

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Tumorinfiltráló immunsejtek prognosztikai és prediktív szerepe

Dr. Ladányi Andrea



Országos Onkológiai Intézet

Budapest, 2021

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
1. BEVEZETÉS	8
1.1. A tumor-mikrokörnyezet jelentősége	8
1.2. A daganatok elleni immunválasz	8
1.2.1. Antigénbemutatás, kostimuláció, immunellenőrző pontok.....	10
1.2.2. A tumorelles immunválasz elkerülésének lehetséges okai és mechanizmusai.....	12
1.3. A tumorasszociált immunsejtek típusai, prognosztikus szerepük	13
1.3.1. T-limfociták.....	14
1.3.1.1. <i>Aktivált T-sejtek</i>	14
1.3.1.2. <i>Regulátor T-sejtek</i>	15
1.3.2. B-limfociták, terciér limfoid struktúrák.....	15
1.3.3. NK- és NKT-sejtek.....	16
1.3.4. Dendritikus sejtek.....	16
1.3.5. Makrofágok.....	17
1.3.6. Granulociták és hízósejtek.....	18
1.4. A daganatok immunterápiája, a tumorasszociált immunsejtek prediktív szerepe	18
1.4.1. Immunellenőrzőpont-gátlók.....	20
1.5. Egyéb tumorterápiák – a tumorasszociált immunsejtek prediktív szerepe	22
1.6. Immunsejtek és a vaszkularizáció kapcsolata daganatokban	22
1.7. A vizsgált tumortípusok – a bőr malignus melanómája	23
1.7.1. Epidemiológia, rizikótényezők, klinikai megjelenés.....	23
1.7.2. Genetikai tényezők.....	24
1.7.3. Stádiumbeosztás.....	25
1.7.4. Örszemnyirokcsomók.....	25
1.7.5. A melanómát infiltráló immunsejtek prognosztikai jelentősége.....	26
1.7.5.1. <i>Tumorinfiltráló limfociták</i>	26
1.7.5.2. <i>T-limfociták</i>	26
1.7.5.3. <i>B-limfociták</i>	27
1.7.5.4. <i>Dendritikus sejtek</i>	27
1.7.5.5. <i>Makrofágok</i>	27
1.7.5.6. <i>Granulociták és hízósejtek</i>	28
1.7.5.7. <i>A melanómaáttéteket infiltráló immunsejtek prognosztikai jelentősége</i>	28
1.8. A vizsgált tumortípusok – fej-nyaki laphámrák	28
1.8.1. Epidemiológia, rizikótényezők.....	28
1.8.1.1. <i>HPV fej-nyaki daganatokban</i>	29
1.8.2. Kezelési lehetőségek HNSCC-ben.....	29
1.8.3. A fej-nyaki daganatokat infiltráló immunsejtek prognosztikai jelentősége.....	30
2. CÉLKITŰZÉSEK	31
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	32
3.1. A vizsgálatokba bevont betegek és szövetminták jellemzői	32
3.1.1. Primer melanómák vizsgálata.....	32

3.1.2. Melanómás betegek őrszemnyirokcsomóinak vizsgálata.....	37
3.1.3. Ipilimumabkezelésben részesülő melanómás betegek áttéteinek vizsgálata.....	39
3.1.4. Neoadjuváns leukocita-interleukin terápiában részesülő szájüregi laphámrákos betegek tumormintáinak vizsgálata.....	40
3.1.5. Indukciós kemoterápiában (ICT) és cetuximabkezelésben részesülő fej-nyaki daganatos betegek tumorbiopsziás mintáinak vizsgálata.....	41
3.2. Immunhisztokémia paraffinos metszeteken.....	42
3.3. Az immunhisztokémiaileg jelölt immunsejtek és erek mennyiségi értékelése.....	43
3.3.1. Infiltráló immunsejtek és mikroerek mennyiségi értékelése primer melanómákban.....	43
3.3.2. Immunsejtek mennyiségi értékelése melanómás betegek őrszemnyirokcsomóiban.....	44
3.3.3. Immunsejtek mennyiségi értékelése ipilimumabkezelésben részesülő melanómás betegek áttéteiben.....	44
3.3.4. HLA-expressziós szint értékelése ipilimumabkezelésben részesülő melanómás betegek áttéteiben.....	44
3.3.5. Immunsejtek mennyiségi értékelése fej-nyaki daganatos betegek tumormintáiban.....	45
3.4. VAP-1/laminin immunhisztokémia fagyasztott metszeteken.....	46
3.5. Statisztikai elemzés.....	46
4. EREDMÉNYEK.....	47
4.1. Aktivált T-limfociták vizsgálata primer melanómában.....	47
4.1.1. CD25 és OX40 T-sejt-aktivációs markereket hordozó limfociták immunhisztokémiai kimutatása.....	47
4.1.2. Az aktivált T-sejtek infiltrációjának kapcsolata a tumorok áttétképző képességével.....	48
4.1.3. Az aktivált T-sejtek infiltrációjának kapcsolata a túléléssel.....	50
4.2. FOXP3⁺ sejtek vizsgálata primer melanómában.....	51
4.2.1. FOXP3 ⁺ limfociták immunhisztokémiai kimutatása.....	51
4.2.2. A FOXP3 ⁺ sejtek infiltrációjának kapcsolata klinikopatológiai paraméterekkel.....	52
4.2.3. A FOXP3 ⁺ sejtek infiltrációjának kapcsolata a túléléssel.....	52
4.3. Dendritikus sejtek vizsgálata primer melanómában.....	53
4.3.1. CD1a és DC-LAMP markereket hordozó dendritikus sejtek immunhisztokémiai kimutatása.....	53
4.3.2. A dendritikus sejtek infiltrációjának korrelációja a tumorvastagsággal.....	54
4.3.3. A dendritikus sejtek infiltrációjának kapcsolata a tumorok áttétképző képességével.....	56
4.3.4. A dendritikus sejtek infiltrációjának kapcsolata klinikopatológiai paraméterekkel.....	57
4.3.5. A dendritikus sejtek infiltrációjának kapcsolata a túléléssel.....	57
4.4. B-limfociták vizsgálata primer melanómában.....	59
4.4.1. CD20 ⁺ B-sejtek immunhisztokémiai kimutatása.....	59
4.4.2. A B-sejtek infiltrációjának kapcsolata klinikopatológiai paraméterekkel.....	60
4.4.3. A B-sejtek infiltrációjának kapcsolata a túléléssel.....	62

4.5. Az ektópiás nyirokstruktúrák vizsgálata primer melanómában.....	63
4.5.1. Az ektópiás nyirokstruktúrákkal asszociált sejtek immunhisztokémiai kimutatása.....	63
4.5.2. Az ektópiás nyirokstruktúrák kapcsolata klinikopatológiai paraméterekkel.....	65
4.6. MECA-79⁺ erek vizsgálata primer melanómában.....	66
4.6.1. MECA-79 ⁺ erek immunhisztokémiai kimutatása, korreláció a tumorinfiltráló immunsejtek mennyiségével, illetve az ektópiás nyirokstruktúrák jelenlétével.....	66
4.6.2. A MECA-79 ⁺ erek kapcsolata klinikopatológiai paraméterekkel.....	68
4.6.3. A MECA-79 ⁺ erek és az immunsejtek denzitásának kapcsolata az áttétképzéssel és a túléléssel.....	69
4.7. Mikroérsűrűség és immunsejtdenzitás kapcsolatának vizsgálata primer melanómában.....	70
4.7.1. Korreláció a mikroérsűrűség és a tumorinfiltráló immunsejtek denzitása között.....	70
4.7.2. Az MVD, illetve a T-sejt- és makrofáginfiltráció kapcsolata klinikopatológiai paraméterekkel.....	71
4.8. A tumorbeli erek VAP-1-expressziójának vizsgálata primer melanómában.....	73
4.8.1. A VAP-1 protein immunhisztokémiai kimutatása.....	73
4.8.2. Az intratumorális erek VAP-1-expressziójának kapcsolata a tumorstagsággal és a betegek túlélésével.....	74
4.9. Immunsejtek vizsgálata melanómás betegek őrszemnyirokcsomóiban.....	74
4.9.1. Immunsejtek immunhisztokémiai kimutatása.....	74
4.9.2. Szentinel- és nem szentinel nyirokcsomók, továbbá metasztatikus vs. tumormentes SLN-ek immunsejtdenzitásának összehasonlítása.....	76
4.9.3. Az őrszemnyirokcsomók immunsejt-denzitásának kapcsolata klinikopatológiai paraméterekkel.....	77
4.9.4. Az őrszemnyirokcsomók immunsejt-denzitásának kapcsolata a betegségprogresszióval és a túléléssel.....	77
4.10. Immunsejtek vizsgálata ipilimumabkezelésben részesülő metasztatikus melanómás betegek nyirokcsomó- és bőr/szubkután áttéteiben.....	79
4.10.1. Immunsejtek immunhisztokémiai kimutatása.....	79
4.10.2. A metasztázisok immunsejt-denzitásának kapcsolata az ipilimumabterápiára adott válasszal.....	80
4.10.3. A metasztázisok immunsejt-denzitásának kapcsolata a túléléssel.....	82
4.11. HLA-expresszió vizsgálata ipilimumabkezelésben részesülő metasztatikus melanómás betegek nyirokcsomó- és bőr/szubkután áttéteiben.....	84
4.11.1. HLA-I és -II molekulák expressziójának immunhisztokémiai kimutatása melanómasejteken.....	84
4.11.2. A melanómasejtek HLA-expressziójának korrelációja a tumorinfiltráló immunsejtek denzitásával.....	85
4.11.3. A melanómasejtek HLA-expressziójának kapcsolata az ipilimumabterápiára adott válasszal.....	85
4.11.4. A melanómasejtek HLA-expressziójának kapcsolata a túléléssel.....	87
4.12. Immunsejtek vizsgálata neoadjuváns leukocita-interleukin terápiában részesülő szájüregi laphámrákos betegek tumormintáiban.....	89
4.12.1. Immunsejtek immunhisztokémiai kimutatása, LI-kezelt és kezeletlen	

tumorok összehasonlítása – első (fázis I/II-es) klinikai trial.....	89
4.12.2. LI-kezelt és kezeletlen tumorok összehasonlítása, összefüggés a terápiás válasszal – második (fázis II-es) klinikai trial.....	90
4.13. Immunsejtek vizsgálata indukciós kemoterápiában (ICT) és cetuximabkezelésben részesülő fej-nyaki daganatos betegek tumorbiopsziás mintáiban.....	92
4.13.1. Az immunsejtek denzitásának kapcsolata a kezelésre adott válasszal és a túléléssel.....	92
4.13.2. Az immunsejtek denzitásának kapcsolata a p16-státusszal és egyéb klinikopatológiai paraméterekkel.....	94
5. MEGBESZÉLÉS.....	95
5.1. Primer melanómákat infiltráló immunsejtek prognosztikai vizsgálata, kapcsolat az erzettséggel.....	95
5.2. Immunsejtek vizsgálata melanómás betegek őrszemnyirokcsomóiban.....	101
5.3. Ipilimumabkezelésben részesülő metasztatikus melanómás betegek áttéteit infiltráló immunsejtek denzitásának és a tumorsejtek HLA-expresszójának prediktív szerepe.....	103
5.4. Immunsejtek vizsgálata neoadjuváns leukocita-interleukin terápiában részesülő szájüregi laphámrákos betegek tumormintáiban.....	107
5.5. Immunsejtek vizsgálata indukciós kemoterápiában (ICT) és cetuximabkezelésben részesülő fej-nyaki daganatos betegek tumorbiopsziás mintáiban.....	108
5.6. Következtetések, a kutatások korlátai és értékei.....	110
6. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK.....	113
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	115
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	116
9. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK.....	132
9.1. Az értekezés alapját képező, a PhD fokozat elnyerése (1996) után született közlemények.....	132
9.1.1. Lektorált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények.....	132
9.1.2. Magyar nyelvű közlemények.....	133
9.2. Egyéb, a PhD fokozat elnyerése után született közlemények.....	134
9.2.1. Lektorált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények.....	134
9.2.2. Magyar nyelvű közlemények.....	136
9.3. Egyéb, a PhD fokozat elnyerése előtt született közlemények.....	137
9.4. Tudománymetriai adatok.....	139

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity (antitestfüggő sejt közvetített citotoxicitás)
AEC: 3-amino-9-etilkarbazol
AID: aktiváció-indukált citidin-deamináz
AJCC: American Joint Committee on Cancer
ALM: akrolentiginózus melanóma
APC: antigen-presenting cell (antigénprezentáló sejt)
β2M: β2-mikroglobulin
BCG: Bacillus Calmette–Guérin
CAR: chimeric antigen receptor (kiméra antigénreceptor)
CD: cluster of differentiation
CTLA-4: citotoxikus T-limfocita-asszociált protein 4
DC: dendritic cell (dendritikus sejt)
DC-LAMP: dendritic cell-lysosome associated membrane protein (DC-lizoszómaasszociált membránprotein)
ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group
EGFR: epidermal growth factor receptor (epidermális növekedési faktor receptor)
Fc: fragment crystallizable
FcR: Fc-receptor
FGF: fibroblast growth factor (fibroblaszt növekedési faktor)
FOXP3: forkhead box P3
GM-CSF: granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor
HEV: high endothelial venule (magas endotélsejtes venula)
HGP: horizontal growth phase (horizontális növekedési fázis)
HLA: humán leukocita antigén
HNSCC: head and neck squamous cell carcinoma (fej-nyaki laphámrák)
HPV: humán papillómavírus
ICI: immune checkpoint inhibitor (immunellenőrzőpont-gátló)
ICT: induction chemotherapy (indukciós kemoterápia)
IDO: indolamin-2,3-dioxigenáz
IFN: interferon
IL: interleukin
irRC: immune-related response criteria (immunfüggő válasz kritériumok)
KIR: killer cell immunoglobulin-like receptor
LDH: lactate dehydrogenase (tejsav-dehidrogenáz)
LI: leukocita-interleukin
LMM: lentigo maligna melanoma
MHC: major histocompatibility complex (fő hisztokompatibilitási komplex)
MPO: mieloperoxidáz
MVD: microvascular density (mikroérsűrűség)
NK-sejt: natural killer (természetes ölő) sejt
NKT-sejt: natural killer T-sejt
NM: noduláris melanóma

NSLN: non-sentinel lymph node (nem szentinel nyirokcsomó)
OS: overall survival (teljes túlélés)
OSCC: oral squamous cell carcinoma (szájüregi laphámrák)
PCR: polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
pDC: plasmacytoid dendritic cells (plazmacitoid dendritikus sejt)
PD-1: programmed cell death 1 (programozott sejthalál 1)
PD-L1, -2: programmed cell death ligand 1, 2 (programozott sejthalál ligandum-1, -2)
PDGF: platelet-derived growth factor (vérlemezke-eredetű növekedési faktor)
PF: ciszplatin, 5-fluorouracil
PFS: progression-free survival (progressziómentes túlélés)
PNAd: peripheral node addressin
scFv: single chain variable fragment
SLN: sentinel lymph node (őrszemnyirokcsomó)
SSM: superficial spreading melanoma
TAM: tumorasszociált makrofág
TAN: tumorasszociált neutrofil
TCR: T-cell receptor (T-sejt-receptor)
TGF: transforming growth factor (transzformáló növekedési faktor)
TIL: tumorinfiltráló limfociták
TLS: terciér limfoid struktúra
TNF: tumornekrózis-faktor
TNM: tumor-nyirokcsomó-metasztázis klasszifikáció
TPF: docetaxel, ciszplatin, 5-fluorouracil
Treg: regulátor T-sejt
VAP-1: vaszkuláris adhézions protein-1
VEGF: vascular endothelial growth factor (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor)
VGP: vertical growth phase (vertikális növekedési fázis)

1. BEVEZETÉS

1.1. A tumor-mikrokörnyezet jelentősége

A szolid tumorok szerves részét képezik a gazdaszervezet sejtes és molekuláris komponensei, melyeknek a daganatsejtekkel való kölcsönhatása alapvetően meghatározza a tumor biológiai viselkedését, a betegség lefolyását. A szervezet és a daganat kapcsolata kétirányú; a tumorsejtek különböző növekedési faktorok (pl. FGF-2, PDGF, TGF- β 1, VEGF) termelése révén elősegítik a strómaképződést, a stromális sejtek (fibroblasztok, mezenhimális stromális sejtek) viszont növekedési faktorok, citokinek, szövetbontó enzimek, ill. ezek inhibitorainak termelése útján befolyásolják a daganatsejtek szaporodását, migrációját, invázióját és áttétképzését (1). A tumor-mikrokörnyezet további sejtes elemei az angiogenezishez nélkülözhetetlen endotélsejtek és periciták, valamint a zsírsejtek, melyek lipidek, növekedési faktorok és citokinek termelésével befolyásolhatják a daganatok progresszióját (2).

A fentiek mellett a tumorsejtek és a gazdaszervezet közti kölcsönhatások kiemelkedő fontosságú szereplői az immunrendszer, ezen belül a természetes (más néven veleszületett) és szerzett (adaptív) immunrendszer elemei, melyek mind pozitív, mind negatív hatást gyakorolhatnak a betegség kimenetelére.

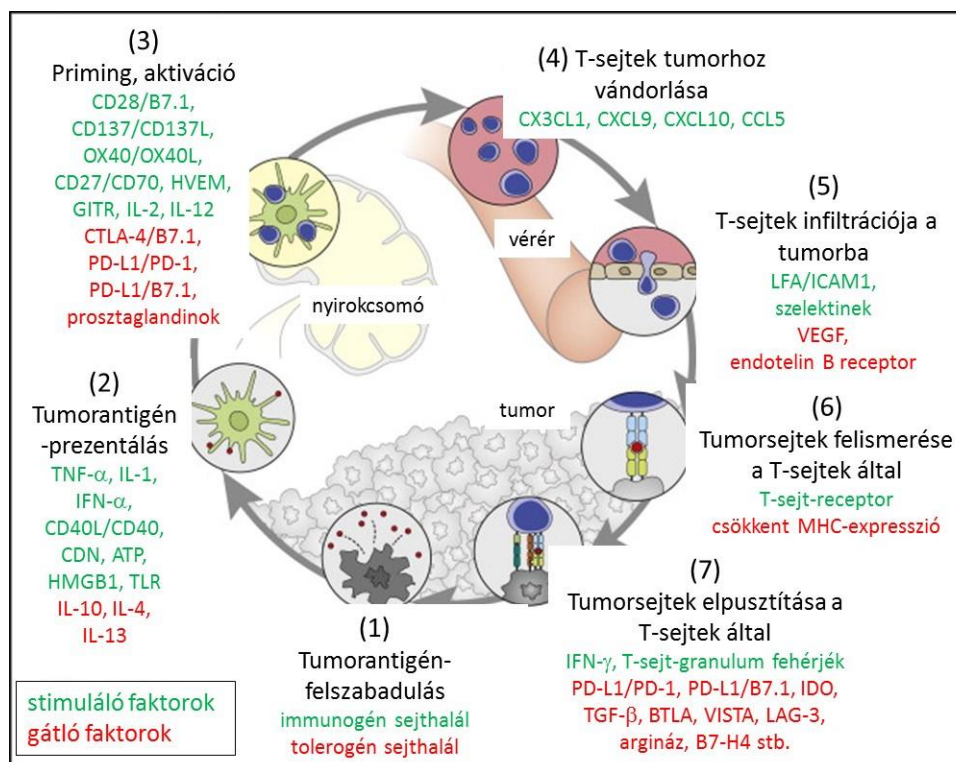
1.2. A daganatok elleni immunválasz

Az immunrendszer első védelmi vonalát a veleszületett immunválasz elemei jelentik (makrofágok, dendritikus sejtek, granulociták, hízósejtek, NK- és NKT-sejtek stb.) (3). Egy részük (pl. NK-sejtek, makrofágok, granulociták, hízósejtek) közvetlen tumorsejttölő képességgel rendelkezik szolubilis mediátorok termelésén keresztül, azonban a daganatprogressziót elősegítő hatást is gyakorolhatnak. Az immunválasz második szintjét képviselő szerzett (más néven adaptív) immunitás folyamatai ugyanakkor a veleszületett immunválaszra épülve indulnak be, s a két rendszer sejtjei és az általuk termelt szolubilis faktorok szoros kölcsönhatásban állnak. Az adaptív immunrendszer központi résztvevői a sejtközvetített immunválaszban főszerepet játszó CD8⁺ (citotoxikus) T-limfociták, az antitestközvetített immunválaszért felelős B-limfociták, továbbá a mindkét immunválasz-típus hatékonyságát növelő CD4⁺ segítő (helper) T-sejtek.

A sejtközvetített immunreakció többlépéses folyamat, melynek elindításához és végbemeneteléhez az immunrendszer által idegenként (nem sajátként) felismert antigén

mellett megfelelő, az immunaktiválódást támogató szöveti környezet szükséges. A tumorsejtek saját, normális sejtjeinkből származnak, mégis hordozhatnak olyan antigéneket, melyeket az immunrendszer felismer. Ezek egy része a tumorsejtek inherens genetikai instabilitása eredményeként létrejövő mutációk révén kialakult, az adott tumorra specifikus neoantigén, más részük ún. tumorasszociált antigén, mely egészséges sejteken is megjelenik, de korlátozott az expressziója. Utóbbiaknak több csoportja ismert, mint az adott sejt típusra (normális vagy transzformált, pl. melanocita és melanóma) jellemző differenciációs antigének, a különböző daganattípusok mellett csak a here sejtjein megjelenő „rák-csíravonal” (más néven „rák-herc”) antigének, vagy a tumorokban fokozottan kifejeződő antigének. Az újabb kutatási eredmények szerint a tumorspecifikus neoantigének elleni immunreakciók dominálnak mind a spontán létrejövő immunválaszban, mind az immunterápiákra adott válaszban (4, 5).

A sejtközvetített immunválasz folyamán a károsodott tumorsejtekből kiszabaduló molekulákat a szervezet számos pontján megtalálható antigénprezentáló sejtek (APC) felveszik, és a fehérjék fragmentumait a nyirokcsomókban MHC- (fő hisztokompatibilitási komplex) molekuláikhoz kapcsolatosan bemutatják a T-limfocitáknak (3). A $CD8^+$ T-sejtek felé a prezentáció az MHC-I-es (emberben elnevezése humán leukocita antigén, HLA-I), míg a $CD4^+$ T-sejtek számára az MHC-II-es (embernél HLA-II) molekulák segítségével történik. Az MHC-I komplexum egy polimorf α -láncból (HLA-A, -B vagy -C allélek) és a β_2 -mikroglobulin (β_2M) molekulából, az MHC-II komplexum pedig polimorf α - és β -láncból (HLA-DP, -DQ, DR allélek) tevődik össze. A T-limfociták specifikus receptoraik (T-sejt-receptor, TCR) segítségével képesek kapcsolódni az MHC-antigénpeptid komplexumhoz, s a megfelelő antigénepitópot felismerő T-sejt a kapcsolódást követően aktiváción és klonális felszaporodáson megy keresztül. Az aktivált antigénspecifikus $CD8^+$ T-sejtek a tumorba jutva a megfelelő antigént hordozó tumorsejteket elpusztíthatják, s az elpusztult daganatsejtekből további, antigéntermészetű molekulák felszabadulásával újraindítják a folyamatot („rákimmunitási ciklus”, 6), melynek kimenetelét a részfolyamatokat pozitívan, illetve negatívan befolyásoló szabályozó mechanizmusok egyensúlya szabja meg (1. ábra).



1. ábra. A „rákimmunitási ciklus” szabályozó mechanizmusai (forrás: Chen DS, Mellman I. *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. Immunity* 39:1–10, 2013)

1.2.1. Antigénbemutatás, kostimuláció, immunellenőrző pontok

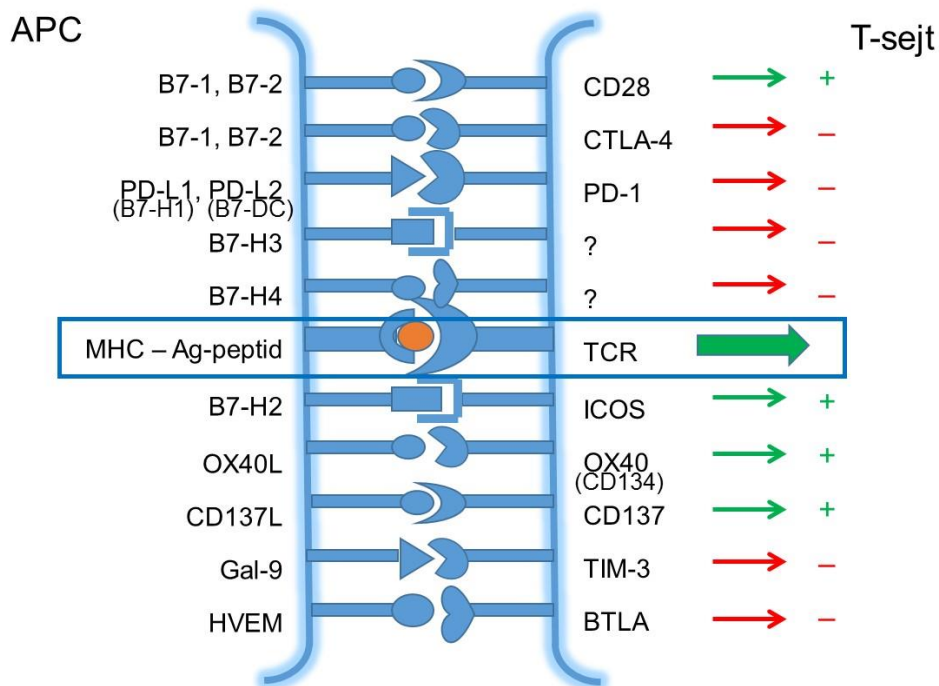
Mind a CD4⁺, mind a CD8⁺ T-limfociták aktiválásában kulcsfontosságú az antigénprezentáló sejtek általi antigénfeldolgozás és -bemutatás (3, 7). Ebben az ún. hivatásos antigénprezentáló sejtek (dendritikus sejtek, makrofágok, B-sejtek) közül kiemelt jelentősége van a dendritikus sejteknek (DC), melyek egyedül képesek naiv (antigénnel még nem találkozott) CD8⁺ T-limfociták elsődleges aktiválására. A dendritikus sejt az antigénfelvétel és környezeti veszélyszignálok (pl. mikrobiális termékek, gyulladáscsökkentő citokinek) hatására érési folyamaton megy keresztül. Az érett DC-ken az MHC- és ún. kostimulátor molekulák expressziója megnő, így képesek hatékony antigénbemutatásra.

A T-sejtek aktiválásához az MHC-antigén-TCR kapcsolódás (első szignál) mellett egy második, ún. kostimulációs jelre is szükség van, melynek hiányában a T-sejt válaszképtelensége következik be. A legfontosabb, APC-ken megjelenő kostimulációs molekulák a B7.1 (CD80) és B7.2 (CD86), melyeknek a T-limfociták felszínén kifejeződő receptorukhoz, a CD28-hoz való kapcsolódása stimuláló szignált jelent a T-sejtek számára. A B7 molekuláknak ugyanakkor létezik egy negatív szignált közvetítő receptora is, a CTLA-4 (citotoxikus T-limfocita-asszociált protein 4, más néven CD152), mely a T-sejteken általános

sejtfelszíni expressziót mutató CD28-cal ellentétben nyugvó állapotban intracelluláris lokalizációjú, csak aktiváció hatására jelenik meg a sejtek felszínén (8). Kivételt képeznek a regulátor T-sejtek (Treg), melyeken – több más, a T-limfocitákon általában aktivációt követően kifejeződő markerhez hasonlóan – a CTLA-4 konstitutív sejtfelszíni expressziót mutat, és fontos szerepet játszik immunszuppresszív hatásuk kifejtésében.

A CTLA-4 nagyobb affinitással köti a B7 ligandumokat, mint a CD28, így az utóbbival való kompetíció révén is akadályozza a T-sejtek aktiválódását a közvetlen gátló szignalizációs útvonal elindítása mellett. E negatív visszacsatolós folyamatnak fontos fiziológiás szerepe van az immunválasz korai fázisában a T-sejt-aktiváció mértékének szabályozásában.

Az antigénprezentáló sejtek és a T-limfociták kölcsönhatásában számos más szabályozó receptor-ligandum interakció szerepet játszik (ún. immunellenőrző pontok, immune checkpoints) (9, 10) (2. ábra). Az immunválaszt stimuláló kölcsönhatások közül kiemelendő az OX40 (CD134) és liganduma (OX40L, CD252), valamint a 4-1BB (CD137) és liganduma (CD137L) kapcsolódása.



2. ábra. Az antigénprezentáló sejtek és a T-sejtek interakcióját szabályozó fontosabb receptor-ligandum kölcsönhatások (forrás: Ladányi A, Balatoni T. Az immunválasz “akadálymentesítése”: újabb lehetőségek a melanoma immunterápiájában. *Magy Onkol* 57:100–107, 2013)

A kostimulátor szignálok mellett fiziológias körülmények között létfontosságúak a gátló szabályozó mechanizmusok is, melyek az egészséges szövetek védelmét hivatottak biztosítani az autoimmun folyamatok kialakulásának megelőzésével. Daganatos szervezetben ugyanakkor hozzájárulhatnak a hatékony tumorellenes immunválasz kialakulásának gátlásához. Közülük kiemelt jelentőségűek a B7 molekulacsaládba tartozó B7-H1 (más néven PD-L1, programozott sejthalál ligandum-1, CD274) és a B7-DC (PD-L2, CD273). Az előbbit széles expressziós spektrum jellemzi, hemopoetikus sejtek mellett megtalálható epiteliális és endotélsejteken is, míg az utóbbi főleg dendritikus sejteken és makrofágokon jelenik meg (9, 11). Receptoruk, a PD-1 (programozott sejthalál-1, más néven CD279) a CTLA-4-hez hasonlóan szintén aktiváció hatására jelenik meg T-limfocitákon (kivéve a konstitutív expressziót mutató Treg-sejteket), emellett B-, NK- és mieloid sejteken is kifejeződik. A PD-1-nek ligandumaival történő kölcsönhatása gátolja a T-és B-limfociták aktivációját, s fontos szerepe van az immunválasz szabályozásában, a perifériás tolerancia kialakulásában és fenntartásában (9, 11). A PD-L1 tumorsejteken is kifejeződik, a tumorinfiltráló limfocitákon ugyanakkor megjelenik a PD-1 receptor, ami szerepet játszhat a daganatok elleni immunvédekezés hatástalanságában.

