

## Válasz dr. Gyulai Rolland egyetemi tanár, az MTA doktora bírálataira

Szeretném megköszönni dr. Gyulai Rollandnak doktori értekezésem igen részletes és gondolatébresztő bírálatát. Köszönöm elismerő véleményét a célkitűzések jelentőségéről, a bemutatott új eredmények tudományos és gyakorlati fontosságáról és az értekezés áttekinthetőségéről. 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...

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

1. Primer melanómában a T-sejt aktivációs markereket hordozó limfociták vizsgálatok a kifekélyesedett tumorterületeken igen magas volt a pozitív sejtek denzitása. Mivel ezt az ulceráció miatt kialakult gyulladós környezet hatásának (azaz másodlagos reakciónak) tulajdonítja, ezeket a területeket nem vette figyelembe az értékelésben. Tekintve, hogy az ulceráció melanómában az egyik legerősebb prognosztikai faktor, az aktivált T-sejtek magas száma az ulcerált területeken korántsem biztos, hogy másodlagos jelenség. A vertikális növekedési fázisban lévő melanómák feletti epidermisben a jelölt is immunológiai változásokat (pl. csökkent Langerhans sejt denzitást) ír le. **Milyen típusú T-sejt (illetve egyéb immunsejt) összetétel jellemezte az ulcerált területeket? Van-e irodalmi adat a kifekélyesedés és a gyulladós reakció összefüggésére melanómában?**

**Válasz:** Vizsgálatunkban az ulcerált melanómák 37%-ára (14/38) volt jellemző a CD25<sup>+</sup>, illetve OX40<sup>+</sup> T-limfociták magas száma a kifekélyesedett területeken. Ezekben az esetekben a jelölt metszetek utólagos átnézése alapján megállapítható, hogy az ulcerált tumorterületeken a gyulladós sejtek (neutrofil granulociták, makrofágok) megnövekedett mennyisége is jellemző volt. Van több irodalmi adat is a kifekélyesedés és a gyulladós reakció összefüggésére melanómában, leírták pl. mind a neutrofilek, mind a makrofágok jelentősen emelkedett számát ulcerált melanómákban (Jensen TO et al, Cancer 118:2476-85, 2012; Koelblinger P et al, J Eur Acad Dermatol Venereol 33:667-75, 2019). Sőt, több, elismert melanóma-szakértő patológusoktól származó közleményben – az AJCC hivatalos definíciójától némileg eltérően – az intakt epidermisz hiánya mellett a gazdaszervezeti reakció jelenléte is az ulceráció kritériumaként szerepel (pl. In 't Hout FE, ... Thompson JF, Scolyer RA, Ann Surg 255:1165-70, 2012; Spatz A, ..., Ruiter DJ, Barnhill RL, Eur J Cancer 39:1861-5, 2003; Mandala M, Massi D, Virchows Arch 464:265-81, 2014), javasolva e szűkebb definíció használatát a patológiai feldolgozás során bekövetkező sérülés hatására esetlegesen kialakuló epidermisz-diszkontinuitás ulcerációként való értékelésének kizárására.

2. A vizsgálatok során a CD25 expressziót a T-sejt aktiváció markereként használja. Ugyanakkor a CD25 molekulát magasan expresszáló sejtek regulátoros T sejtek is lehetnek. **Végzett-e vizsgálatokat a CD25 pozitív sejtek alcsoportjainak elkülönítésére (pl. FOXP3 CD25 kettős pozitív sejtek aránya a CD25<sup>+</sup> populáción belül)?**

**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 szövegben 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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.

3. Primer melanómában a CD1a<sup>+</sup> dendritikus sejtek, illetve a DC-LAMP<sup>+</sup> érett dendritikus sejtek magas peritumorális denzitása túlélési előnnyel járt. Mivel a vizsgálat 1980-2001 között eltávolított tumormintákon történt, a betegek feltételezhetően nem részesültek modern (immunonkológiai vagy célzott) kezelésben. **Végzett-e a jelölt vizsgálatokat**



**vagy ismer-e adatokat az anti-CTLA-4, anti-PD-1 vagy BRAF/MEK inhibitor kezelésben részesült melanómás betegek esetén a peritumorális DC-denzitás prognosztikai értékével kapcsolatban?**

