



SEMMELWEIS EGYETEM

Általános Orvostudományi Kar I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet

Egyetemi tanár / igazgató

DR. MATOLCSY ANDRÁS

Professzor Hortobágyi Tibor
bíráló

Válasz Hortobágyi Tibor professzor úrnak

Szeretném megköszönni, hogy értekezésem bírálatát elvállalta és elkészítette. Köszönöm a rendkívül alapos, mindenre kiterjedő értékelést.

A formai kritikákat elolvasva szembesültem vele, hogy ugyan igyekeztem megtenni mindent, és törekedtem rá, de az idegenszavak használatában, írásmód egységességében még maradt pontatlanság. Többen is átnéztük a dolgozatot benyújtás előtt, én sajnálom a legjobban, hogy maradt még benne néhány elütés, mert ezeken javítani tudomásom szerint már nem lehet. Remélem, hogy ezek, illetve a helyenként megjelenő egyéb stiláris és kisebb szerkesztési hibáim – mint például a rövidítésjegyzék elhelyezése (a többi bíráló is megjegyezte), irodalom formázása – nem zavarták a munkám követhetőségét. A rövidítésjegyzéket a dolgozat végére helyeztem, mert nekem nagyon furcsa, amikor egy dolgozatot kézbevéve hosszasan lapoznom kell ahhoz, hogy a munka érdemi részéhez érjek. Belátom azonban, hogy a dolgozat elején könnyebb keresni ebben.

Nagyon köszönöm a tudományos eredményeim kiemelését, azok elfogadására tett javaslatát és azt is, hogy nagyra értékelte munkámat.

Köszönöm, hogy a jobb követhetőség érdekében sok helyen az adott fejezetet, oldalszámokat megadva írta meg megjegyzéseit és kérdéseit. A következőkben a specifikus megjegyzésekre és kérdésekre szeretnék válaszolni. A bonyolultabb patológiai osztályozásokkal, tumortípusokkal is összefüggő orvosi kérdésekkel kapcsolatban biológusként a patológus kollégák segítségével igyekeztem minél pontosabban válaszolni a feltett kérdésekre. Egyes megjegyzéseket és kérdéseket néhány helyen összevonva válaszoltam meg, amennyiben a kérdések és/vagy a válaszaim összefüggtek egymással.

1.,2.,3. kérdés

1. 13. oldal (p13): A TGF-béta hatás csendesítése valóban terápiásan releváns lehet, erre számos *in vitro* és *in vivo* kísérletes adat, preklinikai vizsgálati modell eredménye is utal. Ugyanakkor, a célzott ('on-target') anti-TGF-béta terápiák nem igazán sikeresek a human klinikai onkológiai alkalmazásban. Mi lehet ennek az oka, melyek a fő megválaszolendő kérdések?
2. Mi a véleménye az antisense oligonucleotid (ASO) terápiás alkalmazhatóságáról, különös tekintettel a TGF-béta transzláció (és expresszió) gátlása vonatkozásában?
3. Az epithelialis-mesenchymalis transitio (EMT) valamint a mesenchymalis-epithelialis transitio (MET) jelentős az áttétképződésben, tumor progresszióban és szorosan összefügg a TGF-béta és mTOR szignalizációs útvonallal, mint ezt a Jelölt értekezésében kifejti. Milyen jelentősége van e folyamatoknak a progresszióban a nem klasszikus epithelialis, hanem neuroepithelialis idegrendszeri tumorok esetében? Az EMT szerepét más idegrendszeri daganatok, pl. medulloblastoma esetén is kimutatták. Mennyire bizakodhatunk, hogy az EMT és MET reverzibilisnek tartott folyamatait agydaganatok esetében sikeresen manipuláljuk terápiás céllal?

A három kérdés a TGFβ daganatbiológiai és epitheliális-mesenchymális tranzícióban (EMT-ben) játszott szerepével, valamint a TGFβ-gátlás és csendesítés lehetőségeivel, illetve az EMT jelentőségével nem

Cím: 1085 Budapest, Üllői út 26.

Postacím: 1085 Budapest, Üllői út 26.; 1428 Budapest, Pf. 2.

E-mail: titkarsag.1path@med.semmelweis-univ.hu

Tel.: (+36-1) 317-1074, (+36-1) 459-1500 / 54455, Fax.: (+36-1)459-1500 / 54431

semmelweis.hu/patologia1



klasszikus epitheliális, hanem neuroepitheliális idegrendszeri tumorokban és medulloblastomákban foglalkozó fontos kérdések.

Munkám elején a TGFb hatásának sokféleségével és elsősorban a lymphomák esetében elmaradó negatív szabályozó hatásokkal, érzékenység-változásokkal foglalkoztam. Érdeklődésünk már akkor sem az első fellángolása volt az ilyen típusú kutatási kérdéseknek a TGFb Janus-arcú daganatbiológiai szerepével kapcsolatban. Azt hiszem, ma már egyáltalán nem meglepő, főleg, ha a tumorszövet sokféle heterogenitását (celluláris, genetikai, mikrokörnyezeti, metabolikus) is figyelembe vesszük, hogy egy olyan szabályozó molekula hatásainak befolyásolása, aminek sejttypustól és mikrokörnyezettől függően eltérő hatásai vannak, *in vivo* nem a legsikeresebb a daganatok esetében.

A fő nehézségeket a daganatok kialakulásában és progressziójában a TGFb időben és térben eltérő hatásai; a daganatsejtek gyakori érzékenység vesztese/változása; a TGFb immunregulációban, más mikrokörnyezeti tényezőkben, nem tumoros sejtekben és EMT-MET-ben játszott összetett szabályozó szerepe jelenti. Az anti-TGFb kezelések a daganatkialakulás korai szakaszában az EMT gátlásával a sejtek migrációs képességének kialakulását, illetve immunszuppresszív hatásait ugyan gátolni képesek, de egy későbbi fázisban; például a már szóródott tumorsejtek esetében az anti-TGFb kezelés segítheti a daganatsejtek MET átalakulását, így a sejtek újra aktiválódhatnak, oszódhatnak, a tumor növekedésnek indulhat az új helyen TGFb gátlás esetében. Arról, hogy a daganat- és normál sejtek TGFb termelése, akár az exosomális TGFb transzportjának távoli hatásai, illetve TGFb válasza a sejt típusától és differenciációs állapotától is függ szintén beszélni kell, ez jelentősen korlátozza az *in vivo* vizsgálatok eredményeit különös tekintettel a „cancer-associated” fibroblasztok hatásaira. Mindezek alapján, a TGFb-termelést vagy funkcióit gátló terápiák esetében, lokális kezelés mellett, a teljes szövetet, míg szisztémás kezeléskor az egész szervezetet érintő sokféle hatással, illetve adott típusú daganatsejtek esetében eltérő hatásokkal is számolnunk kell. Fontos klinikai korlátozó tényező a TGFb szignál gátlás esetében a kezelés kardiotoxikus hatása, illetve a TGFb negatív feedback mechanizmusainak elmaradása miatt a TGFb molekulacsald (pl. BMP-k) más elemeinek, így a Smad útvonalban megjelenő következményes szabályozási zavarok megjelenése is. Ez utóbbi akár jóindulatú tumorok növekedését vagy a metasztatikus sejtek túlélését és proliferációjának újraaktiválódását is segítheti adott mikrokörnyezetben.

Még a mi vizsgálataink idején elindultak azok az antisense oligonukleotid (ASO) kezelések, amelyek lokálisan a tumorszövet (tumor- és mikrokörnyezeti sejtek) TGFb1, illetve 2 termelését, ezen keresztül a TGFb tumornövekedését támogató, elsősorban immunszuppresszív, EMT-t, migrációt és metasztázist segítő hatásait célozták. Voltak kezdeti sikerek például lokális antisense alkalmazásával gliomás betegek esetében, de a terápia eddig nem került bevezetésre (TGFb2: AP12009 – NCT00761280 fázis III.; TGFb1: ISTH0036 – NCT02406833 mindkettővel kapcsolatos vizsgálatok jelenleg inaktívak). A TGFb2 ASO-terápia kemoterápiával összevetve hatásosabbnak bizonyult (OS ~36 hónap – 23 hónappal szemben) gliomás betegekben, illetve más daganatok, így pl. pankreász tumorok növekedésében, EMT-jének gátlásában is (alacsony betegszámok mellett). Az eredmények és ezeknek az ASO-oknak alkalmazása azonban még nem elég sikeres, nem standardizálható, főleg más típusú gátlószerek alkalmazásával összevetve (pl. a TGFb-receptor-mediált hatások kompetitív gátlása vagy receptor kináz-gátlók használata). Előbbi háttérben több dolog is áll, köztük a TGFb-termelés szabályozásának különbségei, illetve a mikrokörnyezeti TGFb transzportja (pl. exosomális), tárolása és aktiválása; illetve az ASO-ok felvétele, akkumulációja, bomlékonysága (instabilitása) és előállításának költségei is. A TGFb2 ASO és antitumor vakcináció kombinációt tesztelték (pl. NSCLC-ben), de ez a kezelés sem hozott igazi áttörést, mindössze 3 hónap túlélési előnyt mutattak ki az OS-ben (a PFS-ben annyit sem). Több olyan vizsgálat is indult, ahol például GM-CSF és TGFb-t vagy furin convertase-t (a TGFb poszttranszlációs érésében szükséges) célzó ASO, illetve shRNAi-kezeléssel (vigil) próbálták a PD-L1-gátló hatásait fokozni metasztatikus NSCLC-ben. Vigil esetében jelenleg is több fáziskísérlet van például ovárium daganatokban és Ewing-sarcomákban is. A TGFb gátló hatású kezelések között folynak, folytak még vizsgálatok neutralizáló antitestekkel, szolubilis receptorokkal fibrotikus kórképekben, systemas sclerosis-ban és például ovarium carcinomákban, Ewing-sarcomákban és melanomákban is. A szolubilis betaglycan (mint extracelluláris TGFb-t kötő, semlegesítő fehérje) pl. csökkentette a TGFb szérumszintet és gátolta a tüdő metasztázisok kialakulását *in vivo* emlő carcinoma modell kísérletekben. A legsikeresebbek talán mégis inkább a kismolekulasúlyú TGFb receptor tirozin kináz-inhibitorok lehetnek, amelyekkel még jelenleg is több fázisvizsgálat is zajlik pl. glioblastomák, metasztatikus

vese-, gyomor- és tüdő-, pankréász-, prostata- daganatok és myeloma esetében is (NCT01582269, 02452008, 02688712, 03143985, 03698825, 03724851, 03732274).