1.2.2. A tumorellenes immunválasz elkerülésének lehetséges okai és mechanizmusai

A legtöbb szolid daganat tartalmaz – sokszor jelentékeny mennyiségben – immunsejteket, s a tumorsejtek felismerésére képes T-limfociták kimutathatók a tumorszövetben, a másodlagos nyirokszervekben és a perifériás vérben egyaránt, ami a gazdaszervezet daganatellenes reakcióját tükrözheti. A tumor progressziója azonban jelentős limfoid infiltrátum, vagy akár kimutatható tumorellenes immunválasz jelenlétében is bekövetkezhet, ami arra utal, hogy az immunrendszer az esetek jelentős részében nem képes a daganatnövekedés féken tartására. Ennek hátterében számos, egymást nem kizáró mechanizmust leírtak, melyek az immunreakció folyamatának különböző lépéseinél játszanak szerepet (1. ábra). A tumorantigének, MHC-molekulák expressziójának hiánya vagy csökkenése, az antigénfeldolgozás és -bemutatás zavara, kostimuláció hiánya, illetve a tumorsejtek és más, környezetükben levő gazdaszervezeti sejtek által termelt immunszuppresszív anyagok gátolhatják a T-sejtek aktiválódását (12, 13). Optimális T-sejt-aktiváció esetén is problémát okozhat, ha ezek a sejtek nem képesek a tumorba jutni a kemoattraktánsok hiánya, a denz stróma vagy az endoteliális adhézis molekulák abnormális kifejeződése miatt (14, 15). Végül az immuneffektor funkciót is gátolhatja a tumorsejtek antigén-, ill. MHC-I-expressziójának

csökkenése, negatív szabályozó molekulák expressziója, illetve a tumor mikrokörnyezetében jelenlevő immunszuppresszív sejtek vagy anyagok (13, 14).

Az MHC-I-deficienciának lehetnek genetikai okai, mint pl. a β 2-mikroglobulin génjének mutációja, gyakoribb azonban a különböző epigenetikai mechanizmusok útján bekövetkező expressziócsökkenés (16–18). A tumor-neoantigének kialakulása háttérében a fehérjekódoló gének nem szinonim mutációi állhatnak, így mennyiségük általában korrelál a daganatok mutációs terhelésével, s áttételesen a DNS-hibajavító mechanizmusok hiányosságaival (16, 17). A daganatok progressziója során azonban gyakran megfigyelhető a tumorantigének (és MHC-I) expressziójának csökkenése, melynek háttérében immunszelekciós mechanizmusok állhatnak (16, 17, 19).

Mind a veleszületett, mind az adaptív immunrendszer sejtjei tumorelles aktivitásuk mellett a daganatok keletkezését és progresszióját támogató hatást is kifejthetnek, részben a tumorokhoz gyakran kapcsolódó gyulladásos folyamatok kialakulásában és fenntartásában játszott szerepük révén. A krónikus gyulladás a daganatkeletkezés egyik régóta ismert kockázati tényezője, de a nem gyulladás talaján kialakult tumorok esetében is elősegítheti a progressziót (20, 21). E folyamatok kulcsfontosságú közreműködői a makrofágok, melyek – a T-limfociták mellett – a daganatok nagy részében a legnépesebb immunsejt-populációt képviselik, s növekedési faktorok, citokinek, proangiogén és immunszuppresszív anyagok termelésével elősegíthetik a tumornövekedést és -progressziót (22–24). Hasonló hatást a neutrofil granulociták és hízósejtek esetén is leírtak (24–26).

1.3. A tumorasszociált immunsejtek típusai, prognosztikus szerepük

A limfoid infiltrátum jelenléte a tumorokban (tumorinfiltráló limfociták, TIL), ezen belül a T-sejtek kifejezett infiltrációja számos daganattípus esetében a betegség kedvező kimenetelére utaló jelnek bizonyult (27–29). A leghatékonyabb antigénprezentáló sejtnek számon tartott dendritikus sejtek mennyisége is összefüggést mutatott a túléléssel a legtöbb tumortípusban. A tumorasszociált makrofágok, illetve neutrofilek akkumulációja ezzel szemben sokszor kedvezőtlen prognosztikai jel.

A daganatok elleni immunválasz a tumorok kialakulásának és progressziójának kontrollálása mellett az immunterápiák, valamint – az utóbbi évek kutatásai szerint – egyéb rákkezelési módzatok (kemo- és sugárterápia, célzott terápiák) hatékonyságát is befolyásolja (30–32). E kezelésmódok sokféle mechanizmuson keresztül hatással vannak az immunrendszerre, s ez

hozzájárulhat a terápia sikerességéhez. A daganatokhoz kapcsolódó immunsejtek így prognosztikai jelentőségük mellett a daganatterápia hatásosságának előrejelzői is lehetnek (30, 32).

1.3.1. T-limfociták

A tumorok elleni védelemben elsődlegesnek tekintett sejtközvetített immunválasz kulcsszereplői a T-limfociták. Az autológ tumorsejtek felismerésére képes CD4⁺ (helper – segítő) és CD8⁺ (citotoxikus – sejtölő) T-limfociták kimutathatók a daganatokban, a drenáló nyirokcsomókban és a perifériás vérben egyaránt, és egyre növekszik a tumorantigének listája, melyek e sejteket MHC I-es vagy II-es molekulán történő bemutatást követően stimulálni képesek (33).

Bár a limfoid infiltráció a tumorelles immunreakció jele lehet, a TIL, ezen belül a tumorasszociált T-sejtek patofiziológiai és prognosztikai jelentősége nem egyértelmű. Az infiltráció intenzitása a daganatok többségében pozitívan korrelált a túléléssel (28, 29), azonban ez nem minden tumortípusra nézve igazolódott, sőt veserák esetén fordított korrelációt tapasztaltak (34). Prognosztikai szempontból jelentősége lehet a különbségtételnek egyrészt a T-sejtek egyes alcsoportjai, másrészt a tumoron belüli lokalizáció szempontjából. Egy több mint 600 vastag-, ill. végbélrákos beteg szövetmintáján végzett vizsgálatban a tumor belsejében, illetve az invazív szegélynél található CD8⁺ (citotoxikus) és CD45RO⁺ (memória) T-sejtek mennyisége alapján nyert „immunpontszám” (Immunoscore) erősebb prognosztikus tényezőnek bizonyult, mint a hagyományos TNM-stádium (35, 36). Ezen eredmények alapján nemzetközi konzorcium alakult az Immunoscore prognosztikus potenciáljának validálására kolorektális daganatokon a stádium meghatározásának gyakorlatába való beilleszthetőség céljából, illetve egyéb daganattípusokban való alkalmazhatóság megállapítására (37, 38).

1.3.1.1. Aktivált T-sejtek

Az emberi daganatokat infiltráló T-sejtek sokszor funkcionálisan sérültek, illetve válaszképtelenek, proliferációs, citokintermelési, illetve citotoxicitási képességük csökkent (14, 39). A TIL vagy az infiltráló T-limfociták kimutatása ezért önmagában nem feltétlenül a legmegfelelőbb markere a tumorelles immunválasz létrejöttének, fontos lehet a T-sejtek funkcionális, ill. aktivációs állapotának feltérképezése is, kevés olyan prognosztikus vizsgálatot végeztek azonban, amely ezt a tényezőt is figyelembe vette. Veserákban az intratumorális CD8⁺ T-limfociták proliferációs aktivitása független prognosztikus tényezőnek

bizonyult (34). Melanómában a granzim B-t expresszáló CD8⁺ T-sejtek (40), kolorektális daganatokban pedig az OX40 (CD134) aktivációs markert kifejező T-sejtek infiltrációja korrelált a túléléssel (41). A granzim B az egyik legfontosabb effektor molekula, míg az OX40 kostimulációs molekula, így funkcionális és aktivációs markerek is egyben.

1.3.1.2. Regulátor T-sejtek

A tumorelles immunválasz gátlásáért felelős szuppresszor-sejt-típusok közül a CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulátor T-sejtek (Treg) a legjobban jellemzettek. Az ún. természetes Treg-sejtek a tímuszban jönnek létre, míg az indukált Treg-sejtek a perifériás szövetekben aktiváció hatására alakulnak ki CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ sejtekből. A regulátor T-sejtek gátolják a többi CD4⁺, valamint a CD8⁺ T-limfociták és az NK-sejtek proliferációját és aktivitását, s alapvető fontosságúak az autoimmun folyamatok kialakulásának megelőzésében. A daganatszövetben való akkumulációjuk számos tumortípusban megfigyelhető (42), ezek prognosztikai szerepe azonban ellentmondásos; egyes ráktípusokban a nagyfokú Treg-infiltráció kedvezőtlen, másokban kedvező prognózissal függött össze, míg egyes esetekben nem tártak fel kapcsolatot a túléléssel (28, 29, 43). Az ellentmondásos eredmények háttérében részben az állhat, hogy az alkalmazott marker (FOXP3) – bár jelenleg nem ismert specifikusabb Treg-marker, ezért általánosan használt és elfogadott – a regulátor T-sejtekben mutatott konstitutív expressziója mellett átmenetileg egyéb CD4⁺ és CD8⁺ T-limfocitákban is megjelenik aktiváció hatására. Másrészt a Treg-sejtek gyulladásgátló aktivitással rendelkeznek, így azokban a daganattípusokban, melyekre jellemző a gyulladással etiológia, kedvező hatásuk lehet.

1.3.2. B-limfociták, terciér limfoid struktúrák

A T-limfocitákhoz viszonyítva a B-sejtek a legtöbb daganatban kisebb mennyiségben vannak jelen. Az ellenanyag-közvetített immunválasz szerepe a tumorelles immunitásban nem tisztázott, és vitatott, hogy a szisztémás B-sejtes reakció vagy a tumorban e sejtek jelenléte hogyan befolyásolja a daganatok biológiai viselkedését. Egyes kísérleti modellekben a B-sejtek fokozták a tumornövekedést vagy -progressziót, más vizsgálatok viszont ezzel ellentétes eredményre vezettek. Az ellentmondás háttérében a B-limfociták funkcionális sokszínűsége állhat; egyrészt a termelt ellenanyagok, immunkomplexek vagy egyéb immungátló anyagok révén elősegíthetik a tumornövekedést, másrészt viszont hatékony

antigénprezentáló sejt-ként is működhetnek, támogatva a daganatellenes T-sejtes immunválaszt (44–46).

A tumorokhoz kapcsolódóan megfigyelték ektópiás nyirokszövet, ún. terciér limfoid struktúrák (TLS) jelenlétét. Ezeknek legszembeötlőbb eleme a B-sejteknek a nyirokcsomókban mutatotthoz hasonló elrendeződésű, folliculuszerű aggregátuma, melyhez T-sejtek csoportja kapcsolódik. A folliculusok némelyikében folliculáris DC-k hálózata is megtalálható, s a TLS-hez kapcsolatosan gyakran megfigyelhető a – szintén a nyirokcsomókra jellemző – magas endotélsejtes venulák (high endothelial venules, HEV) jelenléte. E struktúrákat leírták autoimmun megbetegedések mellett számos daganattípusban, illetve melanómaáttétekben is (47–49). Feltételezik, hogy a T-sejtek kezdeti aktivációjának helyeként szolgálva szerepet játszhatnak a tumorelles immunreakciók kialakulásában, és több tumortípusban összefüggést mutattak ki jelenlétük és a betegség kedvező kimenetele között (49–51).

1.3.3. NK- és NKT-sejtek

A természetes ölősejtek (natural killer, NK) a veleszületett immunrendszer effektor sejtjei, melyeknek fontos szerepe van a vírusfertőzött és daganatsejtek elpusztításában (52), emellett a dendritikus sejtekkel való kölcsönhatáson keresztül az adaptív immunreakciók szabályozásában is részt vesznek (53). Aktivációs állapotukat az aktiváló (pl. NKG2D, DNAM-1, NKp30, NKp44, NKp46), illetve gátló receptorok (az ún. KIR – killer cell immunoglobulin-like receptor – család tagjai, CD94/NKG2A stb.) által kiváltott szignálok egyensúlya szabja meg. Szolid tumorokban általában kis mennyiségben fordulnak elő, feltételezés szerint főként a szisztémás tumorelles védekezésben lehet szerepük a hematogén áttétképzés gátlásával. A tumorinfiltráló NK-sejteket az aktiváló receptorok alacsony expressziója és csökkent funkcionális aktivitás jellemezheti (54, 55).

Az NKT-sejtek az NK-sejtek markerei (pl. a CD56) mellett a T-limfocitákra jellemző molekulákat is expresszálnak, így a CD3-at és a klasszikus ($\alpha\beta$) T-sejt-receptort. Az NK-sejtekhez hasonlóan ezek is ritkán fordulnak elő szolid tumorokban.

1.3.4. Dendritikus sejtek

A dendritikus sejtek (DC-k) a leghatékonyabb antigénprezentáló sejtek, s a tumorantigének feldolgozása és CD4⁺, illetve CD8⁺ T-limfocitáknak való bemutatása révén kulcsszerepük van

a daganatok elleni immunválaszban. A DC-k számottevő fenotípusbeli, lokalizációs és funkcionális heterogenitást mutató sejtek komplex rendszerét alkotják (56). A bőrben található mieloid eredetű DC-típusok a Langerhans-sejtek és a dermális DC-k; a harmadik DC-csoport, az ún. plazmacitoid DC-k (pDC) eredete (mieloid vs. limfoid) vitatott (56, 57).

Az antigén felvétele és feldolgozása, valamint mikrobiális termékek, citokinek, egyéb stimulusok hatására a dendritikus sejtek érési folyamaton mennek keresztül, melynek eredményeképp felszínükön emelkedik az MHC és kostimulációs molekulák expressziója, megnő citokintermelési és T-sejt-aktiválási képességük. A tumorelles immunválasz létrejöttében játszott központi szerepükkel összhangban a nagymértékű DC-infiltráció a legtöbb daganattípus esetén pozitív korrelációt mutatott a betegek túlélésével (29).

A plazmacitoid dendritikus sejtek antigénprezentáló képességük mellett I-es típusú interferon termelésén keresztül is támogathatják a tumorelles immunválaszt (58), a tumor környezetében található pDC-k azonban az eddigi vizsgálatok szerint inkább immunszuppresszívek (59).

1.3.5. Makrofágok

A legtöbb szolid daganat nagy mennyiségű makrofágot tartalmaz, melyek heterogén sejtcsoportot alkotnak és az őket érő stimulusok függvényében különböző funkcionális jellemzőkkel rendelkeznek. Az ún. M1 makrofágokat magas antigénprezentáló képesség jellemzi, s ezáltal, valamint közvetlen citotoxikus aktivitásuk révén képesek hozzájárulni a tumorok elleni védekezéshez. Az M2 makrofágok ezzel szemben gyenge antigénprezentáló potenciállal rendelkeznek, s legfontosabb tevékenységük a sejtörmelékek eltakarítása, a szövet-újraépítés és angiogenezis elősegítése; serkentik az antitesttermelést, viszont gátolják a CD8⁺ T-sejtek és az NK-sejtek aktivitását (22). Az egyszerűsített M1/M2 beosztás a makrofágok funkcionális aktivitása széles spektrumának két végpontját jelöli. Az uralkodó nézet szerint a tumorasszociált makrofágok (TAM) az M2 típushoz állnak közelebb; növekedési faktorok, citokinek, kemokinek, szövetbontó enzimek szekréciója, illetve az angiogenezis serkentése révén képesek fokozni a tumornövekedést, migrációt, inváziót és áttétképzést, továbbá immunszuppresszor anyagokat is termelnek (22, 23, 60). A fentiekkel összhangban a makrofágok nagyfokú infiltrációja számos daganattípus esetén kedvezőtlen prognosztikai paraméternek bizonyult, bár ezzel ellenkező eredményt is leírtak több esetben (29, 61), melynek hátterében feltehetőleg a nagyfokú funkcionális diverzitás áll.

1.3.6. Granulociták és hízósejtek

A makrofágok mellett a neutrofil granulociták a tumorokhoz kapcsolódó gyulladásos folyamatok fő mediátorai. Bár aktivált állapotban képesek a daganatsejtek elpusztítására, a tumorasszociált neutrofilek (TAN) esetén inkább a daganatprogressziót elősegítő hatások dominálnak. Citokinek és növekedési faktorok termelésével például a tumornövekedést közvetlenül vagy az angiogenezis serkentése útján fokozhatják, mátrixbontó enzimeik révén pedig elősegíthetik az inváziót és áttétképzést (24, 25). Ezzel összhangban, a nagy mennyiségű TAN kedvezőtlen prognosztikai paraméternek bizonyult a vizsgált daganattípusok többségében (29). Az eozinofil granulociták jelenléte ezzel szemben általában kedvező prognózissal járt együtt (29), ezért feltételezhető, hogy a tumorelleses hatásaik dominálnak citotoxikus anyagok kibocsátása vagy más effektor sejtek aktiválása révén; a pontos hatásmechanizmus nem ismert.

A bazofil granulociták ritkán fordulnak elő a daganatokban. A hízósejtek azonban, melyek sok tekintetben a bazofilekre emlékeztetnek és azok szövethez kötött megfelelőinek tekinthetők, gyakorta megtalálhatók a tumorok mikrokörnyezetében és fontos szerepet játszanak a gyulladásos és immunfolyamatok szabályozásában. Multifunkcionális sejtekként különböző hatásuk lehet a tumorokra: citotoxikus molekulák kibocsátásán keresztül vagy más immunsejtek stimulálásával közreműködhetnek a daganatsejtek elpusztításában, azonban ezzel ellentétes hatást is kifejthetnek növekedési faktorok, citokinek termelése, illetve a krónikus gyulladás kialakulásának elősegítése révén. Számos angiogén faktort és mátrixbontó enzimet is termelnek továbbá, serkentve az érképződést, az inváziót és az áttétképzést (24, 26). Prognosztikus szerepükről ellentmondásos eredmények láttak napvilágot; több vizsgálat korrelációt talált mennyiségük és a tumorok progressziója, illetve vaszkularizációja között, mások viszont kedvező prognózissal mutattak összefüggést (24, 26, 29).

1.4. A daganatok immunterápiája, a tumorasszociált immunsejtek prediktív szerepe

A daganatellenes immunterápiák két nagy csoportját az aktív és a passzív (más néven adoptív) immunterápiák alkotják (62). Előbbiek esetén a szervezet immunaktivitását fokozzák, míg az utóbbi során kész „reagenseket” (tumorelleses ellenanyagokat, illetve effektor sejteket) adnak be. Az aktív immunterápia lehet antigénspecifikus, mint a különböző (ismert tumorantigénekre alapuló vagy teljes tumorsejtekkel történő) vakcinációs eljárások, valamint

nem specifikus, mint pl. citokinek (IFN- α , IL-2, TNF- α , GM-CSF stb.) vagy bakteriális eredetű immunstimulánsok (pl. BCG).

Viszonylag kevés tanulmány elemezte az aktív immunterápiák hatásának megjósolásában a tumort infiltráló immunsejtek, illetve a lokális immunaktivitás meghatározásának relevanciáját (63, 64). Metasztatikus melanómában szenvedő betegek IL-2-alapú kezelésre való reagálása összefüggést mutatott a T-sejtek és makrofágok infiltrációjával (65), s hasonló kapcsolatot írtak le a CD4⁺ T-limfociták száma és az interferonkezelés eredményessége között (66). Többféle daganattípuson végzett különféle immunterápiák, mint IL-2-kezelés vagy tumorantigén-vakcina esetében is kimutatták egyes immunasszociált gének (pl. IFN- γ -stimulált gének, kemokinek és immuneffektor molekulák génjei) koordinált expresszióját a terápiás válasszal összefüggésben (67, 68). Melanómavakcinával kezelt, progressziót nem mutató betegek áttéteiben a progrediálókhoz viszonyítva nagyobb számú CD4⁺, CD8⁺, illetve granzim-B⁺ limfocitát találtak (69).

A passzív immunterápiás modalitások közül jól ismertek a tumorsejteken kifejeződő célmolekulákat felismerő ellenanyagok (pl. rituximab – CD20, trastuzumab – HER2, cetuximab – EGFR). Ezek hatásában fontos szerepe van az immunrendszernek, elsősorban az antitestfüggő sejtközvetített citotoxicitás (ADCC) mechanizmusának, melynek során a daganatsejthez kötődő terápiás ellenanyag Fc (fragment crystallizable) régiójához kapcsolódó, a megfelelő Fc-receptorral (FcR) rendelkező ADCC-effektor sejtek (NK-sejtek, monociták/makrofágok, granulociták) a tumorsejtet elpusztítják (30, 70). A cetuximab esetén emellett a T-sejt-közvetített adaptív immunválasz közreműködését is leírták, az antitest kapcsolódása révén stimulált NK-sejtek által aktivált dendritikus sejtek hatásán keresztül (70, 71). Cetuximabot is tartalmazó kemoterápiás regimennel kezelt metastatikus vastag-, ill. végbélrákos betegekben a cetuximab ADCC-közvetített hatásában a CD56⁺ sejtek (főként NK-sejtek) szerepét találták elsődlegesnek, s a primer tumorban e sejtípus infiltrációja korrelált a terápia hatásával és a túléléssel (72). Adjuváns trastuzumabkezelésben részesülő tripla-negatív emlőrákos betegekben a tumorinfiltráló limfociták mennyisége korrelált a terápia hatásosságával (73).

A passzív immunterápia másik, ígéretes lehetősége az adoptív sejtranzfer. Ennek során a beteg saját, tumorellenes limfocitáit (leggyakrabban T-sejteket) injektálják vissza a betegbe felszaporítás (és esetleges génmanipuláció) után, előzetes limfodepléciós kondicionáló kezelést követően, általában IL-2 egyidejű alkalmazásával. E terápiás modalitás egyik válfaja

a tumorinfiltráló T-limfocitákat hasznosító TIL-terápia, melyet világszerte több centrumban alkalmaznak eredményesen, főként áttétes melanómás betegek kezelésére (74, 75). További lehetőségek a – még kísérleti stádiumban levő –, adott tumorantigént felismerő T-sejt-receptor (TCR) génjével transzfektált, perifériás vérből származó T-limfocitákkal történő kezelés, továbbá az ún. kiméra antigénreceptorral módosított T-sejtek (CAR T-sejtek) alkalmazása. Az utóbbi, innovatív technológia tumorantigént felismerő, módosított immunglobulin (scFv: single chain variable fragment) gén transzfekcióján alapul és sikerrel alkalmazzák hematológiai daganatos betegségekben (76). A terápiás választ előrejelző biomarkerekről elsősorban a TIL-terápia esetén állnak rendelkezésre adatok, főként a TIL-preparátum karakterizálására fókuszálva; az eredmények szerint a beadott TIL-készítményben a CD8⁺ T-limfociták mennyisége és differenciált effektor fenotípusa bizonyult prediktívnek (77). Robbins és mtsai teljesexom-szekvenálással azonosítottak olyan, a tumorban expresszálandó mutáns antigéneket, melyeknek a tumorinfiltráló limfociták általi felismerése korrelált a TIL-terápia eredményeként létrejövő regresszióval (4).

1.4.1. Immunellenőrzőpont-gátlók

Külön fejezetet érdemelnek az immunterápiákon belül a hatásos tumorelles immunreakciók kialakulását gátló folyamatok (az immunrendszer „fékjei”) kiiktatására irányuló megközelítések, ezek között is az immunellenőrzőpont-gátló ágensek (immune checkpoint inhibitor, ICI), melyekről elmondható, hogy maguk is új fejezetet nyitottak a daganatkezelésben (9, 10). Első képviselőjük a CTLA-4-et blokkoló ipilimumab volt, mely 2011-ben került be az előrehaladott melanóma terápiás arzenáljába, miután két fázis III-as klinikai vizsgálat is igazolta túlélést meghosszabbító hatását (78, 79). Megnyitotta egyúttal az utat más immunszabályozó molekulákat célzó terápiák számára, melyek közül mára a PD-1-útvonalat (a PD-1 receptort – nivolumab, pembrolizumab –, illetve egyik ligandumát, a PD-L1-et – atezolizumab, durvalumab, avelumab) célzó ellenanyag-terápia nyert tért a daganattípusok egyre szélesedő palettáján (64, 80). Az eddigi tapasztalatok szerint ezek az antitestek az ipilimumabnál kedvezőbb hatás/mellékhatás profilt mutatnak.

Az immunellenőrzőpont-gátlókra reagáló betegek jelentős részében tartós remissziót idéz elő a terápia, melyhez hasonló klinikai hatásosságra e betegségekben, többszörösen előkezelt, előrehaladott állapotú betegekben eddig nem volt példa. Mindazonáltal ezek az ágensek is általában csak a betegek kisebb hányadában bizonyultak hatékonyak (tumortípustól függően kb. 20-40%-ban), viszont használatuk során nem ritkán toxikus, jellemzően autoimmun

mellékhatásokkal kell számolni (főként a CTLA-4-gátlók esetén), és az új gyógyszerek magas ára sem elhanyagolható szempont. Annak érdekében, hogy a terápiára reagálók arányát növelni lehessen, elsődleges fontosságú a terápiás hatást előre jelezni képes biomarkerek kutatása. Ipilimumab esetében számos lehetséges prediktív markert vizsgáltak, elsősorban perifériás vérből kimutatható szérumfaktorokat és egyes fehérvérsejt-populációk részarányát (81, 82). A tumorinfiltráló immunsejtek prediktív potenciálját kevesebben tanulmányozták; kimutatták pl. immungének fokozott kifejeződésének, továbbá a FOXP3-at expresszáló sejtek és az immun-suppresszív indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO) enzim mennyiségének korrelációját az ipilimumab klinikai hatásával melanómában (83, 84). A PD-1-útvonalat célzó antitest-terápiák esetén a legtöbb vizsgálat a PD-L1 ligandum expressziójának prediktív szerepére összpontosított (85, 86), mely többnyire összefüggést mutatott a kezelés hatásosságával, ám az összefüggés nem abszolút és a PD-L1-negatív tumorok egy része is reagál a kezelésre (87–89). Nivolumabbal kezelt melanómás betegekben a tumorsejtek PD-L1-expressziója korrelált az immunsejtek infiltrációjával, ezen belül a B-limfocitákéval, továbbá az immunsejtek PD-1-expressziójával, az utóbbi paraméterek azonban nem mutattak összefüggést a terápiás válasszal (87). A CD8⁺ T-sejtek denzitása azonban prediktívnek bizonyult a pembrolizumab hatékonyságára nézve melanómás betegekben (90). Egy újabb keletű vizsgálatban mind a CD8⁺, mind a CD4⁺ T-limfociták mennyisége korrelált az anti-PD-1 terápiára (nivolumab vagy pembrolizumab) adott válasszal metasztatikus melanómás és tüdőrákos betegekben (91). Az ipilimumabhoz hasonlóan a PD-1-útvonal gátlószerei esetén is korrelációt találtak a klinikai hatás és az immunaktivitással kapcsolatos gének expressziója között (92–94). Érdekes módon a daganatokban a szomatikus mutációk frekvenciája és a neoantigének (ezzel arányos) mennyisége – mely egyes genomalapú elemzések szerint korrelált a tumorokban jelenlevő citotoxikus T-sejtek mennyiségével (CD8A-génexpresszió alapján) (95), valamint a sejtölő aktivitással (perforin- és granzimexpresszió alapján) (96) – összefüggést mutatott mind a CTLA-4-et, mind a PD-1-et gátló terápiák hatékonyságával (97–99). A β 2-mikroglobulin (a HLA-I komplexum alkotórésze) mutációját vagy heterozigótaság-vesztését is azonosították egyes esetekben a CTLA-4- és PD-1-inhibitorokra mutatott rezisztencia hátterében (100, 101), míg a HLA-I fehérjeszintű expressziójának összefüggését az ICI-k hatékonyságával csak egy vizsgálatban tanulmányozták (102).

1.5. Egyéb tumorterápiák – a tumorasszociált immunsejtek prediktív szerepe

A hagyományos rákellenes terápiák, mint a kemo- és sugárterápia egyedüli hatásmechanizmusának korábban a daganatsejtek közvetlen elpusztítását tartották, mellékhatásként az immunrendszer károsításával. Újabb vizsgálatok azonban feltárták, hogy a kezelésmódok némelyike serkenti a daganatellenes immunválaszt, s ez hozzájárulhat a kezelés sikerességéhez a terápiát túlélő ráksejtek elpusztítása vagy tartósan „alvó” állapotban tartása révén (31, 32, 103). A tumorok immunsejtek általi infiltrációjának elemzése ezért a kezelésmódok esetében is prediktív információt nyújthat, hasznosnak bizonyult például a terápiás hatás és a túlélés megjósolása szempontjából több ráktípuson végzett vizsgálatokban (64, 104–106). Egyes célzott terápiás ágensekről is bebizonyosodott, hogy a tumorsejtekre gyakorolt közvetlen hatásuk mellett immunmechanizmusokat stimulálnak. Az imatinibról például kimutatták, hogy aktiválja az NK-sejteket (107), míg a BRAF-inhibitor-terápia metasztatikus melanómában fokozta a T-sejtek infiltrációját és az antigénexpressziót (108).

1.6. Immunsejtek és a vaszkularizáció kapcsolata daganatokban

A daganatok érellátása meghatározó szerepet játszik a tumornövekedésben, az invázió és áttétképzés folyamatában. Az érképződést a daganat- és stromális sejtek által termelt angiogén és antiangiogén faktorok egyensúlya szabályozza. Az érújdonképződés (neoangiogenezis) mellett azonban a tumorok vaszkularizációjában több alternatív mechanizmus részvételét is igazolták, mint a meglévő erek bekebelezése, a glomeruloid angiogenezis vagy az ún. vaszkulogén mimikri (109, 110).

