

Válasz dr. Méhes Gábor egyetemi tanár, az MTA doktora bírálata

Nagyon köszönöm dr. Méhes Gábornak doktori értekezésem alapos és gondolatébresztő bírálatát. Köszönöm elismerő véleményét az eredmények tudományos és gyakorlati jelentőségéről és az értekezés felépítéséről, nyelvezetéről.

A 8-11. táblázattal kapcsolatban a bíráló megjegyzi, hogy áttekinthetőbb lett volna ugyanazt a táblázatrendszert alkalmazni mindegyik sejttípus esetében (pl. a 11. táblázatét, ami a legrészletesebb). Az eltérő formátum alkalmazásának oka az volt, hogy az egyes sejttípusok esetén más-más jellegzetességekre próbáltuk felhívni a figyelmet a megfelelő cikkekben, így az aktivált T-sejtek és a dendritikus sejtek esetén az áttétképző képességgel való összefüggésre, utóbbiaknál emellett a tumorvastagsággal való összefüggésre is; valóban lehetett volna az értekezésben egységesen bemutatni az egyéb klinikopatológiai paraméterekkel való kapcsolatot is (illetve ennek hiányát). A bíráló további észrevétele, hogy az intra- vs. peritumorális előfordulásra vonatkozó információ nem minden esetben derül ki az ábrák (ill. táblázatok) feliratából. Bár az ábrafeliratok többsége tartalmazta ezt az információt, valóban előfordult egy-két esetben (pl. a 15. táblázatnál), hogy csak a fejezet szövege utalt a peritumorális elhelyezkedésre; sajnálom, ha ez nehézséget okozott az eredmények értelmezésében.

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

1. A részletes vizsgálatok a daganat közvetlen környezetének immuneltéréseire, azok esetleges prognosztikai/prediktív jellegére irányult. ***Mennyiben lehet az itt kimutatott lokális immun moduláció/aktiváció hatással a perifériás vérben keringő lymphocyták összetételére? Ismert-e olyan adat, ami a vérben kimutatható immunsejtek alapján a tumor immunitás mértékére enged következtetni?***

Válasz: A daganatos betegek immunstátuszát elemző tanulmányok nagy többsége vagy csak a lokális, vagy csak a perifériás vérben mérhető paraméterekre fókuszál; viszonylag kevés vizsgálatban elemzik párhuzamosan mindkettőt, és azokban is többnyire külön-külön értékeli a prognózissal való összefüggést, vagy változást pl. különböző terápiák hatására, és nem értékeli ezek egymással mutatott korrelációit. Néhány cikket azért találtam, ami erre irányult; például melanómás és tüdőrákos betegek perifériás vérében mind a CD4⁺, mind a CD8⁺ T-sejtek között a centrális memória és az effektor T-sejtek aránya (CM/Eff) korrelált a tumorban mérhető immungén-expresszió mértékével (Manjarrez-Orduno N et al, Front Immunol 9:1613, 2018). A jelenlegi konszenzus szerint pl. az immunterápiákra mutatott válasz szempontjából hasznosabb a tumor területén detektálható immunparamétereket vizsgálni, mert a szisztémás immunitás változásai kevésbé reprezentálják a daganatokban lokálisan fennálló immunstátuszt (Schnell A et al, Biomedicine 6:25, 2018; Tjin EPM et al, Clin Cancer Res 17:5736-47, 2011). Ugyanakkor nyilvánvaló előnyei is vannak a szisztémás tényezők (pl. perifériás vér sejtjei, szérumfaktorok) vizsgálatának, mivel ezek könnyen elérhetőek, és a betegség progressziója, illetve a kezelés során való követés, az ismételt tesztelés is egyszerűbben megvalósítható. Ezért nem annyira arra irányulnak a vizsgálatok, hogy ezekből mennyire lehet következtetni a tumor elleni immunitásra, hanem leginkább a szisztémás paramétereknek a közvetlen prognosztikai vagy prediktív értékére, azaz a klinikai hasznosítás lehetőségeire. Például az immunellenőrzőpont-gátlókra mutatott válasz számos vizsgálatban pozitív összefüggést mutatott a keringő limfociták számával, míg negatív asszociációt a neutrofilek számával és a neutrofil/limfocita aránnyal (NLR) (Buder-Bakhaya K, Hassel JC, Front Immunol 9:1474, 2018). Ezek egyébként prognosztikus tényezők is több daganattípusban (Ménétrier-Caux et al, J Immunother Cancer 7:85, 2019). A legtöbb adat az NLR-re, mint gyulladásos/immunológiai markerre vonatkozóan van; a magas NLR gyakorlatilag az összes szolid tumor esetén negatív prognosztikus faktornak bizonyult (Templeton AJ et al, JNCI 106:dju124, 2014), azonban kevés az információ az ennek hátterében álló mechanizmusokról és az összefüggésről a lokális immunparaméterekkel.