A TGF β EMT-t segítő szerepe miatt, nemcsak a lokális TGF β termelésnek, hanem a TGF β -nak mint ligandnak a neutralizálása, ligandkötésének vagy a TGF β útvonal elemeinek gátlása is felmerül bizonyos agydaganatok, köztük a gliomák és a medulloblastomák esetében is. A mesenchymális átalakulás következményeként megfigyelhető mesenchymális morfológiájú gliomasejtek megjelenése rosszabb prognózissal hozható összefüggésbe. Kisebb esetszámú vizsgálatok elemzése alapján, az EMT eredményeként megjelenő mesenchymális jellegű gliomasejtek a prognózis szempontjából mindenképpen rosszat jeleznek, és a szisztémás metasztázisok, koponyacsonti infiltráció megjelenésével is összefügghetnek. Ezzel párhuzamosan a daganatos sejtekben az EMT markerek (pl. TWIST, SNAIL, ZEB TF-ok) megjelenése a rossz prognózissal összefüggésben igazolható. Az EMT-MET szerepe a túlélő terápiarezisztens, összejtszerű fenotípussal rendelkező sejtek megjelenése az egyik legnagyobb problémát jelenti a központi idegrendszeri malignitások tekintetében is. Ezekben az átalakulásokban nemcsak a TGF β , hanem számos más, növekedési faktor útvonal aktivitásváltozásának is fontos szerepe van, az mTOR szignál központi szerepe mellett (többféle útvonaltól érkező jelek összegzése). Fontos szerepet tulajdonítanak a legkülönbözőbb vizsgálatok a HGF/c-Met-nek; az embrionális eredetű daganatoknál Sonic Hedgehog (shh), illetve Notch útvonalaknak is. Jól mutatja az előbbi útvonalak jelentőségét, hogy a HGF overexpresszió gliomasejtekben növeli a sejtek tumorigenitását; serkenti a tumor növekedését, a formálódó tumorban az angiogenezist, míg ezek gátlásával az *in vivo* tumornövekedés lassítható glioma kísérleti modellekben. A különböző növekedési faktor útvonalak a jelátviteli hálózaton belül egymásra is hatással vannak, így gátlásuk, és az EMT gátlása nem könnyű feladat. Mindezek alapján az anti-EMT terápiát mindenképpen kombinálni kell más molekulárisan célzott terápiákkal, ami a várható mellékhatásokat is figyelembe véve nem lesz könnyű feladat. Számos potenciális target ellen azonban egyre jobb inhibitorok érhetők el. A HGF/c-Met gátlókat, a c-Met/Alk gátló crizotinib terápiát, NTRK fúziós gátlókat, a multikináz inhibitorokat vagy a VEGF gátlószereket akár a hagyományos kemoterápiás készítményekkel is kombinálni lehet. Például a HGF/c-MET inhibitorok közül is többet teszteltek, tesztelnek glioblastomás betegekben (crizotinib, PLB-1001, pivatinib, cabozantinib onartuzumab, rilotumumab, telisotuzumab, emibetuzumab). A vér-agy gát miatt a kismolekulasúlyú inhibitorok esetében talán nagyobb a remény (fázis I/II vizsgálatok NCT02386826, NCT03175224, NCT01870726, NCT01441388), bár ezek a vizsgálatok az agydaganatok esetében nem annyira eredményesek, mint más daganatok esetében, ahol már több fázis III vizsgálat is elkezdődött. Nagy szükség van jobb terápiás eredményekre, de arra is vigyázni kell, hogy az ilyen multi-targeted kezelés után/közben ne egy rendkívül agresszív tumorsejtklón jelenjen meg a tumorszövet adaptációs mechanizmusainak és heterogenitásának eredményeként. A MET-EMT folyamataival párhuzamosan a sejtek anyagcseréje is változik, így saját eredményeink alapján mi abban bízunk, hogy, a metabolikus és egyéb adaptációs mechanizmusokat még jobban megismerve, metabolikus katasztrófa előidézésével is javíthatjuk a jelenlegi kezelési eredményeket a rossz prognózissal EMT-t mutató daganatok esetében.

-Huang CY, Chung CL, Hu TH, Chen JJ, Liu PF, Chen CL. Recent progress in TGF- β inhibitors for cancer therapy. Biomed Pharmacother. 2021 Feb;134:111046.

-Teixeira AF, Ten Dijke P, Zhu HJ. On-Target Anti-TGF- β Therapies Are Not Succeeding in Clinical Cancer Treatments: What Are Remaining Challenges? Front Cell Dev Biol. 2020 Jul 8;8:605.

-Schlingensiepen KH, et al. Targeted tumor therapy with the TGF-beta 2 antisense compound AP 12009. Cytokine Growth Factor Rev. 2006 Feb-Apr;17(1-2):129-39.

-Jaschinski F, et al. The antisense oligonucleotide trabedersen (AP 12009) for the targeted inhibition of TGF- β 2. Curr Pharm Biotechnol. 2011 Dec;12(12):2203-13.

-K.H. Schlingensiepen, et al. Transforming growth factor-beta 2 gene silencing with trabedersen (AP 12009) in pancreatic cancer. Cancer Sci., 102 (6) (2011), pp. 1193-1200

-Alvarez MA, et al. TGF- β Inhibitors in Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. J Gastrointest Cancer. 2019 Jun;50(2):207-213.

-Khater AR, Abou-Antoun T. Mesenchymal Epithelial Transition Factor Signaling in Pediatric Nervous System Tumors: Implications for Malignancy and Cancer Stem Cell Enrichment. Front Cell Dev Biol. 2021 May 13;9:654103.

-Lu YB, et al. Targeting the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Stem Cells for a Better Clinical Outcome of Glioma. Technol Cancer Res Treat. 2020 Jan-Dec;19:1533033820948053.

-Mulcahy EQX, et al. HGF/MET Signaling in Malignant Brain Tumors. Int J Mol Sci. 2020 Oct 13;21(20):7546.

-Le Rhun E, et al. Molecular targeted therapy of glioblastoma. Cancer Treat Rev. 2019 Nov;80:101896.

-Cheng F, Guo D. MET in glioma: signaling pathways and targeted therapies. J Exp Clin Cancer Res. 2019 Jun 20;38(1):270.

Cím: 1085 Budapest, Üllői út 26.

Postacím: 1085 Budapest, Üllői út 26.; 1428 Budapest, Pf. 2.

E-mail: mintakar@semmelweis-univ.hu

Tel.: (+36-1) 459-1500

semmelweis.hu



-Rozen, E.J., Shohet, J.M. Systematic review of the receptor tyrosine kinase superfamily in neuroblastoma pathophysiology. *Cancer Metastasis Rev* (2021). <https://doi.org/10.1007/s10555-021-10001-7>
-Hu H, et al. Mutational Landscape of Secondary Glioblastoma Guides MET-Targeted Trial in Brain Tumor. *Cell*. 2018 Nov 29;175(6):1665-1678.e18. doi: 10.1016/j.cell.2018.09.038. NCT02978261.
-Gibson EG, et al. Population pharmacokinetic analysis of crizotinib in children with progressive/recurrent high-grade and diffuse intrinsic pontine gliomas. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2021 Dec;88(6):1009-1020.
-Bolcaen J, et al. Novel Receptor Tyrosine Kinase Pathway Inhibitors for Targeted Radionuclide Therapy of Glioblastoma. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Jun 29;14(7):626.

4. kérdés

4. p18: '..egyelőre olyan gátlószer még nem áll rendelkezésre, amely kizárólag az mTORC2 hatásait befolyásolná' - állítja a Jelölt. Ezzel szemben Werfel TA et al. közleménye (*Cancer Res*, 2018) a nanoparticulum-alapú Rictor-gátlás kedvező hatásáról számol be Her-2 amplifikált sejtek esetén, kísérletes modellben.

Nagyon köszönöm, hogy a bíráló felhívta a figyelmet Thomas Werfel közleményére, amit valóban nem említettem a dolgozatban, a vizsgálatban valóban mTORC2 specifikus gátlást teszteltek sejtvonalakban, illetve egér emlő carcinoma modellben. Ebben a munkában Rictor nanoparticulum-siRNS kezeléssel dolgoztak, mi is terveztük, hogy saját vizsgálatainkban ehhez hasonlóan siRNS-sel oldjuk meg az mTORC2-komplex specifikus gátlását, mert hasonló siRNS vagy antisense kezelésekkel vannak más kutatócsoportok munkáiban is adatok. Sajnos ezekről és így Werfel módosított siRNS kezelésének további terápiás felhasználásáról nincsenek újabb és/vagy klinikai adatok, fázisvizsgálatokat sem kezdtek, vagy legalábbis, nem találtunk még ilyet. Ennek kapcsán azonban most újra sokféle kereséssel, a legkülönbözőbb adatbázisokban keresve néztünk utána potenciális kismolekulasúlyú specifikus mTORC2-gátlóknak, majd egy friss review alapján találtunk meg egy másik közleményt (a Pubmedben csak a pontos címre keresve találtuk meg). Ebben a cikkben egy kismolekulasúlyú inhibitorot azonosítottak, mint mTORC2-gátlót (CID613034 v. jr-ab2-000 és jr-ab2-011 analógja; mTOR-Rictor komplex kialakulását gátolja a molekula). Gliomamodellekben tesztelték, *in vitro* gátolta a sejtek proliferációját és túlélését is, kolóniaképződés alapján is hatékony citotoxikus kezelésnek bizonyult; *in vivo* csökkentette a metasztázisok kialakulását, lassította a progressziót, késleltette a daganatnövekedést, az állatok túlélése jelentősen meghosszabbodott. Számomra meglepő, hogy csak további két közleményben említik ezt a gátlót, ezek dolgozatom benyújtása után jelentek meg egy melanomás, illetve egy nemdaganatos, az M1-M2 makrofág differenciációval foglalkozó munkában, és a készítménynek semmilyen klinikai tesztelése nem kezdődött még el. Bízató azonban, hogy mindkét esetben meggyőzően igazolták az mTORC2 specifikus gátlóhatásokat, a jövőben saját kísérleteinkben mi is tesztelni szeretnénk ezt.

-Benavides-Serrato A, Lee J, Holmes B, Landon KA, Bashir T, Jung ME, Lichtenstein A, Gera J. Specific blockade of Rictor-mTOR association inhibits mTORC2 activity and is cytotoxic in glioblastoma. *PLoS One*. 2017 Apr 28;12(4):e0176599.
-Guenzle J, Akasaka H, Joechle K, Reichardt W, Venkatasamy A, Hoepfner J, Hellerbrand C, Fichtner-Feigl S, Lang SA. Pharmacological Inhibition of mTORC2 Reduces Migration and Metastasis in Melanoma. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 22;22(1):30.
-Wu MM, Wang QM, Huang BY, Mai CT, Wang CL, Wang TT, Zhang XJ. Dioscin ameliorates murine ulcerative colitis by regulating macrophage polarization. *Pharmacol Res*. 2021 Oct;172:105796.

5., 8. és 19-es kérdés

5. Az mTOR gátló Rapalink-1 agyi iszkémia modellben infarktus-növekedést, vér-agy gát (BBB) károsodást okozott egy friss közlemény szerint (Chi oz et al., *Frontiers in Physiology*, 2021), mely az értekezést követően jelent meg. Ennek kapcsán kérdezem, hogy a Rapalink-1 BBB-t megnyitó hatása alacsonyabb (de meg remélhetőleg terápiásan hatékony) dózis esetén akár kedvező is lehet agyi tumorok esetén?

8. p32: Hol tart jelenleg a harmadik generációs mTOR gátlók (Rapalink-1) terápiás alkalmazása?

19. p103: Agyi áttetek: Az mTOR inhibitorok BBB-n átjutásáról vannak irodalmi adatok? Teljes agyi besugárzás (WBRT) után jobban átjutnak ezen hatóanyagok? A szelektív inhibitor (mTORC2) BBB-re kifejtett hatásáról a Megjegyzést lsd. fentebb.

A három kérdés a harmadik generációs Rapalink-1 mTORC1-C2-gátló vér-agy gát (BBB) integritását megbontó hatására, egy ezzel kapcsolatos idei friss közleményre; a Rapalink-1 terápiás alkalmazásának vizsgálatára, az mTOR-gátlók vagy egyéb hatóanyagok vér-agy gáton átjutására vonatkozik.

Az említett közlemény szerzői egy korábbi munkájukban már a rapamycin esetében hasonló, a vér-agy-gát károsodását és agyi infarktust fokozó hatásokat mutattak ki. Ebben arra utaltak, hogy az mTOR-gátlással összefüggő vér-agy gátat érintő hatás valószínűleg független az mTORC1-gátlás iszkémiás agyi infarktusos területnövekedést okozó hatásától (mert abban a neuronális sejtek túlélésében feltételezhetően az mTORC2 aktivitásoknak lehet nagyobb szerepe). Ezek alapján a rapamycin, sirolimus, temsirolimus vér-agy gát megbontó hatásait tartanám a feltett kérdéssel kapcsolatosan kiemelendőnek. Az mTORC2-komplexnek általánosan a sejtek túlélésének támogatásában nagyobb szerepet tulajdonítanak, így gátlásának, az Akt specifikus Ser473-as foszforiláció elmaradásának a nem daganatos agyi területek esetleges sejtkárosodásában, egyes idegrendszeri mellékhatásokban nagyobb szerepe lehet. Persze amennyiben az adott agydaganatban vagy adott daganatok agyi metasztatáisaiban (amire mi is találtunk példákat) fokozott mTORC2-aktivitást mutatnak ki, akkor a C1-C2-gátlás mindenképpen hatásos, akár a C1-gátlóknál hatásosabb antitumorális kezelés is lehet (megfelelő alacsony toxicitású dózis esetében).

