

Válasz dr. Berki Tímea egyetemi tanár, az MTA doktora bírálataira

Szeretném megköszönni dr. Berki Tímeának doktori értekezésem alapos bírálatát. Köszönöm elismerő véleményét az értekezés kiviteléről. A módszertan egyoldalúságával kapcsolatos kritikai megjegyzését elfogadom, „mentségemül” az szolgálhat, hogy a PhD-fokozat elnyerése utáni időszakban megjelent, igen szerteágazó tematikájú és metodológiájú cikkek közül a jelen értekezésbe bekerülők kiválasztásánál a fő szempont az volt, hogy ezek témája, eredményei minél konzisztensebbek legyenek. A beválasztott cikkek túlnyomó többségének a fő célkitűzése az egyes immunsejttípusok, illetve markereik prognosztikus vagy prediktív értékének tanulmányozása volt, nem a funkcionális vizsgálatuk, hasonlóan az ilyen jellegű kutatások többségéhez. Így nem került be végül a disszertációba néhány – többféle *in vitro* és *in vivo* tesztet, molekuláris és morfológiai módszereket alkalmazó, szintén a daganatimmunológiához kapcsolható, de a fenti, viszonylag szűkre szabott tematikai körbe nem teljesen illeszkedő – cikk módszereinek és eredményeinek ismertetése. A bírálatok ismeretében lehet, hogy ez nem volt a legjobb stratégia...

Az automata képelemzés módszerének bevezetése még nem történt meg a laboratóriumunkban, de a legutóbbi vizsgálatokban – az innsbrucki egyetem otolaringológiai és fej-nyak sebészeti osztályával együttműködésben – alkalmaztuk melanómaáttétekben a HLA-I-expresszió kvantitatív meghatározására (Ladányi A et al, Pathol Oncol Res 28:1610297, 2022).

A színes immunhisztokémiai képek szuboptimális minőségét sajnos csak a dolgozat nyomdában, több példányban való kinyomtatása és bekötése után vettem észre. Talán nem is annyira a méret a probléma (hasonló méretben jelentek meg a cikkekben is ezek az ábrák, tökéletes értékelhetőséggel), inkább a nyomdai színezés minősége; sajnálom ezt a hiányosságot.

A bemutatott tudományos eredményekkel kapcsolatos kérdésekre és megjegyzésekre a válaszaim az alábbiak.

1. A 4.1 fejezetben a CD25⁺ sejteket aktivált sejtekként értékeli. Ismert, hogy melanóma környezetében gyakran jelennek meg a CD25^{high} regulatórikus T sejtek is. Hogy tudja kizárni, hogy az észlelt CD25 pozitivitás aktivált vagy Treg sejt akkumulációból adódik? Célszerű lett volna CD25 és Foxp3 kettős jelölést végezni. Ezt támasztja alá a 4.3.5 fejezetben leírt túlélési görbék eredménye is, ahol a DC-LAMP/OX40 kombináció jó prognosztikai tényezőnek bizonyult, míg a DC-LAMP/CD25 nem. Ugyanakkor mindkét marker kombináció az aktivált T és DC-et jelölte.

Válasz: A regulátor T-sejtek szerepe daganatokban 2001-2002-ben kezdett körvonalazódni, a Foxp3 transzkripció faktor szerepére is akkoriban derült fény, míg immunhisztokémiai vizsgálatokat a Foxp3-at expresszáló sejtek kimutatására 2004-ben végeztek először. A mi szóban forgó cikkünket 2002-ben nyújtottuk be; abban az időben a CD25 még egyértelműen T-sejt-aktivációs markerként szerepelt a köztudatban, és lehetőség sem volt a Foxp3⁺ sejtek immunhisztokémiai elkülönítésére. Arra valóban gondolhattam volna a disszertáció megírásakor, hogy ezt a kérdést árnyaltabban tárgyaljam. A rendelkezésre álló szakirodalom szerint (De Panfilis et al, J Invest Dermatol 128:676-84, 2008; Ahmadzadeh M et al, Blood 112:4953-60, 2008) a (primer, ill. áttéti) melanómában található CD25⁺ sejtek többségében kifejeződik a Foxp3 transzkripció faktor, ami elvben arra utal, hogy többségük regulátor T-sejt. Ez azonban nem ennyire egyszerű, mert a Foxp3-ról is kimutatták, hogy a Treg-ekben mutatott konstitutív expressziója mellett átmenetileg indukálódik aktivált, nem regulátor funkciójú T-sejtekben is, amint gyakorlatilag minden más Treg-marker (CD25, CTLA-4, GITR, LAG-3, CD127) egyben T-sejt-aktivációs marker is. Azaz, a Foxp3-pozitív T-sejtekről sem állítható teljes biztonsággal, hogy regulátor T-sejtek. A kérdés végén levő felvetésre válaszolva, a 4.3.5. fejezetben található túlélési görbék (11. ábra) szerint a DC-LAMP/CD25 kombináció éppúgy kedvező prognosztikai tényezőnek bizonyult, mint a DC-LAMP/OX40 kombináció.

