióma rendkívül ritka, a betegek azbeszt expozíció megléte vagy hiánya alapján történő összehasonlítása nehézségekbe ütközne a relatív kis esetszám miatt. Ennélfogva, a C4d és gyulladáshoz kapcsolódó paraméterek szintjét mi elsősorban az azbeszt expozíció mértéke, intenzitása és időtartama függvényében vizsgálnánk, mintsem annak egyszerű jelenléte vonatkozásában. Jelen tanulmány során – a betegek vizsgálatba történő bevonása alkalmával – kísérletet tettünk az előbbieken részletezett paraméterek feltérképezésére. Sajnálatos módon azonban azt tapasztaltuk, hogy a bevont betegek jelentős hányada nem tud pontos választ adni az azbeszt expozíció mértékére vonatkozóan, sőt sokszor még az expozíció tényét sem tudják biztosan igazolni. Következésképpen, a megbízható adatok hiányában, az azbeszt expozícióra vonatkozó alcsoport elemzéseinktől eltekintettünk. Ettől függetlenül mindenképpen érdekesnek tartanám a Bíráló által is felvetett jelenségek további vizsgálatát megbízható anamnesztikus adatok birtokában.

7. Az apelinrel kapcsolatos vizsgálatokban történt-e a tumorok angiogén és nem-angiogén fenotípus szerinti felosztása az I. fejezetben leírtakhoz hasonlóan? Ha igen, észleltek-e különbségeket? Ha nem, milyen eredményeket várna az összehasonlításban?

Válasz: Előzetes eredményeink és az apelin jól dokumentált angiogén funkciói alapján feltételeztük, hogy az apelin molekula az NSCLC tumorok növekedését elsősorban a vérerek kapillárisokra gyakorolt stimuláló hatása révén serkenti. Ennek megfelelően vizsgáltuk az apelin expresszió mértéke és a daganat angiogén jellemzői közötti összefüggést és azt találtuk, hogy a nagymértékű apelin expressziót mutató tumorokban a mikroerek száma jelentősen nagyobb volt, mint az apelin kismértékben kifejezőkben. Ezt az eredményt alátámasztotta az a megfigyelésünk is, hogy az apelin túltermelés jelentősen megnövelte a szubkután tumorok intratumorális mikroereinek számát NSCLC sejtvonalakkal oltott nude egerekben is. Továbbá, egy friss, ez év márciusában megjelent tanulmányunk szintén az apelin érképződésben betöltött szerepét hangsúlyozza tüdőáttétet adó melanóma esetén is [10]. Az apelin expresszió és a pontos angiogén fenotípus (angiogén vs. nem angiogén) közötti összefüggést nem vizsgáltuk jelen tanulmány során. Ugyanakkor, tekintettel arra, hogy a nem angiogén tumorokkal szemben (amik elsősorban a gazdaszöveti erek bekebelezése révén fejlődnek) az angiogén tumorok folyamatos angiogenezis kíséretében növekednek, azt feltételezzük, hogy az apelin expresszió elsősorban ez utóbbi fenotípus kialakulásához járul hozzá. Hangsúlyozandó azonban, hogy az angiogén fenotípus kialakulása (mint azt tanulmányunkban is részleteztük) összetett folyamat, ezért az apelin bár hozzájárulhat az

adott fenotípus létrejöttéhez, semmiképpen sem tekinthető az egyedüli befolyásoló tényezőnek.

8. Van-e arra vonatkozóan bármilyen adat, hogy a napjainkban a tüdődaganatok kezelésében alkalmazott angiogenezis gátlók az apelin és receptora által aktivált molekuláris mechanizmusokat is gátolják-e?