Mínt hogy a tumorinfiltráló immunsejtek többsége a keringésből származik, várható, hogy a tumor környéki mikroérhálózat sűrűsége arányos lehet a lokális immunsejtdenzitással. Emellett az endotélsejtek aktívan részt vesznek az immunsejtek szövetekbe (ezen belül a tumorba) jutásának szabályozásában, továbbá az immunaktivitást is képesek mind serkenteni, mind gátolni (111). A daganatokat gyakran jellemző hipoxia is befolyásolja mind a veleszületett, mind az adaptív immunfolyamatokat (112).

Másrészt az infiltráló gazdaszervezeti sejtek is termelhetnek az angiogenezist serkentő faktorokat. A makrofágok, mely a legnagyobb mennyiségben jelenlevő immunsejttípusok egyik csoportja, az angiogén tényezők egyik legfontosabb forrása is egyben; termelnek többek között vaszkuláris növekedési faktort (VEGF), fibroblaszt növekedési faktor-2-t (FGF-2),

interleukin-8-at (IL-8), továbbá angiogén kemokineket (22–24, 60). Hasonló funkciókat neutrofil granulociták és hízósejtek esetén is leírtak (24).

További kapcsolat a tumorvaszkularizáció és az immunrendszer között, hogy a másodlagos nyirokszervekre jellemző specializált posztkapilláris erek, az ún. magas endotélsejtes venulák (high endothelial venules, HEV) jelenlétét daganatokban is kimutatták (113–115). A nyirokcsomókban a limfociták migrációja ezeken az ereken keresztül valósul meg, és feltételezik, hogy a tumorasszociált HEV-ek megkönnyítik a daganatellenes immunválasz kialakulását (116). Erre egyelőre viszonylag kevés, közvetett bizonyíték van, pl. korreláció a HEV-denzitás és a T-, ill. B-limfociták mennyisége között emlőrákban és melanómában, valamint a kedvező prognózissal való összefüggés emlőrákban (113–115). A HEV-ek endotélsejtjeinek megkülönböztető adhéziós molekulája az L-szelektin (CD62) ligandumaként működő PNA_d (peripheral node addressin), melyet a 6-szulfo-szialil-Lewis X antigént felismerő MECA-79 antitesttel lehet detektálni. A klasszikus „homing-asszociált” molekulák mellett egyéb adhéziós fehérjék is kritikus szerepet játszanak a leukociták extravazációjának szabályozásában, így a vaszkuláris adhéziós protein-1 (VAP-1) és a CD73, melyek a sejtfelszínen expresszálandó enzimek (117). A VAP-1 nem csak HEV-en, hanem gyulladásozó környezetben vagy tumorok egyéb erein is megjelenhet, s egyes kísérletek szerint mieloid eredetű szuppresszor-sejtek daganatba jutásának megkönnyítése útján fokozhatják a tumorprogressziót (117).

1.7. A vizsgált tumortípusok – a bőr malignus melanómája

1.7.1. Epidemiológia, rizikótényezők, klinikai megjelenés

A melanóma a velőcső-eredetű melanociták kontrollálatlan osztódása útján kialakuló rosszindulatú daganat. Leggyakrabban a bőrön jelenik meg, jóval ritkább a nyálkahártya-, meningeális, ill. uveális lokalizáció. A bőr malignus melanómája az összes bőrdaganatnak csak kevesebb mint 5%-át teszi ki, mégis a bőrdaganatok okozta halálozás többségéért felel, így népegészségügyi jelentősége közülük a legnagyobb (118). A kialakulásában szerepet játszó környezeti tényezők között elsődleges fontosságú az ultraibolya (UVA, UVB) sugárzás. Előfordulási gyakorisága az utóbbi néhány évtizedben világszerte folyamatosan emelkedett, s nagy különbségeket mutat földrajzi elhelyezkedés és bőrtípus szerint, illetve kor és nem tekintetében is (118, 119).

A bőrmelanóma szövettani típusai közül az europid nagyrassz esetén a leggyakoribb a felszínesen terjedő változat (superficial spreading melanoma, SSM), melynél a bőr mélyebb rétegeibe való terjedést (vertikális növekedési fázis, VGP) általában horizontális irányú növekedés előzi meg (HGP). A félgömbszerű megjelenésű noduláris melanómánál (NM) a terjedés azonnal vertikális irányú, gyors növekedés és viszonylag korai áttétképzés jellemzi. Az europid nagyrasszban ritkábban előforduló változatok az idősebb korosztályban, napfénynek állandóan kitett bőrön megjelenő, lassú növekedésű lentigo maligna melanoma (LMM) és a tenyéren, talpon és köröm alatti területen kialakuló akrolentiginózus melanóma (ALM); utóbbi az ázsiai és afrikai származású populációban a leggyakoribb melanómatípus. Egyéb, igen ritkán előforduló típusok pl. a dezmoplasztikus melanóma, a kongenitális vagy a kék névusz talaján kialakuló melanómák.

1.7.2. Genetikai tényezők

A melanóma – az UV-sugárzás mutagén hatásának következtében – egyike a legnagyobb szomatikus mutációs teherrel jellemzett daganatoknak, de nagy heterogenitás figyelhető meg az anatómiai lokalizáció, illetve ezzel összefüggésben a napfényexpozíció szerint. A mutációknak csak kis része az, melynek lényeges szerepe van a tumorok kialakulásában (ún. „driver” mutációk), míg nagyobb részük ún. „passenger” mutáció; ez utóbbiak (is) vezethetnek ugyanakkor új antigénepitópok kialakulásához, így immunérzékenység szempontjából jelentőségük lehet. A driver mutációk közül a legfontosabbak a BRAF pontmutációi (V600E, V600K), melyek az időszakos napfényexpozíciónak kitett régiók (törzs, végtagok) melanómaiban a leggyakoribbak. A BRAF gén egy szerin/treonin proteinkináz kódol, mely a RAS/RAF/MEK/ERK szignálút vonal (MAPK – mitogénaktivált proteinkináz – út vonal) kulcseleme. A második leggyakoribb driver mutációk az NRAS gént érintő elváltozások, melyek többnyire BRAF-mutációra negatív melanómákra jellemzőek. A KIT proto-onkogén aktiváló mutációi, melyek a BRAF- és NRAS-mutációkkal együtt általában nem fordulnak elő, legnagyobb százalékban az akrális, mukozális és a krónikus napfénykárosításnak kitett bőrfelületeken levő melanómákban fordulnak elő (120, 121). Egyéb, melanómákban előforduló mutációk közül megemlítendő az NF1 (neurofibromin 1), CDKN2A (ciklindependens kináz inhibitor 2A), PTEN (foszfátáz és tenzin homológ), TERT (telomeráz reverz transzkriptáz), TP53 és MITF (mikroftalmia-asszociált transzkripció faktor) gének elváltozásai. A leggyakrabban megjelenő mutációkra alapozva javasolták a melanómák genomalapú osztályozását (122).

1.7.3. Stádiumbeosztás

A TNM- (tumor, nyirokcsomó, metasztázis) stádiumbeosztás lényeges információt nyújt mind a várható prognózis megbecslése, mind a terápia megtervezése (majd eredményességének értékelése) szempontjából. Az AJCC (American Joint Committee on Cancer) TNM-klasszifikáció 2009-ben kiadott 7. verziójában a T-stádiumot meghatározó legfontosabb tényezők a tumor vastagsága (Breslow-index), kifehélyeződése, ill. a mitózisszám (123, 124) (az utóbbi a legújabb, 8. verzióban nem szerepel; 125). Az N kategória meghatározói az áttétes regionális nyirokcsomók száma és az áttét klinikai detektálhatósága, illetve itt szerepelnek az ún. *in tranzit* metasztázisok és a szatelliták is. Az M kategóriát definiáló tényezők a távoli áttét(ek) helye, valamint az LDH-szérumszint (123, 125).

1.7.4. Őrszemnyirokcsomók

A stádiummeghatározás szempontjából kiemelt jelentősége van az ún. őrszemnyirokcsomó(k) patológiai diagnosztikájának. Az őrszemnyirokcsomó (sentinel lymph node, SLN) a tumor anatómiai régiójában a nyirokelfolyás útjába eső első nyirokcsomó, amelyben a legnagyobb valószínűséggel és legkorábban alakul ki regionális áttét. Tumorentessége esetén a régió többi nyirokcsomója is nagy valószínűséggel áttétmentes. Az őrszemnyirokcsomók azonosítása, eltávolítása és patológiai feldolgozása közepes vastagságú (>1–4 mm) melanómák esetén a rutin sebészi ellátás része, továbbá fontos prognosztikai tényező (124).

Prognosztikai jelentőségén kívül az őrszemnyirokcsomók vizsgálatával tumorimmunológiai szempontból is fontos információhoz juthatunk, minthogy – amellet, hogy a korai áttétképzés preferenciális helye – az SLN a tumorelles immunválasz kialakulásának, ezen belül a T-sejtek aktiválódásának is fontos színtere. Korábbi tanulmányok leírtak eltéréseket a szentinel és nem szentinel nyirokcsomók immunológiai jellemzői között, azonban az eredmények ellentmondásosak; míg egyes, melanómás, ill. emlőrákos betegeken végzett vizsgálatok eredménye arra utalt, hogy az őrszemnyirokcsomók immunszupprimáltak, minthogy kevesebb T-limfocitát és dendritikus sejtet tartalmaznak (126, 127), mások nem találtak ilyen különbséget (128, 129). Hasonlóan ellentmondásos eredmények láttak napvilágot a tumorpozitív és -negatív SLN-ek összehasonlításáról is (130–132). Kevés vizsgálat elemezte az őrszemnyirokcsomók immunstátuszának prognosztikai jelentőségét, illetve klinikopatológiai tényezőkkel való összefüggéseit. Cochran és mtsai melanómás betegek

szentinel nyirokcsomóiban a dendritikus sejtek denzitásának prognosztikus szerepéről számoltak be (133), Elliott és mtsai pedig a metasztatikus SLN-ekben az érett DC-k mennyiségének kapcsolatát írták le a túléléssel (134). A FOXP3⁺ regulátor T-sejtek akkumulációja az őrszemnyirokcsomókban kedvezőtlen prognózissal társult emlő- és gyomorrákban valamint melanómában (135–137).

1.7.5. A melanómát infiltráló immunsejtek prognosztikai jelentősége

A bőr malignus melanómáját a legimmunogénebb daganatok között tartják számon. Magas mutációs rátája mellett viszonylag intenzív immunsejtes infiltráció is jellemzi, ugyanakkor mindkét paraméter jelentős heterogenitást mutat az egyes betegek között.

1.7.5.1. Tumorinfiltráló limfociták

A prognosztikai vizsgálatok legnagyobb részében a tumorinfiltráló limfociták mennyiségét hematoxin-eozin festést követően határozták meg (138). Míg több vizsgálatban a jelentős limfoid infiltráció a kedvező prognózis független előjelzője volt (139, 140), különösen, ha csak a vertikális növekedési fázist infiltráló limfocitákat vették figyelembe (141, 142), mások nem találtak összefüggést a túléléssel (143, 144), vagy a TIL mennyisége nem bizonyult független prognosztikai paraméternek (145–148). Az utóbbi vizsgálatok egy részében az alacsony TIL-tartalom az őrszemnyirokcsomó-pozitivitás független prediktorának bizonyult (144, 147, 148). A távoli áttétek gyakoriságával viszont nem mutattak ki összefüggést, ami magyarázhatja a TIL és a túlélés korrelációjának hiányát (144).

1.7.5.2. T-limfociták

A T-limfociták, illetve alcsoportjaik infiltrációjának prognosztikai értékéről melanómában viszonylag kevés közlemény jelent meg, többségük kis esetszámba támaszkodva és összességében ellentmondásos eredménnyel. Két kisebb vizsgálatban (47, ill. 34 beteggel) a túlélés pozitív korrelációt mutatott a CD8⁺ vagy CD4⁺ T-sejtek intratumorális mennyiségével (40, 149), míg egy harmadikban (58 betegen) fordított korrelációt találtak a CD3⁺ T-limfociták intratumorális infiltrációjával és nem találtak összefüggést a CD8⁺ sejtekkel (150). Az eltérő eredmények hátterében a viszonylag kis esetszámok és metodikai különbségek állhatnak (értékelés a VGP-ben, illetve a teljes tumor területén). Későbbi, nagyobb mintaszámra támaszkodó vizsgálatok szerint nem volt összefüggés a VGP-t infiltráló CD8⁺ T-

limfociták (151), illetve az intra- és peritumorális CD3⁺ T-sejtek (152) mennyisége és a túlélés között.

A T-sejtek funkcionális vagy aktiváltsági állapotának prognosztikai vonatkozásait is kevés és kis esetszámú kutatás elemezte. A granzim B-t kifejező CD8⁺ T-limfociták mennyisége kedvező túléléssel korrelált (40), a CD69, illetve PD-1 aktivációs markereket hordozó T-sejtek száma azonban nem mutatott azzal összefüggést (150, 153).

A regulátor T-sejtek prognosztikus hatását (a mi vizsgálatunkat megelőzően) két tanulmány kutatta. Az egyik szerint a Treg-ek magas intra- és peritumorális aránya a helyi kiújulást valószínűsítette, a túléléssel való kapcsolatot azonban nem elemezték (154). A másik nem talált korrelációt a FOXP3⁺ limfociták száma és a Breslow-index vagy a túlélés között (150).

1.7.5.3. B-limfociták

Más tumortípusokhoz hasonlóan a melanóma infiltrátumában is a T-sejtek dominálnak; a B-sejtek gyakoriságát az összes limfocita ~15-20%-ára teszik (150, 155). Prognosztikai relevanciájukat korábban csak egy tanulmányban elemezték, mely nem talált kapcsolatot a túléléssel (150). B-sejt-folikulusok, illetve terciér limfoid struktúrák jelenlétét csak melanómaáttétekben írták le, primer melanómákban nem (47, 48).

1.7.5.4. Dendritikus sejtek

A mi vizsgálatunkat megelőzően a dendritikus sejtek infiltrációjának prognosztikai jelentőségéről nem jelent meg közlemény. Leírták a Langerhans-sejtek mennyiségének csökkenését a tumorvastagság növekedésével (156). Az érett DC-k jelenlétét csak néhány esetben vizsgálták (157).

1.7.5.5. Makrofágok

A makrofágok infiltrációjára vonatkozóan a korábbi, kisebb esetszámú vizsgálatok nem utaltak szignifikáns asszociációra a betegek túlélésével (149, 150). Jensen 190 beteg bevonásával végzett tanulmányában a CD68⁺ makrofágok nagy mennyisége az invazív szélnél, továbbá a CD163⁺ makrofágok magas stromális denzitása kedvezőtlen prognosztikus tényezőnek bizonyult (158); ezeket az eredményeket egy későbbi kisebb vizsgálat is támogatta (159). Egy másik nagy esetszámú vizsgálat (202 beteg) ezzel szemben nem talált szignifikáns korrelációt a TAM-szám és a túlélés között, bár feltárt kapcsolatot bizonyos,

kedvezőtlen prognosztikus faktorként ismert klinikopatológiai paraméterrel, mint a tumorvastagság és az ulceráció (160). Más tumortípusokhoz hasonlóan a makrofágok denzitása az utóbbi vizsgálat szerint korrelált a mikroérsűrűséggel (160).

1.7.5.6. Granulociták és hízósejtek

A neutrofil granulociták mennyisége, mely a daganatok többségénél rossz prognózist jelent (29) melanóma esetében is rövidebb túléléssel mutatott összefüggést 186 beteg szövetmintájában a CD66b marker kimutatása alapján (151). Az eozinofil granulociták melanómában kis mennyiségben fordulnak elő, prognosztikai jelentőségüket nem vizsgálták. A hízósejtekkel foglalkozó két (kis esetszámú) tanulmány ellentmondó eredményre vezetett (161, 162).

1.7.5.7. A melanómaáttéteket infiltráló immunsejtek prognosztikai jelentősége

Néhány, főként nyirokcsomó-, bőr- és szubkután metasztázison végzett vizsgálat foglalkozott az áttéteket infiltráló immunsejtekkel prognosztikai szempontból. Az összes TIL (163–165), illetve a CD3⁺ T-limfociták (164) mennyisége korrelációt mutatott a betegek túlélésével. Egy nagyobb esetszámú tanulmányban a CD3⁺, CD8⁺ T-sejtek, továbbá a CD20⁺ B-limfociták emelkedett száma a betegség kedvező kimenetelét jelezte, míg egyéb immunsejttípusok esetén (CD4⁺, CD56⁺, CD163⁺, DC-LAMP⁺) nem találtak összefüggést (166).

1.8. A vizsgált tumortípusok – fej-nyaki laphámrák

1.8.1. Epidemiológia, rizikótényezők

Világviszonylatban évente több mint 650 000 fej-nyaki rákot diagnosztizálnak, ami több mint 350 000 halálozásért felel évente (167). Az elmúlt évtizedben Magyarország vezető helyet foglalt el az szájüregi, garat- és gégerákos európai halálozási statisztikákban mindkét nemnél (168, 169). A Nemzeti Rákregiszter adatai alapján 2006–2015 között évente 3600–4000 közötti fej-nyaki daganatos esetet diagnosztizáltak férfiaknál, míg nőknél az előfordulási gyakoriság – a nemzetközi trenddel összhangban – alacsonyabb, kb. 1100 és 1400 közötti volt (170).

A fej-nyaki daganatok több mint 90%-a a laphámrákok csoportjába tartozik (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC), melyek a szájüreg, a garat (ezen belül a szájgarat, orrgarat és algarat), illetve a gége elszarusodó laphámjából indulnak ki. Legfontosabb ismert

rizikótényezőjük a dohányzás, alkoholfogyasztás, valamint a humán papillómavírus (HPV) fertőzés (különösen a magas rizikójú 16-os típus).

1.8.1.1. HPV fej-nyaki daganatokban

A HPV egy DNS-vírus, mely a bőr és a nyálkahártyák keratinocitáit fertőzi meg. A vírusgenom által kódolt korai fehérjék közül az E6 a p53 tumorszuppresszor fehérje degradációját idézi elő, míg az E7 az Rb tumorszuppresszor génhez kötődve gátolja annak sejtciklus-szabályozó hatását. Az utóbbi folyamat „mellékterméke” a p16 protein, egy ciklindependens kináz inhibitor expressziójának fokozódása, ami a HPV-fertőzés széles körben alkalmazott helyettesítő markere (171–173).

A HPV okozta fej-nyaki daganatok incidenciája gyorsan emelkedik a fejlett nyugati országokban. A HPV előfordulása a leggyakoribb a szájgarat tumoraiban (40–80%) (174, 175). Szájüregi, algarat-, illetve gégerákokban ritkábban, kb. 10–20%-ban fordul elő (HPV-DNS PCR-rel vagy a p16 immunhisztokémiai kimutatásával; a specifikusabb, ugyanakkor kevésbé szenzitív kimutatási módszerrel, az *in situ* hibridizációval 10% alatti gyakoriságot mértek) (175). A HPV-asszociált szájgaratrákok megjelenése, viselkedése általában eltér a HPV-negatív daganatokétól. Gyakrabban fordulnak elő fiatal korban, nem dohányzóknál, férfiakban; szövettani megjelenésükben is sokszor eltérések figyelhetők meg (171, 173). Fontos különbség, hogy prognózisuk általában kedvezőbb, terápiás érzékenységük jobb, mint a HPV-független laphámrákoké (171, 176).

1.8.2. Kezelési lehetőségek HNSCC-ben

A betegség stádiumától függően a HNSCC elsődleges kezelése a sebészi és/vagy sugárterápia, melyek alkalmazásánál korai (I/II-es) stádiumban a gyógyulás aránya magas. A betegek nagy része azonban III/IVa-B (lokoregionálisan előrehaladott) stádiumú daganattal jelentkezik, melynek prognózisa meglehetősen rossz. Kezelése sebészi, sugár- és kemoterápiát magában foglaló multimodális megközelítést igényel. Egy lehetséges alternatív módszer az indukciós kemoterápia (ICT) (más néven neoadjuváns kemoterápia) majd a reagálóknál sugár- vagy kemoterápia szervkímélés céljából, illetve műtét a nem reagálóknál. A TPF (docetaxel, ciszplatin, 5-fluorouracil) séma hatékonyabbnak bizonyult, mint a PF (ciszplatin, 5-fluorouracil) protokoll (177, 178).

Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) a tumorok 80-90%-ában túlexpresszált. Az anti-EGFR antitest cetuximab javította a túlélést sugárterápiával együtt alkalmazva lokálisan előrehaladott HNSCC-ben, illetve kemoterápiával kezelt rekurrens/metasztatikus betegekben (179). A TPF indukciós kemoterápiához való hozzáadása növelheti a terápia hatékonyságát, de megnövekedett toxicitás árán (180, 181).

A lokálisan előrehaladott daganatok esetén magas a kiújulás vagy áttét kialakulásának esélye, mely jelentősen rontja a betegek prognózisát. Recidív/metasztatikus tumorok kezelésére platinaalapú kemoterápiát alkalmaznak cetuximabbal kiegészítve. Progresszió esetén – egyéb kemoterápiás szerek mellett – már a PD-1-gátló ICI-terápia is lehetséges opció (179, 182–185). Egyéb immunterápiás klinikai vizsgálatok is folynak HNSCC-s betegek bevonásával (nem csak recidív, ill. metasztatikus stádiumban), főként vakcinációval, illetve adoptív sejterápiával (186, 187). Korábbi vizsgálatokban hatékonyak bizonyult különböző citokinkészítmények lokális neoadjuváns adása (186).

1.8.3. A fej-nyaki daganatokat infiltráló immunsejtek prognosztikai jelentősége

A CD3⁺, ill. CD8⁺ T-limfociták infiltrációja – számos más daganattípushoz hasonlóan – HNSCC-ben (illetve lokalizáció szerinti csoportjaiban) is kedvező túléléshez kapcsolódott, továbbá korrelált a kemoradioterápia hatásosságával (185, 188–190). Érdekes módon, a legtöbb ráktípussal ellentétben a regulátor T-sejtek nagy mennyisége jobb prognózissal mutatott összefüggést (185, 188). Az egyéb immunsejt-típusok közül a dendritikus sejtek esetén írtak le pozitív prognosztikus hatást, valamint a többi daganatfajtaéhoz viszonyítva nagyobb mennyiségben jelenlevő NK-sejteknél (188, 191, 192).

Bár a HPV és az immunrendszer közötti kapcsolat jól dokumentált (193), a HPV- vagy p16-státusz és a daganatok lokális immunparaméterei közötti összefüggés kevésbé egyértelmű. A szájgaratrákokon végzett vizsgálatok többségében a TIL és a T-limfociták mennyisége magasabb volt a HPV-pozitív esetekben (194–196), a nem csak erre a lokalizációra korlátozódó tanulmányokban azonban ellentmondó eredmények születtek (190, 192). Egy génexpressziós profilon és a HPV-státuszon alapuló, 5 HNSCC-altípust eredményező osztályozás szerint az immun-mezenhimális alcsoportok a HPV-státusztól függetlenül fokozott CD8⁺ T-sejtes infiltrációt mutatnak (197).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk középpontjában a daganatokat infiltráló immunsejtek prognosztikai és prediktív értékének tanulmányozása állt, elsősorban melanómás valamint fej-nyaki laphámrákos betegekben. Célul tűztük ki ezen belül:

- primer melanómákat infiltráló, a tumorelles immunválasz kialakulásában és szabályozásában kulcsszerepet játszó immunsejttípusok, így az antigénprezentáló dendritikus sejtek, aktivált T-limfociták, regulátor T-sejtek és B-limfociták prognosztikai szerepének és klinikopatológiai paraméterekkel mutatott összefüggéseinek meghatározását;
- szintén primer melanómában az immunsejtek és a vaszkularizáció kapcsolatának feltárását (CD34⁺ mikroerek, MECA-79⁺ HEV, ill. VAP-1⁺ erek és különböző immunsejt-típusok párhuzamos jelölésével);
- melanómás betegek őrszemnyirokcsomóiban az immunaktivációhoz, illetve -szuppresszióhoz kapcsolható sejttípusok (érett DC-k, aktivált T-limfociták, regulátor T-sejtek, plazmacitoid DC-k) megjelenésének összevetését nem szentinel nyirokcsomókkal, továbbá ezek prognosztikai szerepének vizsgálatát;
- ipilimumabterápiában részesülő metasztatikus melanómás betegek kezelés előtti áttéti tumormintáit infiltráló immunsejtek mennyisége összefüggésének feltárását a terápiás válasszal és a betegek túlélésével (11 immunsejtmarkerből álló panel alkalmazásával), továbbá a melanómasejtek HLA-expressziója és a T-sejt-infiltráció, illetve a betegség kimenetele közti korreláció vizsgálatát;
- lokális neoadjuváns leukocita-interleukin terápiában részesült szájüregi laphámrákos betegek tumormintáiban az infiltráló immunsejtek mennyiségének összehasonlítását kezeletlen kontroll tumorokéval, illetve elemzését a kezelésre adott válasz vonatkozásában;
- indukciós kemoterápiában és cetuximabkezelésben részesülő fej-nyaki laphámrákos betegek kezelés előtti tumorbiopsziás mintáiban többféle immunsejttípus mennyisége prediktív szerepének és klinikopatológiai paraméterekkel mutatott összefüggéseinek meghatározását.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A vizsgálatokba bevont betegek és szövetminták jellemzői

3.1.1. Primer melanómák vizsgálata

A primer melanómákat infiltráló immunsejtek vizsgálatát a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán, illetve az Országos Onkológiai Intézetben (OOI) 1980 és 2001 között operált, bőrmelanómában szenvedő betegek archivált sebészi tumormintáin végeztük; az aktivált T-limfociták esetén 76, a FOXP3⁺ sejteknél 97, a dendritikus sejteknél 82, a B-limfocitáknál 106, míg a mikroérdenzitás és az immunsejtek összefüggésének vizsgálatánál 52 beteg mintáin. A betegek és tumorok jellemzőit az 1–5. táblázat mutatja. Az ektópiás nyirokstruktúrák vizsgálatához 147 beteg primer melanóma mintáit használtuk fel; közülük 101 beteget 1980 és 2000 között operáltak a fenti két intézetben, míg 46-ot 1999 és 2001 között az OOI-ben (a beteg- és tumorparamétereket az Eredmények szekcióban található 12. táblázat mutatja be). A MECA-79⁺ erek vizsgálatát 118 beteg tumormintáin végeztük, közülük 47-et a Semmelweis Egyetemen operáltak az 1984 és 1997 közötti időszakban (1. kohorsz), míg 71-et az OOI-ben 1999 és 2001 között (2. kohorsz) (jellemzőiket ld. az Eredmények szekcióban található 14. táblázatban). A tumorbeli erek VAP-1-expresszióját 28 beteg (15 nő, 13 férfi) melanómamintáján tanulmányoztuk (medián tumorvastagság: 3,5 mm, 16 SSM, 10 NM, 2 ALM).

A prognosztikai vizsgálatokba a valós előfordulási gyakoriságuknál nagyobb mértékben vontunk be közepesen vastag és vastag melanómákat (>1,0 mm), melyek prognózisa a vékony tumorokénál bizonytalanabb. Klinikai regressziót vagy késői regresszió szövettani jeleit mutató daganatokat nem vontunk be a kutatásba. A melanómás eseteket a tumorvastagság szerint a vizsgálatok idején érvényes AJCC-stádiumbeosztás alapján 4 csoportba soroltuk ($\leq 1,0$, 1,01–2,0, 2,01–4,0, >4,0 mm), illetve a betegség progressziója szerint 3 kategóriába: nem metasztatizáló, a követési idő alatt csak regionális nyirokcsomókba metasztatizáló, illetve szervi áttétet (is) adó daganatok. A túlélő betegek esetén legalább öt éves követési idő állt rendelkezésre; ezalatt egy beteg sem halt meg a melanómával nem összefüggő ok következtében. A betegek a primer melanóma műtéti eltávolítását megelőzően nem részesültek szisztémás onkológiai kezelésben. A vizsgálatokat mindkét intézmény etikai bizottsága jóváhagyta.