**Válasz:** Kevés ezzel a témával foglalkozó közlemény található a szakirodalomban. A legkésőbbi egy 2012-es tanulmány, melyben 186 beteg primer melanómájában igazolták a peritumorális DC-LAMP<sup>+</sup> dendritikus sejtek prognosztikus szerepét (Jensen TO et al, Cancer 118:2476-85, 2012). A műtét azonban a bevont betegekben 1997-2000 között történt, és a cikkben nem esik szó a betegek későbbi kezeléséről. Indirekt bizonyítékot prezentáltak egy későbbi vizsgálatban a melanóma-asszociált DC-k szerepéről, pontos lokalizáció (intra- vagy peritumorális) megjelölése nélkül: az ún. „stimulátor” (BDCA-3<sup>+</sup>) DC-kre jellemző génexpressziós mintázat metasztatikus melanómában pozitív összefüggést mutatott mind a túléléssel, mind a PD-1-gátló terápiára adott válasszal (Barry KC et al, Nat Med 24:1178-91, 2018).

4. A szentinel (SLN) és nem szentinel nyirokcsomók (NSLN) immunsejt denzitásának összehasonlítása során az összes vizsgált paraméter esetén magasabb gyulladós sejt értékeket észlelt a sentinel nyirokcsomók esetén. Ez alapján feltételezi, hogy az őrszemnyirokcsomók funkcionálisan aktívabbak a nem sentinel nyirokcsomóknál. Fontos azonban szem előtt tartani, hogy az SLN eltávolítása nem a primer tumorral egy lépésben, hanem általában néhány héttel annak eltávolítását követően történik. Így az SLN által drenált bőrterületen sebgyógyulási és gyulladós folyamatok történnek/történhetnek a nyirokcsomó eltávolításának idején. **Végeztek-e vizsgálatot olyan SLN-ek esetén, amikor a primer melanóma műtétje a nyirokcsomó eltávolítással egyidőben történt?** A vizsgált paraméterek esetén igen jelentős szórást mutattak az adatok. **Bár a szokásos klinikopatológiai paraméterekkel (primer tumor vastagsága, típusa, ulcerációjá, stb.) nem mutattak összefüggést az SLN-ben észlelt denzitásértékek, vizsgálták-e az összefüggést a primer tumor immunsejt (pl. aktivált T-sejt, Treg, DC, stb.) denzitás értékeivel? Szintén érdekes lenne bizonyos pro/anti-inflammatorikus citokinek és kemokinek primer tumorban észlelt expresszióját összevetni a nyirokcsomóban látott immunsejt sűrűségekkel. Történtek-e ilyen vizsgálatok?**

**Válasz:** A kérdés első felére válaszolva, a vizsgálatunkba bevont 60 eset a „szentinel-korszak” kezdeti időszakából származik (1999 és 2001 közöttiek); többségüknél (a 60-ból 47 esetben) a primer tumor excíziójával egy időben történt az őrszemnyirokcsomók eltávolítása. Csak ezeknek az eseteknek az értékelése (utólagos elemzés alapján) hasonló eredményre vezet, mint az összes eset értékelése. A kérdés második felére reagálva, az eredeti tanulmány idején nem vizsgáltuk az SLN-ben talált immunsejt-denzitás és a primer tumorban meghatározott denzitásértékek közötti esetleges összefüggést, azonban 42 (egy ülésben operált) beteg esetén rendelkezésre állnak mind az őrszemnyirokcsomókra, mind a primer melanómára vonatkozó értékek a FOXP3<sup>+</sup> és az OX40<sup>+</sup> sejtek denzitásáról, és a kettő közt nem látható korreláció egyik marker esetén sem. Érdekes felvetés a kérdés végén az esetleges összefüggés a primer tumor citokin/kemokin expressziója és a nyirokcsomók immunsejt-sűrűsége között, azonban erre vonatkozó kísérleti adatot az irodalomban nem találtam, csak hipotéziseket arra vonatkozóan, hogy a primer tumorból származó faktorok gátolják az őrszemnyirokcsomók immunológiai aktivitását (Grotz TE et al, Melanoma Res 22:9-18, 2011). Például a primer tumorban termelődő TGF- $\beta$  az őrszemnyirokcsomókban a dendritikus sejtek apoptózisát vagy tolerogénné alakulását idézheti elő tüdőrákos, ill. melanómás betegekben (Ito M et al, J Immunol 176:5637-42, 2006; Polak ME et al, Br J Cancer 96:1879-87, 2007).