Válasz: Szakirodalmi adatok alapján megállapítható, hogy sem a bevacizumab, sem a nintedanib kezelés nem képes hatékonyan gátolni az apelin és receptora által aktivált molekuláris mechanizmusokat [11, 12]. Éppen ellenkezőleg, magas apelin expresszióval rendelkező daganatok esetén lényegesen alacsonyabb mindkét terápiás ágens hatékonysága az apelint kisebb mértékben expresszáló daganatoknál tapasztaltakkal szemben [11, 12]. Feltételezhető tehát, hogy az apelin által indukált angiogenezis lényegesen különböző útvonalak révén valósul meg, mint a VEGF-, valamint a vele szoros összefüggésben működő jelátviteli útvonalak [11]. A magas apelin expresszió okozta terápiás sikertelenségre a választ a kombinált terápia jelentheti. Egy friss közlemény szerint ugyanis magas apelin expresszióval rendelkező tumorok esetén lényegesen jobb eredmények érhetőek el, ha a nintedanibot egy apelin-inhibitorral kombinálva alkalmazzák, mint nintedanib monoterápia esetén [11]. Az apelin-inhibitorok hatékonyságát munkacsoportunk is elemezte a közelmúltban. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a MM54 apelin-inhibitor képes hatékonyan gátolni mind az angiogenezist, mind a tumor növekedést magas apelin expresszióval rendelkező daganatok esetén *in vivo* [10].

Köszönöm az általános kritikai megjegyzéseket és az észrevételeket a felmerülő hiányosságokra vonatkozóan. Ezeket az előadásban próbálok/tam meg megfelelő részletességgel pótolni.

Végül ismételten köszönöm Kulka Janina Professzor Asszonynak értekezésem bírálatát, építő kritikáját és támogató gondolatait. Tisztelettel kérem válaszaim elfogadására.

Tisztelettel:


Prof. Dr. Rényi-Vámos Ferenc

Budapest, 2021. október. 12

Felhasznált irodalom

1. Warth A. Spread through air spaces (STAS): a comprehensive update. *Transl Lung Cancer Res.* 2017;6(5):501-507. doi:10.21037/tlcr.2017.06.08
2. Kerjaschki D. The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115(9):2316-2319. doi:10.1172/JCI26354
3. Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, et al. Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol.* 1997;151(5):1417-1423.
4. Kadota K, Nitadori JI, Sima CS, et al. Tumor Spread through Air Spaces is an Important Pattern of Invasion and Impacts the Frequency and Location of Recurrences after Limited Resection for Small Stage I Lung Adenocarcinomas. *J Thorac Oncol.* 2015;10(5):806-814. doi:10.1097/JTO.0000000000000486
5. Ito M, Yamashita Y, Miyata Y, et al. Prognostic impact of the primary tumor location based on the hilar structures in non-small cell lung cancer with mediastinal lymph node metastasis. *Lung Cancer.* 2012;76(1):93-97. doi:10.1016/j.lungcan.2011.07.015
6. Ketchedjian A, Daly BD, Fernando HC, et al. Location as an important predictor of lymph node involvement for pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;132(3):544-548. doi:10.1016/j.jtcvs.2006.05.023
7. Megyesfalvi Z, Tallosy B, Pipek O, et al. The landscape of small cell lung cancer metastases: Organ specificity and timing. *Thorac Cancer.* 2021;12(6):914-923. doi:10.1111/1759-7714.13854
8. Radeckzy P, Moldvay J, Fillinger J, et al. Bone-Specific Metastasis Pattern of Advanced-Stage Lung Adenocarcinoma According to the Localization of the Primary Tumor. *Pathol. Oncol. Res.*, 23 September 2021 doi.org/10.3389/pore.2021.1609926
9. Zerva LV, Constantopoulos SH, Moutsopoulos HM. Humoral immunity alterations after environmental asbestos exposure. *Respiration.* 1989;55(4):237-241. doi:10.1159/000195740
10. Berta J, Török S, Tárnoki-Zách J, et al. Apelin promotes blood and lymph vessel formation and the growth of melanoma lung metastasis. *Sci Rep.* 2021;11(1):5798. Published 2021 Mar 11. doi:10.1038/s41598-021-85162-0
11. Uribealago I, Hoffmann D, Zhang Y, et al. Apelin inhibition prevents resistance and metastasis associated with anti-angiogenic therapy. *EMBO Mol Med.* 2019;11(8):e9266. doi:10.15252/emmm.201809266
12. Zuurbier L, Rahman A, Cordes M, et al. Apelin: A putative novel predictive biomarker for bevacizumab response in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;8(26):42949-42961. doi:10.18632/oncotarget.17306