1. táblázat. Az aktivált T-sejtek vizsgálatába bevont esetek klinikopatológiai paraméterei

Betegcsoport	Összes beteg	Nem metasztatizáló	Nyirokcsomóáttét ^a	Szervi áttét
Nem				
Férfi	32	12	6	14
Nő	44	22	5	17
Tumorokalizáció				
Végtagok	31	15	4	12
Törzs	40	18	6	16
Fej/nyak	5	1	1	3
Szöveti típus				
SSM	50	26	6	18
NM	23	7	4	12
ALM	2	1	1	0
LMM	1	0	0	1
Tumorvastagság				
≤1 mm	14	14	0	0
1,01–2,0 mm	15	6	3	6
2,01–4,0 mm	29	9	5	15
>4,0 mm	18	5	3	10
Ulceráció				
Van	38	12	7	19
Nincs	38	22	4	12
5 éves túlélés	47/76 (62%)	34/34 (100%)	11/11 (100%)	2/31 (6%)

^aAz 5 éves követési idő alatt csak regionális nyirokcsomóáttétek jöttek létre. SSM: felszínesen terjedő (superficial spreading) melanóma, NM: noduláris melanóma, ALM: akrolentiginózus melanóma, LMM: lentigo maligna melanóma

2. táblázat. A FOXP3⁺ sejtek vizsgálatába bevont esetek klinikopatológiai paraméterei

Betegcsoport	Összes beteg	Nem metasztatizáló	Nyirokcsomóáttét ^a	Szervi áttét
Kor (év) medián (tartomány)	54 (27–76)	50 (27–76)	58 (48–76)	56 (32–76)
Nem				
Férfi	43	16	4	23
Nő	54	29	4	21
Tumorokalizáció				
Végtagok	41	21	4	16
Törzs	53	23	4	26
Fej/nyak	3	1	0	2
Szöveti típus				
SSM	58	30	5	23
NM	33	13	2	18
ALM	4	1	1	2
LMM	1	0	0	1
dezmoplasztikus	1	1	0	0
Tumorvastagság				
≤1 mm	11	10	1	0
1,01–2,0 mm	21	12	3	6
2,01–4,0 mm	37	14	3	20
>4,0 mm	28	9	1	18
Ulceráció				
Van	48	15	4	29
Nincs	49	30	4	15
5 éves túlélés	55/97 (57%)	45/45 (100%)	8/8 (100%)	2/44 (5%)

^aAz 5 éves követési idő alatt csak regionális nyirokcsomóáttétek jöttek létre. SSM: felszínesen terjedő (superficial spreading) melanóma, NM: noduláris melanóma, ALM: akrolentiginózus melanóma, LMM: lentigo maligna melanóma

3. táblázat. A dendritikus sejtek vizsgálatába bevont esetek klinikopatológiai paraméterei

Betegcsoport	Összes beteg	≤1 mm	1,01–2,0 mm	2,01–4,0 mm	>4,0 mm
Kor					
≤50 év	38	11	8	10	9
>50 év	44	7	6	19	12
Nem					
Férfi	34	5	6	12	11
Nő	48	13	8	17	10
Tumorokalizáció					
Végtagok	32	7	7	10	8
Törzs	44	10	6	18	10
Fej/nyak	6	1	1	1	3
Szövettani típus					
SSM	52	18	12	15	7
NM	27	0	0	13	14
ALM	2	0	1	1	0
LMM	1	0	1	0	0
Áttétképzés					
Nem metaszt.	38	16	5	10	7
Nyirokcs. áttét ^a	13	2	3	4	4 ^b
Szervi áttét	31	0	6	15 ^c	10
Ulceráció					
Van	37	1	5	16	15
Nincs	45	17	9	13	6
5 éves túlélés	53/82 (65%)	18/18 (100%)	10/14 (71%)	14/29 (48%)	11/21 (52%)

^aAz 5 éves követési idő alatt csak regionális nyirokcsomóáttétek jöttek létre. SSM: felszínesen terjedő (superficial spreading) melanóma, NM: noduláris melanóma, ALM: akrolentiginózus melanóma, LMM: lentigo maligna melanóma

4. táblázat. A B-sejtek vizsgálatába bevont esetek klinikopatológiai paraméterei

Betegcsoport	Összes beteg	Nem metasztatizáló	Nyirokcsomóáttét ^a	Szervi áttét
Kor (év) medián (tartomány)	53 (16–76)	53 (27–76)	52 (32–76)	55 (16–76)
Nem				
Férfi	45	19	9	17
Nő	61	34	7	20
Tumorokalizáció				
Végtagok	42	23	5	14
Törzs	57	28	9	20
Fej/nyak	7	2	2	3
Szöveti típus				
SSM	66	38	9	19
NM	37	14	6	17
ALM	2	1	1	0
LMM	1	0	0	1
Tumorvastagság				
≤1 mm	17	15	2	0
1,01–2,0 mm	23	11	5	7
2,01–4,0 mm	38	17	5	16
>4,0 mm	28	10	4	14
Ulceráció				
Van	46	17	6	23
Nincs	60	36	10	14
5 éves túlélés	71/106 (67%)	53/53 (100%)	16/16 (100%)	2/37 (5%)

^aAz 5 éves követési idő alatt csak regionális nyirokcsomóáttétek jöttek létre. SSM: felszínesen terjedő (superficial spreading) melanóma, NM: noduláris melanóma, ALM: akrolentiginózus melanóma, LMM: lentigo maligna melanóma

5. táblázat. A mikroérsűrűség és immunsejtdenzitás kapcsolatának vizsgálatába bevont esetek klinikopatológiai paraméterei

Betegcsoport	Összes beteg	Nem metasztatizáló	Nyirokcsomóáttét ^a	Szervi áttét
Nem				
Férfi	24	8	4	12
Nő	28	11	4	13
Tumorokalizáció				
Végtagok	21	8	3	10
Törzs	29	11	5	13
Fej/nyak	2	0	0	2
Szöveti típus				
SSM	30	11	4	15
NM	19	7	3	9
ALM	2	1	1	0
LMM	1	0	0	1
Tumorvastagság				
1,01–2,0 mm	13	5	3	5
2,01–4,0 mm	23	9	3	11
>4,0 mm	16	5	2	9
Ulceráció				
Van	35	11	5	19
Nincs	17	8	3	6
5 éves túlélés	28/52 (54%)	19/19 (100%)	8/8 (100%)	1/25 (4%)

^aAz 5 éves követési idő alatt csak regionális nyirokcsomóáttétek jöttek létre. SSM: felszínesen terjedő (superficial spreading) melanóma, NM: noduláris melanóma, ALM: akrolentiginózus melanóma, LMM: lentigo maligna melanóma

3.1.2. Melanómás betegek őrszemnyirokcsomóinak vizsgálata

A vizsgálatokban 60, 1 mm-nél vastagabb primer melanómás beteg SLN-mintáit használtuk, akiknél az OOI-ben 1999 és 2001 között végeztek őrszemnyirokcsomó-biopsziát. A műtét előtt a betegek nem részesültek szisztémás onkológiai kezelésben. Az őrszemnyirokcsomó-disszekció a betegek többségében (47 esetben) a primer melanóma eltávolításával egyidejűleg történt, míg 13 esetben 2–10 (medián: 4) héttel annak (más intézetben végzett) eltávolítása után. Az SLN-disszekciót kettős jelöléssel (^{99m}Tc-albumin és patentkék festék) végezték, a korábban leírtak szerint (198, 199). Az őrszemnyirokcsomók szövettani vizsgálata sorozatmetszeteken, hematoxilin-eozin festéssel és Melan A/MART-1 immunhisztokémiai jelöléssel történt. Az ötéves követési idő alatt 38 beteg nem mutatott progressziót; közülük 28 esetén negatív őrszemnyirokcsomó-státuszt írtak le, 4 betegnél izolált tumorsejteket vagy 0,1 mm alatti átmérőjű metasztatizist, 3 betegnél 0,1 és 1,0 mm közötti, míg 3-nál 1,0 mm fölötti

átmérőjű áttétet találtak. A 22 progrediáló beteg közül 7-nél negatív SLN-státuszt, 6 esetben 0,1–1,0 mm közötti, míg 9 esetben 1,0 mm feletti átmérőjű metasztázist detektáltak. Összesen 100 (69 tumormentes és 31 tumorpozitív) őrszemnyirokcsomót elemeztünk; a klinikopatológiai jellemzőket a 6. táblázat mutatja. A túlélő betegek esetén legalább ötéves követési idő állt rendelkezésre; ezalatt egy beteg sem halt meg a melanómával nem összefüggő ok következtében. A 22, progressziót mutató beteg közül 17 halt meg az ötéves periódus alatt. Hét beteg esetén nyirokcsomó-blokkdisszekciós minták is rendelkezésre álltak (35 tumormentes és 2 áttétes nyirokcsomó). A vizsgálatokat jóváhagyta az OOI etikai bizottsága, valamint az ETT TUKEB (engedélyszám: 84-61/2008-1018EKU).

6. táblázat. Az őrszemnyirokcsomók vizsgálatába bevont esetek klinikopatológiai paramétereit

Betegcsoport	Összes beteg	SLN-negatív	SLN-pozitív
Kor (év) medián (tartomány)	54 (24–79)	54 (24–79)	54 (24–76)
Nem			
Férfi	27	16	11
Nő	33	19	14
Tumorokalizáció			
Végtagok	31	18	13
Törzs	29	17	12
Szöveti típus			
SSM	37	24	13
NM	19	10	9
ALM	4	1	3
Tumorvastagság			
1,01–2,0 mm	29	21	8
2,01–4,0 mm	20	8	12
>4,0 mm	11	6	5
Ulceráció			
Van	37	26	11
Nincs	20	9	11
Nem ismert	3	0	3
Progresszió 5 év alatt			
Nincs	38	28	10
Van	22	7	15
5 éves túlélés	43/60 (72%)	31/35 (89%)	12/25 (48%)

SSM: felszínesen terjedő (superficial spreading) melanóma, NM: noduláris melanóma, ALM: akrolentiginózus melanóma

3.1.3. Ipilimumabkezelésben részesülő melanómás betegek áttéteinek vizsgálata

2010 és 2014 között négy magyarországi centrumban (Országos Onkológiai Intézet, Szegedi Tudományegyetem, Pécsi Tudományegyetem, Debreceni Egyetem) ipilimumabterápiában részesülő, metasztatikus melanómás betegek kezelés előtti, sebészileg eltávolított, archivált tumormintáin végeztük a vizsgálatokat. Csak olyan eseteket vontunk be, amelyeknél rendelkezésre állt az ipilimumabkezelés kezdetét megelőző 1 éven belül operált áttéti minta. Harminc beteg 87 tumormintáját tanulmányoztuk, 52 nyirokcsomó-, illetve 35 bőr/szubkután áttétet. A primer melanóma 28 esetben bőreredetű volt, míg 2 esetben ismeretlen. A betegek nagy többsége (n=26) az ipilimumabot megelőzően legalább egy szisztémás kezelésben részesült; mindegyikük kapott kemoterápiát, míg 8 sugárterápiát, egy beteg BRAF-inhibitort, 2 páciens pedig elektrokemoterápiát is. 26 beteg megkapta a 4 ciklus ipilimumabkezelést, míg 4 beteg csak 3 ciklust (három beteg progresszió, egy pedig mellékhatások miatt). A terápiás válasz értékelése az immunfüggő válasz kritériumok (irRC) (200) alapján történt. Vizsgálatunkban reagálóknak tekintettük azokat a betegeket, akiknél a legjobb terápiás válasz teljes vagy részleges regresszió volt, vagy legalább 6 hónapig tartó betegségstabilizáció. A 30 beteg közül 13 tartozott ebbe a csoportba, köztük három 2 évnél tovább tartó (27, 49, 57+ hónapos) komplett választ mutatott. A betegek és tumorminták jellemzőit a 7. táblázat mutatja. A vizsgálatokat az ETT TUKEB jóváhagyta (engedélyszám: 2506-3/2017/EKU, 12120-1/2019/EKU).

7. táblázat. Az ipilimumabterápiában részesülő melanómás betegek áttéti mintáinak vizsgálatába bevont esetek klinikopatológiai paraméterei

Betegcsoport	Kezelésre reagálók	Kezelésre nem reagálók	p-érték
Kor (év) – medián (tartomány)	67 (51–78)	53 (30–66)	0,0000 ^a
Nem			
Férfi	5	8	
Nő	8	9	n.s. ^b
Stádium			
III N3	1	0	
IV M1a	4	2	
IV M1b	3	5	
IV M1c	5	10	n.s. ^b
Érintett szervek száma			
1–2	8	14	
>2	5	3	n.s. ^b
ECOG státusz			
0	10	10	
1	3	5	
2	0	2	n.s. ^b
LDH-szint			
Normális	10	8	
Emelkedett	3	9	n.s. ^b
BRAF V600 mutáció			
Van	5	3	
Nincs	4	6	
Nem ismert	4	8	n.s. ^b
PFS (hónap) – medián (tartomány)	9 (6–57)	2 (1–5)	0,0000 ^a
OS (hónap) – medián (tartomány)	30 (10–61)	7 (2–30)	0,0000 ^a
Értékelt minták – összes	34	53	
Nyirokcsomóáttétek	20	32	
Bőr/sc. áttétek	14	21	

^aMann–Whitney-teszt, ^b χ^2 -teszt, n.s.: nem szignifikáns, LDH: tejsav-dehidrogenáz, ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group, PFS: progressziómentes túlélés, OS: teljes túlélés

3.1.4. Neoadjuváns leukocita-interleukin terápiában részesülő szájüregi laphámrákos betegek tumormintáinak vizsgálata

Két, lokális leukocita-interleukin (LI) injekciót alkalmazó neoadjuváns terápiát vizsgáló klinikai trial-ben részt vevő, szájüregi laphámrákos (oral squamous cell carcinoma, OSCC) betegek tumormintáit tanulmányoztuk, kezeletlen OSCC-s betegek daganatmintáit használva kontrollként. Az első (multicentrikus, fázis I/II) vizsgálatban három különböző LI-dózist hasonlítottak össze: alacsony dózis (400 IU IL-2-ekvivalens hetente háromszor; 8 beteg), közepes dózis (800 IU hetente háromszor; 12 beteg), nagy dózis (800 IU hetente ötször; 7

beteg). A betegek átlagéletkora 55,6 év volt (tartomány: 43–74 év); 23 férfi volt és 4 nő. Tumorlokalizáció szerinti megoszlás: nyelv (13), szájfenék (10), retromoláris (2), szájgarat (1), ajak (1). A 27 kezeletlen kontroll beteg átlagéletkora 57,8 (43–77) év volt, szintén 23 férfi és 4 nő, tumorlokalizáció: nyelv (18), szájfenék (4), ajak (5). A második, fázis II-es multicentrikus vizsgálatban nagy dózisban alkalmazták a leukocita-interleukint (800 IU hetente ötször), 21 betegnél, akiknek átlagéletkora 59,4 (40–87) év volt. Közülük 19-nél volt a daganat patológiailag értékelhető, ezek tumorlokalizáció szerinti megoszlása: nyelv (8), szájfenék (7), ajak (1), szájgarat (1), íny (1), pofa (1). A 20 kezeletlen kontroll beteg átlagéletkora 57,5 (40–77) év volt, lokalizációk: nyelv (12), szájfenék (3), ajak (5).

A klinikai trial-ek a CEL-SCI Corporation (Vienna, VA, USA) szponzorálásával, több magyarországi centrum részvételével folytak; a patológiai vizsgálatokat az Országos Onkológiai Intézetben végezték (a kezeletlen kontroll tumorminták is az OOI archívumából származtak). A próbaexcízió alapján T2-3N0-2M0 stádiumba sorolt daganatok szerepeltek a vizsgálatokban. A leukocita-interleukin készítményt humán perifériás vér mononukleáris sejtekből preparálták (Chesapeake Biological Laboratories, Baltimore, MD, USA) a CEL-SCI számára. A két hetes lokális LI-kezelést kiegészítve a betegek egyszeri intravénás ciklofoszfamid-kezelésben (300 mg/m²) is részesültek, illetve az LI adása idején indometacint (3×25 mg naponta), cink-szulfátot (50 mg naponta) és multivitamint is szedtek. A reziduális tumor sebészi eltávolítása az LI-terápia kezdetét követő 21–28 napon belül történt az első vizsgálatban, míg a másodikban a terápia befejezését követő 14–54. (medián: 22.) napon.

3.1.5. Indukciós kemoterápiában (ICT) és cetuximabkezelésben részesülő fej-nyaki daganatos betegek tumorbiopsziás mintáinak vizsgálata

Az Országos Onkológiai Intézetben 2007 és 2010 között végzett fázis II-es klinikai vizsgálatban 50, III/IV-es stádiumú, kezeletlen, operálható fej-nyaki rákos beteg 2 ciklus TPF (75 mg/m² docetaxel, 75 mg/m² ciszplatin, 750 mg/m² 5-FU) indukciós (neoadjuváns) kemoterápiában és cetuximabkezelésben (400 mg/m² induló dózis, majd 250 mg/m² hetente) részesült. Az indukciós terápiára reagáló betegek 70 Gy besugárzást és hetente 250 mg/m² cetuximabot kaptak, míg a nem reagálók aktív kombinált kezelésmódban részesültek (műtét és sugárterápia, vagy sugárterápia ciszplatinnal, illetve cetuximabbal vagy ezek nélkül). A betegek medián életkora 56 (40–75) év volt, 43 férfi és 7 nő. Többségük (80%) dohányzott (>10 csomag/év), 54% napi 1 egységnél nagyobb mennyiségű alkoholt fogyasztott. A T-stádium az esetek 70%-ában T3-4 volt, a lokalizáció szerinti megoszlás: szájgarat (19 eset), algarat (15), szájüreg (10), gége (6). Az indukciós terápia előtti biopsziás mintákban

értékeljük a HPV-státuszt (a p16-expresszió alapján), valamint az infiltráló immunsejteket; előbbihez 47, utóbbihoz 45 eset biopsziás mintája állt rendelkezésre (a tumorszövet néhány mintában tapasztalható elégtelen mennyisége miatt az egyes immunsejttípusok megbízható eredményű kvantitatív értékelését 35–40 mintán tudtuk elvégezni). Az ICT-re adott terápiás válasz értékelése CT-vel vagy MRI-vel történt; 47 beteg volt értékelhető, 33 részleges választ, 13 betegségstabilizációt, egy beteg progressziót mutatott. A tumormintákon végzett vizsgálatokat az ETT TUKEB jóváhagyta (engedélyszám: 2506-3/2017/EKU).

3.2. Immunhisztokémia paraffinos metszeteken

A formalinban rögzített, paraffinba ágyazott szövetblokkokból készített, 3-5 µm vastag metszetek deparaffinálását követően mikrohullámú készülékben, illetve vízfürdőben, citrátpufferben történt az antigénfeltárás. Az endogén peroxidázaktivitás blokkolására a metszeteket metanolban oldott 3%-os H₂O₂-ben inkubáltuk, majd a nonspecifikus fehérjekötőhelyek blokkolása következett 3%-os BSA, 20%-os kecskeszérum, illetve fehérjementes proteinblokkoló (DAKO, Glostrup, Dánia) felhasználásával. A vizsgálatokban a következő primer antitesteket alkalmaztuk: poliklonális anti-CD3, monoklonális anti-CD8, -CD20cy, -CD34, -CD45, -CD45RO, -CD68, -Ki-67, -mieloperoxidáz (DAKO), monoklonális anti-CD4, -CD25, -CD56, -CD57 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), monoklonális anti-CD1a, -CD208 (DC-LAMP; Coulter-Immunotech, Marseille, Franciaország, majd Beckman Coulter, Miami, FL, USA), monoklonális anti-CD4, -PD-1 (Cell Marque, Rocklin, CA, USA), monoklonális anti-CD123, -CD134 (BD Biosciences, Heidelberg, Németország), monoklonális anti-CD16, -CD137 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), monoklonális anti-FOXP3 (236A/E7) és anti-HLA-A,B,C (EMR8-5) (Abcam, Cambridge, MA, USA), monoklonális anti-NKp46 (R&D Systems, Abingdon, UK). A HCA2 (főként HLA-A alléleket felismerő), HC10 (főként HLA-B és -C alléleket felismerő), NAMB1 (anti-β2M) és LGII-612.14 (anti-HLA-DR,DQ,DP) monoklonális ellenanyagokat Soldano Ferrone (Harvard Medical School, Boston, MA, USA) bocsátotta rendelkezésünkre. A jelölések 4° C-on, éjszakán át történtek. A korábbi vizsgálatokban másodlagos ellenanyagként biotinilált anti-egér/nyúl Ig-t (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), majd sztreptavidin-peroxidáz kezelést használtunk (LSAB2 System, HRP, DAKO), míg a későbbiekben polimerkonjugált detekciós rendszert (SSTM One-Step Polymer-HRP IHC Detection System, BioGenex, Fremont, CA, USA). Az ellenanyag-kötődést 3-amino-9-etilkarbazollal (AEC; Vector Laboratories) vagy 3,3'-diaminobenzidinnel (DAB, BioGenex) tettük láthatóvá. A

háttérfestés hematoxilinnel történt. A monoklonális anti-VAP-1 antitestet S. Jalkanen laboratóriumában állították elő (201). A MECA-79 patkány monoklonális ellenanyaghoz (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) biotinilált anti-patkány IgG-t (Vector Laboratories), majd sztreptavidin-HRP-t (Chemicon International, Temecula, CA, USA) használtunk. A fej-nyaki daganatokban a p16 immunhisztokémiai kimutatása Ventana Benchmark Autostainerrel történt (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA), a CINtec® p16 hisztológiai teszt (E6H4 klón) alkalmazásával. A tumorsejtek >70%-ának erős, diffúz magi és citoplazmai festődését értékeltük pozitívnak.

Kettős festéseknél az első primer antitest előhívása biotin/sztreptavidin-peroxidáz rendszerrel (LSAB2 System, HRP, DAKO) történt Vector SG kromogénnel (Vector Laboratories), a második primer antitesté pedig sztreptavidin-alkalikus foszfatáz kezeléssel (LSAB2 System, Alkaline Phosphatase, DAKO) fukszin kromogénnel (Vector Laboratories). Háttérfestést nem alkalmaztunk.

3.3. Az immunhisztokémiailag jelölt immunsejtek és erek mennyiségi értékelése

A metszeteket egy 10×10 négyzetből álló, az okulárba illeszthető fokhálózat segítségével értékeltük, melynek területe 200× nagyításnál 0,25 mm². Az értékelést két, a klinikai adatokat nem ismerő vizsgáló végezte egymástól függetlenül, majd számolásaik eredményének átlagát használtuk az elemzésekhez.

3.3.1. Infiltráló immunsejtek és mikroerek mennyiségi értékelése primer melanómákban

Mínt hogy a jelölt sejtek és struktúrák eloszlása a tumorokban igen heterogén volt, a teljes tumorterületet értékeltük; kifehélyesedett tumorok esetén az ulcerált területeket nem vettük figyelembe. A pozitív sejtek, ill. erek mm²-enkénti számát adtuk meg, külön-külön értékelve az intratumorális (a melanóma-sejtfészkeket infiltráló) és peritumorális területeket (a melanómák alapja, ill. szegélye mentén 500 µm távolságon belül). A FOXP3-jelölés esetén emellett a pozitív limfociták százalékos arányát is meghatároztuk a legtöbb jelölt sejtet tartalmazó 3 látótérben az adott terület teljes sejtszámára vonatkoztatva. Az igen nagy mennyiségben jelenlevő CD8⁺ és CD45RO⁺ T-sejtek értékelését a hotspot-technikával végeztük, az 5 legerősebb infiltrációt mutató látótérben. A CD68⁺ makrofágok és CD34⁺ mikroerek denzitásának meghatározása szintén a hotspot-módszerrel történt.

Meghatároztuk a jelentős immunsejtdenzitást (illetve mikroérsűrűséget) mutató daganatos betegek részarányát is, küszöbértékként általában az adott sejttípus összes tumormintára vonatkozó denzitásának medián értékét használva (esetenként kisebb módosítással a túlélési analízisben mutatott nagyobb diszkriminációs potenciál érdekében). Az egyes sejttípusokra jellemző immunhisztokémiai markereknél az intra-, ill peritumorális denzitásokra a következő küszöbértékeket állapítottuk meg: CD8: 61 és 432 sejt/mm², CD45RO: 97 és 765 sejt/mm², CD25: 12 és 75 sejt/mm², CD134: 5 és 20 sejt/mm², FOXP3: 30 és 220 sejt/mm² (illetve a jelölt sejtek százalékos arányára 11%), CD1a: 25 és 30 sejt/mm², DC-LAMP (csak peritumorálisan volt jelen): 13 sejt/mm², CD20: 3 és 170 sejt/mm², MECA-79: 9 ér/mm².

3.3.2. Immunsejtek mennyiségi értékelése melanómás betegek őrszemnyirokcsomóiban

A metszeteket alacsony nagyítással átnéztük, majd az 5 területen, mely a legnagyobb mennyiségben tartalmazta a jelölt sejteket, 400× nagyításnál számoltuk meg a pozitív sejteket. Azoknál a betegeknél, akiknél több őrszemnyirokcsomó mintája is rendelkezésre állt, a jelölt sejtek átlagos denzitását is regisztráltuk a vizsgált nyirokcsomókban. Az egyes markerekhez küszöbértékként az adott változónak a teljes betegcsoportban meghatározott medián értékét állítottuk be (esetenként kisebb módosítással a túlélési analízisben mutatott nagyobb diszkriminációs potenciál érdekében), majd megadtuk a küszöbértéket meghaladó sejtdenzitású nyirokcsomókkal rendelkező betegek arányát. A FOXP3⁺, CD134⁺, CD123⁺ és DC-LAMP⁺ sejtekre megállapított küszöbértékek sorrendben a következők voltak: 1900, 73, 480, ill. 936 sejt/mm².

3.3.3. Immunsejtek mennyiségi értékelése ipilimumabkezelésben részesülő melanómás betegek áttéteiben

A nyirokcsomó-, illetve bőr- vagy szubkután metasztázisokon belül a jelölt sejtek számát metszetenként legalább 10 (medián: 20, tartomány: 10–80), véletlenszerűen kiválasztott látótérben regisztráltuk. A nekrotikus területeket az értékelésből kihagytuk, a kisebb áttéteket pedig teljes egészében értékeltük. A két, egymástól független vizsgáló eredményei közötti egybeesés kiváló volt (0,6814 és 0,9156 közötti korrelációs együtthatók az egyes immunsejtmarkerek esetén). Azoknak a betegeknél az esetében, akiknek több tumormintája is rendelkezésre állt, a vizsgált metasztázisokban a jelölődött sejtek átlagos denzitását is megadtuk. Az előzőekben ismertetett módon megállapított küszöbértékek a CD4, CD8, CD45RO, CD134, CD137, FOXP3, PD-1, CD20, NKp46, CD16 és CD68 markerekhez sorrendben a következők voltak: nyirokcsomóáttétek vizsgálatakor 46, 215, 430, 8, 10, 70, 83,

53, 5, 450, ill. 450 sejt/mm²; bőr/szubkután áttétek vizsgálatában 18, 21, 220, 4, 3, 20, 5, 4, 4, 370, ill. 500 sejt/mm²; az összes minta együttes vizsgálatában 24, 155, 440, 8, 7, 60, 28, 34, 4, 440, ill. 400 sejt/mm². Ezután meghatároztuk azon betegek arányát, akiknél az egyes markerekkel a jelölt sejtek átlagos denzitása a küszöbértéket meghaladta.

3.3.4. HLA-expressziós szint értékelése ipilimumabkezelésben részesülő melanómás betegek áttéteiben

A HLA-I alegységeit felismerő ellenanyagokkal történő festődést 0, 1, ill. 2-es pontszámmal értékeltük, amennyiben a jelölődő melanómasejtek aránya <25%, 25–75%, illetve >75% volt (az 1996-os 12. International Histocompatibility Workshop kritériumai alapján). A HLA-II jelölése esetén a pozitív tumorsejtek által elfoglalt terület százalékos arányát határoztuk meg az áttéteken belül. Azoknál a betegeknél, akiknek több tumormintája is rendelkezésre állt, minden marker esetén kiszámítottuk az átlagos pontszámokat. Megállapítottuk a tumorsejteken magas HLA-I-expressziót mutató betegek arányát az előzőekben leírtakhoz hasonlóan kijelölt küszöbértékek alapján (a HCA2 és HC10 antitestek esetén 1,5, az EMR8-5-re 1,9, a NAMB1-nél 1,2 volt a küszöbérték). A HLA-II jelölődése esetén 1%-os és 10%-os küszöbértéket használtunk.

3.3.5. Immunsejtek mennyiségi értékelése fej-nyaki daganatos betegek tumormintáiban

Mind a neoadjuváns leukocita-interleukin terápiában részesülő szájüregi laphámrákos betegek tumormintáinak, mind az indukciós kemoterápiában és cetuximabkezelésben részesülő fej-nyaki daganatos betegek tumorbiopsziás mintáinak vizsgálatában a tumorinfiltráló immunsejtek mennyiségének meghatározása a hotspot-technikával történt, az egyes immunsejttípusokat legnagyobb számban tartalmazó 5 látótérben. Az utóbbi vizsgálatban a CD20⁺ B-limfociták esetén, melyek a megbízható számolást kizáróan nagy mennyiségben voltak jelen a tumormintákban, a jelölt sejtek által elfoglalt tumorterület arányát határoztuk meg. Szintén az utóbbi vizsgálatban, az előzőekben ismertetett módon megállapított küszöbértékek a CD8, CD134, CD137, FOXP3, PD-1, NKp46, DC-LAMP, CD16, CD68 és mieloperoxidáz markerekre sorrendben a következők voltak: 1476, 392, 790, 1472, 92, 220, 176, 1810, 390, ill. 1825 sejt/mm², míg a B-sejtek arányára 8%.

3.4. VAP-1/laminin immunhisztokémia fagyasztott metszeteken

Fagyasztott tumormintákból kriosztáttal készített, 5 µm vastag metszeteken szimultán kettős jelölést végeztünk monoklonális anti-VAP-1 és poliklonális anti-α-laminin (DAKO) ellenanyagokkal. Másodlagos reagensként biotinilált anti-egér IgG-t majd sztreptavidin-FITC-et (Vector Laboratories), illetve TRITC-jelölt anti-nyúl immunglobulint (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) alkalmaztunk. A magfestés TOTO-3-mal történt (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Az immunfluoreszcens jelölődést MRC-1024 konfokális mikroszkóppal (BioRad Laboratories, München, Németország) vizsgáltuk.