Jelenleg a clinical-trials.gov-on egyébként nem találtunk vizsgálatokat a Rapalink-1-gyel, ezek a vizsgálatok valamilyen okból mintha megrekedtek volna a preklinikai fázisban. Az említett friss közlemény alapján felmerülő kérdés, hogy mennyiben változtatja meg a Rapalink-1 - mTORC1-C2 gátló - a vér-agy gátat és ez, vagy más mTOR-gátlók hogyan befolyásolhatják a kombinációs kezelések esetén a szerek agyszöveti koncentrációját, azok hatását, igen fontos. Ez és a megfelelő dózis, annak egyéb hatásai az agyi infarktusok esetében mindenképpen további vizsgálatokat igényelnek.

Az mTOR-gátlók, illetve a kevésbé specifikus kinázgátlók vér-agy gáton átjutásáról nem minden esetben vannak adatok, a rapamycin és ennek származékai átjutnak a vér-agy gáton, lipid oldékonyságuk és szerkezetük, valamint sok esetben, a kimért kísérleti és klinikai adatok alapján is. Egyes mTOR-gátlók esetében a predikciós adatok és a valóságos átjutás között azonban vannak eltérések. Egy nemrég megjelent közleményben közel 60 gátlót vizsgáltak ebből a szempontból. Ezek szerint az első generációs gátlók mellett, a dual inhibitorok között is vannak olyanok, amelyek átjutnak a vér-agy gáton. Ebben a közleményben arról nem találtam adatokat, hogy az mTOR-gátlók átjutását a vér-agy gáton a besugárzás mennyiben módosíthatja, segítheti.

A kérdés azonban rendkívül időszerű, a jelenlegi tumorelleses gyógyszereknek csak kevesebb mint 10%-a jut át a vér-agy gáton, ennek a korlátozó hatásnak megkerülése az agydaganatok vagy akár az agyi metasztatázisok célzása esetében nagyon fontos lenne. Többen felhívták már a figyelmet egyes alternatívákra, mint a besugárzás, az ultrahang-kezelés potenciális transzport fokozó hatására a gyógyszeradagolásban, a vér-agy gáton átjutásban. Ez a jól vascurizált tumorok esetében az agyi lokalizációban, vér-tumor barrier is lehet. Egyes adatok szerint már 1-2 mm-es tumor növekedése esetén a vér-agy gát integritása fellazul, emellé társul a tumorok esetében gyakori hipoxia, ami új erek képződését indíthatja el. Ezekben vagy a fellazuló korábbi, a tumorok által körbenőtt erekben („cooption”) a tight-junction fehérjék, claudinok, occludinok eloszlása is megváltozik. Ebben az átalakulásban a TGF β szerepét is említik; a protektív – a mérgező és terápiás hatóanyagokat az erekbe visszatranszportáló – endothél sejtek és ilyen barrierok átalakulásában. Kimutatták, hogy amennyiben az erek átalakulásával párhuzamosan a periciták mennyisége csökken, akkor a kemoterápiás szerek penetrációja javulhat és ez a jobb prognózzsal is összefüggésben lehet. Arról is egyre több kísérleti adat jelenik meg, hogy radioterápia mellett is megfigyelhető a vér-agy gát funkcióinak és integritásának megbomlása, a tight junction fehérjék mennyiségének csökkenése, az erek átjárhatóságának fokozódása. A vér-agy gát károsodásában számos további tényező szerepét vizsgálták, amelyek között a sugárzást követően az endothel sejtekben a szenescencia aktiválódását és más, az erek permeabilitását fokozó hatásokat írtak le kísérleti rendszerekben. Egy tavaly megjelent review azonban más, a gyógyszertranszportot segítő eljárásokat magasabb evidenciával említ és a teljes agyi besugárzás hatásait a gyógyszerek célba juttatásának elősegítésében kevésbé tartja megalapozottnak. Az egyik legújabb review viszont azt emeli ki, hogy egyes nanopartikulumok a gyógyszerhatóanyagokat könnyebben juttatták célba, amennyiben abban sugárzó izotóp is jelen volt. Ez felhívja a figyelmet arra, hogy adott körülmények mellett a sugárzó anyag vagy a sugárkezelés jótékony, a vér-agy gátat is érintő hatásaira számítani lehet.

- Chi OZ, Mellender SJ, Barsoum S, Liu X, Damito S, Weiss HR. Effects of rapamycin pretreatment on blood-brain barrier disruption in cerebral ischemia-reperfusion. *Neurosci Lett.* 2016 May 4;620:132-
- Borsari C, De Pascale M, Wymann MP. Chemical and Structural Strategies to Selectively Target mTOR Kinase. *ChemMedChem.* 2021 Sep 16;16(18):2744-2759.
- G. Appelboom, et al Stereotactic modulation of blood-brain barrier permeability to enhance drug delivery, *Neuro Oncol.*, 18 (2016), pp. 1601-1609
- J.B. Wang, et al. Focused ultrasound for noninvasive, focal pharmacologic neurointervention, *front Neurosci.*, 14 (2020),
- S. Tiwary, et al. Metastatic brain tumors disrupt the blood-brain barrier and alter lipid metabolism by inhibiting expression of the endothelial cell fatty acid transporter Mfsd2a, *Sci. Rep.*, 8 (2018), pp. 1-13,
- Y.Q. Li, et al. Hypoxia in radiation-induced blood-spinal cord barrier breakdown *Cancer Res.*, 61 (2001)
- D.H. Murrell, et al. Evaluating changes to blood-brain barrier integrity in brain metastasis over time and after radiation treatment *Transl. Oncol.*, 9 (2016), pp. 219-227,
- C.G. Kevil, et al. Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Cell Growth Factor-mediated Permeability Occurs through Disorganization of Endothelial Junctional Proteins*, 1998 (2020)
- Kotb, S. et al. Gadolinium-based nanoparticles and radiation therapy for multiple brain melanoma metastases: proof of concept before phase I trial. *Theranostics* 6, 418–427 (2016).
- Verry, C. et al. Targeting brain metastases with ultrasmall theranostic nanoparticles, a first-in-human trial from an MRI perspective. *Sci. Adv.* 6, eaay5279 (2020)
- Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer.* 2020 Jan;20(1):26-41.
- Y. Yamazaki, et al. Vascular cell senescence contributes to blood-brain barrier breakdown. *Stroke*, 47 (2016), pp. 1068-1077,
- Stegg PS. The blood-tumour barrier in cancer biology and therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021 Nov;18(11):696-714.

6. kérdés

6. p25: Neurodegeneratív betegségek kezelésében is szerepe lehet az mTOR útvonal befolyásolásának. Szükség lehet szelektív mTORC1 ill. mTORC2 szelektív befolyásolására, különös tekintettel az inzulin szignalizáció (az mTORC2 es Akt érintett ebben) és autofágia kapcsolatára neurodegenerációban?

Jól ismert, hogy az mTOR jelátviteli útvonal gátlása megnövelte a kísérleti állatok (*C. elegans*, egér) élethosszát – illetve hosszútávú rapamycin-kezelésnek öregekedést késleltető hatásai is lehetnek. Az autofágia hibás szabályozása fontos szerepet játszik a neurodegeneratív kórfolyamatokban, az abnormális és toxikus fehérjeaggregátumok felhalmozódása elősegíti a sejtek pusztulását. Az ilyen toxikus fehérjék lebontásában az autofágiának fontos szerepe van, így az autofágiát aktiváló kezelések potenciális terápiás lehetőséget jelentenek a legtöbb, elsősorban időskori neurodegeneratív kórképben. Az mTOR-gátlás megakadályozhatja vagy késleltetheti az életkorral összefüggő betegségeket, például az Alzheimer-kórt (AD). A hosszútávú mTOR gátlás, autofágiát indukáló hatásain keresztül az Ab42 (Alzheimer – AD – biomarker) szintet csökkentette, és kísérleti egerekben is késleltette az Alzheimer-kór kialakulását. Éhezés következtében is kimutatható, az mTOR kináz aktivitás csökkenése, ami a növekedési faktor útvonalak hatásainak elmaradása és stressz szabályozó hatásokon keresztül az autofágia egyik fő szabályozója (az autofágiában fontos szabályozók foszforilációja, gátlása marad el mTOR-gátlás esetén, pl. ULK1, Beclin1, Atg6, Vps34, Vps15). A PI3K/Akt jelátviteli út aktivitásváltozása kimutatható Alzheimer- és Parkinson-kór esetében is. Az mTOR aktív formája miatt a hiperfoszforilált tau a korai állapotú AD neuronokban különösen nagy mennyiségben halmozódik fel. Az mTOR-aktivitás, elsősorban az mTORC1-mediált S6K és az mTORC2 aktivitás-mediált GSK3 is részt vehetnek a hiperfoszforilált tau fehérjék képzésében az Alzheimer-kóros betegek neuronjaiban. Azt is kiemeli több vizsgálat, hogy a szisztémás inzulinrezisztencia és a diabetes rizikófaktora az Alzheimer-kórnak. Egyesek szerint az Alzheimer-kór felfogható egy agyi diabetes betegségnek is, mert inzulinrezisztencia alakul ki, ami mellett sokszor igen jelentős mTOR-hiperaktivitás figyelhető meg. Ennek autofágiát gátló hatása és egyéb szignálokat érintő hatásai következményes sejtpusztulást okozhatnak. A szabályozatlan mTOR-hiperaktivitás háttere azonban még kevésbé ismert a neurodegeneratív betegségeknél.

Az mTORC1 gátlás esetében elmaradó negatív feedback mechanizmus miatt az IRS gátlása marad el, így a sejtek túlélési folyamataiban az Akt útvonal hiperaktivása nem szabályozódik le. Ez az mTORC1-gátló autofágiát felszabadító hatás, a toxikus anyagok lebontása mellett a sejtek túlélését az Akt szignál fenntartásával is támogathatja ilyen neurodegeneratív kórképekben. Az előbb leírtak szerint azonban pl. tau fehérje foszforilációját is fokozhatja az mTORC2-n keresztül, amennyiben annak aktivitását egy specifikus

mTORC1-gátló nem érinti. Talán éppen ezért ezekben a folyamatokban a minél specifikusabb mTORC1 gátlásnak és esetleg az S6K gátlásnak lehetne a jövőben nagyobb szerepe és ebben az esetben a sejtekben az mTORC2-mediált Akt hatások fennmaradása fokozhatná (sejtek túlélésének támogatásán keresztül is) az autofágia jótékony hatásait. Még sok nyitott kérdés van és ellentmondások is vannak az eddig megjelent eredmények között, nem szabad megfeledkezni arról pl., hogy az mTORC2 autofágiát negatívan szabályozó hatásairól is egyre több adat áll rendelkezésünkre.

A legtöbb eddigi kísérleti és egyes klinikai eredmény azonban igazolja, hogy a rapamycin alkalmas lehet számos életkorhoz kapcsolható neurodegeneratív betegség (pl. Parkinson-kór, Huntington-kór, Alzheimer-kór) terápiás kezelésére. Az mTOR szerteágazó hatású, több molekuláris mechanizmusával próbálták alátámasztani gátlásának neuroprotektív hatásait különböző neurodegeneratív kísérleti modellben. A rapamycin neurodegeneratív kórképekben alkalmazhatóságát egyelőre azonban sokszor akadályozzák a nemkívánatos és a krónikus alkalmazásból eredő egyéb mellékhatások, így a legkellemetlenebb a rash vagy pl. a rapamycin indukált diabetes-szerű hiperglikémia, hiperlipidémia, hipoinzulinémia, amelyek monitorozására, kezelésére rapalógok alkalmazásakor mindenképpen gondolni kell.