2. A következőkben hasonló immun- és klinikopatológiai elemzés történik kezeletlen őrszem nyirokcsomókban, mely jól tükrözi a sentinel nyirokcsomók speciális funkcionális jellegzetességeit, bár ez csak részben függött a tumoros érintettségétől (az OX40⁺ T-sejtek esetében). Az immun infiltrátum mértékét a nyirokszöveti állomány 5 területében számolással határozták meg, ami feltételezhetően reprodukálható adatot eredményezett. ***A metasztatikus nyirokcsomók melanómás érintettsége viszont erősen változó volt. Mutathat-e a nyirokcsomóban található tumoros sejttömeg mértéke összefüggést az immunsejtek elosztásával és gyakoriságával? Volt-e lehetőség a metasztázison belüli intratumor infiltrátum értékelésére? Különbözik-e ez a primer melanómától?***

Válasz: A kérdés(ek) első felére válaszolva, az eredeti vizsgálat idején nem elemeztük, hogy mutat-e összefüggést az őrszemnyirokcsomó-áttétek mérete az egyes immunsejt-típusok megjelenési gyakoriságával. Utólag összehasonlítva az immunsejtdenzitásokat az áttét mérete szerint szétválasztott csoportokban (<0,1 mm, 0,1-1,0 mm, ill. >1,0 mm) nem látható jelentős különbség. A szakirodalomban mindössze két tanulmányt találtam, amelyben ez a kérdés felmerült, mindkettő emlőrákos betegek őrszemnyirokcsomóiban vizsgálta a FOXP3⁺ limfocitákat, s egyikben sem találtak összefüggést az SLN-áttétek méretével (Gupta R et al, Cancer Invest 29:419-25, 2011; Gökmen-Polar Y et al, Cell Oncol 36:405-9, 2013). A kérdés második részére reagálva, az őrszemnyirokcsomókon végzett vizsgálatunkban

csak az értekezésben is szereplő 4 immunsejtmarker (FOXP3, OX40, DC-LAMP, CD123) szerepelt, s az ezeket hordozó sejtek a metasztatikusokon belül ritkán és kis számban voltak csak megfigyelhetőek, ezért ezt nem tudtuk kvantitatívan értékelni. Az irodalmi keresés két tanulmányt eredményezett, amelyben vizsgálták őrszemnyirokcsomó-áttétekben intratumorális immunsejtek megjelenését. Az egyikben a primer tumor immuninfiltrátumával nem voltak párhuzamot, csak a túléléssel (Kakavand H et al, Mod Pathol 28:1535-44, 2015); a másik vizsgálatban csak két beteg esetén hasonlították össze a primer tumort és az SLN-áttétet, ami statisztikailag nem értékelhető (Beasley GM et al, Cancer Immunol Immunother 70:475-83, 2021).