3.5. Statisztikai elemzés

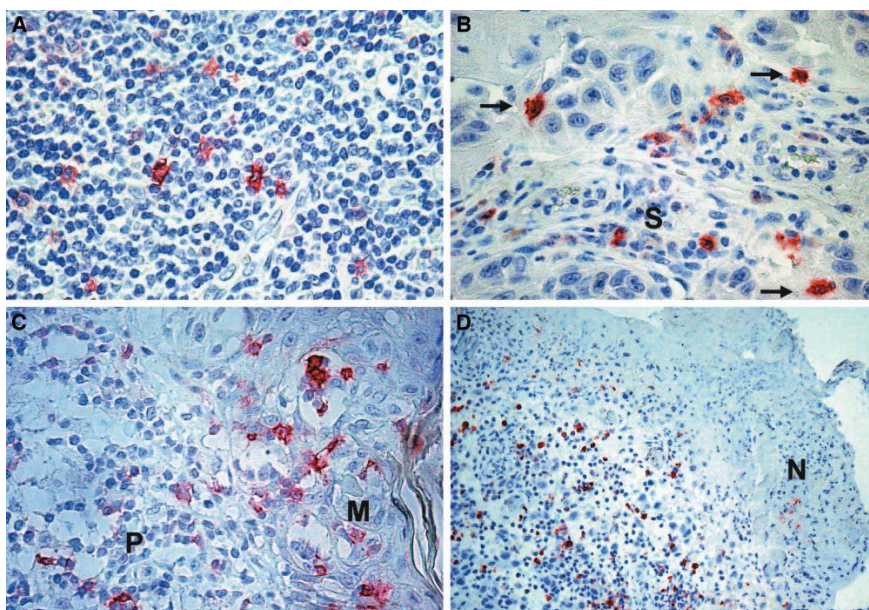
Az immunsejtek és erek denzitásának összehasonlítására a különböző csoportok között Mann–Whitney U-tesztet, illetve Kruskal–Wallis-tesztet, míg a magas denzitású minták részarányának összehasonlítására χ^2 -, illetve Fisher-egzakt tesztet alkalmaztunk. Az immunsejtdenzitások és a tumorvastagság, illetve HLA-expresszió, valamint az egyes immunsejtek mennyiségének egymással való korrelációját Pearson-teszttel, ill. Spearman-féle rangkorrelációs teszttel vizsgáltuk. A MECA-79⁺ erek és a különböző immunsejtek denzitása korrelációjának vizsgálatakor a Spearman-rangkorrelációt követően Benjamini és Hochberg módszerével ellenőriztük a többszörös tesztelésből adódó téves felfedezések arányát (ezt az arányt 0,1-re beállítva). A túlélési analízist a Kaplan–Meier-módszerrel, statisztikai elemzését log-rank (Mantel–Cox-), illetve generalizált Wilcoxon-teszttel végeztük. Egy- és többváltozós Cox-regressziós analízist is végeztünk, utóbbi esetén – a vizsgált immunológiai változók mellett – egyéb beteg- és tumorparaméterek bevonásával. A statisztikai elemzést a vizsgálatok többségében a BMDP Statistical Software Pack segítségével végeztük, míg az indukciós kemoterápiával kezelt HNSCC-s betegek mintáinak analízisére a MedCalc Version 12.1.3.0 programot használtuk. A 0,05 alatti p-értékeket tekintettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Aktivált T-limfociták vizsgálata primer melanómában

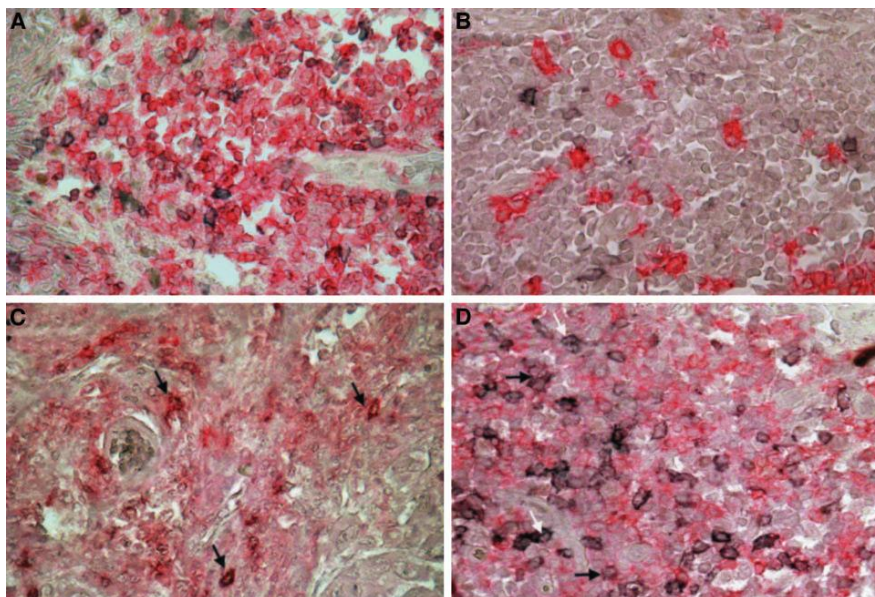
4.1.1. CD25 és OX40 T-sejt-aktivációs markereket hordozó limfociták immunhisztokémiai kimutatása

A CD25 és OX40 (CD134) expressziója főként kis limfocitákon volt kimutatható a melanóma-sejtfészkeken belül és az ezeket körülvevő strómában (3. ábra).



3. ábra. OX40⁺ limfoid sejtek a peritumorális (A) és intratumorális (B) infiltrátumban. Bár intratumorálisan a jelölt sejtek nagy része stromális elhelyezkedésű volt (S), a melanómasejtekkel érintkező OX40⁺ sejtek is detektálhatók (nyíl). C) CD25⁺ limfoid sejtek peritumorálisan (P) és a melanóma-sejtfészken belül (M). D) Nagy mennyiségű OX40⁺ sejt ulcerált melanómában a nekrotikus felszíni zóna alatt (N). (AEC kromogén, vörös)

Az aktivációs markerek és limfocita-alcsoportok markereinek (CD3, CD4, CD8, CD20) kettős festését követően a CD25 és OX40 kifejeződése a CD3-pozitív (T-sejtes) területeken volt megfigyelhető a melanómák infiltrátumában, ezen belül főleg CD4⁺, ritkábban CD8⁺ limfocitákon, míg CD20⁺ B-sejteken nem expresszálódtak (4. ábra).



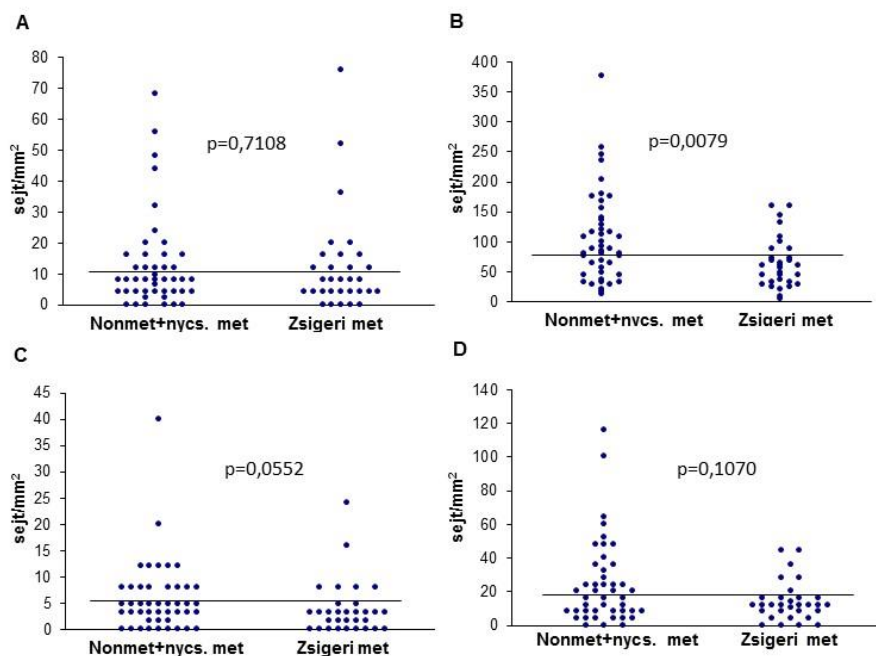
4. ábra. CD25 (Vector SG kromogén, szürke) és CD3 (A), CD20 (B), CD4 (C), ill. CD8 (D) markerek (fukszin kromogén, vörös) kettős jelölése primer melanómákban

A daganatok többségében az aktivált T-sejtek peritumorális denzitása meghaladta az intratumorális mennyiségüket, és mindkét lokalizációban a CD25⁺ sejtek domináltak (intra- és peritumorális CD25⁺ limfociták: 12,4±15,4 és 88,2±66,4 sejt/mm², intra- és peritumorális OX40⁺ limfociták: 4,9±6,3 és 19,8±21,0 sejt/mm²). A kifekélyesedett tuumorterületeken az ulcerált melanómák 37%-ában (14/38) igen magas volt a pozitív sejtek sűrűsége (3.D ábra), feltehetően a kifekélyeződés következtében kialakuló gyulladásos környezet hatására; az ilyen területeket ezért az értékelésben nem vettük figyelembe. A kétféle aktivációs markert expresszáló limfociták denzitása korrelált egymással ($p < 0,001$). A peritumorális OX40⁺ sejtek kivételével az infiltráció intenzitása egy statisztikailag nem szignifikáns csökkenő tendenciát mutatott a daganatvastagság növekedésével (nem mutatott eredmények).

4.1.2. Az aktivált T-sejtek infiltrációjának kapcsolata a tumorok áttétképző képességével

A CD25⁺ és OX40⁺ limfociták infiltrációjának intenzitását vizsgáltuk olyan daganatokban, melyek nem vagy csak a regionális nyirokcsomókba adtak áttétet az 5 éves követési idő alatt, összehasonlítva a zsigeri áttétet adó tumorokkal (5. ábra). A nem metasztatikus és a nyirokcsomóáttétet képző melanómákat együtt értékeltük, mivel nem volt szignifikáns különbség a vizsgált sejtek mennyiségében, továbbá a két betegcsoport túlélési adatai is azonosak voltak (100% 5 éves túlélés). A CD25⁺ mononukleáris sejtek intratumorális infiltrációja nem mutatott összefüggést az áttétképzéssel, az OX40⁺ limfociták intralézionális megjelenése azonban kifejezettebb volt a nem metasztatikus, illetve csak nyirokcsomóáttétet

adó melanómákban a távoli áttétet adókhöz viszonyítva ($p=0,0552$). A $CD25^+$ limfociták csökkent peritumorális denzitást mutattak a viszcerális áttétes tumorokban ($p=0,0079$); hasonló tendencia volt megfigyelhető az $OX40^+$ sejtek esetén ($p=0,1070$) (5. ábra).



5. ábra. Intratumorális (A) és peritumorális (B) $CD25^+$, ill. intratumorális (C) és peritumorális (D) $OX40^+$ limfociták nem metasztatikus + nyirokcsomó-áttétes, vs. zsigeri áttétet adó melanómákban. A pontok egyedi tumorokat jelentenek; a vízszintes vonalak a teljes betegcsoportra vonatkoztatott átlagérték alapján megadott küszöbértékek

Mindkét aktivációs markerhez küszöbértékeket állapítottunk meg az intra-, ill. peritumorális denzitásra (az adott markert hordozó sejtek mennyiségének az összes tumormintában meghatározott átlagértékei alapján, ld. az 5. ábrán), s kiszámítottuk a küszöbértéket meghaladó denzitást mutató esetek arányát az egyes betegcsoportokban. Összehasonlítva ezt az arányt a különböző áttétképző viselkedésű daganatokban nem találtunk különbséget a nem metasztatikus vagy csak nyirokcsomóáttétet adó és a zsigeri metasztázist képző melanómák között az intratumorális $CD25^+$ vagy $OX40^+$ T-sejtes infiltráció tekintetében. Erősen szignifikáns különbséget eredményezett ezzel szemben a két sejtpopuláció peritumorális mennyiségének összehasonlítása: a távoli áttétet adó daganatok között kisebb volt a jelentős mennyiségű aktivált T-sejtet tartalmazó minták aránya (8. táblázat). A szignifikancia akkor is megmaradt, ha a – kizárólag nem metasztatikus, intenzív $CD25^+$ és $OX40^+$ T-sejtes infiltrációval jellemzett – ≤ 1 mm vastagságú melanómákat az értékelésből kizártuk.

8. táblázat. A jelentős mennyiségű aktivált T-sejtet tartalmazó tumoros betegek aránya az áttétképzés szerinti csoportokban

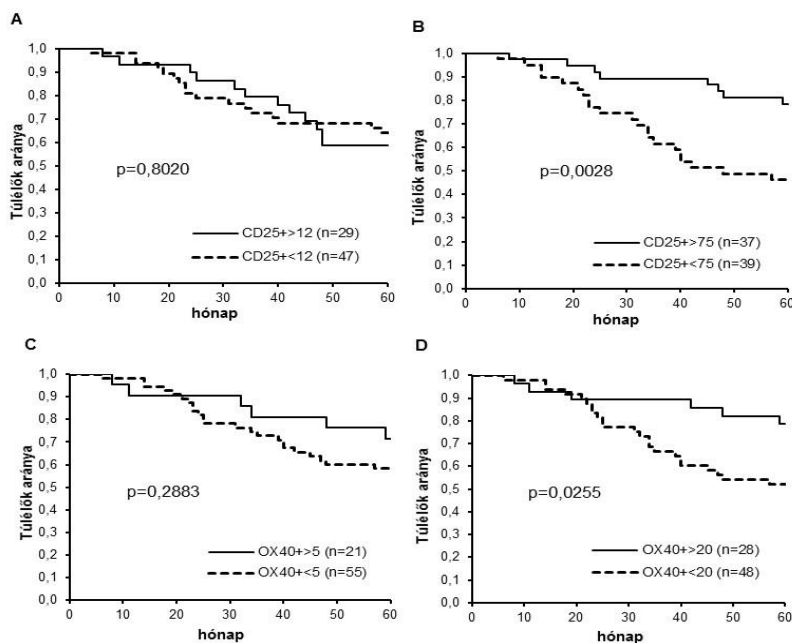
Betegcsoport	CD25					OX40			
	n	Intratumorális		Peritumorális		Intratumorális		Peritumorális	
	n	n (%)	p-érték	n (%)	p-érték	n (%)	p-érték	n (%)	p-érték
Összes	76	29 (38)		37 (49)		21 (28)		28 (37)	
Nem+nycs	45	17 (38)		29 (64)		15 (33)		22 (49)	
Zsigeri	31	12 (39)	n.s.	8 (26)	0,0009	6 (19)	n.s.	6 (19)	0,0087
>1,0 mm	62	21 (34)		29 (47)		15 (24)		20 (32)	
Nem+nycs	31	9 (29)		21 (68)		9 (29)		14 (45)	
Zsigeri	31	12 (39)	n.s.	8 (26)	0,0009	6 (19)	n.s.	6 (19)	0,0297

n: esetszám, nem+nycs: nem metasztatikus, ill. nyirokcsomó-áttétes, n.s.: nem szignifikáns

A küszöbérték feletti denzitású tumorok arányát összevetettük egyéb beteg- és tumorparaméterek (mint a beteg neme, a tumor vastagsága, szövettani típusa, lokalizációja, ill. ulcerációja) alapján képezett csoportokban is, de nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget.

4.1.3. Az aktivált T-sejtek infiltrációjának kapcsolata a túléléssel

A CD25⁺ vagy OX40⁺ sejtek intratumorális denzitása nem mutatott összefüggést a betegek túlélésével Kaplan–Meier-analízissel vizsgálva, a nagyfokú peritumorális infiltráció azonban mindkét marker esetén szignifikáns túlélésbeli előnnyel járt ($p=0,0028$, $p=0,0255$) (6. ábra).



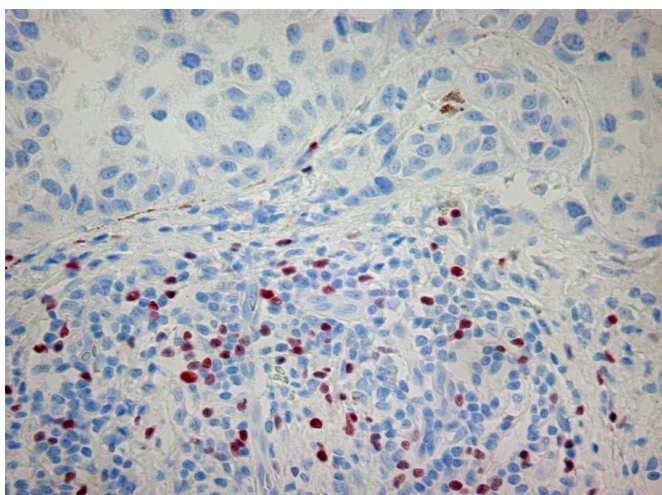
6. ábra. Kaplan–Meier görbék az intra- (A) és peritumorális (B) CD25⁺, ill. az intra- (C) és peritumorális (D) OX40⁺ sejtek denzitása alapján

A CD25 marker esetén a különbség szignifikáns maradt abban az esetben is, ha csak az 1,0 mm-nél vastagabb melanómákat értékeltük ($p=0,0032$), s OX40 esetén is hasonló tendencia mutatkozott ($p=0,0775$). A nagy mennyiségű peritumorális CD25⁺ vagy OX40⁺ T-sejtet tartalmazó tumoros betegek nagyobb része mutatott 5 évet meghaladó túlélést (78% vs. 49% és 79% vs. 52%). Többváltozós Cox-regressziós analízissel, melyben az aktivációs markereket hordozó T-sejtek mennyisége mellett egyéb potenciális prognosztikus faktorokat vizsgáltunk (a tumor vastagsága, lokalizációja, szövettani típusa, ulcerációja, valamint a beteg neme) a tumorvastagság mellett ($p=0,001$) az OX40⁺ sejtek peritumorális denzitása is független prognosztikus tényezőnek bizonyult ($p=0,035$).

4.2. FOXP3⁺ sejtek vizsgálata primer melanómában

4.2.1. FOXP3⁺ limfociták immunhisztokémiai kimutatása

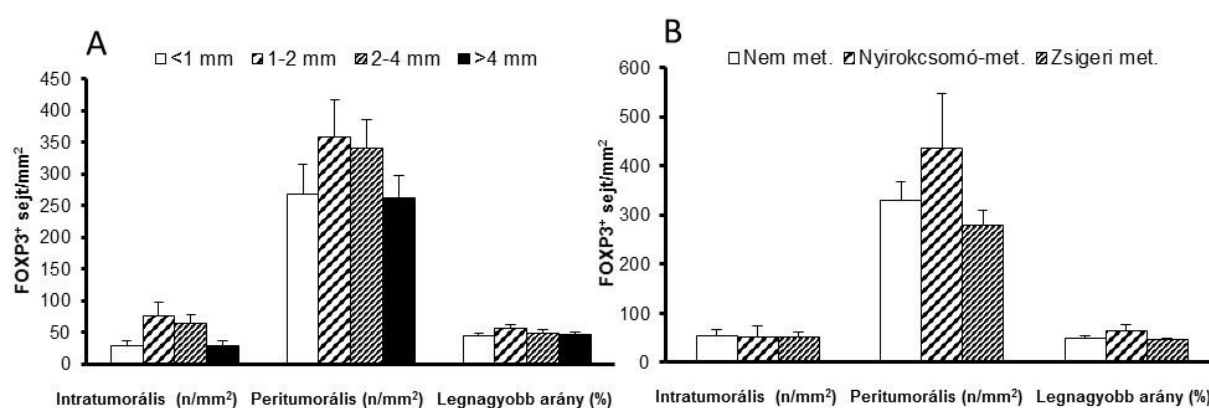
A melanómamintákban magi FOXP3-festődést főként kis limfocitákban észleltünk (7. ábra); igen ritkán melanómasejtek morfológiai jegyeit viselő nagyobb sejtekben is kimutatható volt magi reakció. A FOXP3⁺ limfociták nagyobb számban jelentek meg a peritumorális területeken a tumorsejtfészkekhez viszonyítva (átlag \pm SD: 292,2 \pm 211,5 vs. 48,8 \pm 63,3 sejt/mm²). Meghatároztuk a FOXP3⁺ sejtek százalékos arányát is a pozitív sejtek legmagasabb denzitását mutató 3 látótérben, ami az egész betegcsoportra nézve 11,9 \pm 5,8%-nak adódott.



7. ábra. FOXP3⁺ sejtek primer melanómában (AEC kromogén, vörös)

4.2.2. A FOXP3⁺ sejtek infiltrációjának kapcsolata klinikopatológiai paraméterekkel

A FOXP3⁺ limfociták intra-, ill. peritumorális infiltrációja vagy a pozitív sejtek aránya nem korrelált szignifikánsan a tumorvastagsággal ($r=0,1285$, $r=-0,1193$ és $r=-0,0048$; $p>0,05$). Bár a közepes vastagságú melanómák magasabb intratumorális denzitást mutattak ($p=0,0039$ Kruskal–Wallis-teszttel), nem találtunk hasonló különbséget a peritumorális denzitás és a pozitív sejtek aránya esetén (8.A ábra). Nem volt továbbá összefüggés a FOXP3⁺ sejtek mennyisége és az 5 éves követési periódus alatt megfigyelt áttétképzés között ($p=0,8292$, $p=0,2337$ és $p=0,1803$ az intra-, és peritumorális denzitás, illetve a pozitív sejtek aránya esetén; 8.B ábra).



8. ábra. A FOXP3⁺ sejtek intra- és peritumorális denzitása, ill. legmagasabb aránya melanómában a tumorvastagság (A) és az áttétképzés (B) függvényében

Mindhárom mérőszámra nézve meghatároztuk az adott paraméter teljes betegcsoportban mutatott medián értéke alapján felállított küszöbértékeket meghaladó mennyiségű jelölt sejtet tartalmazó tumorminták arányát, s értékeltük ennek összefüggését a daganatok vastagságával és az áttétképzéssel. Sem ezekkel, sem egyéb vizsgált klinikopatológiai paraméterrel (kor, nem, tumorlokalizáció, szövettani típus, ulceráció) nem mutatott kapcsolatot a FOXP3⁺ limfociták mennyisége.

4.2.3. A FOXP3⁺ sejtek infiltrációjának kapcsolata a túléléssel

Kaplan–Meier-görbén elemezve a FOXP3⁺ limfociták infiltrációjának esetleges prognosztikai jelentőségét, sem az intra- vagy peritumorális denzitásuk, sem a pozitív sejtek százalékos aránya nem mutatott szignifikáns összefüggést a betegek túlélésével ($p=0,4890$, $p=0,6245$, ill. $p=0,2711$). Az 5 évnél hosszabban túlélő betegek aránya hasonló volt a FOXP3⁺ sejtek mennyiségétől függetlenül (60% vs. 53%, $p=0,5327$, 59% vs. 54%, $p=0,6181$ és 51% vs.

62%, $p=0,2773$ a magas vs. alacsony intra-, peritumorális denzitásra, ill. a pozitív sejtek magas vs. alacsony arányára nézve).

4.3. Dendritikus sejtek vizsgálata primer melanómában

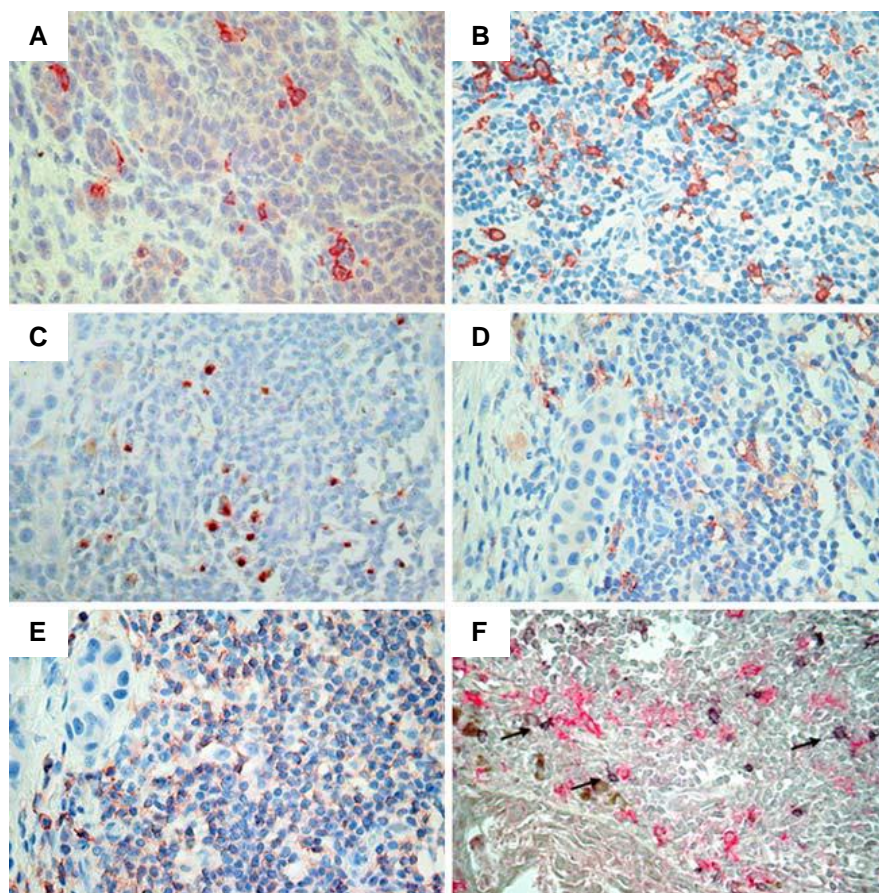
4.3.1. CD1a és DC-LAMP markereket hordozó dendritikus sejtek immunhisztokémiai kimutatása

A tumorokkal szomszédos normális epidermiszhez viszonyítva kevesebb CD1a-pozitív Langerhans-sejt volt megfigyelhető a melanómák fölötti epidermiszben. Ez a jelenség leginkább a felszínesen terjedő melanómák (SSM) vertikális fázisa, illetve a noduláris melanómák esetén volt jellemző, melyeknél jelentős csökkenést tapasztaltunk az esetek többségében (50%-nál nagyobb arányú csökkenés a 61 értékelhető tumorból 44-ben). A mind horizontális, mind vertikális növekedési fázist tartalmazó SSM-eknél ($n=24$) nagyobb mérvű csökkenést láttunk a Langerhans-sejtek számában a VGP fölött a HGP-hez viszonyítva (61,6% vs. 25,6% átlagos csökkenés, $p<0,001$). A noduláris melanómák esetén a csökkenés a VGP-hez hasonló mértékű volt (66,4%).

A melanómákon belül a CD1a⁺ dendritikus sejtek mind a tumorsejtszigeteken belül, mind peritumorálisan megtalálhatóak voltak (9.A,B ábra), hasonló mennyiségben [átlagos (\pm SD) intra- és peritumorális denzitás az egész betegcsoportra nézve: $26,6\pm 33,7$ és $30,5\pm 37,0$ sejt/mm²]. A horizontális és vertikális növekedési fázissal is rendelkező SSM-ekben a HGP-t a VGP-hez viszonyítva erősebb DC-infiltráció jellemezte (intratumorálisan: $47,0\pm 42,4$ vs. $22,1\pm 30,3$ sejt/mm², $p=0,0049$; peritumorálisan: $47,5\pm 37,6$ vs. $22,3\pm 28,6$ sejt/mm², $p=0,0032$).

Az érett dendritikus sejtekre jellemző DC-LAMP marker juxtanukleáris, pontszerű reakció formájában jelent meg; pozitív sejtek csaknem kizárólag a peritumorális kompartmentben voltak megtalálhatóak, limfocita-aggregátumokhoz asszociáltan (9.C ábra), $19,5\pm 23,3$ sejt/mm²-es átlagos denzitással. A melanóma-sejtfészkeket infiltráló DC-LAMP⁺ sejtet mindössze 5 esetben láttunk (átlagos intratumorális denzitás: $0,7\pm 3,1$ sejt/mm²). Egymást követő metszetek immunhisztokémiai festése a peritumorális CD1a⁺ és DC-LAMP⁺ DC-k kolokalizációját mutatta a T-sejtekben gazdag területeken (9.C-E ábra). A CD1a és CD25 vagy OX40 markerek kettős festésével a dendritikus sejtek és az aktivációs markereket hordozó T-limfociták kapcsolata volt megfigyelhető (9.F ábra). A DC-k és a CD25⁺, illetve OX40⁺ T-sejtek denzitása szignifikánsan korrelált; a legerősebb korreláció a CD1a⁺, ill. DC-

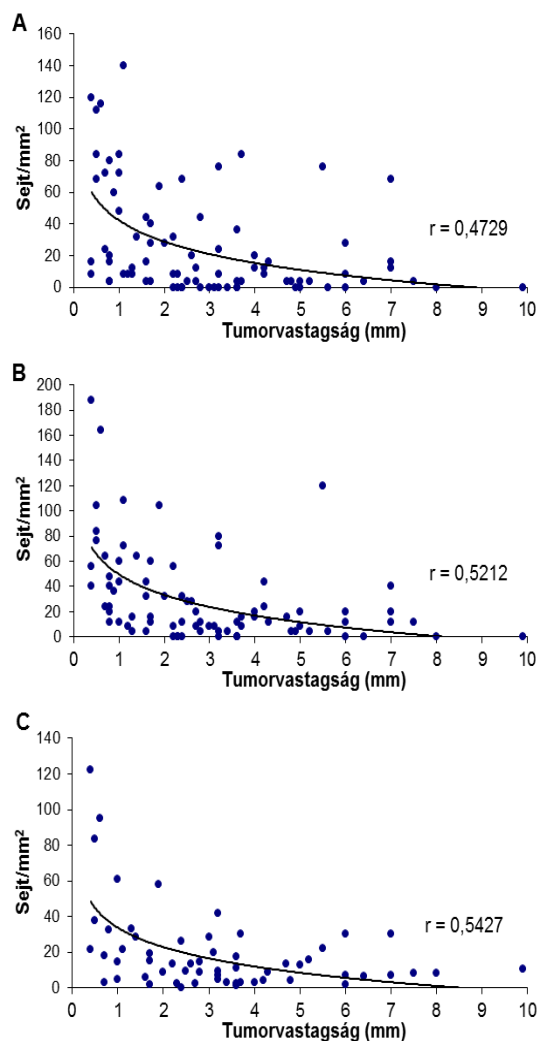
LAMP⁺ sejtek peritumorális mennyisége és a CD25⁺ T-sejt-denzitás között volt megfigyelhető ($r=0,4384$ és $r=0,5637$, $p<,001$).



9. ábra. A) Melanóma-sejtfészket infiltráló, ill. B) peritumorális CD1a⁺ dendritikus sejtek. C) CD1a⁺, ill. D) DC-LAMP⁺ DC-k kolokalizációja melanóma limfocitás infiltrátumában (CD45RO-jelölés, E), egymást követő metszeteken. F) OX40 (Vector SG kromogén, szürke) és CD1a (fukszin kromogén, vörös) kettős jelölése

4.3.2. A dendritikus sejtek infiltrációjának korrelációja a tumorvastagsággal

A CD1a⁺ és DC-LAMP⁺ dendritikus sejtek infiltrációjának intenzitása fordított korrelációt mutatott a melanómák vastagságával ($p<0,001$; 10. ábra). A CD1a⁺ DC-k intra- és peritumorális, valamint a DC-LAMP⁺ érett DC-k peritumorális denzitására meghatározott küszöbértékeket meghaladó mennyiségű DC-t tartalmazó daganatok aránya szintén csökkent a tumorvastagság növekedésével (9. táblázat).