- Querfurth H, Lee HK. Mammalian/mechanistic target of rapamycin (mTOR) complexes in neurodegeneration. Mol Neurodegener. 2021 Jul 2;16(1):44.
- Cai Z, Yan LJ. Rapamycin, Autophagy, and Alzheimer's Disease. J Biochem Pharmacol Res. 2013 Jun;1(2):84-90. PMID: 23826514; PMCID: PMC3697866
- Yu-Yun Chang, et al; Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway. Biochem Soc Trans 1 February 2009; 37 (1): 232–236.
- Heras-Sandoval D, et al J. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. Cell Signal. 2014 Dec;26(12):2694-701.
- Bové, J., Martínez-Vicente, M. & Vila, M. Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. Nat Rev Neurosci 12, 437–452 (2011).

7. megjegyzés

p27, 9. ábra: Lehetett volna itt referenciát is megadni?

Ennél az ábránál a TCGA adatbázisból gyűjtöttük a mutációkról elérhető %-os előfordulási adatokat és a TCGA adatbázis programjával készítettük az ábrát, ezt nem adtam meg pontosan, adatbázisokat írtam és nem neveztem meg a TCGA adatbázist a hivatkozásában. Egy legújabb közlemény szerint annak ellenére, hogy 2014 előtt még azt gondolták, hogy az mTOR kináz mutációja ritka, az mTOR gént már mutációs gyakoriságát tekintve daganatbiológiai szempontból a jelentős onkogének és TOP 50 gyakrabban mutáns kináz gén között említi.

- Mendiratta G, Ke E, Aziz M, Liarakos D, Tong M, Stites EC. Cancer gene mutation frequencies for the U.S. population. Nat Commun. 2021 Oct 13;12(1):5961.

9. megjegyzés

p41: *TP53* a p53 fehérjét kódoló gén hivatalos neve (es nem *P53*)

A p53 fehérjét kódoló gént hivatalosan valóban *TP53*-nak kell nevezni. Nagyon régóta megjelenik a különböző magyarnyelvű közleményekben, igaz helytelenül, de elterjedt a *P53* gén elnevezés is. Ez lehet az oka, hogy nem tűnt fel nekem, hogy a gén nevét nem a hivatalos nomenklatúra szerint, pontatlanul használtam a dolgozatban.

10. megjegyzés

p43: A tüdőrák klasszifikáció pontosítandó: a nagysejtes neuroendocrin carcinoma (LCNEC) anagysejtes carcinoma (LCC) egyik altípusa (a WHO osztályozás szerint).

Szeretném pontosítani a dolgozatomban leírtakat a 2015-ös WHO klasszifikáció alapján (amelynek ide vonatkozó részei a legújabb 2020-21-es klasszifikációban nem változtak). A tüdődaganatok osztályozásában a 2004 utáni új markerek megjelenése és fenotipizálások eredményei alapján a nagysejtes tüdődaganatok nagyon sokféle típusán belül igyekeztek egyszerűsíteni az osztályozást. A jelenlegi definíció alapján a nagysejtes neuroendocrín carcinoma egy olyan nem kissejtes tüdődaganat, ami neuroendocrín morfológiai és immunfenotípusos jellegekkel rendelkezik. Ebben, illetve a jelenlegi legújabb osztályozásban a neuroendocrín tumorokat egy külön csoportba rendezték és azon belül található a kissejtes mellett a nagysejtes neuroendocrín tumorokat, karcinoid tumorokat és a preinvaszív neuroendocrín elváltozásokat vagy léziókat.

- Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MS, Wistuba I; WHO Panel. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol.* 2015 Sep;10(9):1243-1260.

11. megjegyzés-kérdés

p44: A tripla negatív emlőrák (TNBC) terápiájában az értekezés beadása ('a tripla negatív csoportban az új terápiás sikerek meg egyelőre elmaradnak') óta jelentős előrelépés, reménykeltő eredmények születtek. Kérem, hogy ismertesse ezeket röviden (pl. antitest-drug konjugátum alkalmazása/Trodely; chemo-immunoterápia).

Már a 2010-es évek közepén leírták, hogy TNBC-ákban a PD-L1 expresszió gyakori; így ez a csoport, igazolt PD-L1 expresszióval rendelkező esetekben, az eddigi kezelésekk mellett rosszabb prognózis miatt is jó célcsoportja az immunterápiáknak. Az előbbiekk mellett, ebben a csoportban a tumorok mutációs terhelése is általában jelentősebb, a *BRCA*-mutáns és a más mutációkkal jellemezhető tumorok esetében is.

Hagyományosan a TNBC metasztatikus daganatok megjelenésekor kemoterápiás kezelést alkalmaztak. Ezt a korai immunterápiák biztató eredményei alapján egy újabb vizsgálatban (IMpassion-130) elsővonalban kombináltak nab-paclitaxellel (albuminkötött nanoparticuláris paclitaxellel) egy erősen szelektált (pl. agyi metasztázis kizárva), de nagyszámú betegpopulációban ($n \sim 900$). Eredményeik szerint, a PD-L1 pozitív betegek esetében a progressziómentes túlélés jobbnak bizonyult, az OS több mint 6 hónap túlélési előnyt mutatott (25,5 versus 17,9 hónap) az atezolizumab+nab-paclitaxel csoportban. Erre alapozva, más vizsgálatok közül eredményesnek bizonyult a pembrolizumab és capecitabine/paclitaxel kombináció is (12 hónapnál közel 50%-os volt a response rate a csak kemoterápiával kezelt 25%-hoz képest). Így a metasztatikus TNBC esetében elsővonalban is javasolható az immune-check point inhibitor terápia. 2019-ben az FDA be is fogadta az atezolizumab/nab-paclitaxel kombinált kezelést TNBC esetében. Ezekbe a korábbi vizsgálatokba olyan betegeket, amelyek esetében agyi metasztázis is megfigyelhető volt még nem válogattak be.

Egy új retrospektív tanulmányban azonban elemezték különböző agyi metasztatikus daganatos betegek túlélési adatait immune-check point inhibitor kezelés eredményessége szempontjából. Ez a vizsgálat egyértelmű túlélési előnyt mutatott ki az inhibitorral is kezelt betegcsoportokban (14 versus 7,9 hónap). A legmarkánsabb különbség a NSCL (14,4 vs. 8,2 hó), TNBC (23,9 vs. 11,6 hó) és melanómás betegek (27,6 vs. 16,8 hó) esetében volt, de például vesedaganatos betegek (16,7 vs. 14 hó) esetében ilyen előnyt kimutatni már nem tudtak.

Az immune-check point inhibitorok más, nemcsak kemoterápiás, hanem egyes multikináz, illetve specifikus például PARP-inhibitor (PARPi) vagy MEK és VEGFR3 receptor-kináz kombinációit is nagy erővel tesztelik; egyrészt a mellékhatások tolerálhatósága, másrészt a hatékonyság szempontjából. TNBC-ban a kináz-inhibitorok (pl. MEK és VEGFR3 inhibitorok is) esetében a hatékonyság szempontjából is biztatóak az új vizsgálatok (pl. COLET fázis II - cobetinib-taxane-atezolizumab). Folyik egy fázis III vizsgálat elsővonalban ipatasertib/atezolizumab/paclitaxellel előrehaladott, illetve metasztatikus TNBC-kban (NCT04177108) is.

A másik jelentősebb előrelépés a homológ rekombináció deficiens daganatok esetében a PARP inhibitoroktól (PARPi) várható, amelyek a DNS repair gátlásával a replikációs zavarokkal (pl. *BRCA*-mutáns daganatok) rendelkező daganatok esetében hatékonyak. A PARPi-kat először az örökletes, majd a szerzett *BRCA*-mutáns daganatok esetében kezdték vizsgálni, alkalmazni. Ilyen esetekben a felhalmozódó DNS törések indukált sejthalálhoz, szintetikus letalitáshoz vezethetnek.

Ugyan a legújabb monoterápiás PARPi vizsgálatok eredményei nem annyira igazolták vissza az eredeti elvárásokat, de a germline *BRCA*-mutáns betegek progresszió mentes túlélésében és életminőség javulásában a kemoterápiához képest a PARPi-k jelentős előnyt mutattak (igaz az OS-ben ez már nem mutatható ki, a betegknél rezisztencia jelenik meg). 2018-ban az FDA, majd az EMA is befogadta az olaparib és talazoparib kezeléseket gBRCA és előrehaladott, metasztatikus HER2- emlődaganatok esetében. Kombinálva az immunterápiával vagy más kezelésekkel a PARPi-okat a megjelenő rezisztencia áttörhető, és ezek a kezelések még eredményesebbek lehetnek. Egyes nemrég lezárult fázis III vizsgálatok például egyértelmű, *BRCA*-mutációtól független, progressziómentes túlélési előnyt mutatnak TNBC betegknél veliparib+carboplatin/paclitaxel kezelés mellett a 2 és 3 éves PFS-ben (40% vs. 25%, illetve 35% vs 13%). Reménykeltők a PARPi és ICI kombinációs vizsgálatok első eredményei is. TNBC-ákban a jelenleg is zajló talazoparib/avelumab kombináció fázisvizsgálat (NCT03330405), illetve az olaparib/durvalumab (MEDIOLA fázis II) kezelések első megjelent eredményei mindenképpen alátámasztják a fenti kezelések alkalmazhatóságát első- és másodvonalban is TNBC-ákban.

Az antitest drog konjugátumok a specifikus célbajuttatás és így a szisztémás toxicitás csökkentésével, a lokálisan nagyobb drogkoncentráció elérésével növelhetik a kezelések hatékonyságát. TNBC esetében a legígéretesebbnek az idén novemberben EMA-engedélyezett Trodelvy (sacituzumab-govitecan) lehet, amelyet mTNBC-ben taxán, antraciklin kezelést követő progresszió után másodvonalban lehet alkalmazni. Ez akár monoterápiában is közel 6 hónap túlélési előnyt eredményezhet. A Trodelvy egy monoklonális ellenanyag készítmény, ami a Trop2 sejtfelszíni glikoproteinhez köt, majd receptor-mediált endocitózissal kerül a sejtek belsejébe, ahol a lizoszómában a savas pH hatására felszabadul a hozzá kötött SN-38 topoizoméráz I gátló. Így a tumorsejtek magjában kialakulhat a DNS károsító, osztódást gátló, majd következményes sejthalál indukáló hatás. A Trop2 epitheliális daganatokban, így TNBC-ban is gyakran overexpresszált fehérje, így a kezelés szelektíven juthat a daganatsejtekbe.

Mindezek alapján az elmúlt években valóban új lehetőségek jelentek meg az előrehaladott, metasztatikus TNBC kezelésében, egyrészt a PD-L1/PD1 inhibitorok elsővonalbeli és kemoterápia kombinált használatával, másrészt a PARPi-ok megjelenésével, illetve a legújabban bevezetett antitest kombinált topoizoméráz-gátló célba juttatásával. Mindezek azt támasztják alá, hogy a metasztatikus TNBC kezelése is jelentősen fejlődik és a kezelési protokollokban a kemoterápia kiegészülhet immunterápiával, felválthatja PARPi kombinált terápia vagy akár célzott kinázgátló vagy immunkonjugált kezelés is javíthatja a betegek életminőségét és túlélését.

-O'Reilly D, Sendi MA, Kelly CM. Overview of recent advances in metastatic triple negative breast cancer. *World J Clin Oncol.* 2021 Mar 24;12(3):164-182.