3. Bár kicsi az esetszám, fontos adatnak tűnik, hogy a melanoma által érintett nyirokcsövetben a megemelkedett FOXP3+ T-sejtszám kifejezetten ront a betegség kimenetelén. **Reprodukálható-e, mérhető-e ez az észlelés egyéb módszerrel (pl. nyirokcsomóból izolált sejtszuspenzióban áramláscitometriával).**

Válasz: Az eredeti terveinkben szerepelt a műtét után az őrszemnyirokcsomókból frissen nyert sejtszuspenziókban egyes immunsejttípusok, illetve ezek markereinek áramlási citometriával történő kimutatása. E célból megkíséreltük – egy korábbi közlemény (Vuylsteke RJ et al, Am J Pathol 161:19-26, 2002) technikájának módosításával – a nyirokcsomókból való sejtkenyérést optimalizálni úgy, hogy az a diagnosztikai célú feldolgozást ne veszélyeztesse. A sejtszuspenziókban áramlási citometria segítségével kettős jelöléssel meghatároztuk az aktivációs és regulátor T-sejtmarkereket hordozó T-limfocita-altípusok, illetve kostimulátor molekulákat kifejező dendritikus sejtek mennyiségét. A kinyert sejtszám sajnos nem bizonyult elégségesnek a tervezett vizsgálatok elvégzéséhez és megbízható értékeléséhez. A kísérletre felhasználható sejtek mennyiségét korlátozta, hogy a mintavételben részt vevő patológusok – természetesen – csak addig folytatták a sejtkenyérési eljárást, amíg biztosak voltak benne, hogy azzal nem korlátozzák a biztonságos diagnózis lehetőségét, mely gyakorlatilag a teljes nyirokcsomó sorozatmetszéssel történő feldolgozását igényelte. Emiatt felhagytunk ezekkel a vizsgálatokkal, és az azokba bevont esetek alacsony száma miatt ezek statisztikai értékelése nem volt lehetséges. A szakirodalomban sem találtam olyan publikációt, amely választ adna erre a kérdésre.

4. A CTLA-4 gátló kezelés hatásának megjósolásához már előkezelt metasztatikus tumorszöveteket vizsgáltak és jelentős különbségeket találtak a terápiás válasz függvényében, többnyire kifejezett szórással. **Felmerül a lehetőség, hogy a korábbi szisztémás kezelés hatására bizonyos melanomákban jelentősebb immunaktiváló folyamatok indukálódtak (pl. neoepitópok), míg másokban a terápia inkább az immun checkpoint aktiváció irányában szelektált. Hogyan lehetne ezeket a folyamatokat egzakt módon tanulmányozni?**

Válasz: Ez egy nehéz kérdés, mert ha az előző kezelésekre szerinti alcsoportokba soroljuk be a betegeket, valószínűleg túl kicsi lesz a csoportokon belüli esetszám a korrekt statisztikai elemzéshez. Ha a betegekben lejátszódó immunológiai folyamatok megértése a kérdés, és rendelkezésre állnak a különböző kezelésekre előtti és utáni tumorminták, akkor ezek követéses vizsgálata adhat választ, illetve a legjobb megoldás lehet ilyen vizsgálatok prospektív tervezése. Ha azonban prediktív markerek azonosítása a cél (ami a fő szempont volt a mi kutatásunkban), akkor a kezelésekre szerinti stratifikációnak nincs lényeges szerepe (az ilyen vizsgálatok nem is alkalmazzák).

5. Az ipilimumab kezelést megelőzően eltávolított metasztatikus tumorokban a szerzők jelentős különbségeket tapasztaltak majd minden immunsejt szempontjából, miszerint a jobb klinikai válasszal magasabb immunsejt arányok jártak és fordítva, a magas értékek kedvezőbb hosszú távú túléléssel jártak. Mindez a cutan/subcutan áttétek esetében csak a CD68+, ill. CD16+ sejtekre volt igaz, viszont erre a jelenségre a megbeszélés során sem született magyarázat. **Lehetséges-e, hogy itt egyszerűen a szöveti különbözőségről lehet szó, azaz az immunsejtek a bőrben eleve sokkal alacsonyabb arányban vannak jelen, mint a nyirokcsövetben és a lymphocyta homing minőségileg is különbözik. Mi lehet a szerepe a terápia során a bőrben fiziológiásan rezidens CD68+/CD16+ monocyták/macrophag vonalnak?**