5. A melanómás betegek pozitív őrszemnyirokcsomóinak egy részében igen magas (>1900/mm<sup>2</sup>) Treg értékeket észlelt. Az SLN-ben észlelt magas Treg szám erős negatív korrelációt mutatott mind a progressziómentes túléléssel mind a teljes túléléssel. Úgy gondolom, ez az értekezés egyik legfontosabb új megállapítása – SLN pozitív esetekben ez a viszonylag egyszerű vizsgálat alkalmas lehet alacsony és magas rizikójú csoportok elkülönítésére. Figyelembe véve, hogy SLN pozitív esetén az esetek mintegy 50 százalékában következik be relapszus, ugyanakkor a jelenlegi ajánlások szerint csaknem az összes SLN pozitív beteget BRAF/MEK inhibitor vagy PD-1 inhibitor adjuváns kezelésben részesítjük, belátható, hogy nagy szükség lenne megbízható prognosztikai markerre. Ugyanakkor a vizsgált tumorminták és a túlélési adatok még az immunonkológiai és célzott melanóma terápiák bevezetése előtti időszakból származnak. **Vizsgálták-e a Treg sejtek SLN denzitásának jelentőségét a túlélésre célzott vagy immunonkológiai terápiák esetén? Javasolná-e a SLN pozitív esetekben alacsony Treg sejt denzitásnál az adjuváns kezelés mellőzését?** Ugyanakkor az SLN pozitív esetekben az intratumorális Treg denzitás egyrészt jól alacsonyabb átlag értékeket mutatott, másrészt a nagyobb Treg sűrűség pozitívan korrelált a túléléssel. **Mi lehet a magyarázata a teljes nyirokcsomóban és az intratumorálisan mért Treg denzitások túlélésre gyakorolt eltérő hatásának?**

**Válasz:** A kérdés első részére válaszolva, sajnos nem találtam olyan közölt tanulmányt, amelyben célzott vagy immunonkológiai terápiában részesült betegeknél vizsgálták a Treg-sejteket őrszemnyirokcsomókban. Két cikkben foglalkoznak (többek között) a regulátor T-sejtek SLN-denzitásának esetleges prognosztikai szerepével. Az egyik szerint (Speeckaert R et al, Eur J Cancer 48:2004-11, 2012) a FOXP3<sup>+</sup> sejtek magas denzitása rövidebb túléléssel járt; a betegek műtétjének idejét nem említik és a további kezelésekre sem térnek ki a közleményben, továbbá nem vizsgálták



elkülönítve az SLN-pozitív és –negatív eseteket. Egy másik tanulmányban (Kakavand H et al, Mod Pathol 28:1535-44, 2015) statisztikailag nem szignifikáns tendencia igazolódott metasztatikus őrszemnyirokcsomókban a FOXP3<sup>+</sup> limfociták peritumorális magas peritumorális száma és a rövidebb túlélés összefüggésében; az ebbe a vizsgálatba bevont betegeket 1993-2008 között diagnosztizálták, és ebben az esetben sem említik a szerzők a későbbi kezeléseket. Elméletben javasolható lehet az adjuváns kezelés mellőzése alacsony Treg-denzitásnál SLN-pozitív esetekben, de úgy gondolom, egy ilyen döntéshez az eddigi eredményeknek nagyobb esetszámú vizsgálatokban való megerősítése lenne szükséges. A kérdés második fele ennek (az őrszemnyirokcsomókon végzett) vizsgálatnak az eredményeit veti össze a későbbi, ipilimumabbal kezelt betegek nyirokcsomóáttétein végzett vizsgálatával. Az első esetben a teljes nyirokcsomóban, míg a másodikban az áttétek területén értékeltük a FOXP3-pozitív sejteket, ami magyarázza eltérő mennyiségüket. A túlélésre gyakorolt eltérő hatásnak több oka is lehet. Egyrészt eredményezheti az ipilimumabbal kezelt betegekben a regulátor T-sejtek kedvező hatását az ipilimumab egyik feltételezett hatásmechanizmusa, mely a – konstitutív CTLA-4-expressziót mutató – Treg-sejtek antitestfüggő sejt közvetített citotoxicitás révén történő elpusztítása. Egy másik lehetséges (az előzőt nem kizáró) magyarázat, hogy az aktív immunológiai mikrokönyezettel jellemezhető esetekben a tumorelles immunválaszban kulcsfontosságú egyéb immunsejtek (pl. citotoxikus T-sejtek) megjelenésével párhuzamosan az immunsuppresszív sejtek mennyisége is megnövekedhet, az immunrendszer működésére jellemző negatív visszacsatolós mechanizmusként, és nem önmagában a Treg-ek nagyobb mennyisége, hanem az általános magasabb lokális immunaktivitás áll az immunterápia fokozott hatékonyságának a hátterében.