-Du W, Sirbu C, Lucas BD Jr, Jubelirer SJ, Khalid A, Mei L. A Retrospective Study of Brain Metastases From Solid Malignancies: The Effect of Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Oncol.* 2021 Aug 27;11:667847. doi: 10.3389/fonc.2021.667847.

-Olivier T, Prasad V. Sacituzumab govitecan in metastatic triple negative breast cancer (TNBC): Four design features in the ASCENT trial potentially favored the experimental arm. *Transl Oncol.* 2022 Jan;15(1):101248. doi: 10.1016/j.tranon.2021.101248.

- Tolba MF, Elghazaly H, Bousoik E, Elmazar MMA, Tolaney SM. Novel combinatorial strategies for boosting the efficacy of immune checkpoint inhibitors in advanced breast cancers. *Clin Transl Oncol.* 2021 Oct;23(10):1979-1994.

-Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, Su X, Wang Y, Gonzalez-Angulo AM, Akcakanat A, Chawla A, Curran M, Hwu P, Sharma P, Litton JK, Molldrem JJ, Alatrash G. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res.* 2014;2:361–370.

- Ayoub JP, Wildiers H, Friedlander M, Arun BK, Han HS, Puhalla S, Shparyk Y, Jakobsen EH, Wu M, Bach BA, Feng D, Ratajczak CK, Maag D, Diéras V. Safety and efficacy of veliparib plus carboplatin/paclitaxel in patients with HER2-negative metastatic or locally advanced breast cancer: subgroup analyses by germline *BRCA1/2* mutations and hormone receptor status from the phase-3 BROCADE3 trial. *Ther Adv Med Oncol.* 2021 Dec 9;13:17588359211059601.

-Domchek SM, Postel-Vinay S, Im SA, Park YH, Delord JP, Italiano A, Alexandre J, You B, Bastian S, Krebs MG, Wang D, Waqar SN, Lanasa M, Rhee J, Gao H, Rocher-Ros V, Jones EV, Gulati S, Coenen-Stass A, Kozarewa I, Lai Z, Angell HK, Opincar L, Herbolzheimer P, Kaufman B. Olaparib and durvalumab in patients with germline BRCA-mutated metastatic breast cancer (MEDIOLA): an open-label, multicentre, phase 1/2, basket study. *Lancet Oncol.* 2020 Sep;21(9):1155-1164.
- <https://www.onclive.com/view/checkpoint-and-parp-inhibition-remain-the-focus-of-ongoing-research-in-tnbc>
- Barchiesi G, Roberto M, Verrico M, Vici P, Tomao S, Tomao F. Emerging Role of PARP Inhibitors in Metastatic Triple Negative Breast Cancer. Current Scenario and Future Perspectives. *Front Oncol.* 2021 Nov 25;11:769280.

12. megjegyzés

p44: 'A központi idegrendszer (KIR) daganatai ritkák, de rendkívül rossz prognózisúak' - javasolom ezt a nagyon általánosító megjegyzést pontosítani (pl: A KIR daganatok a 2. leggyakoribb gyermekkori malignus tumorok a haematológiai neopláziák után; számos jó prognózisú KIR tumor van).

A 44. oldalon található mondatomat valóban pontosítani kell, a mondatban malignus központi idegrendszeri daganatok helyett csak daganatokat írtam. A leírt mondat valóban nem helyes, pontatlan, mert ugyan a gyermekkori daganatok önmagukban ritka daganatoknak tekinthetők, de köztük valóban viszonylag gyakoribbak (a 2. leggyakoribbak) a központi idegrendszeri daganatok és ezek között szerencsére több jó prognózisú is van.

13. megjegyzés

p46: Panoramic (nem 'Panoramic') (a 118. oldalon is)

Nagyon köszönöm, hogy erre felhívta a figyelmemet, mert valóban, Molnár Béla tanár úr el is szokta mondani, hogy a program a *Pannon* szóból kapta a nevét, ezt az elírást nem vettem korábban észre. Figyelni fogunk erre.

14. és 28. kérdések A statinok alkalmazásához, jelentőségéhez kapcsolódnak

p68: A statinok antitumorális hatása kapcsán kérdezem, hogy ez milyen más daganatokban ismert és klinikailag tesztelt? Miért nem szélesebb körben alkalmazott kezelés? Lehet tumor- preventív szerepe is? Mik a statinok lehetséges terápiás targetjei rákok esetében? Vajon mekkora dózis lehet antitumorálisan is hatékony (ugyanis tartós magas dóziszú statin kezelésnek a mellékhatásai is számottevők)?

28. p135: A *TP53* mutáció (és nem *P53*) és statin szenzitivitás kapcsolata kicsit részletesebben kifejtve hasznos és érdekes lenne.

A 2000-es évek elején végzett vizsgálataink óta a statinok antitumorális hatásait kimutatták már a legkülönbözőbb szolid daganatokban; emlő-, prosztatá-, gyomor-, NSCLC, fej-nyaki, petefészek-, colon-, hasnyálmirigy-, májdaganatok és csonttátek esetében is. Bár az eredményekben vannak ellentmondások, tesztelésük több klinikai vizsgálatban zajlik, különböző kombinációs kezelésekből is.

A statinok – mint 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase gátlók – a mevalonát képződés direkt gátlásán keresztül befolyásolják (csökkentik) a koleszterinszintézist, a szteroid hormonok termelését, de számos egyéb hatáson keresztül érintik a sejtek túlélési, adhéziós, migrációs, proliferációs folyamatait, az immun-, endotél sejtek funkcióit és az antioxidáns folyamatokat is.

Nem véletlen, hogy ezzel összefüggésben a statinok gátló hatásai többféle daganat kialakulásának rizikóját csökkenthetik, illetve bizonyos daganatok kezelését is segíthetik.

Bizonyos mutációk, köztük a *TP53*, a HMG-CoA reductase, a sterol-regulatory element binding proteins (SREBPs) cleavage-activating protein (SCAP) mutációk, illetve egyes, a daganatok esetében gyakran hiperaktivált kináz útvonalakkal összefüggő mutációk (hiperaktív PKB/AKT, inaktív AMPK), vagy akár ezekkel összefüggésben egyes transzkripciós faktorok overexpressziója (SREBP, HIF-1) esetében a statinok alkalmazása daganatnövekedés-gátló hatású lehet. A daganatsejtek koleszterin szükséglete általában magasabb, mint a normál sejteké, így a statinok elsőként felismert daganatellenes hatásai a koleszterinszintézissel, a sejtproliferációhoz szükséges lipid raftok, új membránok létrehozásának igényével vannak összefüggésben. A koleszterin mennyisége azonban direkt módon is befolyásolhatja a daganatok

növekedését például az onkogén Hedgehog útvonalat aktiválva fokozza az mTORC1-szignál aktivitását és ezen keresztül magas szintje hozzájárulhat a daganatindukcióhoz.

Azokban a daganatokban, amelyek kialakulásában és progressziójában a lipidanyagcsere változásának kitüntetett szerepe van (pl. pankreász vagy emlődaganatok) a lipidek nemcsak mint építőmolekulák vesznek részt az onkogén mikrokörnyezet fentartásában (lehetnek akár szignál molekulák), de ezzel összefüggésben általában a koleszterinszintézis is szignifikánsan emelkedett. Nem véletlen, hogy ezeknél a daganatoknál az elhízás vagy ezzel összefüggésben a magas koleszterin szint is kockázati tényezőként szerepel. A statinok alkalmazásával a tumor mikrokörnyezet koleszterin szintjének csökkentésén keresztül teremthető tápanyaghiányos környezet, ami az AMPK aktiváción át csökkentve az mTOR-aktivitást szintén tumornövekedés-gátló hatású lehet. Fontos, hogy a daganatsejtek sejthalál és ROS védőmechanizmusát segíti a mevalonát képződéskor keletkező antioxidáns hatású CoenzimQ10 is, amelynek gátlása hozzájárulhat a statinok adott kezeléseket érzékenyítő hatásához. Szintén az anyagcserét érintő hatásain keresztül a simvastatin gyulladáshoz vezető folyamatokban megfigyelhető sejthalál mechanizmust (pyroptosis) indukál NSCLC sejtvonal és xenograft modellekben.

Ha a legújabb adatokat figyelembe vesszük, akkor a direkt mevalonát anyagcserét és koleszterin szintézist gátló hatásain túl a statinok antitumorális hatásait és így targetmechanizmusait 4 csoportba oszthatjuk a: az antiproliferatív hatásokra, amelyek összefüggésben vannak a koleszterinanyagcsere gátlásával és az Erk1/2, PI3K/Akt/mTOR, Ras/MAPK, PKM2, Myc, HDAC gátlását eredményezhetik; b. pro-apoptotikus hatásokra, amelyek az ER stresszt serkentik, a kaszpázok, Bax, PTEN mennyiségét, illetve aktivitását fokozzák, a Bcl2, Bcl-XL és a Ciklin dependens kinázok (CDK1,4), Akt temelését, gátlását eredményezik; c. antimigrációs és inváziós hatásokra, amit például a T- és B-sejtek és endothél sejtek esetében is megfigyeltek a legkülönbözőbb intarcelluláris mechanizmusokon keresztül (autofágia szintjének, E-cadherin termelésének fokozása vagy VEGF, vimentin termelést és Shh gátló hatások); d. az úgynevezett daganat őssejteket érintő hatások, amelyek a progresszió és a relapszus kialakulását gátolhatják (pl. szintén az Shh szignál gátlásán, a Nanog, Oct4 expresszió, Rho, Yap/TAZ aktivitás gátláson keresztül).

Mindezek ellenére a statinok alkalmazása széleskörben valóban nem terjedt el a daganatok kezelésében. Ennek pl. egyik oka, hogy a statin kezeléseknél hosszabb időtartamot és dózist limitáló mellékhatásaik is vannak. Ezek között elsődlegesen a hepatotoxicitás, diabeteses tünetek megjelenése, izomműködés- (rhabdomyolysis) és kognitív zavarok szerepelnek, de hemorrhagias stroke, intersticiális tüdőgyulladás, inszakkadás is előfordulhat, ezért alkalmazásuk körültekintő dozírozást és a betegek szorosabb kontrolját igényli. A napi maximálisan alkalmazható dózis pl. atorvastatin és ruzuvastatin esetében 40, illetve 80 mg lehet. Nem elhanyagolható azonban az sem, hogy sok más gyógyszerhatóanyaggal vannak káros interakciók a statinoknak, ami szintén korlátozza alkalmazásukat, ez 10-20 mg-nál alacsonyabb dózis alkalmazását engedik csak meg (pl. clarithromycin, erythromycin, cyclosporine, amiodarone, diltiazem, verapamil, grapefruit, itraconazole, stb.).

A dózisfüggő mellékhatások csökkentése érdekében szinergista hatóanyag (pl. monoterpének – carvacrol vagy szeszkviterpének – farnesol, diterpének – geranyl acetone vagy isoprenoidok – alfa-tocotrienol) kombinációkkal is próbálkoznak, ami mellett a statinok koncentrációját csökkenteni lehet. Ezek a szinergista kombinációk tumorok esetében is hatékonyak lehetnek.