2. A 8. táblázatban összefoglalja a CD25 és OX40 pozitív eseteket. Hol vonta meg a határt az alacsony és jelentős mennyiségű aktivált T sejtet tartalmazó tumorok között? A táblázat alapján nem világos, hogy mit mihez hasonlít? Milyen paraméterek összehasonlítása eredményezi a p-értéket? Célszerű lett volna vastagabb vonalakkal elválasztani az összehasonlításra kerülő sorokat.

Válasz: Az egyes sejttípusoknál alkalmazott küszöbértékek az Anyagok és módszerek részben (3.3.1. fejezet) összefoglalva szerepelnek, és az aktivált T-sejtekre vonatkozóakat az 5. ábra is mutatja, azonban a 8. táblázatba valóban nem kerültek be; szerencsésebb lett volna abban is megemlíteni ezeket, a többi táblázathoz hasonlóan. Az előadáson bemutatott diákon megpróbálom érthetőbbé tenni a táblázatokat.

3. A Foxp3 jelölődést külön fejezetben elemzi a klinikopatológiai paraméterekkel keresve az összefüggést. Egyetlen eltérés a peritumorális nagymennyiségű Foxp3+ sejt volt tumor mérettől és metasztatizáló képességtől függetlenül. Mivel magyarázza ezt a jelenséget? Végeztek-e hasonló jelölést az áttétek szövetében?

Válasz: A kérdés (ha jól értelmezem) arra irányul, vajon miért nem tapasztaltunk összefüggést a Foxp3⁺ sejtek peritumorális mennyisége és a tumorvastagság, illetve az áttétképzés között. Sem a peritumorális, sem az intratumorális sejt-denzitás nem mutatott összefüggést az említett paraméterekkel (és egyéb vizsgált klinikopatológiai paraméterrel sem), valamint a túléléssel sem mutatkozott összefüggés. Bár logikailag az lenne várható, hogy az előrehaladottabb tumorokban nagyobb mennyiségű Treg-et találunk, ez nem minden daganattípusban igazolódik; számos tumortípusban leírták még az összefüggés hiányát (így pl. az összes, melanómán végzett vizsgálatban), sőt, egyes tumortípusokban a Treg-ek pozitív prognosztikus szerepét is. A jelenségnek több magyarázata is lehet; talán a legvalószínűbb, hogy az immunsuppresszor sejtek és mechanizmusok többnyire (negatív visszacsatolós folyamatként) együtt jelennek meg a daganatokban a tumorelles immunválaszban kulcsfontosságú egyéb immunsejtekkel (pl. citotoxikus T-sejtekkel), egymás hatását ellensúlyozva. A primer melanómák és (ugyanabból a betegből származó) áttétek összehasonlítására nem végeztünk vizsgálatot a Foxp3⁺ sejtek tekintetében. Az őrszemnyirokcsomók vizsgálata a jelölt sejtek jóval magasabb denzitását mutatta az SLN-ekben (metasztatikusokban és nem metasztatikusokban egyaránt) a primer melanómák peritumorális területeihez viszonyítva.

4. A magas intra- és peritumorális B sejt-denzitású betegeknél egyértelműen jobb 5 éves túlélési arányokat talált. Mivel magyarázza a B sejtek ilyen jelentős prognosztikai szerepét a melanoma elleni immunválasz során? Mi lehet a funkciója és fenotípusa ezeknek a B sejteknek? Ehhez kapcsolódóan feltehető az a kérdés, hogy vajon a terciér nyirokszövet kialakulása (melyet nagyon körültekintően jellemez CD20, CD45RO, CD21 és HEV jelöléssel) a tumor környezetében miért nem jelent előnyt a túlélésben?