10. ábra. Korreláció az intratumorális CD1a⁺ (A), peritumorális CD1a⁺ (B), illetve DC-LAMP⁺ dendritikus sejtek denzitása és a tumorvastagság között (r: korrelációs együttható)

9. táblázat. A jelentős mennyiségű dendritikus sejtet tartalmazó tumoros betegek aránya a Breslow-index szerinti csoportokban

Betegcsoport	Intratumorális CD1a ⁺ >25 sejt/mm ²		Peritumorális CD1a ⁺ >30 sejt/mm ²		Peritumorális DC-LAMP ⁺ >13 sejt/mm ²	
	n (%)	p-érték	n (%)	p-érték	n (%)	p-érték
Összes tumor	29/82 (35)		28/82 (34)		29/59 (49)	
≤1,0 mm	12/18 (67)		13/18 (72)		9/11 (82)	
1,01–2,0 mm	7/14 (50)		8/14 (57)		6/9 (67)	
2,01–4,0 mm	7/29 (24)		4/29 (14)		9/23 (39)	
>4,0 mm	3/21 (14)	0,0021	3/21 (14)	0,0000	5/16 (31)	0,0324

n: esetszám

4.3.3. A dendritikus sejtek infiltrációjának kapcsolata a tumorok áttétképző képességével

A DC-infiltráció intenzitását tanulmányoztuk az 5 éves követési idő alatti áttétképzés függvényében. A nem metasztatizáló daganatok a zsigeri áttétet adókhöz viszonyítva nagyobb számú peritumorális CD1a⁺ dendritikus sejtet tartalmaztak (38,9±44,1 vs. 19,9±24,9 sejt/mm², p=0,0262). Hasonló, de statisztikailag nem szignifikáns különbség volt megfigyelhető az intratumorális CD1a⁺ és a peritumorális DC-LAMP⁺ sejtek esetén (32,5±38,1 vs. 19,2±28,3, ill. 28,0±32,7 vs. 13,5±12,5 sejt/mm², p=0,1426 és p=0,1850). A csak regionális nyirokcsomóáttétet képező melanómák köztes mértékű DC-infiltrációt mutattak, mely nem különbözött szignifikánsan a többi csoporttól.

Az elemzést elvégeztük a vékony (≤1,0 mm) tumorok kizárásával is, hogy meggyőződjünk róla, a dendritikus sejtek denzitása az általában bizonytalanabb kimenetelű közepesen vastag, ill. vastag melanómák csoportján belül is képes-e különbséget tenni a különböző áttétképző képességű daganatok között. A ≤1,0 mm vastagságú melanómák közé főként nem metasztatikus daganatok tartoztak (3. táblázat), ugyanakkor ezek mutatták a legmagasabb DC-denzitást (10. ábra, 9. táblázat), ami az egész betegcsoportra nézve is befolyásolhatja az áttétképző képességgel való korrelációt. E feltevést igazolta, hogy a fennmaradó (>1,0 mm vastagságú) 64 melanóma vizsgálata nem tárt fel szignifikáns különbséget az áttétképzés szerint alkotott csoportokban.

A magas (a korábban említett küszöbértéket meghaladó) DC-denzitású tumorok arányának elemzése az áttétképzés függvényében nem mutatott szignifikáns eltérést az intratumorális CD1a⁺ sejtek infiltrációjában. A nagy mennyiségű peritumorális CD1a⁺ és DC-LAMP⁺ DC-t tartalmazó tumorok nagyobb arányban fordultak elő a nem vagy csak regionális nyirokcsomókba metasztatizáló melanómák csoportjában a zsigeri áttétet adókhöz képest (10. táblázat). Az előbbi két csoportot együttesen értékeltük, mivel e daganatok között hasonló volt a magas DC-denzitást mutatók aránya és a betegség lefolyása is hasonló volt (100%-os 5 éves túlélés). Amennyiben csak az 1,0 mm-nél vastagabb tumorokat vontuk be az elemzésbe, nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között (10. táblázat).

10. táblázat. A jelentős mennyiségű dendritikus sejtet tartalmazó tumoros betegek aránya az áttétképzés szerinti csoportokban

Betegcsoport	Intratumorális CD1a ⁺ >25 sejt/mm ²		Peritumorális CD1a ⁺ >30 sejt/mm ²		Peritumorális DC-LAMP ⁺ >13 sejt/mm ²	
	n (%)	p-érték	n (%)	p-érték	n (%)	p-érték
Összes tumor	29/82 (35)		28/82 (34)		29/59 (49)	
Nem+nycs	19/51 (37)		22/51 (43)		19/31 (61)	
Zsigeri	10/31 (32)	n.s.	6/31 (19)	0,0277	10/28 (36)	0,0497
>1,0 mm	17/64 (27)		15/64 (23)		20/48 (42)	
Nem+nycs	7/33 (21)		9/33 (27)		10/20 (50)	
Zsigeri	10/31 (32)	n.s.	6/31 (19)	n.s.	10/28 (36)	n.s.

n: esetszám, nem+nycs: nem metasztatikus, ill. nyirokcsomó-áttétes, n.s.: nem szignifikáns

4.3.4. A dendritikus sejtek infiltrációjának kapcsolata klinikopatológiai paraméterekkel

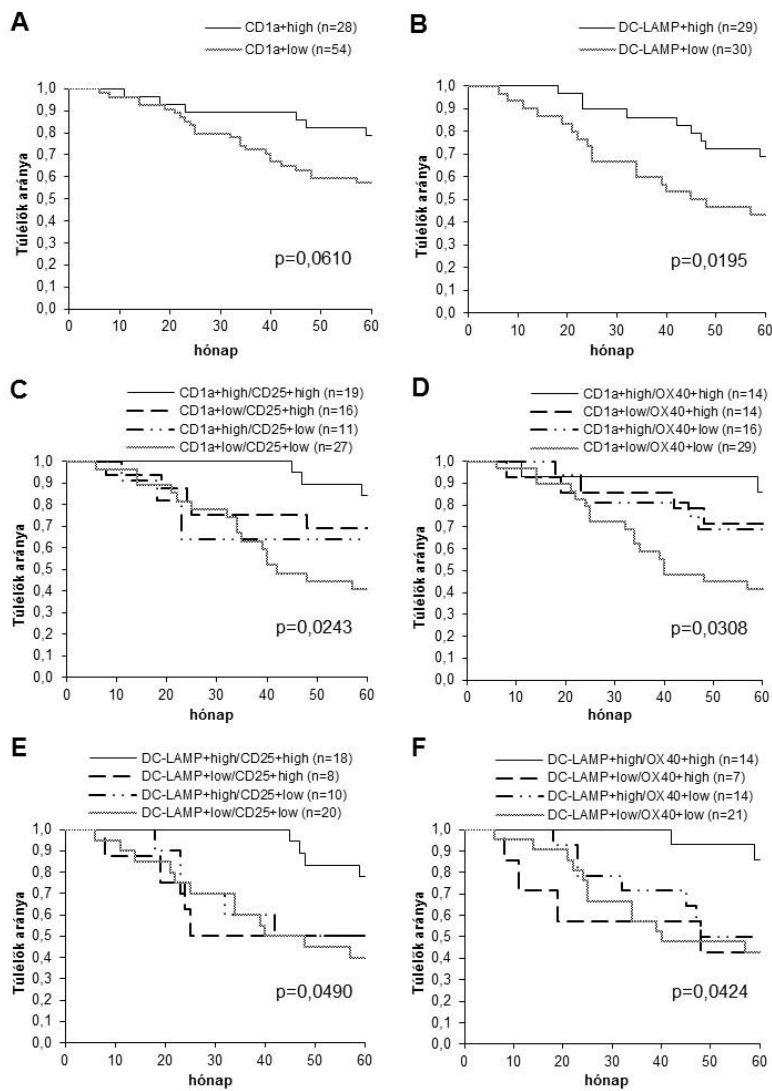
A magas DC-denzitású daganatok aránya és (az eddig nem említett) beteg- és tumorjellemzők kapcsolatának vizsgálata nem tárt fel szignifikáns összefüggést a betegek korával vagy nemével, illetve a tumorlokalizációval. A melanómák szövettani típusával (SSM vagy NM) való potenciális kapcsolatot csak a 2 mm-nél vastagabb daganatokban elemeztük, mert a vékonyabb melanómák között nem volt noduláris típusú; a DC-infiltrációval nem találtunk összefüggést ezekben az esetekben. Az ulcerált daganatok között azonban alacsonyabb volt az intenzív DC-infiltrációt mutatók aránya (intra-, ill. peritumorális CD1a⁺ sejtek: p=0,0579, p=0,0004; peritumorális DC-LAMP⁺ sejtek: p=0,0011).

4.3.5. A dendritikus sejtek infiltrációjának kapcsolata a túléléssel

Kaplan–Meier-görbén vizsgálva a fentebb leírt DC-denzitási küszöbértékek szerint csoportosított betegek túlélését, a CD1a⁺ dendritikus sejtek intratumorális sűrűsége nem mutatott összefüggést a túléléssel. A CD1a⁺ DC-k és különösen a DC-LAMP⁺ érett dendritikus sejtek intenzív peritumorális infiltrációja azonban túlélési előnnyel járt (p=0,0610 és p=0,0195) (11.A,B ábra).

A dendritikus sejtek mennyiségének prognosztikus hatását a CD25, illetve OX40 aktivációs markert hordozó T-limfociták mennyiségével kombinációban is tanulmányoztuk, melynek kapcsolatát a túléléssel korábbi vizsgálatunkban igazoltuk. Az aktivált T-sejtek és a dendritikus sejtek denzitása erősen korrelált, az egyes sejtpopulációkból nagy mennyiséget tartalmazó tumorminták azonban nem fedtek át teljesen, így lehetőség nyílt a magas, illetve alacsony DC-denzitással és az aktivált T-sejtek magas, ill. alacsony számával jellemzett betegcsoportok túlélési görbéinek összehasonlítására. A két DC-marker és két T-sejt-

aktivációs marker valamennyi kombinációjában a dendritikus sejtek és aktivált T-limfociták egyidejű magas denzitása a többi alcsoporthoz viszonyítva kedvezőbb túlélésű betegcsoportot jelölt ki (11.C-F ábra). Érdekes módon a magas DC-LAMP/magas aktivált T-sejt kombinációk mutatták a legkifejezettebb különbséget a többi csoporttal összehasonlítva (melyek egymástól nem különböztek szignifikáns mértékben) (11.E,F ábra; $p=0,0057$ és $p=0,0097$ a magas DC-LAMP/magas CD25, ill. magas DC-LAMP/magas OX40 kombinációk és a többi csoport összehasonlításában). Az alacsony CD1a/alacsony aktivált T-sejt kombinációk ezzel szemben különösen kedvezőtlen prognózisú betegcsoportot jellemeztek (11.C,D ábra; $p=0,0086$ és $p=0,0044$ az alacsony CD1a/alacsony CD25, ill. alacsony CD1a/alacsony OX40 kombinációkra a többi csoporttal összehasonlítva).



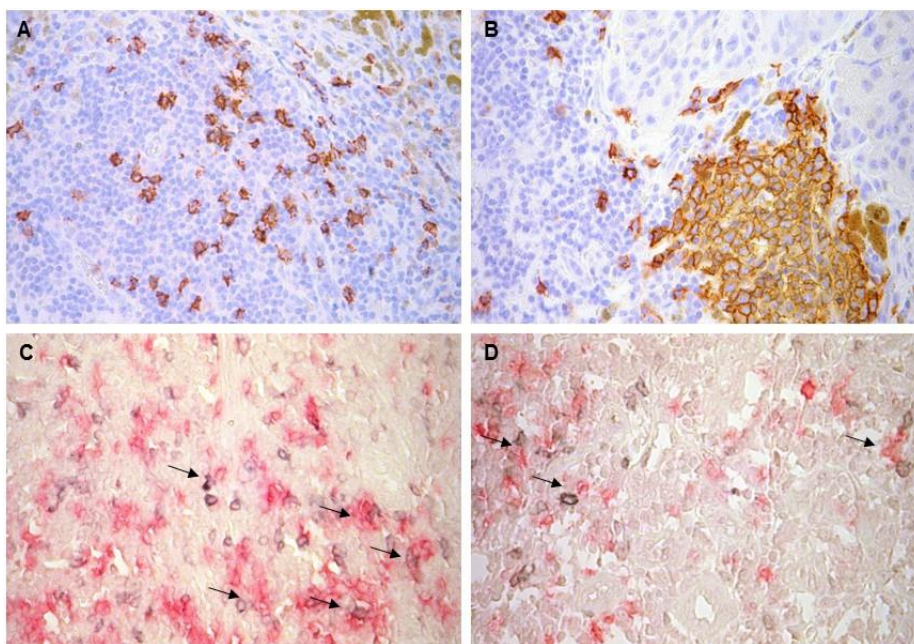
11. ábra. Kaplan–Meier túlélési görbék a peritumorális CD1a⁺ (A), DC-LAMP⁺ (B) dendritikus sejtek denzitása, valamint a CD1a⁺ és CD25⁺ (C), CD1a⁺ és OX40⁺ (D), DC-LAMP⁺ és CD25⁺ (E), ill. DC-LAMP⁺ és OX40⁺ (F) sejtek denzitásértékeinek kombinációja szerinti betegcsoportosításban

Az összes fent említett immunsejt-denzitási paramétert (dendritikus sejtek, aktivált T-sejtek, illetve ezek kombinációi) többváltozós analízissel is elemeztük egyéb potenciális prognosztikus faktorokkal együtt (a tumorok vastagsága, lokalizációja, szövettani típusa, ulceráltsága, illetve a betegek kora és neme). A tumorvastagság mellett (relatív kockázat: 1,238, $p=0,001$) a magas DC-LAMP/OX40 kombináció is szignifikáns független prognosztikai tényezőnek bizonyult (relatív kockázat: 0,215, $p=0,010$).

4.4. B-limfociták vizsgálata primer melanómában

4.4.1. CD20⁺ B-sejtek immunhisztokémiai kimutatása

A vizsgált 106 primer melanóma mintában a CD20 marker kifejeződését elsősorban a peritumorálisan elszórtan található limfocitákon észleltük (12.A ábra). A melanómasejt-fészkek közelében denz, a nyirokcsomók folliculusaira emlékeztető, kb. 0,1–0,8 mm közötti méretű aggregátumokba tömörülő B-sejteket (12.B ábra) is megfigyeltünk az esetek egy részében (28/106, 26%).



12. ábra. CD20⁺ B-limfociták melanóma infiltrátumában elszórtan (A), illetve denz aggregátumot képezve (B) (AEC kromogén, vörös). CD20 (Vector SG kromogén, szürke) és CD25 (C), ill. OX40 (D) (fukszin kromogén, vörös) kettős jelölése (a nyilak a CD20⁺ B- és CD25⁺, ill. OX40⁺ T-sejtek szoros kontaktusát jelölik)

A jelölt sejtek peritumorális sűrűsége a minták nagy részében jelentősen, átlagosan 36-szorosan meghaladta az intratumorális denzitásukat (átlag \pm SD: 178,7 \pm 156,1 és 4,9 \pm 6,9 sejt/mm²). Minden minta tartalmazott legalább néhány peritumorális CD20⁺ limfocitát, melyek sűrűsége a minták 86%-ában (91/106) meghaladta a 10 sejt/mm²-t, míg az intratumorális B-sejtes infiltráció 1 sejt/mm² alatt volt az esetek többségében (66/106, 62%).

A CD20 és T-sejt-aktivációs markerek (CD25, OX40) kettős jelölése helyenként kapcsolatot mutatott a B-sejtek és az aktivált T-limfociták között (12.C,D ábra). Emellett szignifikáns korreláció volt a B-sejtek és aktivált T-sejtek peritumorális denzitása között ($r=0,3062$, $p<0,02$ és $r=0,4105$, $p<0,001$ a CD25, illetve OX40 markerek esetén; $n=67$).

4.4.2. A B-sejtek infiltrációjának kapcsolata klinikopatológiai paraméterekkel

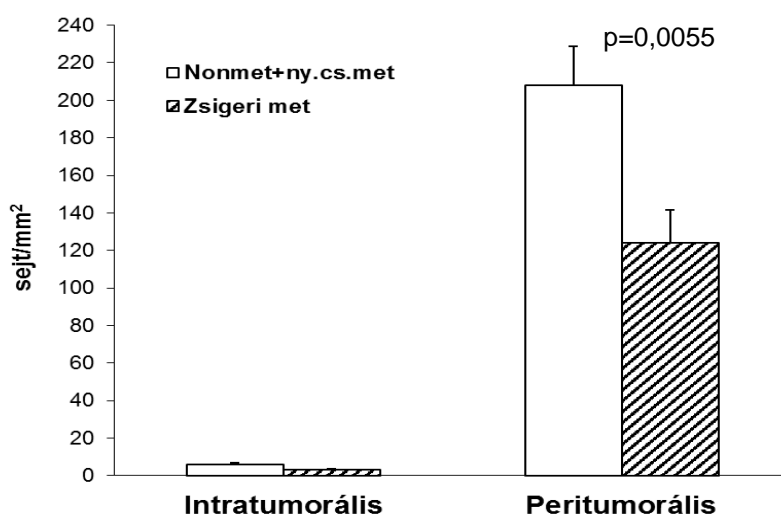
A CD20⁺ limfociták infiltrációjának intenzitása nem korrelált a melanómák vastagságával (intratumorális: $r=0,0723$, peritumorális: $r=0,0730$, $p>0,05$). Megvizsgáltuk a jelölt sejteket az intra-, ill. peritumorális B-sejt-sűrűsége bevezetett küszöbértékeket meghaladó mennyiségben tartalmazó tumoros betegek arányát a klinikopatológiai paraméterekkel összefüggésben (11. táblázat). A végtagokon megjelenő melanómák között kisebb arányban fordultak elő nagyfokú peritumorális B-sejt-infiltrációt mutató daganatok a törzs és fej/nyak melanómáihoz viszonyítva, míg egyéb beteg- és tumorjellemzők (kor, nem, szövettani típus, ulceráció) tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget.

11. táblázat. A jelentős mennyiségű B-sejtet tartalmazó tumoros betegek aránya a különböző klinikopatológiai paraméterek szerinti csoportokban

Betegcsoport	Intratumorális CD20 ⁺ >3 sejt/mm ²		Peritumorális CD20 ⁺ >170 sejt/mm ²	
	n (%)	p-érték	n (%)	p-érték
Összes beteg	45/106 (42)		42/106 (40)	
Kor				
<53 év	26/53 (49)		20/53 (38)	
>53 év	19/53 (36)	n.s.	22/52 (42)	n.s.
Nem				
Férfi	21/45 (47)		19/45 (42)	
Nő	24/61 (39)	n.s.	23/61 (38)	n.s.
Tumorokalizáció				
Végtagok	19/42 (45)		10/42 (24)	
Axiális	26/64 (41)	n.s.	32/64 (50)	0,0070
Szövettani típus ^a				
SSM	10/29 (34)		12/29 (41)	
NM	17/36 (47)	n.s.	17/36 (47)	n.s.
Tumorvastagság				
≤1 mm	6/17 (35)		6/17 (35)	
1,01–2,0 mm	12/23 (52)		7/23 (30)	
2,01–4,0 mm	17/38 (45)		15/38 (39)	
>4,0 mm	10/28 (36)	n.s.	14/28 (50)	n.s.
Ulceráció				
Van	18/46 (39)		17/46 (37)	
Nincs	27/60 (45)	n.s.	25/60 (42)	n.s.
Áttétképzés				
Nem+nycs	35/69 (51)		34/69 (49)	
Zsigeri	10/37 (27)	0,0186	8/37 (22)	0,0055
Túlélés				
>5 év	35/71 (49)		34/71 (48)	
<5 év	10/35 (29)	0,0423	8/35 (23)	0,0132

n.s.: nem szignifikáns, nem+nycs: nem metasztatikus, ill. nyirokcsomó-áttétes, SSM: felszínesen terjedő melanóma, NM: noduláris melanóma. ^aA két akrolentiginózus és egy lentigo maligna melanóma nem szerepel a táblázatban; csak a 2,0 mm-t meghaladó vastagságú daganatok szerepelnek

A B-sejtek infiltrációját összehasonlítottuk az 5 éves követési periódus alatt nem, vagy csak regionális nyirokcsomóáttéteket adó tumorokban a zsigeri metasztázist (is) adókkal összehasonlítva. Az előbbi két csoportot együtt értékeltük, mivel nem volt szignifikáns különbség a B-sejt-denzitási értékekben, s a túlélési mutatóik is megegyeztek (100%-os 5 éves túlélés). Mind az intra-, mind a peritumorális B-sejt-sűrűség nagyobb volt a nem metasztatikus, ill. csak nyirokcsomóba áttétképző melanómákban a távoli áttétet adókhöz képest (13. ábra). Hasonlóképpen, kb. kétszeres különbség volt látható a magas B-sejt-denzitású daganatok arányában a két csoport között (11. táblázat).

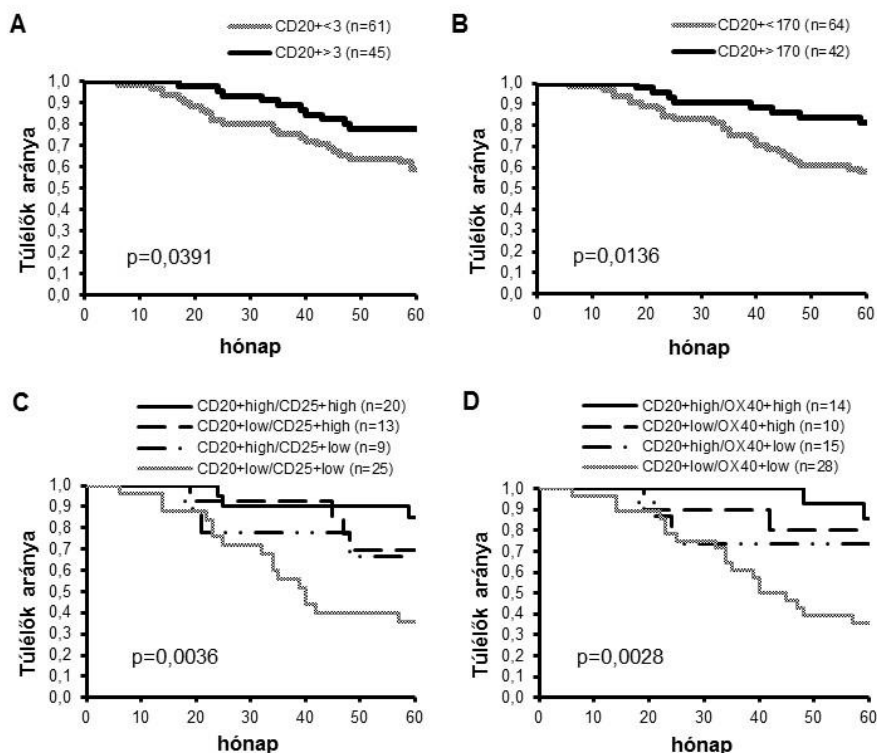


13. ábra. A B-sejt-denzitás a különböző áttétképző képességű melanómákban (átlag és SEM)

4.4.3. A B-sejtek infiltrációjának kapcsolata a túléléssel

A CD20⁺ limfociták denzitása alapján kategorizált betegek túlélésének Kaplan–Meier-analízise azt mutatta, hogy e sejtek nagy mennyisége szignifikáns túlélésbeli előnnyel jár (14.A,B ábra). Magas intra-, ill. peritumorális B-sejt-denzitás esetén az 5 évet meghaladó túlélésű betegek aránya magasabb volt (78% vs. 59% és 81% vs. 58%; 11. táblázat).

Korábbi vizsgálataink feltárták a CD25, illetve OX40 aktivációs markert hordozó T-limfociták mennyiségének kapcsolatát a túléléssel. Hasonlóan a dendritikus sejtek vizsgálatában kapott eredményekhez, a B-sejtek és az aktivált T-limfociták denzitása is szignifikáns korrelációt mutatott egymással, de az egyes sejtpopulációkra nézve magas denzitású minták nem fedtek át teljes mértékben, így ebben az esetben is elvégeztük kombinált prognosztikai vizsgálatukat. A B- és aktivált T-sejtek magas, ill. alacsony peritumorális denzitásával jellemzett betegcsoportok kombinált analízise szignifikáns különbségeket eredményezett mind a CD25, mind az OX40 marker esetén (14.C,D ábra). A B- és aktivált T-limfociták együttes alacsony mennyisége igen rossz prognózissal járt (36%-os 5 éves túlélés mindkét aktivációs markernél; $p=0,0004$ a többi csoporthoz együttesen viszonyítva Kaplan–Meier-analízissel), míg a magas B-sejt/magas aktivált T-sejt-denzitású csoportok prognózisa volt a legkedvezőbb (85% és 86% 5 éves túlélés a CD25 és OX40 esetén).



14. ábra. Kaplan–Meier túlélési görbék az intra- (A) és peritumorális (B) $CD20^{+}$ B-sejtek denzitása, valamint a $CD20^{+}$ és $CD25^{+}$ (C), ill. $CD20^{+}$ és $OX40^{+}$ (D) sejtek denzitásértékeinek kombinációja szerinti betegcsoportosításban

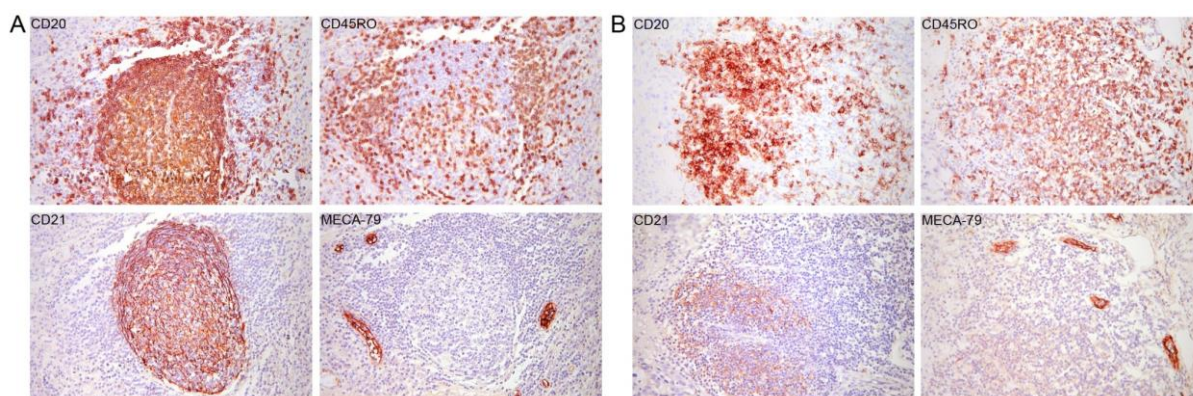
Az összes vizsgált paramétert (B-, aktivált T-sejt-denitás, illetve kombinációik), továbbá egyéb potenciális prognosztikus faktorokat (tumorvastagság, -lokalizáció, szövettani típus, ulceráció, a betegek kora és neme) tesztelve multivariáns Cox-regressziós analízissel, a tumorvastagság (relatív kockázat: 1,275, $p=0,000$) és az alacsony $CD20^{+}$ /alacsony $OX40^{+}$ kombináció (relatív kockázat: 1,696, $p=0,001$) bizonyult szignifikáns független negatív prognosztikai tényezőnek.

4.5. Az ektópiás nyirokstruktúrák vizsgálata primer melanómában

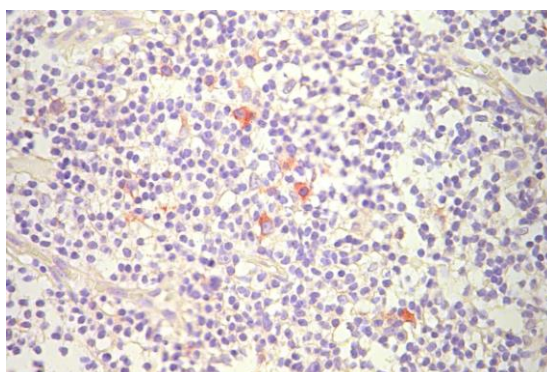
4.5.1. Az ektópiás nyirokstruktúrákkal asszociált sejtek immunhisztokémiai kimutatása

A $CD20$ B-sejt-marker immunhisztokémiai kimutatásával a 147 vizsgált primer melanóma 27%-ában (39 eset) találtunk B-sejt-aggregátumokat, melyek mérete kb. 0,1–0,8 mm között volt. Az ezekhez kapcsolódóan megjelenő immunsejttípusokat szintén immunhisztokémiai technikával jellemeztük. $CD3^{+}$ T-limfociták, melyek nagy része $CD45RO^{+}$ memória-T-sejt volt (15. ábra) jelenléte rendszerint megállapítható volt a B-sejt-csoportokhoz asszociáltan. $CD21^{+}$ folliculáris dendritikus sejtek hálózatát a B-sejt-aggregátumok 36%-ában (a vizsgált

22 esetből 8-ban) mutattuk ki (15. ábra). Néhány esetben kisszámú, AID-t (aktiváció-indukált citidin-deaminázt, az immunglobulingének osztályváltó rekombinációjában és szomatikus hipermutációjában közreműködő enzimet) expresszáló sejtet is megfigyeltünk (16. ábra). Ezek morfológiailag interfollikuláris nagy B-sejtekre hasonlítottak, melyek a másodlagos nyirokszervekben és pl. a Sjögren-szindrómában megfigyelhető ektópiás limfoid szövetekben AID-expressziót mutatnak (202, 203). DC-LAMP markert kifejező érett dendritikus sejtek megtalálhatóak voltak a T-sejt-csoportokhoz asszociáltan egyes esetekben, de jelenlétük az ektópiás nyirokstruktúrákon kívül is kimutatható volt. Továbbá, MECA-79-festéssel a folliculusok közelében HEV-szerű erek is láthatóvá váltak a vizsgált esetek többségében (14/18, 78%) (15. ábra), azonban ezek jelenléte sem korlátozódott az ektópiás nyirokstruktúrákkal rendelkező melanómákra.