A mutáns p53 fehérje stabil szerkezetével és egyéb, a vad típusú fehérje konformációkat is befolyásoló szerepével kapcsolatban a mevalonát útvonal, illetve a statin potenciális antitumorális szerepét az elmúlt években intenzíven vizsgálták. A mutáns p53 lebontását elősegítő gyógyszereket keresve ismerték fel a statinok potenciális szerepét (*high throughput* hatóanyag tesztek). Azt is kimutatták, hogy ehhez igen alacsony dózisú statin koncentráció is elegendő (4-25 μ M) és ez a vad típusú p53 fehérje stabilitását nem érinti, csak a mutánsét. Ez a hatás független a statinok prenilációt vagy koleszterinszintézist érintő hatásaitól is, de daganatkialakulást megelőző szerepében fontos lehet. Az eredmények igazolták, hogy a mevalonát út támogatja nemcsak a mutáns p53 stabilizációját, de az onkogén Ras és Rho prenilációját, a RAS farnezilációját is (RAS membrán transzlokációt csökkentő hatása a statinoknak). Mivel a daganatok sok esetben függenek a mutáns p53, Ras, Rho hatásaitól, így a statinok daganatellenes hatásai főleg ilyen mutációkkal rendelkező daganatok esetében magyarázhatók ezekkel a lebontási, fehérjék instabilitását

okozó hatásokkal is. Ezzel összefüggésben leírták például a *TP53*-mutáns emlődaganatokban a mevalonát útvonal enzimeinek overexpresszióját és a rosszabb prognózis összefüggését is. Jelenleg is zajlik klinikai pilot vizsgálat, atorvastatinnal *TP53*-mutáns és vad típusú daganatok esetében (NCT03560882), illetve több olyan vizsgálat is, ahol platinaszármazékokat vagy egyéb kemoterapeutikumokat, akár immune-check point inhibitor kezelést, kombinálnak statinokkal (pl. endometrium, ovárium daganatok, AML).

Mindezek alapján, a mevalonát útvonal hiperaktivitásának (pl. igazolt HMG-CoA reduktáz overexpresszió), aktivitásának szerepét és gátlásának lehetőségét a legkülönbözőbb, elsősorban *TP53*. vagy *RAS*-mutáns daganatok esetében mindenképpen érdemes megfontolni, illetve tovább vizsgálni.

Külön köszönöm a bírónak a statinokkal kapcsolatos kérdéseit, mert azok megválaszolása közben több olyan adatra figyeltem fel, amelyek a 2000-es évek elején még nem voltak elérhetőek, illetve más oldalát hangsúlyozzák a statinok lehetséges hatásainak, ezekkel kapcsolatosan olyan kérdések is felmerülnek, amik a jövőbeni az anyagcsere-vizsgálatainkat is kiegészíthetik.

- Bathaie SZ, Ashrafi M, Azizian M, Tamanoi F. Mevalonate Pathway and Human Cancers. *Curr Mol Pharmacol* (2017) 10(2):77–85.
- Mo, H., Jeter, R., Bachmann, A., Yount, S. T., Shen, C. L., & Yeganehjoo, H. (2019). The Potential of Isoprenoids in Adjuvant Cancer Therapy to Reduce Adverse Effects of Statins. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1515.
- Barbalata CI, Tefas LR, Achim M, Tomuta I, Porfire AS. Statins in risk-reduction and treatment of cancer. *World J Clin Oncol*. 2020 Aug 24;11(8):573-588.
- Hayashi T, Fujita K, Matsushita M, Nonomura N. Main Inflammatory Cells and Potentials of Anti-Inflammatory Agents in Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019 Aug 12; 11(8):
- Kumar AS, Esserman LJ. Statins: health-promoting agents show promise for breast cancer prevention. *Clin Breast Cancer*. 2005 Dec; 6(5):455-9.
- Lee JW, You NY, Kim Y, Kim Y, Kim J, Kang HT. Statin use and site-specific risk of colorectal cancer in individuals with hypercholesterolemia from the National Health Insurance Service-National Health Screening Cohort (NHIS-HEALS) *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2019;29:701–709.
- Li X, Zhou J. Impact of postdiagnostic statin use on ovarian cancer mortality: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Br J Clin Pharmacol*. 2018 Jun; 84(6):1109-1120.
- Singh S, Singh PP, Singh AG, Murad MH, Sanchez W: Statins are associated with a reduced risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 2013 Feb; 144(2):323-332.
- Parrales A, Thoenen E, Iwakuma T. The interplay between mutant p53 and the mevalonate pathway. *Cell Death Differ*. 2018 Mar;25(3):460-470.
- Parrales A, Ranjan A, Iyer SV, Padhye S, Weir SJ, Roy A, Iwakuma T DNAA1 controls the fate of misfolded mutant p53 through the mevalonate pathway. *Nat Cell Biol*. 2016 Nov; 18(11):1233-1243.
- Freed-Pastor WA, Mizuno H, Zhao X, Langerød A, Moon SH, Rodriguez-Barrueco R, Barsotti A, Chicas A, Li W, Polotskaia A, Bissell MJ, Osborne TF, Tian B, Lowe SW, Silva JM, Børresen-Dale AL, Levine AJ, Bargonetti J, Prives C. Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell*. 2012 Jan 20; 148(1-2):244-58.
- Nam GH, Kwon M, Jung H, Ko E, Kim SA, Choi Y, et al. Statin mediated inhibition of RAS prenylation activates ER stress to enhance Wee1, Statins and p53 Mutation in Cancers immunogenicity of KRAS mutant cancer. *J Immunother Cancer*. (2021) 9:e002474.
- Meng X, Gao JZ, Gomenzoza SMT, Li JW, Yang S. Recent Advances of WEE1 Inhibitors and Statins in Cancers With p53 Mutations. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Oct 4;8:737951.

16. megjegyzés

p94, 11. Táblázat: Gyerekek esetében megfelelőbb a 'lány' és 'fiú' (nem nő és férfi) megnevezés.

Köszönöm ezt a helyesbítést, magyar közleményekben gyerekeknél majd igyekszem a fiú-lány kategóriát használni.

15. és 17. megjegyzések és hozzákapcsolódó kérdések

15. p72: Histoscore: óvatosság indokolt, mert az intenzitás mértéke és fehérjetartalom között nincs egyenesen arányos kapcsolat DAB chromogén alkalmazása esetén (immunfluoreszcens vizsgálat esetén sokkal inkább).

17. p98: A szöveti microarray (TMA) esetén a regionális heterogenitás sokkal kevésbé értékelhető, mint teljes metszet vizsgálata esetén. Ez mennyiben befolyásolhatta az eredményeket?

A Histoscore értékelésekben, adott szöveten belül egy-egy belső kontrollhoz (pl. p-S6 esetén a plazmasejtek pozitívítását figyelembe véve) hasonlítva értékeltük a DAB festődés intenzitását, rutinos patológus kollégákkal, akik ilyen jellegű IHC festések patológiai diagnosztikai értékelésében vesznek részt (pl. emlő- és tüdő carcinomák HER2 és PD-L1 immun score-olásában). Figyelembe véve a bíráló megjegyzését, a jövőben erre ügyelni fogunk.

A szöveti heterogenitással kapcsolatos vizsgálatainkban, pl. az emlő carcinoma vizsgálataink esetében teljes biopsziás minták értékelésére törekedtünk. Azokban az esetekben, ahol esetleg csak TMA-kal volt lehetőségünk dolgozni (erre csak néhány esetben volt példa), illetve egyes nem emlődaganatos vizsgálatainkban mindig több szövethenger szerepelt egy-egy esetből a TMA lemezeken. Teljesen egyetérték a bírálóval, hogy, ha a szöveti heterogenitást értékelni szeretnénk, akkor mindenképpen teljes biopsziás minták körülmekinté értékelésére van szükség. Ezekben az esetekben a H-score értékek sem igazán megfelelőek, mert egy nagyon heterogén szövetben kaphatjuk ugyanazt a score értéket, mint egy homogén esetben, és a daganatszövetben zajló szelekcióban a homogén vagy diverz kép egészen mást jelent. Előbbiek miatt szeretnénk a jövőben egy olyan score-olási/értékelési rendszert kidolgozni, amiben a szöveti heterogenitást is értékelni, megjeleníteni és kategorizálni tudjuk, mert vizsgálataink szerint az ilyen heterogenitás-vizsgálatoknak egyre nagyobb szerep juthat a jövőben.

18. 24. megjegyzések

18. p99: 44. ábra: 20x bizonyára a mikroszkóp objektív nagyítása, a teljes eredeti nagyítás valószínűleg 200x. 'Scale bar' alkalmazása jobb lett volna, más ábrák esetében is (pl. 51.).

24. p128: Dicséretes, hogy a 68. ábrán van 'scale bar'.

Köszönöm a bíráló kritikáját, mert a scale bar alkalmazása valóban a legmegfelelőbb, a nagyítások számszerű megadása mindig pontatlan; az ábrák szerkesztésekor ez tovább változhat. Törekszünk arra, hogy scale bart használjunk, de ez korábbi munkáinkban még nem volt jellemző. Panoramic viewer programmal szkennelt metszetekből készített fotók esetében egyébként is szerencsésebb a scale bar használata. A dolgozatban vannak még korábbi, a Panoramic viewer előtti időből származó mikroszkópos felvételek, ebből a szempontból a dolgozatom nem egységes, és egyes helyeken a Panoramic viewernél nem, vagy nem jól szerepelt a nagyítás. A jövőben jobban fogok figyelni erre.

20. kérdés

20. p113: Miért kevésbé agresszív az IDH1 mutáns gliális tumor, mint a vad típusú? Van ennek bioenergetikai oka/aspektusa?

Az *IDH*-mutációk gyakoriak gliomákban, elsősorban „*low grade*” astrocytomákban, oligodendrogliomákban és szekunder glioblastomákban (80%), ritkábban primer glioblastomákban is előfordulnak. Ezek kialakulásában az *IDH*-mutáció megjelenését a tumorigenezis első lépésének tartják. Míg gliomákban az *IDH*-mutáció egyértelműen jobb prognózissal függ össze, aminek háttere még nem teljesen tisztázott, addig ugyanez a többi *IDH*-mutációval rendelkező egyéb daganattípusban (felnttkori akut myeloid leukémiák 15-20%-ában, a chondrosarcomák közel 50%-ában, egyes cholangio-, pajzsmirigycarcinomában, vagy colorectalis carcinomában) inkább rosszabb prognózissal társul. A magyarázat inkább a kezeléseikben, azok eltérő hatékonyságában lehet. Jól ismert, hogy a temozolomide kezelés *IDH*-mutáns, low grade esetekben általában relatíve jobb eredményeket mutat. Ennek hátterében áll, a 2-hidroxioglutarát (2HG) onkometabolit egyik hatása is, ami a DNS repair mechanizmusok gátlását is okozza az aKG-függő dioxigenázok gátlásán keresztül. Ez, az alkiláló hatású kemoterápiás szerekkel (pl. temozolomide) szemben fokozott érzékenységet eredményezhet (persze ebben más társuló epigenetikai változásoknak pl. MGMT promotor csendesítésnek – CpG metilátor fenotípusnak és TET gátlásnak is van szerepe). Ugyanezen hatások okozhatják a *BRCA*-mutáns daganatokhoz hasonlóan ezekben a gliomákban is a homolog rekombináció zavarát, így felvetődik a gliomák PARPi-szenzitivitásának lehetősége is. Jelenleg a PARPi-kezelések alkalmazásának lehetőségét több fázisvizsgálatban is megkezdtek (NCT03749187, NCT03914742, NCT03581292).