Válasz: Valószínűleg legalább részben az a magyarázata az egyes immunsejttípusok eltérő prediktív jelentőségének, amit a bíráló is említ, azaz hogy (feltételezhetően a szöveti környezet különbözősége következtében) a nyirokcsomóáttétekben a legtöbb immunsejt-típus jelentősebb nagyobb számban van jelen, mint a bőr-, ill. szubkután áttétekben. Érdekes módon kivételt képeztek a CD68+ makrofágok, melyek egyformán nagy mennyiségben voltak megtalálhatók mindkét áttéttípusban, és a CD16+ sejteknél sem volt annyira jelentős a különbség, mint a legtöbb egyéb sejttípus esetén, a CD68+ makrofágok után ezek denzitása volt a legnagyobb a bőr/sc. áttétekben. Hogy mi lehet a szerepe ezeknek a sejteknek az ipilimumabkezelés során, arra egy lehetséges választ adhat az anti-CTLA-4 antitest-terápia egyik feltételezett (részben bizonyított) hatásmechanizmusa, a CTLA-4-et konstitutívan kifejező regulátor T-sejtek ADCC-közvetített elpusztítása Fc γ -receptort expresszáló monociták/makrofágok által (Bulliard Y et al, J Exp Med 210:1685-93, 2013; Simpson TR et al, J Exp Med 210:1695-710, 2013). Ezzel összhangban, ipilimumabterápiában részesülő melanómás betegek kezelés előtt operált áttéteiben a CD16+CD68+ sejtek denzitása magasabb volt a terápiára reagálók, mint a nem reagálók esetén (Romano E et al, PNAS 112:6140-5, 2015); a CD16 az ADCC-ben részt vevő Fc-receptor (Fc γ RIII), míg a CD68+ makrofágok az ADCC egyik fő effektor sejttípusa. Eredményeink részben

megfelelnek a fentieknek, bár a CD16⁺ és CD68⁺ sejtek mennyiségének szignifikáns összefüggését a klinikai válasszal csak a bőr/sc. metasztázisok tanulmányozásakor figyeltük meg, míg nyirokcsomóáttéteknél inkább a túléléssel mutatkozott korreláció.

6. Az orális laphámrákok vizsgálata során hasonló érdekes megfigyelésekre jutottak immunmodulációs kezeléseket követően, az itt ismertetett két tanulmányban neoadjuváns leukocyt-interleukin (LI) terápia, ill. kemoterápia + cetuximab kezelés hatásait vizsgálták.

Az LI kezelés hatását szövettani szinten meglehetősen bonyolult megközelítéssel elemezték, azzal a szándékkal hogy a tumorszövet háms- és stromális eredetű régiói is figyelmet kaphassanak. Meghatározásra kerültek daganatos zónák, benne ismételtelen felemlegetve a tumor-stroma átmenetet. Az alkalmazott bontás még tapasztaltabb szövettanász számára is nehezen érthető, ezért szerencsés lett volna **a szövettani/mikroszkópos kiértékelés ezen módját a jobb megérthetőség érdekében, esetleg sémásan szemléltetni ... Kérem a jelöltet a kiértékelés elmagyarázására!**

Válasz: Az említett értékelési séma valóban kissé bonyolult; azért alkalmaztuk, mert a CEL-SCI Corporation által szponzorált klinikai vizsgálat protokollja ezt írta elő, de igazából csak a CD1a⁺ dendritikus sejtek értékelése szempontjából volt jelentősége, melyek az LI-kezelt esetekben átcsoportosulást mutattak a tumor-stróma határ irányába. A három régió gyakorlatilag az egész (makroszkópos) tumortömeg különböző régióit jelentette (mikroszkóposan értékelve), a (külső) felszíni területet, a tumor központi részét, illetve a tumor-stróma határt, mely a mai (az ImmunoScore elterjedése óta közismertebb) terminológiával megfelel az invazív szegélynek.