15. ábra. Reprezentatív ektópiás limfoid struktúrák primer melanómákban (A: 5,6 mm vastagságú NM; B: 2,0 mm vastagságú SSM). CD20, CD45RO, CD21 és MECA-79 immunhisztokémiai jelölése (AEC kromogén, vörös)



16. ábra. A 15.B ábrán látható ektópiás nyirokstruktúráján belül néhány sejt AID-festődése (AEC kromogén, vörös)

4.5.2. Az ektópiás nyirokstruktúrák kapcsolata klinikopatológiai paraméterekkel

A B-sejt-aggregátumok jelenlétének elemzése a klinikopatológiai jellemzők tükrében magasabb előfordulási gyakoriságot mutatott az axiális lokalizációjú melanómákban, különösen a fej és a nyak területén található tumorokban (6/10, 60%). Tendencia mutatkozott a folliculuszerű struktúrák gyakoribb megjelenésére a vastagabb daganatokban, más beteg-, illetve tumorparaméterrel azonban nem találtunk összefüggést (12. táblázat). Az ektópiás nyirokstruktúrák jelenlétének prognosztikai relevanciáját vizsgáló Kaplan–Meier-analízis nem tárt fel szignifikáns összefüggést a túléléssel, és a limfoid folliculusokat tartalmazó vagy nem tartalmazó melanómák 5 éven belüli áttétképzésében, illetve a betegek 5 éves túlélésében sem volt különbség (12. táblázat).

12. táblázat. B-sejt-folliculusok jelenlétének összefüggése a klinikopatológiai paraméterekkel

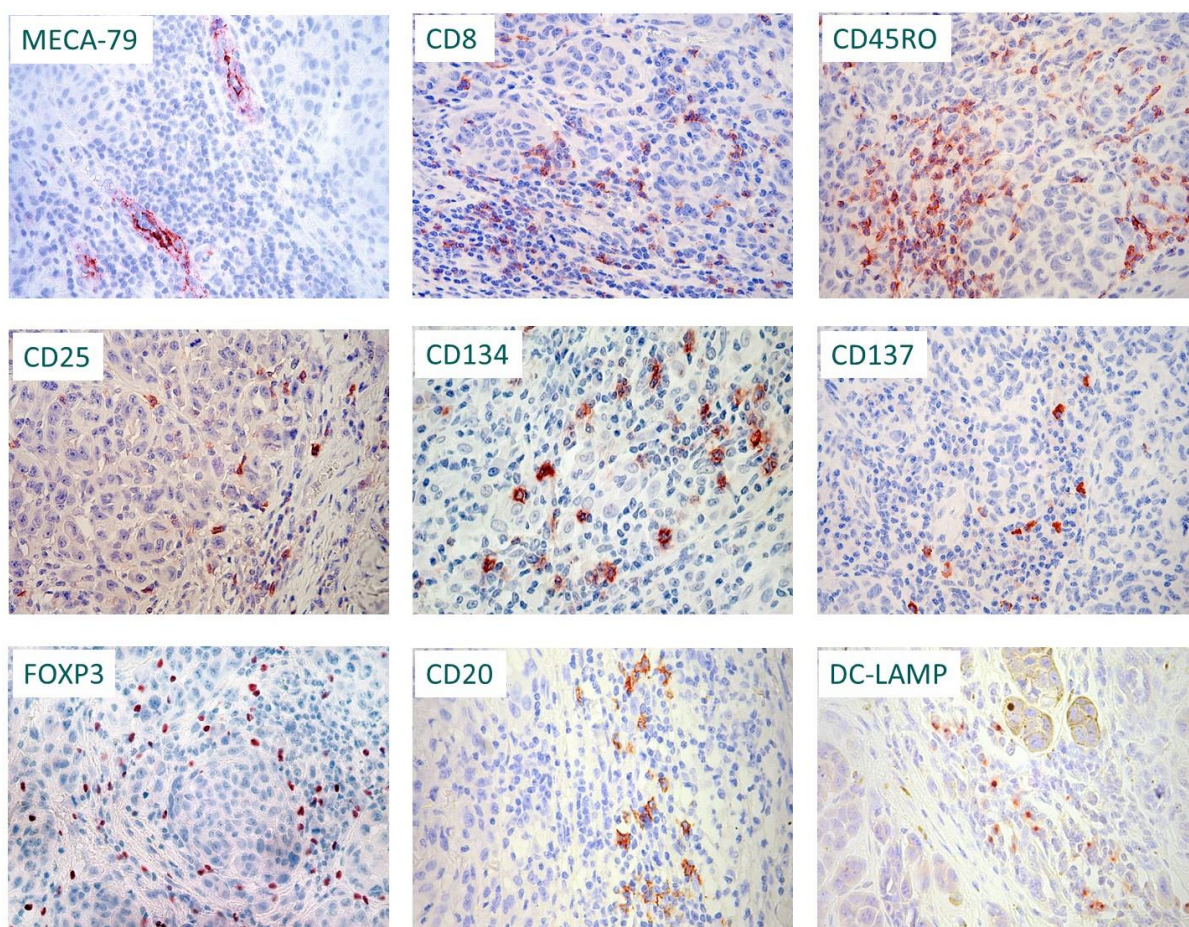
	Betegszám	B-sejt-aggregátumok jelenléte, n (%)	p-érték
Összes beteg	147	39 (27)	
Kor			
<53 év	72	16 (22)	
>53 év	75	23 (31)	n.s.
Nem			
Férfi	66	22 (33)	
Nő	81	17 (21)	n.s.
Tumorokalizáció			
Végtagok	61	10 (16)	
Axiális	86	29 (34)	0,0190
Szöveti típus ^a			
SSM	91	21 (23)	
NM	51	18 (35)	n.s.
Tumorvastagság			
≤2 mm	55	9 (16)	
2,01–4,0 mm	55	16 (29)	
>4,0 mm	37	14 (38)	0,0630
Ulceráció			
Van	64	21 (33)	
Nincs	83	18 (22)	n.s.
Áttétképzés			
Nem+nycs	97	26 (27)	
Zsigeri	50	13 (26)	n.s.
Túlélés			
>5 év	100	27 (27)	
<5 év	47	12 (26)	n.s.

n.s.: nem szignifikáns, nem+nycs: nem metasztatikus, ill. nyirokcsomó-áttétes, SSM: felszínesen terjedő melanóma, NM: noduláris melanóma. ^aA négy akrolentiginózus és egy lentigo maligna melanóma nem szerepel a táblázatban

4.6. MECA-79⁺ erek vizsgálata primer melanómában

4.6.1. MECA-79⁺ erek immunhisztokémiai kimutatása, korreláció a tumorinfiltráló immunsejtek mennyiségével, illetve az ektópiás nyirokstruktúrák jelenlétével

A MECA-79-pozitív erek és 8 immunsejttípus (CD8⁺, ill. CD45RO⁺ T-limfociták, a CD25, CD134/OX40, CD137/4-1BB aktivációs markereket hordozó limfociták, FOXP3⁺ regulátor T-sejtek, CD20⁺ B-sejtek, DC-LAMP⁺ érett dendritikus sejtek) (17. ábra) denzitását 118 primer melanómában határoztuk meg.



17. ábra. MECA-79⁺ erek és a CD8, CD45RO, CD25, CD134, CD137, FOXP3, CD20, ill. DC-LAMP markereket kifejező tumorinfiltráló immunsejtek primer melanómában (AEC kromogén, vörös)

A MECA-79⁺ erek számának összefüggéseit tanulmányoztuk az immunsejtek intra- és peritumorális denzitásával, beteg- és tumorparaméterekkel mint a tumorvastagság, ulceráció, szövettani típus, lokalizáció, a betegek kora és neme, valamint a betegség kimenetelével. A statisztikai elemzéseket az összes adaton, illetve a vizsgálatba bevont két betegkohorszon külön-külön is elvégeztük (1. kohorsz: a Semmelweis Egyetemen operált 47 beteg, 2.

kohorsz: az Országos Onkológiai Intézetben operált 71 beteg). A MECA-79-pozitív HEV-szerű erek jelentését a melanómaminták többségében kimutattuk (összes eset: 93/118, 79%; 1. kohorsz: 35/47, 74%; 2. kohorsz: 58/71, 82%). A medián denzitás 2,4/mm² (tartomány: 0–33). A jelölt erek a limfocitákban gazdag peritumorális területeken helyezkedtek el, s Spearman-féle rangkorrelációs teszt alapján számuk korrelált az immunsejtek peritumorális sűrűségével (az intratumorális denzitással nem). A legerősebb korreláció a CD20⁺ B-limfociták esetén volt megfigyelhető (p<0,001 mindkét kohorsz és az összes minta együttes elemzése esetén is). A FOXP3⁺, CD8⁺ és CD45RO⁺ sejtek peritumorális denzitása szintén korrelált a MECA-79⁺ erek mennyiségével az összes csoportban, míg a többi sejttípusnál a korreláció gyengébb volt és csak az egyik betegkohorszban volt megfigyelhető (13. táblázat). Valamennyi, 0,05 alatti p-értékkel jellemzett összefüggés szignifikáns maradt a többszörös tesztelés okozta esetleges statisztikai hibák kiküszöbölésére elvégzett Benjamini–Hochberg-teszt elvégzése után.

13. táblázat. Spearman-féle rangkorreláció a MECA-79⁺ erek és az egyes immunsejttípusok mennyiségi összefüggésének kimutatására

Sejtmarker	Összes beteg (n=118)		1. kohorsz (n=47)		2. kohorsz (n=71)	
	r _s	p-érték	r _s	p-érték	r _s	p-érték
CD20	0,5939	<0,001	0,6283	<0,001	0,4899	<0,001
CD8	0,2938	<0,002	0,2947	<0,05	0,2843	<0,02
CD45RO	0,2680	<0,005	0,3515	<0,02	0,2617	<0,05
FOXP3	0,3560	<0,001	0,4094	<0,01	0,3279	<0,01
CD25	0,2219	<0,02	0,3511	<0,02	0,1539	n.s.
CD134/OX40	0,1978	<0,05	0,3666	<0,02	0,0755	n.s.
CD137/4-1BB	0,2664	<0,01	0,2578	n.s.	0,2554	<0,05
DC-LAMP	0,2407	<0,02	0,1232	n.s.	0,3206	<0,01

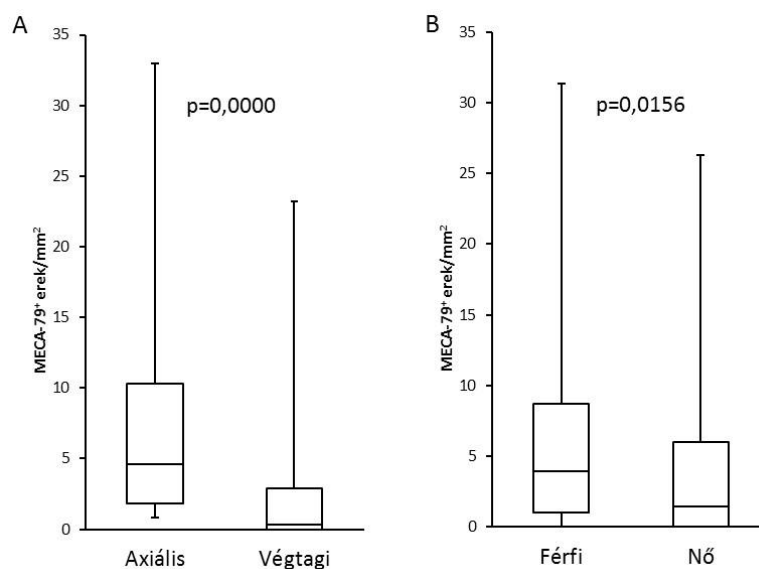
r_s: Spearman-féle rangkorrelációs együttható, n.s.: nem szignifikáns

Értékeljük az immunsejtek és a MECA-79⁺ erek mennyisége és az ektópiás nyirokstruktúrák (újabbán használt nevükön terciér limfoid struktúrák, TLS) jelenléte közötti összefüggéseket is. A TLS-t tartalmazó 29 tumorban a HEV-szerű erek denzitása nagyobb volt, mint az azt nem tartalmazó melanómákban (n=88) [mediánértékek: 5,5 (tartomány: 0,0–28,0) vs. 1,8 (0,0–33,0), p=0,0051]. Hasonló különbséget találtunk a CD20⁺ B-sejtek, CD8⁺, CD45RO⁺ T-limfociták, illetve a CD137 aktivációs markert hordozó sejtek esetén is (sorrendben p=0,0000, p=0,0175, p=0,0474 és p=0,0000 a peritumorális, p=0,0048, p=0,0641, p=0,0190 és p=0,0002 az intratumorális denzitásnál). A FOXP3⁺, CD25⁺, CD134⁺ sejtek és DC-LAMP⁺ DC-k

mennyisége ezzel szemben nem mutatott összefüggést a TLS-ek jelenlétével. Mind a MECA-79⁺ erek, mind az összes tanulmányozott immunsejttípus megtalálható volt az ektópiás nyirokstruktúrák területén kívül és az azokat nem tartalmazó melanómákban egyaránt. A MECA-79⁺ erek és az immunsejtek denzitása közötti korrelációk továbbá akkor is megfigyelhetőek voltak, ha csak a TLS-t nem tartalmazó tumorokban értékeltük ezeket.

4.6.2. A MECA-79⁺ erek kapcsolata klinikopatológiai paraméterekkel

A MECA-79⁺ erek denzitása és a klinikopatológiai paraméterek kapcsolatának vizsgálata összefüggést tárt fel a melanómák elhelyezkedésével és a betegek nemével. Feltűnően magasabb értékeket találtunk az axiális lokalizációjú (törzs, fej és nyak) tumorokban a végtagi lokalizációjú daganatokhoz viszonyítva ($p=0,0000$, $p=0,0005$ és $p=0,0001$ az összes tumorra, illetve az 1. és 2. kohorszra nézve) (18.A ábra). Emellett a MECA-79⁺ erek száma férfiakban magasabb volt, mint nőkben, bár ez a különbség kevésbé volt jelentős ($p=0,0156$, $p=0,0756$ és $p=0,0827$ az összes betegben és a két kohorszban) (18.B ábra). A magas HEV-denzitású tumorok arányának elemzése az egyes klinikopatológiai tényezők szerint szintén szignifikáns különbséget tárt fel a tumorlokalizáció és a betegek neme esetén, míg egyéb beteg- és tumorparaméterekkel nem találtunk összefüggést (14. táblázat).



18. ábra. A MECA-79⁺ erek denzitásának összefüggése a tumorlokalizációval (A) és a betegek nemével (B)

14. táblázat. A jelentős mennyiségű MECA-79⁺ eret tartalmazó tumoros betegek aránya a különböző klinikopatológiai paraméterek szerinti csoportokban

Betegcsoport	Összes beteg (n=118)		1. kohorsz (n=47)		2. kohorsz (n=71)	
	n (%)	p-érték	n (%)	p-érték	n (%)	p-érték
Kor						
<54 év	26/57 (46)		10/23 (43)		16/34 (47)	
>54 év	34/61 (56)	n.s.	14/24 (58)	n.s.	20/37 (54)	n.s.
Nem						
Férfi	35/51 (69)		13/18 (72)		22/33 (67)	
Nő	25/67 (37)	0,0007	11/29 (38)	0,0222	14/38 (37)	0,0122
Tumorokalizáció						
Végtagok	17/57 (30)		7/23 (30)		10/34 (29)	
Axiális	43/61 (70)	0,0000	17/24 (71)	0,0056	26/37 (70)	0,0006
Szöveti típus^a						
SSM	38/76 (50)		16/30 (53)		22/46 (48)	
NM	20/35 (57)	n.s.	7/14 (50)	n.s.	13/21 (62)	n.s.
Tumorvastagság						
≤1 mm	13/19 (68)		6/9 (67)		7/10 (70)	
1,01–2,0 mm	16/33 (48)		4/9 (44)		12/24 (50)	
2,01–4,0 mm	18/38 (47)		7/16 (44)		11/22 (50)	
>4,0 mm	13/28 (46)	n.s.	7/13 (54)	n.s.	6/15 (40)	n.s.
Ulceráció						
Van	26/50 (52)		11/24 (46)		15/26 (58)	
Nincs	34/68 (50)	n.s.	13/23 (56)	n.s.	21/45 (47)	n.s.
Áttétképzés						
Nem+nycs	38/75 (51)		11/23 (48)		27/52 (52)	
Zsigeri	22/43 (51)	n.s.	13/24 (54)	n.s.	9/19 (47)	n.s.
Túlélés						
>5 év	39/77 (51)		12/24 (50)		27/53 (51)	
<5 év	21/41 (51)	n.s.	12/23 (52)	n.s.	9/18 (50)	n.s.

n.s.: nem szignifikáns, nem+nycs: nem metasztatikus, ill. nyirokcsomó-áttétes, SSM: felszínesen terjedő (superficial spreading) melanóma, NM: noduláris melanóma. ^aA négy akrolentiginózus, két lentigo maligna és egy dezmoplasztikus melanóma nem szerepel a táblázatban

4.6.3. A MECA-79⁺ erek és az immunsejtek denzitásának kapcsolata az áttétképzéssel és a túléléssel

A MECA-79⁺ erek mennyisége nem mutatott összefüggést az 5 éves követés alatt bekövetkező áttétképzéssel (14. táblázat), sem a betegek túlélésével (14. táblázat, Kaplan–Meier görbe/generalizált Wilcoxon-teszt: p=0,6208). Hogy megbizonyosodjunk arról, vajon ezeket az eredményeket befolyásolta-e az axiális lokalizációjú daganatokban, illetve a férfi betegekben talált magasabb HEV-szám, az egyes lokalizációkban és a különböző nemű

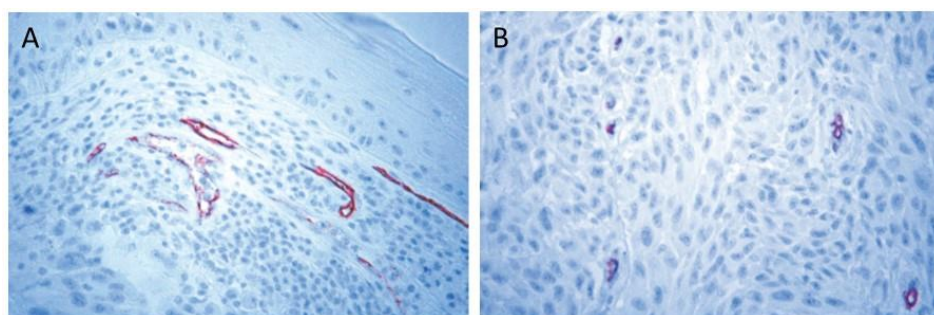
betegekben is elvégeztük a túlélés elemzését, de ez sem eredményezett szignifikáns különbséget egyik alcsoportban sem. Kombinált analízist is végeztünk a HEV-denzitás és a lokalizáció, illetve a nem együttes elemzésével, mely szintén nem tárt fel szignifikáns prognosztikus korrelációt.

A tanulmányozott tumorinfiltráló immunsejtek közül a $CD134^+$, $CD25^+$ limfociták, továbbá a $DC-LAMP^+$ dendritikus sejtek denzitása mindegyik betegkohorszban korrelált a túléléssel (nem mutatott eredmények), korábbi vizsgálatainkhoz hasonlóan. A $CD20^+$ B-sejtek mennyisége prognosztikusnak bizonyult az 1. kohorszban, míg a többi marker ($CD8$, $CD45RO$, $FOXP3$, $CD137$) esetén nem találtunk összefüggést a túléléssel.

4.7. Mikroérsűrűség és immunsejtdenzitás kapcsolatának vizsgálata primer melanómában

4.7.1. Korreláció a mikroérsűrűség és a tumorinfiltráló immunsejtek denzitása között

Egy kisebb esetszámú vizsgálatban (52 beteg 1 mm-nél vastagabb melanómája) az immunhisztokémiai úton kimutatott (19. ábra) $CD34^+$ mikroerek sűrűsége (mikrovaszkuláris denzitás, MVD) és a $CD3^+$, $CD8^+$ T-limfociták, $CD20^+$ B-sejtek, $CD68^+$ makrofágok és $CD1a^+$ dendritikus sejtek mennyisége közti korrelációt elemeztük, a tumorvastagság, illetve a későbbi áttétképzés alapján csoportosított daganatokban.



19. ábra. $CD34^+$ peritumorális (A) és intratumorális (B) mikroerek immunhisztokémiai kimutatása primer melanómában (AEC kromogén, vörös)

A vizsgált immunsejtek intratumorális infiltrációja egyik csoportban sem mutatott összefüggést az MVD-vel. A peritumorális immunsejt-denzitások tekintetében, a teljes betegpopuláción vizsgálva, az immunsejt-típusok közül csak a $CD3^+$ T-sejtek esetén kaptunk statisztikailag szignifikáns korrelációt ($p < 0,05$) (15. táblázat). Az összefüggés erősebb volt a legnagyobb vastagsági kategóriába eső daganatoknál ($>4,0$ mm), illetve az 5 éves követési

időn belül zsigeri áttétet adó melanómáknál ($p < 0,001$, ill. $p < 0,01$). E csoportokban korreláció mutatkozott a CD8⁺ T-sejtek esetén is. A 4 mm-nél vastagabb melanómákban az MVD a makrofágdenzitással is pozitívan korrelált, míg a zsigeri áttétet adó esetekben gyenge összefüggést találtunk a B- és dendritikus sejtek mennyiségével. A vékonyabb (1,01–2,0 mm), illetve a nem metasztatikus melanómáknál ugyanakkor az immunsejtmakerek többsége esetén nem figyeltünk meg korrelációt az MVD-vel (15. táblázat).

15. táblázat. Spearman-féle rangkorreláció az MVD és az immunsejtek mennyiségi összefüggésének kimutatására

Betegcsoport	n	Sejttípusmarker				
		CD3	CD8	CD20	CD68	CD1a
Összes tumor	52	0,2950 ^a	-0,0900	0,1305	0,1570	0,1910
Vastagság						
1,01–2,0 mm	13	-0,1209	-0,6573 ^c	-0,0559	0,1748	-0,0769
2,01–4,0 mm	23	0,0451	-0,0110	0,0215	-0,3104	0,5791 ^c
>4,0 mm	16	0,7643 ^d	0,7758 ^d	0,3500	0,5794 ^b	0,3712
Áttétképzés						
Nem metasztatikus	19	0,0857	-0,2181	-0,3024	0,0237	-0,2021
Nyirokcsomóáttét	8	0,7143 ^a	0,0952	0,0000	0,4524	0,3713
Zsigeri áttét	25	0,5209 ^c	0,5011 ^b	0,4213 ^a	0,1350	0,4344 ^a

A táblázat a Spearman-féle rangkorrelációs együtthatókat mutatja; ^a $p < 0,05$, ^b $p < 0,02$, ^c $p < 0,01$, ^d $p < 0,001$

4.7.2. Az MVD, illetve a T-sejt- és makrofág infiltráció kapcsolata klinikopatológiai paraméterekkel

A peritumorális mikroérsűrűség az intratumorálisnál több mint kétszer magasabbnak bizonyult (16. táblázat). Nem találtunk szignifikáns összefüggést az MVD és a melanómák vastagsága, lokalizációja, szövettani típusa, ulcerációja, illetve áttétképzése között; az egyetlen szignifikáns különbség a nemek között mutatkozott, férfiakban az intratumorális MVD magasabb volt (16. táblázat).

16. táblázat. Intra- és peritumorális mikroérsűrűség a különböző klinikopatológiai paraméterek szerinti csoportokban

	n	Intratumorális MVD (CD34 ⁺ mikroér/mm ²)		Peritumorális MVD (CD34 ⁺ mikroér/mm ²)	
		átlag±SD	p-érték	átlag±SD	p-érték
Nem					
Férfi	24	97,6±33,6		202,0±78,8	
Nő	28	76,8±34,4	0,0303	216,0±106,0	n.s.
Tumorokalizáció					
Végtagok	21	84,4±31,6		207,6±88,0	
Axiális	31	87,6±38,0	n.s.	210,4±98,8	n.s.
Szövettani típus ^a					
SSM	30	79,6±30,0		201,2±86,4	
NM	19	94,4±41,2	n.s.	221,6±112,0	n.s.
Tumorvastagság					
1,01–2,0 mm	13	75,6±39,6		174,0±83,2	
2,01–4,0 mm	23	97,2±36,0		216,0±98,8	
>4,0 mm	16	79,6±27,6	n.s.	228,8±92,0	n.s.
Ulceráció					
Van	35	90,8±36,8		216,8±96,8	
Nincs	17	77,2±30,8	n.s.	194,4±87,6	n.s.
Áttétképzés					
Nem metasztatikus	19	89,6±44,0		220,3±118,4	
Nyirokcsomóáttét	8	77,2±26,0		208,0±88,4	
Zsigeri áttét	25	86,8±31,2	n.s.	201,6±75,2	n.s.
Túlélés					
>5 év	28	86,4±38,8		215,2±107,2	
<5 év	24	86,4±32,0	n.s.	202,8±76,8	n.s.

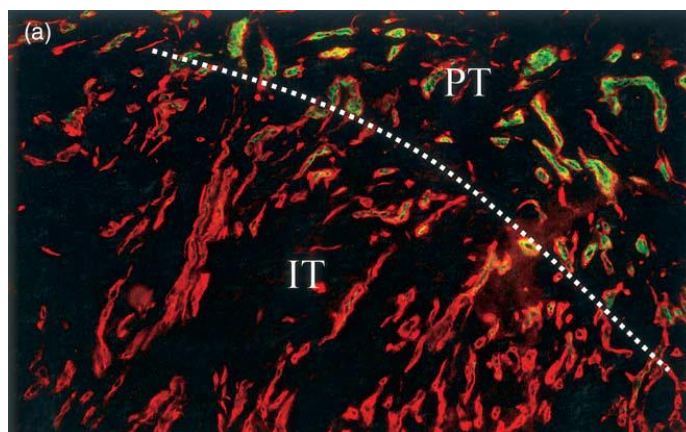
n.s.: nem szignifikáns, SSM: felszínesen terjedő (superficial spreading) melanóma, NM: noduláris melanóma. ^aA két akrolentiginózus és egy lentigo maligna melanóma nem szerepel a táblázatban

A továbbiakban elemeztük a tumorinfiltrátum két domináns sejt típusa, a makrofágok és a T-sejtek mennyiségének összefüggéseit a beteg- és tumorparaméterekkel. A CD68⁺ makrofágok intra- és peritumorális denzitása nagyobb volt a 2 mm-nél vastagabb melanómákban a vékonyabb tumorokhoz viszonyítva ($p=0,0259$ és $p=0,0520$). Az MVD esetében megfigyeltekhez hasonlóan az intratumorális makrofáginfiltráció alacsonyabb volt nőknél, mint férfiaknál ($p=0,0527$), míg a peritumorális mennyiségük nem mutatott különbséget. A tumorok lokalizációja, szövettani típusa, ulceráltsága és a betegség kimenetele nem mutatott összefüggést a makrofáginfiltrációval. A CD3⁺ T-limfociták peritumorális denzitása azonban kissé alacsonyabb volt az 5 éves követési idő alatt távoli szervi áttétet adó melanómáknál a nem metasztatizáló daganatokkal összevetve ($p=0,0659$).

4.8. A tumorbeli erek VAP-1-expressziójának vizsgálata primer melanómában

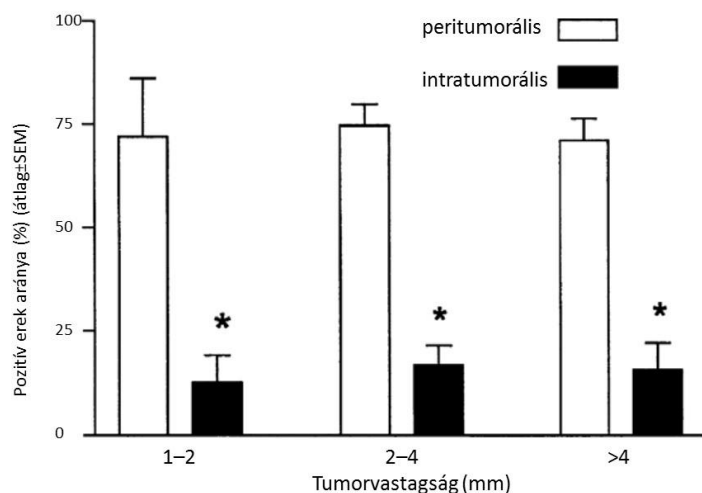
4.8.1. A VAP-1 protein immunhisztokémiai kimutatása

A humán melanómák vizsgálata a peritumorális ereken való megjelenéséhez képest az intratumorális ereken a VAP-1 fehérje alacsonyabb festődési intenzitását és gyakoriságát mutatta (20. ábra).



20. ábra. VAP-1 (FITC-jelölés, zöld) és laminin (rodaminnal jelölve, piros) kimutatása primer melanómában konfokális mikroszkóppal. Az intratumorális (IT) ereken jóval alacsonyabb mértékű VAP-1-expresszió látható a peritumorálisakhoz (PT) viszonyítva

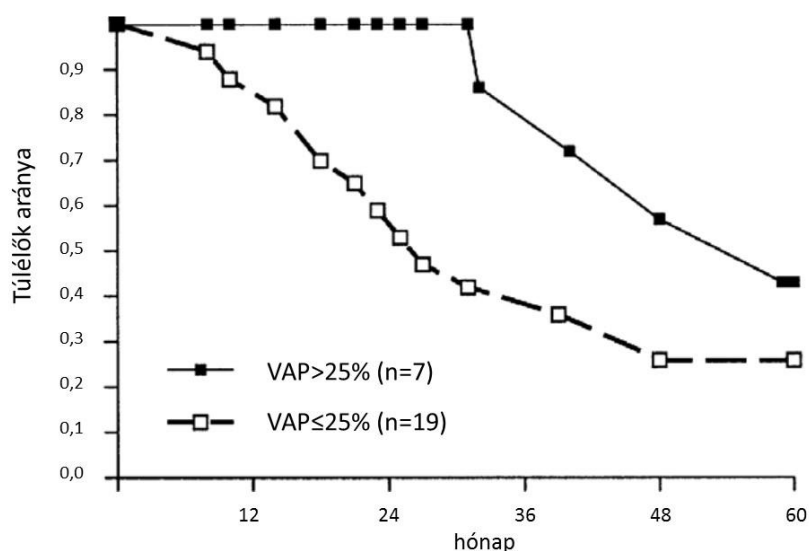
Huszonnyolc primer malignus melanómában elemezve a VAP-1-pozitivitás aránya intratumorális ereken szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a peritumorálisokon (átlag \pm SEM 15,6 \pm 18,4% vs. 70,6 \pm 19,3%, $p < 0,01$); a jelenség a tumorvastagságtól függetlenül megfigyelhető volt (21. ábra).