Saját vizsgálataink alapján is feltételezhetőek azonban olyan, az *IDH*-mutáció okozta bioenergetikai különbségek is, amelyek az előbbi prognosztikai különbségeket magyarázhatják. Glioma sejtvonalak vizsgálatával azt tapasztaltuk, hogy mind a mutáció, mind pedig a következményeként megjelenő 2HG (ennek exogén hozzáadása is) megváltoztatja a sejtek anyagcseréjét. A mutáció OXPHOS eltolódást, magasabb oxigénfogyasztást okoz a sejtekben az *IDH* vad típusú sejtekben tapasztaltakhoz képest. Az *IDH*-mutáns, 2HG-ot termelő sejtekben a glutamin-glutamát-aKG-2HG átalakulás mellett, csökkent glutaminoxidáció jellemző, így párhuzamosan a glükóz, illetve reverz Warburg-effektus lehetősége is felmerül a TCA feltöltésben, az OXPHOS folyamatok fokozásában, illetve a háttérbe szoruló Warburg- glikolízisben. Nem elhanyagolható az sem, hogy a gyorsabban, agresszívebben növekvő daganatok jellegzetes bioenergetikai kiszolgálója az igen gyors ATP nyerést biztosító Warburg-effektus. A mutáció és a 2HG termelés jelenlétében megfigyelt visszaszoruló Warburg-effektus valószínűleg a lassabb növekedéssel is összefügg. Saját vizsgálatainkban azt is tapasztaltuk, hogy a vad típusú gliomasejtek esetében nagyon sokféle bioenergetikai hasznosító folyamat szolgálja a gliomasejtek növekedését, köztük akár a GABA bioenergetikai hasznosítása. Ez a GABA, illetve a glutamin – mint energiaszubsztrát hasznosítási lehetőség – azonban az *IDH*-mutáns daganatok esetében az előbbi 2HG termelő folyamatok mellett nem áll rendelkezésre, szűkítve ezzel a mutáns gliomák bioenergetikai alkalmazkodásának lehetőségeit és lassítva növekedésüket is.

Annak ellenére, hogy az *IDH*-mutáció jelenléte jobb prognózissal van összefüggésben, a jelenlegi kemoterápiás lehetőségek mellett, az *IDH*-mutáció következményeként megjelenő funkciónyerő mutáns enzim gátlása terápiás eszköz lehet a gliomákban is. Több mutáns *IDH*-gátló készítmény tesztelése zajlik myelomák, chondrosarcomák esetében is. Habár korábban felmerült, hogy a mutáns *IDH* gátlása a gliomák esetében nem biztos, hogy terápiás előnyt jelent, az eddig szolid tumorokban zajló klinikai vizsgálatok előzetes eredményei azonban azt mutatják, hogy az ivosidenib a vér-agy gáton átjutva az *IDH*-mutáns chondrosarcomák esetében tapasztalatokhoz hasonló antitumor aktivitást mutat a gliomákban is (NCT02073994, NCT03343197, NCT04164901). Így az AML-ekhez hasonlóan hamarosan itt is számíthatunk a kezelések ilyen irányú fejlesztésére.

- van den Bent MJ, Mellingshoff IK, Bindra RS. Gray Areas in the Gray Matter: *IDH1/2* Mutations in Glioma. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2020 Mar;40:1-8.

- Dhillon S. Ivosidenib: First Global Approval. Drugs. 2018 Sep;78(14):1509-1516.

21. kérdés

21. p113: Lehetne (a jövőbeni vizsgálatok során) próbálni a betegből glioma sejtenyészetet létrehozni - ez a személyre szabott medicina lehetőségét is elősegítené.

Gliomás betegek szövetmintáiból hozták létre a jelenleg elérhető humán glioma sejtvonalakat is, amiket egyébként rengeteg kritika ér, pont amiatt, hogy ezeket a sejteket általában azonnal 2D sejtkultúrákban tenyésztették vagy egy megelőző xenograft létrehozása után indítottak 2D sejtvonalakat a humán szövetekből. Új sejtvonalak, illetve primer sejtkultúrák kialakításához etikai engedélyek birtokában lesz lehetőségünk; Dr. Tóvári Józsefék egy futó projektjükben tudomásom szerint indítanak már jelenleg is *patient-derived* glioma xenograftokat (PTDX) az Onkológia Intézetben, egyes kezelések teszteléshez. A fő kritika a mi érdeklődési területünkkel összefüggésben éri egyrészt a PTDX-okat, illetve a később ezekből indított és elérhető sejtvonalakat. Egyrészt, az *in vivo* modellekben (xenograftok esetében SCID egerek felhasználása) csak részben humán a modell, illetve az immundeficiens fenotípus miatt a mikro környezet nem reprezentált megfelelően, aminek az *in vivo* rezisztenciamechanizmusokban és a tumorevolúcióban is kiemelkedő jelentősége van. Másrészt, a jelenlegi 2D sejtenyészetekben a sejtek jelentősen megváltoztak, ezért is kezdtünk el kialakítani 3D tenyészeteket vagy 3D bonyomtatott tenyészeteket mi is az Intézetben.

A jövőben nemcsak gliomák, de szükség szerint más daganatok esetében is tervezünk olyan terápia predikciós vizsgálatokat, amelyekben 3D bonyomtatott *in vitro* tenyészeteket és xenograftokat (PTDX-okat) használunk fel, hogy valóban személyre szabható kezelés tervezésében segíthessünk. Egy-egy esetben

ilyeneket terápiarezisztens gyermekkori sarcomák esetében már próbáltunk is. Azon dolgozunk, hogy amennyiben erre a klinikusok felől igény, esetünkben pedig lehetőség van, akkor biztosítani tudjuk ezt, mivel az intézetben *in vivo* modellek is kialakíthatók, illetve a 3D bionyomató technológia is elérhető. A technológia és a protokollok kidolgozása már elkezdődött a munkacsoportunkban, jelenleg emlő carcinoma 3D bionyomatott raftok segítségével metabolikus összehasonlító vizsgálatokat és hosszabbtávú *in vitro* kezelések hatását vizsgáljuk.

22. megjegyzés

22. p123, 2. sor: Melyik publikáció kapcsolatos a PhD hallgató munkájával (mert a hivatkozott ref. 377-381 valószínűleg nem)?

Elnézést, mert a bíráló amiatt nem találta a hallgató közleményére vonatkozó hivatkozást, mert az nem a számozott idézett közlemények, hanem a saját közlemények között szerepel. Ez a közlemény – *Felkai L, Krencz I, Kiss DJ, Nagy N, Petővári G, Dankó T, Micsik T, Khor A, Tornóczky T, Sági Z, Sebestyén A, Csóka M. Characterization of mTOR Activity and Metabolic Profile in Pediatric Rhabdomyosarcoma. Cancers (Basel). 2020 Jul 17;12(7):1947.* A 377-381-es közlemények mások idevonatkozó munkái. Szalai professzor is hiányolta a saját közlemények idézését, egy-egy rész végén, ezeket a közleményeket a kiemeltek között adtam meg a dolgozat végén.

23. kérdés

p124: Az alacsony esetszámmal végzett vizsgálatokban vannak azóta újabb eredmények(nagyobb esetszámmal)?

Sajnos nem volt lehetőségünk Magyarországon azóta nagyobb esetszámmal új vizsgálatot kezdeni, klinikus munkatársaink segítségével (Csóka Monika és Pápai Zsuzsanna) nemzetközi kollaborációban lenne erre lehetőségünk, pl. a leideni egyetemmel vagy más intézetekkel.

25.-27. megjegyzések

25. p132 (IV. 6. fejezet): Lehetett volna részletesebb ez a fontos és érdekes fejezet. (Modellrendszerek – bionyomatás)

26. p133, 72. ábra: Részletesebb ábraleírás jobb lett volna.

27. p135: A Megbeszélés meglehetősen rövid. Itt lehetett volna a közös szála még jobban felfűzni a kísérletes és humán eredményeket.

A IV.6. fejezetben a megkezdett és még zajló vizsgálataink jelentőségét próbáltam hangsúlyozni és ezen belül az alfejezetekben azokat a kezdeti eredményeinket mutattam be, amelyek a különböző 3D sejttenyésztési eljárások, így a 3D bionyomatás bevezetésének, a technológia hazai beállításának kezdeti lépéseit mutatják be. A 72-es ábrán egy-egy képen mutattam be az általunk használt GeSiM 3D bionyomatót, az első tervezett és nyomtatott struktúrákat, az első bionyomatott csőszerű üreges vázat, nyomtatott sejtes scaffoldokat, illetve utóbbiak 1 hetes tenyésztése után nyert szövetminták HE festett metszeteit, a beültetésük után SCID egerekben kinőtt tumorokat. A 72. ábrán bővebb ábra aláírás és a képek a-f-ig jelölése valóban szerencsésebb lett volna.

A megbeszélést igyekeztem nagyon tömören összeállítani 4 fő téma köré csoportosítva, összefoglalva az elmúlt évek eredményeinek jelentőségét és más munkacsoportok hasonló eredményeit. Amennyiben tudtam, igyekeztem további ábrák és táblázatok felhasználásával is segíteni az áttekinthetőséget. A közös szál, amire az eredmények diskusszióját felépítettem a vizsgálatok idején újszerű kezelési lehetőségek vizsgálata; mTOR-gátló és más metabolikus kezelések terápiás kombinációinak terápiás szenzitivitást fokozó hatásainak bemutatása; illetve ezekben az mTOR-hiperaktivitás (mint target) szerepének feltérképezett jelentősége; és végül ezek kapcsán a legújabb vizsgálataink, a metabolikus plaszticitás onkoterápiás jelentőségének hangsúlyozása volt. Ezeknek

megfelelően foglaltam pontokba a VI. fejezetben az eredeti megfigyeléseket és az eredményeim egyes kísérletes és gyakorlati alkalmazásának lehetőségeit. Törekedtem arra, hogy ne ismétellem meg részleteiben az eredményeinket és így valószínű ez a rész kicsit tömör, de abban bízom, hogy a legfontosabb eredményeim jelentőségét sikerült kiemelnem és a jelengi irodalmi kontextusba helyeznem.

29. kérdés

29. p136, 1. sor: Pontosan milyen 'epitheloid daganat'-ra utal a Jelölt?

Az adott helyen idézett irodalmakban nagyon sokféle humán tumor, illetve az egyik közleményben legkülönbözőbb human sejtvonalak is szerepelnek – melanomák, vese-, gyomor-, pankreász-, májdaganatok, sarcomák, lymphoid sejtvonalak, stb. – a sor nagyon hosszú, próbáltam röviden fogalmazni, ami sajnos így pontatlansághoz vezetett.

30. megjegyzés

30. p136: '...a betegek egyéni metabolikus jellegzetességei nagyban befolyásolhatják a terápia mellékhatásainak tolerálhatóságát'. Javasolom ezt a fontos kérdést kicsit részletesebben kifejteni.

A daganatok kezelésében jelenleg a cél a lehető legjobb kezelés minél személyreszabottabb alkalmazása, amiben nemcsak a kezelések tartós, tumormentesítő hatása, de toxikus mellékhatások csökkentése és a jobb életminőség biztosítása is rendkívül fontos. Hiába a számos, elvileg jó, és várhatóan hatásos hagyományos vagy célzott kezelés, ha a kezelés toxikus mellékhatásai nem tolerálhatók, és így azt felfüggeszteni vagy a protokollokon módosítani kell.

Az egyéni toxicitási különbségek, a mellékhatások súlyossága nagyon ritkán jósolható meg előre. Az egyéni farmakokinetikai és -dinamikai különbségek, gyógyszerinterakciók, etnikai, életkori, vese- és májfunkció különbségek, táplálkozási szokások, alultápláltság, elhízottság, dohányzás, alkoholfogyasztás mind befolyásolják nemcsak a kezelés hatékonyságát, de a kialakuló mellékhatásokat és azok súlyosságát is. A különböző antitumorális kezelések hatásait befolyásoló egyéni genetikai tényezőkről (gyógyszer-metabolizmus szempontjából fontos allél varációkról) egyre több adat áll rendelkezésre elsősorban a hosszútávú és kardiotoxikus mellékhatások tekintetében. A célzott kezelések esetében is előfordul, hogy a mellékhatások miatt azt felfüggeszteni vagy a dózist csökkenteni kell. Az mTOR-gátló kezeléseket például emlődaganatos betegek esetében nagyon sok esetben kell, kellett felfüggeszteni, de arról, hogy az egyéni érzékenységi különbségek hátterében milyen tényezők állnak, még nem sokat tudunk.