7. Hasonlóan a melanomákhoz, érdekes lenne a szájüregi rákok esetében is látni, tudni a saját, kezeletlen primer biopsziák immun infiltrátumának az összetételét, mivel ez az individuális változó jelentősen árnyalhatja a kezelés hatását. **Van-e ilyen adat, ha nincs, mire számítana a szerző?**

Válasz: Az LI-kezelés két klinikai vizsgálatában számos hazai résztvevő centrum, kórház szerepelt, és a protokoll szerint ezek csak a kezelés után, műtétilag eltávolított tumorok szövettani blokkjait küldték a központi patológiai feldolgozást végző centrumba. Felmerült ugyan, hogy bekérhetnénk a kezelés előtti biopsziákat annak tesztelésére, hogy a kezelés hatására változott-e az immunsejt-infiltráció vagy esetleg az eleve meglévő immunsejtarány befolyásolja a kezelés eredményét, de végül ezt elvetettük, részben a logisztikai nehézségek, de főként amiatt, mert a legtöbb immunsejt-típus esetén tapasztalható nagyfokú eloszlásbeli heterogenitás következtében nem lett volna garantálható, hogy megbízható eredményt kapunk az (esetenként igen kicsi méretű) biopsziák értékelésekor, illetve ezeknek a teljes műtéti anyag reprezentatív metszeteivel való összehasonlításakor. Az a meglévő eredményekből is látható, hogy az LI-kezelés hatására változik az immunsejtek összetétele, de feltételezhető, hogy a kezelés hatását befolyásolja a fennálló lokális immunstátusz. Kevés szakirodalmi adat található erre nézve; a Multikine-t (LI), illetve ahhoz hasonló készítményt (IRX-2) fej-nyaki daganatokon alkalmazó tanulmányok nagy része, amennyiben vizsgálták a kezelés előtti biopsziákat is, csak a kezelés hatására bekövetkező változásokat elemzik, az immunparaméterek összefüggését a terápiás hatással azonban nem (pl. Feinmesser M et al, Eur Arch Otorhinolaryngol 261:359-68, 2004; Berinstein NL et al, Oncoimmunology 7:e1423173, 2018; Wolf GT et al, Oral Oncol 111:104928, 2020). Egy erre vonatkozó vizsgálatot találtam (Berinstein NL et al, Cancer Immunol Immunother 61:771-82, 2012); eszerint az IRX-2 készítmény hatására bekövetkező radiológiai tumorméret-csökkenés korrelált a kezelés utáni tumorminták T- és B-sejtes infiltrációjának erősségével, a kezelés előtti biopsziák hasonló paramétereivel azonban nem (továbbá a szerzők megjegyzik, hogy több immunparamétert nem tudtak értékelni a kezelés előtti biopsziákban azok korlátozott mérete miatt).

8. Érdekes és értékes vizsgálat a kombinált, EGFR-gátláson alapuló terápia hatásának elemzése laphámrákban, ahol a LAMP⁺-DC és PD-1⁺ lymphocyták száma magasabbnak bizonyult a kezelésre jól reagáló csoportjában. Irodalmi adatok arra utalnak, hogy EGFR aktiváló mutáció különböző formái esetén a daganat immunstátusza és immunterápiára adott válasza különbözik (elsősorban tüdőrákban). **Tudunk-e valamit, lehet-e jelentősége az EGFR-útvonal aktivációjának és az ezzel kapcsolatos immunmodulációnak fej-nyak rák daganatokban?**

Válasz: Az elérhető szakirodalmi adatok arra utalnak, hogy az EGFR expressziója, amplifikációja, ill. foszforilációja az alacsony immunaktivitási szintet mutató fej-nyaki daganatokban magasabb (Keck MK et al, Clin Cancer Res 21:870-81, 2014; Saloura V et al, Oral Oncol 96:77-88, 2019; Feng B et al, Clin Cancer Res 26:3616-28, 2020); az összefüggés hátterében álló mechanizmus(ok) még tisztázatlan(ok). Továbbá, hasonlóan az NSCLC-nél megfigyeltékhez, HNSCC-ben is azt tapasztalták, hogy az EGFR-mutációk jelenléte PD-1-gátlókkal kezelt betegekben kisebb terápiás hatással és rövidebb PFS-sel járt (ellentétben az EGFR-amplifikáció jelenlétével, melynek nem volt szignifikáns hatása) (Dou S et al, Front Immunol 13:813732, 2022).

Budapest, 2022. május 31.

dr. Ladányi Andrea