6. Az leukocita interleukinnel kezelt szájüregi laphámrákok vizsgálata esetén a hatékony tumorelles válaszhoz a CD4<sup>+</sup> T limfociták száma és a CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> arány jelentős emelkedése volt szükséges. Ez némileg váratlan, hiszen a CD8<sup>+</sup> citotoxikus T sejteknek nagyobb jelentőséget tulajdonítanak a tumorelles védekezésben. **Mivel magyarázható ez a megfigyelés?**

**Válasz:** A CD8<sup>+</sup> T-sejtek jelentősége a tumorelles védekezésben valóban (el)ismertebb, de a CD4<sup>+</sup> T-limfociták is központi szerepet játszanak az immunválasz kialakításában és fenntartásában az antigénprezentáló sejtek stimulálásával, a citotoxikus T-sejtek támogatásával (helper funkció) és az immunológiai memória fenntartásával, illetve effektor funkciót is betölthetnek, citokinszekréció vagy közvetlen citolízis révén. Egészséges személyekben a perifériás vérben a CD4<sup>+</sup> T-limfociták dominálnak, a normális CD4:CD8 arány kb. 2:1. Ez immundeficiencia kialakulásakor, illetve az öregedés során csökken, továbbá a daganatszövetben is általában alacsonyabb CD4:CD8 arány jellemző, így szájüregi daganatokban is (pl. Wolf GT et al, Oral Oncol 51:90-95, 2015; Boxberg M et al, J Immunol 202:278-91, 2019; Lequerica-Fernández et al, Biomedicine 9:653, 2021). A CD4<sup>+</sup> T-limfociták közé tartoznak a regulátor T-sejtek is, de ezek jelenléte – a szolid daganatok többségével ellentétben – fejnyaki daganatoknál pozitív prognosztikus faktor (Shang B et al, Sci Rep 5:15179, 2015; de Ruiter EJ et al, Oncoimmunology 6:e1356148, 2017). Összességében tehát nem feltétlenül meglepő, hogy a hatékony tumorelles immunválasz a szájüregi laphámrákokban az eredetileg alacsony CD4:CD8 arány megfordítását igényelte. A Multikine (LI) nemrégiben lezárult III-as fázisú klinikai vizsgálatának eddig kiértékelt előzetes eredményei alátámasztják a korábbi eredményeinket, minthogy azoknál a betegeknél, akiknek a daganatát magas CD4:CD8 arány jellemezte (a kezelést követően operált tumorban), a terápia hatékonysága magasabb volt.

(Ennél a pontnál szeretnék válaszolni a bírálóiban korábban megjelenő megjegyzésre a kontrollként használt, nem LI-kezelt tumorok hiányzó archiválási időpontjáról: ez mindkét vizsgálatban a kezelt betegcsoporttal közel azonos időintervallum volt, az első vizsgálatban 1999-2000, a másodikban a 2000. év.)

7. Több vizsgálati eredmény esetén is szembeötlő, hogy az intratumorális paraméterek prognosztikai és prediktív szerepe kevésbé jelentős, mint a peritumorális immunsejt összetétel. **Mi lehet ennek a magyarázata? Milyen terápiás stratégiák alkalmazhatóak erre?**

**Válasz:** Erre a kérdésre biztos választ nem tudok adni. Azt gondolom, hogy az eltérés részben a mennyiségbeli különbségből adódhat, ami a legszembetűnőbb az OX40 marker és a CD20<sup>+</sup> B-sejtek esetén, ahol az intratumorális infiltráció minimális a peritumorális jelenlétükhöz viszonyítva; ez nagyban befolyásolja azt, mekkora hatást tudnak gyakorolni a betegség kimenetelére. Más volt a helyzet a CD1a<sup>+</sup> dendritikus sejtek esetén, amelyek nagyjából egyforma mennyiségben jelentek meg az intra- és peritumorális területeken. Azonban nem szabad elfelejteni, hogy az egyes immunsejtípusok nem „magányos harcosok”, hanem egymással kölcsönhatásban tudják a tevékenységüket kifejteni, és pl. egy antigénprezentáló sejt jóval nagyobb eséllyel tud kölcsönhatásba lépni a T-limfocitákkal a T-sejtekben gazdag peritumorális területeken, s ez magyarázhatja, miért nagyobb a peritumorálisan elhelyezkedő dendritikus sejtek (vagy egyéb antigénprezentáló sejtek, pl. B-sejtek) prognosztikus hatása az intratumorálisakhoz képest.

Budapest, 2022. május 31.

dr. Ladányi Andrea