Egyre több olyan metabolomikai vizsgálat áll rendelkezésre, ami adott betegségek súlyos lefolyása esetében a háttérben az egyéni metabolikus különbségeket véli, szeretné azonosítani. Találtak már szérumban metabolit-, elsősorban aminosavkoncentráció különbségeket metabolomikai vizsgálatokban például a COVID betegek súlyos, fatális kimenetelű citokin viharával összefüggésben is. Ezek megjelenése és így a következmények hátterében az egyéni anyagcsere- különbségek is magyarázhatják az életkorral, elhízással, vagy a sportolók esetében tapasztaltakkal összefüggő, de eddig még nem megfejtett ilyen összefüggéseket is. Új szérumban metabolomikai vizsgálatokkal és egyéb klinikai laboratóriumi paraméterek átfogó vizsgálatával olyan egyéni metabolikus fenotípusokat ismerhetünk fel (gyorsabb/lassabb általános anyagcsere, egyes máj- vagy vesefunkció, lipid-vagy aminosav-anyagcsere eltérésekkel összefüggő metabolitkoncentráció-eltérések), amelyek összefüggésbe hozhatók adott kezelések súlyos mellékhatásaival. Mindez pedig segítheti a klinikusok terápiás döntéseit, szer vagy dózis választását, esetleg előre felkészíthető a beteg valamilyen neutralizáló kezeléssel a várható mellékhatásokkal szemben. Saját vizsgálatunkban olyan metabolomikai vizsgálatokat (elsősorban TCA és glikolitikus metabolitok, illetve aminosavszint-eltérések meghatározása) tervezünk, amelyeket kiegészítve egyéb laborparaméterekkel meghatározhatjuk azokat a markereket, amik a súlyos mellékhatásokkal összefüggnek. Ehhez tömegspektrometriai vizsgálatokkal adott terápia szempontjából naiv és a kezelés meghatározott időpontjában már kezelt betegek szérumban gyűjtését, majd metabolomikai vizsgálatát és a jól regisztrált klinikai előzményeik és a kezelési mellékhatásaik összehasonlító elemzését tervezzük különböző

korcsoportokban (pl. gyermek, fiatal felnőtt és középkorú, illetve idős betegek esetében) ugyanolyan, lehetőleg célzott terápia és/vagy a hagyományos kemoterápia mellett. Természetesen, mivel a betegek mintáiból PMN sejtek is gyűjthetők, ez genetikai, epigenetikai vizsgálatokra is lehetőséget nyújtana, amennyiben erre igény és lehetőség lesz.

-Carrera Hueso FJ, Poveda Andrés JL, Puchades-Carrasco L, Pineda-Lucena A. Pharmacometabolomics by NMR in Oncology: A Systematic Review. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Oct 2;14(10):1015.

-D'Amora P, Silva IDC, Budib MA, Ayache R, Silva RMS, Silva FC, Appel RM, Júnior SS, Pontes HBD, Alvarenga AC, Arima EC, Martins WG, Silva NLF, Diaz RS, Salzgeber MB, Palma AM, Evans SS, Nagourney RA. Towards risk stratification and prediction of disease severity and mortality in COVID-19: Next generation metabolomics for the measurement of host response to COVID-19 infection. *PLoS One*.

-Saigusa D, Matsukawa N, Hishinuma E, Koshiba S. Identification of biomarkers to diagnose diseases and find adverse drug reactions by metabolomics. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2021 Apr;37:100373.

-Sun, Y.; Kim, J.H.; Vangipuram, K.; Hayes, D.F.; Smith, E.M.L.; Yeomans, L.; Henry, N.L.; Stringer, K.A.; Hertz, D.L. Pharmacometabolomics Reveals a Role for Histidine, Phenylalanine, and Threonine in the Development of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. *Breast Cancer Res. Treat.* 2018, 171, 657–666.

-Boguszewicz, Ł.; Bieleń, A.; Mrochem-Kwarciak, J.; Skorupa, A.; Ciszek, M.; Heyda, A.; Wygoda, A.; Kotylak, A.; Składowski, K.; Sokół, M. NMR-Based Metabolomics in Real-Time Monitoring of Treatment Induced Toxicity and Cachexia in Head and Neck Cancer: A Method for Early Detection of High Risk Patients. *Metabolomics* 2019, 15, 110.

31. kérdés

31. Az agyban vajon miért olyan gyakori a tüdő és emlő carcinoma áttéte? A Jelölt kutatásai a kérdés megválaszolásához mennyiben járulhatnak hozzá?

A legkülönbözőbb adatok elemzése mind kiemelik, hogy az agyi metasztatikus daganatok között a tüdő- és emlődaganatok fordulnak elő a leggyakrabban (persze ebben valószínű annak is szerepe van, hogy ezek egyébként is igen gyakori daganatok). A legújabb elemzések alapján a tüdődaganatok közel 25%-a, míg a TNBC és HER2+ emlődaganatok közel 30%-a végül agyi áttét/áttétek megjelenéséhez vezet. Ebben a primer daganattípusoknak, azok szubtypusainak és az anatómiai elhelyezkedésnek jelentősége ismert. Előbbiek mellett az elmúlt években azonban számos olyan egyéb tényező szerepe is leírásra, jellemzésre került, amelyek elősegíthetik adott típusú, adott mutációkkal vagy metabolikus adaptációs lehetőségekkel rendelkező daganatok agyi metasztatizálásának megjelenését.

Saját metabolikus vizsgálatainkkal összefüggésben elmondható, hogy a tumor fejlődése és evolúciója során a tumorsejtek metabolikus változása segíti az adott metasztatikus hely mikro környezetéhez alkalmazkodást. Egyre több adat támasztja alá, hogy minél flexibilisebb metabolikusan egy primer tumorszövet annál könnyebben alkalmazkodnak és hatékonyabban élnek túl a primer daganatból kiszakadó sejtek, majd eljutva az új környezetbe ott sikeresen növekedhetnek. Saját vizsgálataink (emlődaganatok szöveti szintű metabolikus jellemzése) is azt mutatták, hogy ha egy tumorszövet sejtjein belül többféle metabolikus útvonal jellegzetes enzimeit fokozottan expresszálódik, akkor az a betegek esetében rosszabb prognózissal, rövidebb PFS-val és OS-val függ össze. A heterogenitás a tumorszöveten belül fontos tényező. Abban az esetben, ha ismerjük a migráció során és/vagy a metasztatikus helyeken a sejtek túléléséhez szükséges metabolikus adaptációs mechanizmusokat, akkor a. vizsgálhatjuk az ezekhez szükséges enzimek jelenlétét a primer vagy az adott áttéteket képzett tumorokban; és b. adott szervekben megjelenő, majd kialakuló metasztatizáló sejtek alkalmazkodásában ezeket gátolva megakadályozhatjuk a metasztatizáció kialakulását, illetve a metasztatikus sejtek proliferációjának aktivációját, így gátolva a daganatprogressziót.

Az agyban található sejteknek van a legnagyobb energiaigénye összehasonlítva más szervek sejtjeivel (a teljes glukózfelhasználás 20%-a történik az agyban), de sejtjei képesek alkalmazkodni vagy aktivitásuk vagy metabolikus erőforrás felhasználás szempontjából is. Például alacsony glükózszint esetén az agy sejtjei képesek acetát, ketontestek vagy elágazóláncú aminosavak (mint alternatív energiaforrások) hasznosítására. Az egyik feltételezés szerint, az agyba metasztatizálni képes sejteknek is ilyen nagyfokú plaszticitásra van szükségük, pl. előnyt jelent számukra az acetát és glutamin vagy az előbb említett as-ak, mint alternatív energia források hasznosításának képessége a

túlélésben. Ezzel összefüggésben kimutatták, hogy az agyba metasztatizált daganatsejtekben gyakori az acetáthasznosítás megjelenése, amivel összefüggésben az ACSS2 (acetátot acetyl-CoA-vá alakítja) overexpresszióját is több esetben figyelték meg. Azt is kimutatták más vizsgálatokban ¹³C-jelölt acetáttal, hogy az acetátot az agyi metasztatizáló primer daganatok sejtjei hatásosan hasznosították, oxidálták a glioblastomákhoz hasonlóan. Ismert az is, hogy az agyi metasztatikus daganatsejtek más agyi metabolikus szubsztrátok hasznosítására is képesek, pl. glutamine, vagy más aminosavak. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy azok a tumorsejtek képesek az agyba metasztatizálni, amelyek a neuronális sejtekhez hasonlóan képesek hasznosítani az agyban fellelhető legkülönbözőbb tápanyag- és erőforrásokat. Ezek alapján a tüdő- és emlődaganatok esetében a metabolikus heterogenitás és plaszticitás közel 25-30%-ban jellemző kell legyen. Saját adatainkat ilyen szempontból nem elemeztük, de a kapott magas mTOR-aktivitás és többféle metabolikus aktivitásra lehetőséget adó metabolikus útvonalak jelenlétét igazoló expressziós profil ezekben a vizsgált daganattípusokban vizsgálataink szerint valóban összefüggött a rosszabb prognózissal vagy akár az ACSS2 overexpresszióval is. Ilyen szempontból érdemes lenne minél több agyi metasztatizáló vagy akár többszervi metasztatizáló primer-metasztatikus tumorpárok metabolikus expressziós profilját vizsgálnunk a jövőben.

Egy másik érdekes vizsgálat arra is felhívja a figyelmet, hogy előbbi változásokkal összefüggésben epigenetikai szabályozók is segítik az adott helyen a jelátviteli folyamatok és ezzel összefüggésben a metabolikus folyamatok átrendezését az adott szervekbe eljutó daganatsejtekben. Egyes közleményekben kimutatták, hogy pl. az astrocyták termeltek exosomák olyan miRNS-eket bocsátanak ki, amelyek segítik a metabolikus folyamatok átrendezését, így a metasztatikus niche-be kerülő tumorsejteket is átprogramozhatják, pl. a nem *PTEN*-mutáns emlődaganatokban ezek segítségével a *PTEN* expresszió csökkenhet, így is biztosítva többek között az mTOR-hiperaktivitást, ami a metabolikus adaptációs folyamatok egy kulcs szereplője.

- Martinez-Outschoorn UE, Bartrons M, Bartrons R. Editorial: Cancer Ecosystems. *Front Oncol.* 2019 Aug 20;9:718.
- Khan M, Arooj S, Li R, Tian Y, Zhang J, Lin J, Liang Y, Xu A, Zheng R, Liu M, Yuan Y. Tumor Primary Site and Histology Subtypes Role in Radiotherapeutic Management of Brain Metastases. *Front Oncol.* 2020 Jul 7;10:781.
- Zhang L, Zhang S, Yao J, Lowery FJ, Zhang Q, Huang WC, Li P, Li M, Wang X, Zhang C, Wang H, Ellis K, Cheerathodi M, McCarty JH, Palmieri D, Saunus J, Lakhani S, Huang S, Sahin AA, Aldape KD, Steeg PS, Yu D. Microenvironment-induced *PTEN* loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature.* 2015 Nov 5;527(7576):100-104.
- Kuskis M, Gao Y, Tran W, Hoey C, Kiss A, Komorowski AS, Dhaliwal AJ, Sahgal A, Das S, Chan KK, Jerzak KJ. The incidence of brain metastases among patients with metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Neuro Oncol.* 2021 Jun 1;23(6):894-904.

Remélem, a válaszaimban sikerült, már amennyire a jelenlegi elérhető és saját adataink engedik, megválaszolni a Professzor Úr kérdéseit. Tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Végül szeretném még egyszer megköszönni a munkám értékelését és a nagyon érdekes kérdéseket, amiknek megválaszolása közben a daganatok kezelésének, progressziójának új területeit is újra át kellett gondolnom. Ezek átgondolásával a jelenlegi kutatásainkhoz kapcsolódó új szempontokra figyelhettem fel.

Köszönettel és tisztelettel:

Sebestyén Anna



Budapest, 2022. január 14.