Válasz: A B-sejtek szerepe a tumorelles immunválaszban egyre inkább előtérbe kerül. Fenotípus szempontjából és funkcionálisan is igen sokszínű sejtpopulációt alkotnak. Részt vesznek pl. a daganatokhoz társuló gyulladás fenntartásában, a termelt ellenanyagok vagy az immunkomplexek révén potenciálisan elősegítik a tumornövekedést, míg a regulátor B-sejtek többféle mechanizmussal idézhetnek elő immunsuppressziót. Másrészt azonban hatékony antigénprezentáló sejtekként is működhetnek, ezáltal segítve a daganatellenes T-sejt-válasz létrejöttét. Az nem kristályosodott még ki, hogy a lehetséges mechanizmusokból melyik milyen fontos szerepet játszik a daganatellenes immunválaszban (Laumont CM et al, Nat Rev Cancer 2022, doi: 10.1038/s41568-022-00466-1). Fenotípusra nézve a rendelkezésre álló (néhány vizsgálatra szorítkozó) szakirodalom szerint primer melanómákban a plazmablaszt-szerű (CD19⁺, CD20⁻, CD38⁺, CD138⁺), a memória B-sejt-szerű (CD19⁺, CD20⁺, CD38⁻, CD138⁻) és az aktivált B-sejtek (CD19⁻, CD20⁺, CD138⁺, CD5⁺) vannak jelen legnagyobb mennyiségben, míg áttétekben ez eltérést mutathat (Chen M et al, Front Cell Dev Biol 9:677944, 2021; Griss J et al, Nat Commun 10:4186, 2019). A tumorokhoz asszociált terciér nyirokszövetek prognosztikai szerepének kérdésköre nem teljesen ellentmondásmentes; míg a legtöbb ráktípusban pozitív prognosztikus összefüggést írtak le, néhány esetben ezzel ellenkező hatást találtak. Az ellentmondás hátterében állhat a TLS-ek eltérő érettségi foka és lokalizációja (Colbeck EJ et al, Front Immunol 8:1830, 2017; Fridman WH et al, Nat Rev Clin Oncol 2022, doi: 10.1038/s41571-022-00619-z). Valószínűleg az lehet az oka a túléléssel való összefüggés hiányának a vizsgálatunkban, hogy primer melanómában többségében éretlen vagy nem teljesen érett TLS-ek találhatóak (pl. CD21⁺ folliculáris dendritikus sejt hálózatot csak az esetek kisebb hányadában találtunk, míg az immunoglobulin gének rekombinációjában és a szomatikus hipermutációban szerepet játszó AID enzim csak elvétve volt detektálható).

5. A melanoma mikroérsűrűség vizsgálata során az erek immunhisztokémiai jelöléséhez használt markerek ismertetése hasznos lett volna a fejezetek elején. A kevésbé jártas olvasónak a MECA-79 (HEV) még ismert, de a CD34+ és VAP-1+ erek szerepe a tumor progresszióban nem annyira evidens. Mi a jelentősége annak, hogy a VAP-1+ erek dominánsan a peritumorális területen fordulnak elő és az intratumorális alacsonyabb expresszió rosszabb túlélési aránnyal függ össze?

Válasz: A CD34 az egyik legismertebb endotélsejtmarker, a daganatok mikroérdenzitásának meghatározására az egyik leggyakrabban használt marker. Igaz, megjelenik más sejt típusokon is (pl. hematopoetikus progenitor sejteken), a jelölődött mikroereknek ezektől való elkülönítése nem okoz nehézséget. Azaz a CD34-et nem a tumorprogresszióban játszott esetleges szerepe miatt vizsgáltuk, hanem mint praktikus markert a tumorasszociált mikroerek kimutatására. A VAP-1 (vaszkuláris adhéziós protein-1) jóval kevésbé ismert, Sirpa Jalkanen és munkacsoportja (University of Turku, Finnország) fedezte fel, és a velük való kooperáció folytán került az érdeklődési körünkbe. A Bevezetés 1.6. fejezetében írtam róla néhány mondatot (valóban elég szűkszavúan, minthogy nem tartozott az értekezés súlyponti témái közé).

A VAP-1 (azóta átnevezték AOC-re: amine oxidase copper containing) egy adhéziós molekula és egyben ektoenzim, mely főként vaszkuláris endoteliális sejteken, simaizomsejteken és adipocitákon jelenik meg. Endotélsejtek esetén különböző fehérvérsejttípusok kötődésében és extravazációjában vesz részt (Salmi M és Jalkanen S, Antioxid Redox Signal 30:314-332, 2019). Az a megfigyelésünk, hogy VAP-1-pozitív erek főként peritumorálisan helyezkedtek el, nem meglepő, minthogy a többi vaszkuláris marker esetén is ezt tapasztaltuk (a MECA-79 gyakorlatilag kizárólag peritumorális erekben jelent meg, és a CD34⁺ mikroerek denzitása is jóval magasabb volt peritumorálisan az intratumorális MVD-hez viszonyítva). A magasabb intratumorális VAP-1-expresszió hosszabb túléléssel való összefüggésére mutatott (statisztikailag nem szignifikáns) tendenciára nem sikerült meggyőző magyarázatot találnunk, minthogy a vizsgált immunsejtek denzitása nem mutatott összefüggést a VAP-1-expresszióval. A VAP-1 tumorprogresszióban játszott szerepére vonatkozóan nem állt semmi információ rendelkezésre a vizsgálatunk idején, és az azóta eltelt időben sem volt jelentős a humán daganatokon végzett vizsgálatok száma. Állatkísérletes tumormodellek egy részében a VAP-1 gátlása az immunszuppresszív mieloid sejtek beáramlásának csökkentése révén fékezte a daganatnövekedést. Emellett a szolubilis VAP-1 biomarkerként való alkalmazhatóságát többféle betegség esetén kutatják (a daganatos megbetegedések mellett pl. diabétesz, májbetegségek esetén) (Salmi M és Jalkanen S, Antioxid Redox Signal 30:314-332, 2019).

6. A dolgozatban bemutatott immunhisztokémiai vizsgálatok a tumorok állapotának egy adott pillanatát mutatják, de nem ad információt a tumor progresszió során történő változásokról. Volt-e lehetőség néhány esetben a kezelés előtti és utáni szövettani anyagok vagy őrszem nyirokcsomók összehasonlító immunfenotípus vizsgálatára? Milyen elképzelései vannak a tumor progresszió nyomon követésének lehetőségeiről? Mely biomarkerek meghatározását javasolná a primer tumor analízisnél, mint prognosztikailag fontos adatot?

Válasz: A válaszadást az utolsó kérdéssel kezdve, a rendelkezésre álló (saját és a szakirodalomban elérhető) adatok alapján a primer tumorban meghatározott immun-biomarkerek közül a dendritikus sejtek (különösen a DC-LAMP-ot expresszáló érett DC-k) tűnnek a legígéretesebb prognosztikus szempontból, mivel mennyiségük valamennyi eddigi vizsgálatban szignifikáns összefüggést mutatott a melanómás betegek túlélésével (ld. a disszertáció 22. táblázatában). Messzemenően egyetérték a bírálónak azzal a megállapításával, hogy az – akár a primer tumoron, akár áttéteken végzett – immunhisztokémiai vizsgálatok csak „pillanatfelvételt” mutatnak, ezért nagyon fontosak a követéses vizsgálatok. Sajnos kevés ilyen tanulmányt publikáltak a melanóma immunjellemzőivel kapcsolatban. A legutóbbi vizsgálatunkban (aminek eredményei még nem kerültek be az értekezésbe) ipilimumabbal kezelt melanómás betegek kezelés előtt és kezelés után operált áttéteit hasonlítottuk össze a HLA-I-expresszióra és ezzel párhuzamosan néhány immunsejttípus (CD8⁺ T-sejtek, NK-sejtek) infiltrációjára nézve; a HLA-I-expresszió csökkenését állapítottuk meg az ipilimumabra nem reagáló betegek kezelés utáni, progrediáló áttéteiben (Ladányi A et al, Pathol Oncol Res 28:1610297, 2022). Hasonló követéses vizsgálatokat tervezünk végezni PD-1-gátló terápiában részesülő betegek esetén is.

Budapest, 2022. május 31.

dr. Ladányi Andrea