21. ábra. VAP-1-pozitív mikroerek százalékos aránya különböző tumorvastagságú primer melanómákban (* $p < 0,05$)

4.8.2. Az intratumorális erek VAP-1-expressziójának kapcsolata a tumorvastagsággal és a betegek túlélésével

Az intratumorális erek VAP-1-pozitivitására 25%-os küszöbértéket használva elemeztük a potenciális összefüggést egyes klinikopatológiai paraméterekkel. Nem találtunk szignifikáns különbséget a melanómák vastagságában az alacsony és a magas VAP-1-expressziós csoportban (átlagos tumorvastagság \pm SEM 4,8 \pm 2,9 vs. 6,0 \pm 7,7 mm). Nem volt különbség a CD8⁺ T-sejtek, illetve a CD1a⁺ dendritikus sejtek intratumorális denzitásában sem a két csoport között. Az alacsonyabb VAP-1-expresszió ugyanakkor némileg rosszabb túléléssel járt (5 éves túlélés 26,3% vs. 42,6%), bár a különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak ($p=0,0632$) (22. ábra), vélhetően részben az alacsony esetszám következtében.



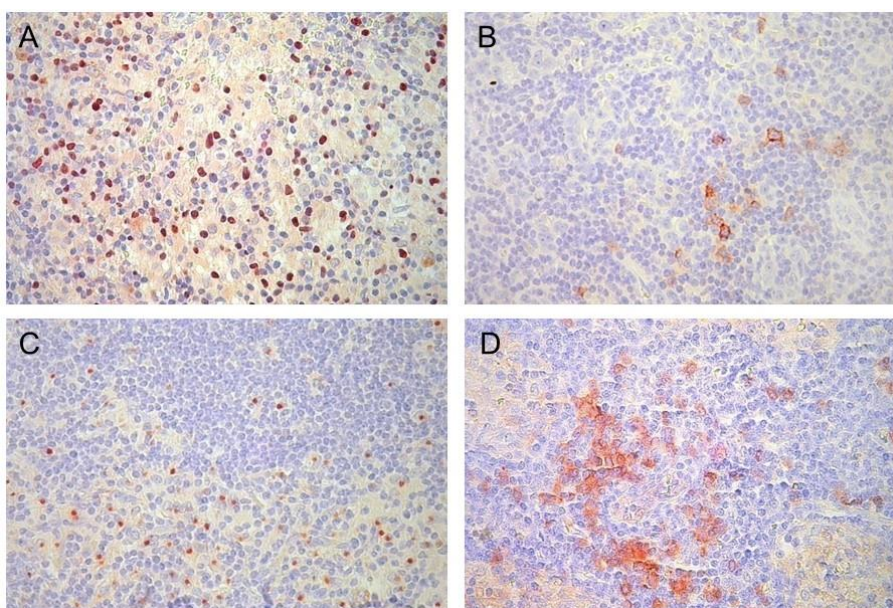
22. ábra. Kaplan–Meier túlélési görbék az intratumorális erek VAP-1-expressziója szerinti betegcsoportosításban

4.9. Immunsejtek vizsgálata melanómás betegek őrszemnyirokcsomóiban

4.9.1. Immunsejtek immunhisztokémiai kimutatása

Négy immunsejttípus megjelenését vizsgáltuk immunhisztokémiai technikával melanómás betegek őrszemnyirokcsomóiban (60 betegből származó 100 SLN-ben): OX40 T-sejt-aktivációs/kostimulációs molekulát expresszáló limfociták, FOXP3⁺ regulátor T-sejtek, DC-LAMP⁺ érett dendritikus sejtek, CD123⁺ plazmacitoid DC-k. Az OX40-membránfestődést mutató, valamint a magi FOXP3-pozitivitást mutató limfociták többnyire a parakortex

területén, elszórta fordultak elő (23.A,B ábra). A DC-LAMP markerre jellemzően juxtanukleáris, pontszerű kifejeződést mutató érett DC-k szintén főként a nyirokcsomók parakortikális régióiban helyezkedtek el, a T-sejtes területeket körülveve (23.C ábra). A CD123⁺ plazmacitoid DC-k részben szétszórta, részben aggregátumokban jelentek meg a parakortexben, többnyire a HEV-ek körül, melyek szintén CD123-pozitívak voltak (23.D ábra). Az áttétes nyirokcsomók némelyikében, különösen a nagy metasztázist tartalmazókban, az OX40⁺ limfociták és a DC-LAMP⁺ dendritikus sejtek megfigyelhetőek voltak az áttétek közelében, esetenként azokon belül is. Ez a jelenség a FOXP3⁺, illetve a CD123⁺ sejtek esetén ritkábban volt megfigyelhető.

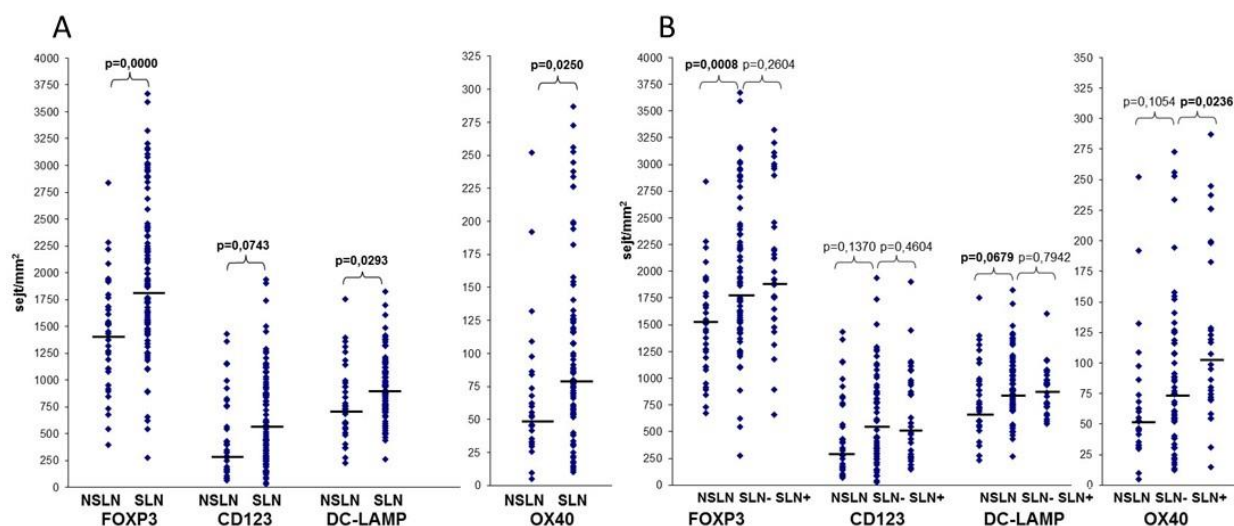


23. ábra. FOXP3⁺ (A), OX40⁺ (B), DC-LAMP⁺ (C), ill. CD123⁺ sejtek (D) melanómás betegek őrszemnyirokcsomóiban

Az immunhisztokémiai eredmények kvantitatív elemzése alapján, mely során az egyes markerekre pozitív sejteket legnagyobb sűrűségben tartalmazó 5-5 területen értékeltük azok denzitását, a FOXP3⁺ sejtek voltak jelen a legnagyobb mennyiségben (átlag±SD: 2003±720 sejt/mm²). Ezt követték a DC-LAMP⁺ érett dendritikus sejtek (938±280 sejt/mm²), majd a CD123⁺ pDC-k (650±434 sejt/mm²), míg az OX40 aktivációs markert hordozó limfociták száma volt a legalacsonyabb (100±68 sejt/mm²). Az egyes sejtípusok denzitásértékei egymással nem mutattak korrelációt.

4.9.2. Szentinel- és nem szentinel nyirokcsomók, továbbá metasztatikus vs. tumormentes SLN-ek immunsejtdenzitásának összehasonlítása

A betegek egy részében – pozitív SLN-státusz miatt végrehajtott – blokkdisszekcióból származó, nem szentinel nyirokcsomók (NSLN) is elérhetőek voltak (7 betegből 37 nyirokcsomó). Az őrszemnyirokcsomókhöz viszonyítva ezekben a FOXP3, OX40 és DC-LAMP markerekre pozitivitást mutató sejtek kisebb mennyiségben voltak megtalálhatóak, s erre mutató trendet figyeltünk meg a CD123⁺ pDC-k esetében (24.A ábra). Hasonló, bár kevésbé szignifikáns tendencia mutatkozott akkor, ha csak a tumormentes nyirokcsomókat (SLN: 69, NSLN: 35) vontuk be a vizsgálatba (24.B ábra). Ezekben a vizsgálatokban az összes beteg őrszemnyirokcsomóit (35 negatív, 25 pozitív SLN-státuszú) és a fent említett (SLN-pozitív státuszú) 7 beteg nem szentinel nyirokcsomóit értékeltük. Hasonló eredményeket kaptunk, ha csak a szentinel-pozitív betegek SLN-jeit vontuk be a vizsgálatba. Továbbá a 7 beteg esetében, akiknél mind SLN-, mind NSLN-minták rendelkezésre álltak, ezek egyedi összehasonlítása is azt mutatta, hogy a betegek többségében az SLN-ek immunsejt-denzitási értékei magasabbak vagy hasonlóak az NSLN-értékekhez (17. táblázat). A – szövettani és immunhisztokémiai vizsgálattal – tumorpozitívként (n=31), illetve -negatívként (n=69) diagnosztizált őrszemnyirokcsomók összehasonlítása az OX40⁺ limfociták magasabb átlagos denzitását tárta fel a metasztatikus nyirokcsomókban az áttétmentesekhez viszonyítva, míg a többi sejtípus esetén nem találtunk különbséget (24.B ábra).



24. ábra. Immunsejtek denzitása A) nem szentinel (n=37) és szentinel (n=100), illetve B) tumornegatív nem szentinel (n=69) és tumornegatív (n=69) vagy -pozitív (n=31) szentinel nyirokcsomókban (a pontok egyedi minták értékei, a vízszintes vonalak mediánértékek)

17. táblázat. Szentinel és nem szentinel nyirokcsomók átlagos immunsejtdenzitása (sejt/mm²) 7 betegnél, akiknek SLN- és NSLN-mintája is elérhető volt

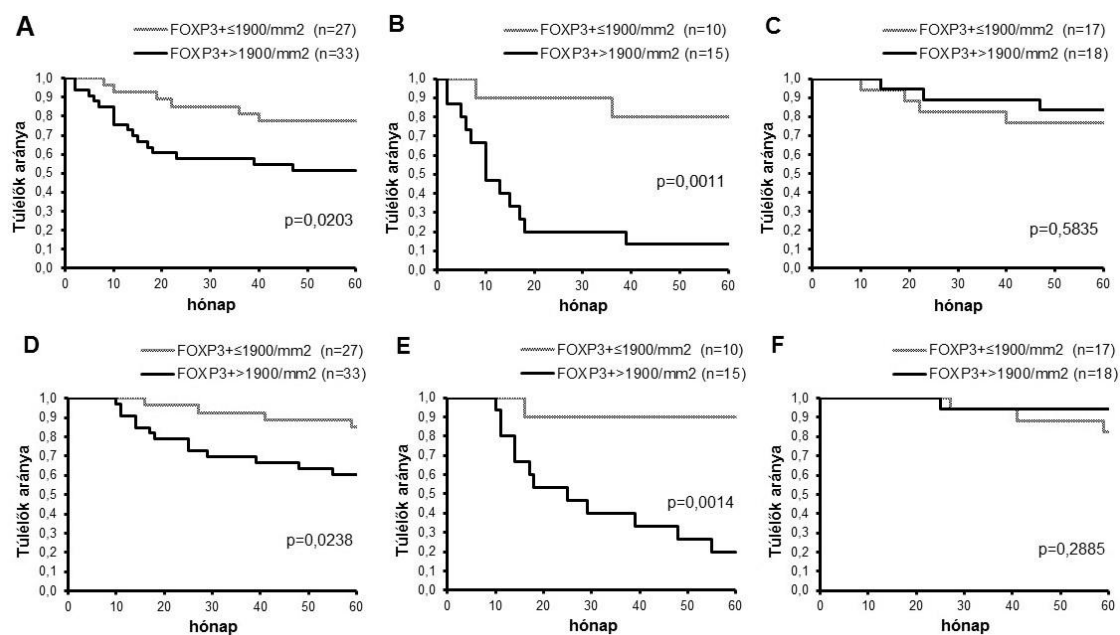
Marker Betegsz.	FOXP3		OX40		CD123		DC-LAMP	
	SLN	NSLN	SLN	NSLN	SLN	NSLN	SLN	NSLN
1.	1958	957	193	65	232	280	818	660
2.	1925	1477	119	192	1450	621	957	648
3.	2205	1060	15	60	222	214	573	1038
4.	1562	1450	117	29	938	242	592	657
5.	2123	2086	245	192	1154	566	1059	384
6.	2814	1747	61	33	244	225	925	744
7.	1768	1633	54	60	395	1040	1171	989

4.9.3. Az őrszemnyirokcsomók immunsejt-denzitásának kapcsolata klinikopatológiai paraméterekkel

Az SLN-ekben a jelölt sejtek átlagos denzitásértékei nem mutattak összefüggést a beteg- és tumorparaméterekkel (a primer tumor vastagsága, szövettani típusa, ulcerációja, ill. lokalizációja, a beteg kora és neme) egyik vizsgált immunsejttípus esetén sem. A mediánértékek alapján az egyes sejttípusokra megállapított küszöb feletti átlagdenzitást mutató betegek aránya sem volt kapcsolatba hozható egyik fenti tényezővel sem, kivéve a nagy mennyiségű CD123⁺ sejtet tartalmazó minták gyakoribb előfordulását a fiatalabb betegekben (53 év alattiak: 21/30 [72%], 53 év felettiak: 13/30 [43%], p=0,0238).

4.9.4. Az őrszemnyirokcsomók immunsejt-denzitásának kapcsolata a betegségprogresszióval és a túléléssel

Az SLN-ekben a FOXP3⁺ sejtek átlagos denzitása alapján elvégzett Kaplan–Meier-analízis arra mutatott, hogy e sejtek nagy mennyisége szignifikánsan rövidebb progressziómentes és teljes túléléssel jár (25.A,B ábra). A pozitív és negatív őrszemnyirokcsomó-státuszú betegeknél külön-külön elvégezve az elemzést kiderült, hogy a különbség teljes egészében az SLN-pozitív betegeknél megfigyelhető jelentős eltérésnek köszönhető (25.C,D ábra), míg az SLN-negatívaknál nem látható túlélésbeli különbség (25.E,F ábra). A többi vizsgált immunsejttípus denzitásértékei nem mutattak összefüggést a túléléssel.



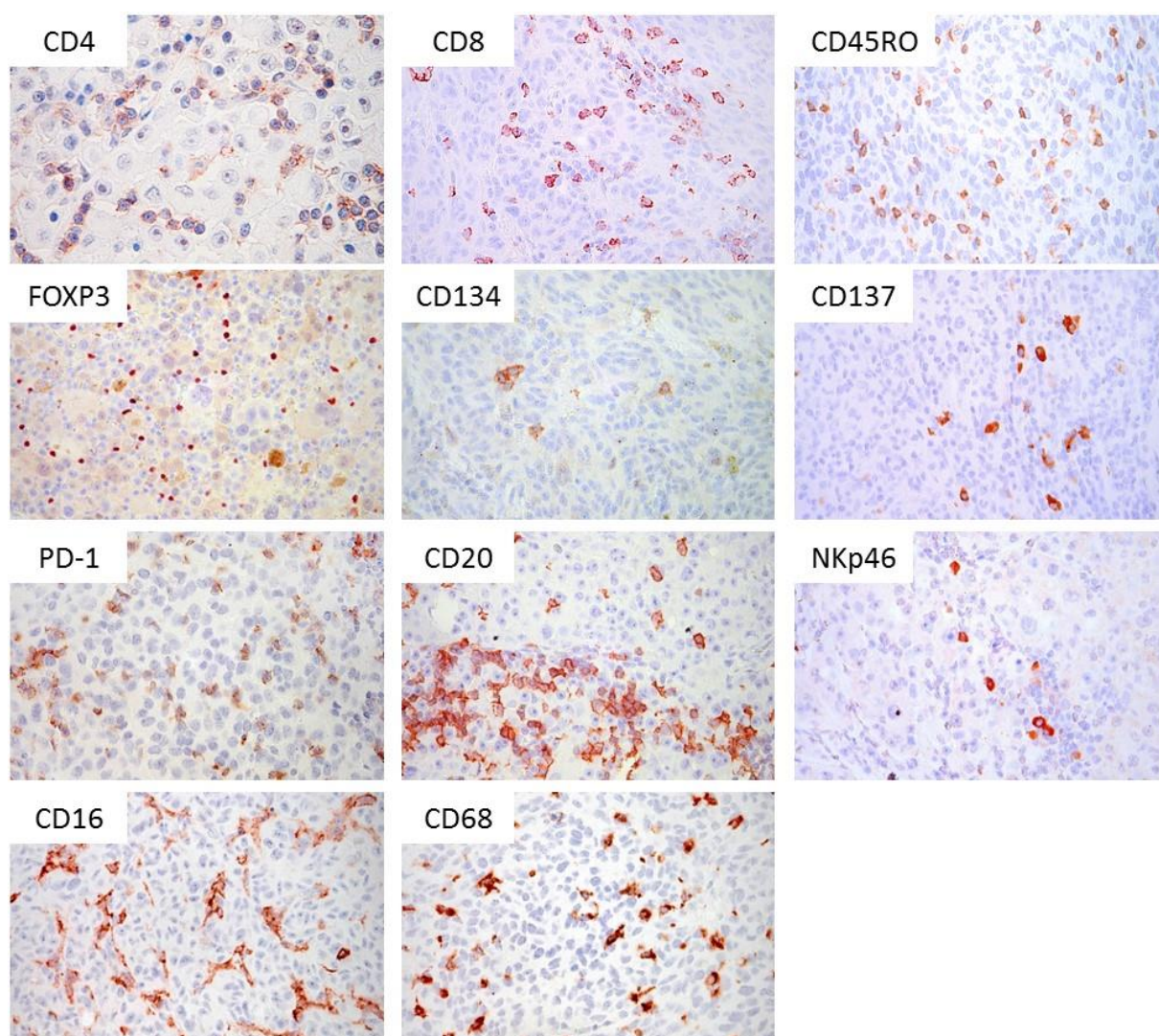
25. ábra. Melanómás betegek progressziómentes (A–C) és teljes túlélése (D–F) a FOXP3⁺ sejtek őrszemnyirokcsomókban meghatározott átlagos denzitása alapján (A, D: összes beteg, B, E: SLN-pozitív, C, F: SLN-negatív betegek)

Az immunsejtek mennyiségének potenciális prognosztikus hatását Cox-féle regressziós modellben is értékeltük, az immunsejtdenzitásokat folytonos változóként megadva, egyéb klinikopatológiai faktorokkal együtt (az előző fejezetben leírt tényezők mellett az őrszemnyirokcsomó-státuszt is bevonva a vizsgálatba). Az összes eset egyváltozós analízisével a primer tumor ulceráltsága, vastagsága, a szentinelstátusz és a szövettani típus függött össze szignifikánsan mind a progressziómentes, mind a teljes túléléssel (PFS: p=0,000, p=0,001, p=0,003, ill. p=0,033; OS: p=0,000, p=0,000, p=0,002, ill. p=0,028). Többváltozós analízissel az ulceráció, tumorvastagság, SLN-státusz és a beteg neve bizonyult a túlélés szignifikáns független prediktorának (PFS: p=0,000, p=0,005, p=0,005, ill. p=0,017; OS: p=0,000, p=0,005, p=0,016, ill. p=0,008). A vizsgált immunsejttípusok mennyisége nem volt prognosztikus sem a progressziómentes, sem a teljes túlélésre nézve. Amennyiben azonban csak a szentinelpozitív betegeket vizsgáltuk, szignifikáns vagy közel szignifikáns összefüggést találtunk a FOXP3⁺ sejtek átlagos denzitása és a PFS, ill. OS között (egyváltozós analízis: p=0,054 és p=0,038; többváltozós analízis: p=0,046 és p=0,069); az ulceráció, tumorvastagság és a beteg neve szintén szignifikáns prediktor volt. A szentinelnegatív betegekben csak a primer tumor szövettani típusa és ulceráltsága mutatott kapcsolatot a progressziómentes és a teljes túléléssel.

4.10. Immunsejtek vizsgálata ipilimumabkezelésben részesülő metasztatikus melanómás betegek nyirokcsomó- és bőr/subkután áttéteiben

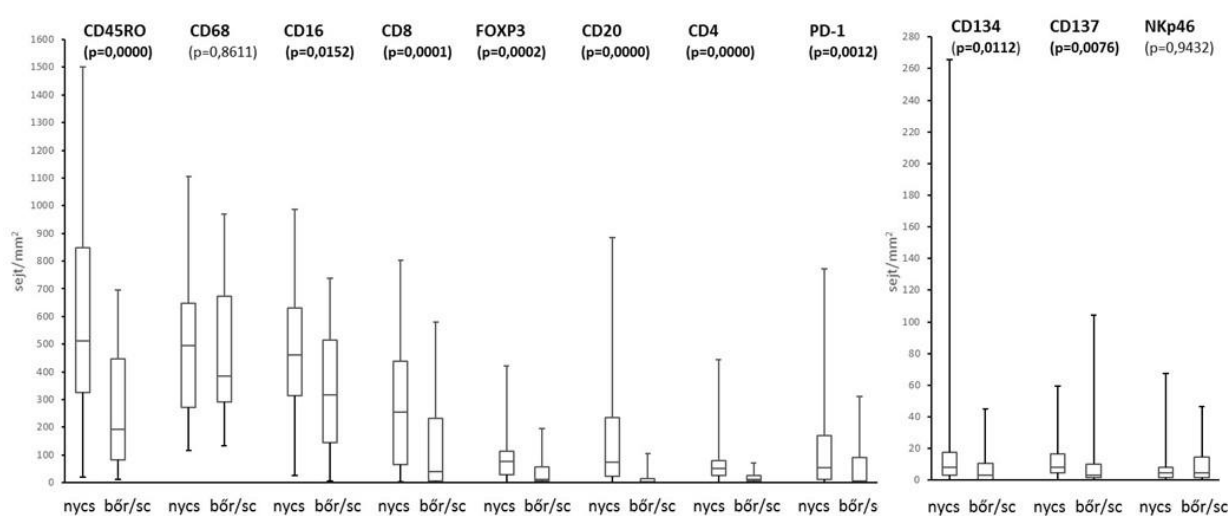
4.10.1. Immunsejtek immunhisztokémiai kimutatása

Tizenegy, különböző immunsejttípusokra specifikus immunsejtmarker (CD4, CD8, CD45RO, CD20, CD134, CD137, FOXP3, PD-1, NKp46, CD16, CD68) immunhisztokémiai kimutatását (26. ábra) követően az azokat expresszáló sejtek intratumorális denzitását 30 beteg 52 nyirokcsomó- és 34 bőr-, illetve szubkután áttétében vizsgáltuk.



26. ábra. $CD4^+$, $CD8^+$, $CD45RO^+$, $FOXP3^+$, $CD134^+$, $CD137^+$, $PD-1^+$, $CD20^+$, $NKp46^+$, $CD16^+$ és $CD68^+$ sejtek immunhisztokémiai kimutatása melanómaáttétekben (AEC kromogén, vörös)

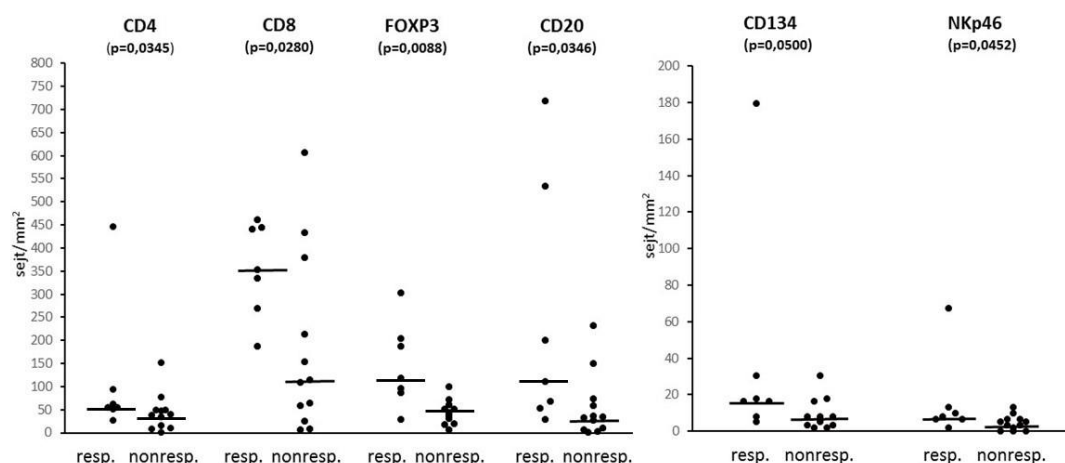
A nyirokcsomóáttétekben a CD45RO⁺ T-limfociták, CD16⁺ sejtek és CD68⁺ makrofágok voltak jelen a legnagyobb mennyiségben, ezeket a CD8⁺ T-sejtek, FOXP3⁺ sejtek, CD20⁺ B-limfociták, CD4⁺ és PD-1⁺ sejtek követték, míg a CD134 és a CD137 aktivációs markereket hordozó sejtek, valamint az NKp46⁺ NK-sejtek kis számban voltak megtalálhatóak (27. ábra). A CD68⁺ makrofágok és NKp46⁺ NK-sejtek kivételével az összes sejtípus esetén szignifikánsan alacsonyabb denzitás volt megfigyelhető a bőr/szubkután metasztázisokban a nyirokcsomóáttétekhez viszonyítva (27. ábra). A két lokalizáció között észlelt nagy denzitáskülönbség miatt az immunsejt-infiltráció prognosztikus és prediktív összefüggéseit a két áttétcsoportban külön-külön is értékeltük.



27. ábra. Immunsejtek denzitása nyirokcsomó- (nycs, n=52) és bőr/szubkután (bőr/sc, n=34) áttétekben (oszlopok: első és harmadik kvartilis, vízszintes vonalak: medián, függőleges vonalak: minimum- és maximumértékek)

4.10.2. A metasztázisok immunsejt-denzitásának kapcsolata az ipilimumabterápiára adott válasszal

Az ipilimumabkezelésre adott válasz alapján két csoportba soroltuk a betegeket: a komplett vagy részleges választ, illetve legalább 6 hónapig tartó betegségstabilizációt mutató betegeket a „reagáló” (responder), a többi beteget a „nem reagáló” (nonresponder) csoportba. A nyirokcsomóáttétekben a CD4⁺, CD8⁺, FOXP3⁺, CD134⁺ limfociták, CD20⁺ B-sejtek és NKp46⁺ NK-sejtek átlagos sűrűsége szignifikánsan nagyobb volt a reagálók csoportjában a nem reagálókhoz viszonyítva (28. ábra).



28. ábra. Immunsejtek denzitása ipilimumabkezelésre reagáló (resp.), ill. nem reagáló (nonresp.) betegek nyirokcsomóáttéteiben (pontok: egyedi értékek; vízszintes vonal: medián)

Mindegyik sejttípusra elemeztük az adott változóhoz tartozó (medián denzitás alapján megállapított) küszöbértéket meghaladó intratumorális átlagdenzitást mutató betegek arányát az ipilimumabterápiára adott válasz függvényében. Ebben az összehasonlításban a fent említett limfocitamarkerek mellett a CD137 is gyakoribb előfordulással jellemezte a kezelésre reagálókat (18. táblázat). A bőr-, illetve szubkután metasztázisok esetén ugyanakkor csak a CD68⁺ makrofágokat, valamint CD16⁺ sejteket nagy mennyiségben tartalmazó áttétes betegek arányában találtunk különbséget a kezelésre reagálók és nem reagálók között (18. táblázat). Az összes minta együttes értékelésekor a terápiás válasszal az NK-sejtek denzitása ($p=0,0182$), illetve az NK-sejtek, FOXP3⁺ sejtek, illetve CD68⁺ makrofágokat nagy mennyiségben tartalmazó áttétes betegek aránya (18. táblázat) mutatott összefüggést.

18. táblázat. Az infiltráló immunsejteket jelentős mennyiségben tartalmazó áttétes betegek arányának kapcsolata az ipilimumabkezelésre adott válasszal

Marker	Nyirokcsomóáttétek			Bőr/sc. áttétek			Összes áttét		
	Resp (n=7)	Nonresp (n=12)	p-érték	Resp (n=9)	Nonresp (n=10)	p-érték	Resp (n=13)	Nonresp (n=17)	p-érték
CD4	6 (86)	4 (33)	0,0274	5 (56)	5 (50)	n.s.	8 (62)	9 (53)	n.s.
CD8	6 (86)	3 (25)	0,0106	4 (44)	5 (50)	n.s.	8 (62)	5 (29)	n.s.
CD45RO	6 (86)	6 (50)	n.s.	6 (67)	4 (40)	n.s.	7 (54)	5 (29)	n.s.
CD20	6 (86)	4 (33)	0,0274	3 (33)	5 (50)	n.s.	6 (46)	4 (24)	n.s.
CD134	5 (71)	3 (25)	0,0480	5 (56)	4 (40)	n.s.	8 (62)	5 (29)	n.s.
CD137	5 (71)	2 (17)	0,0170	4 (44)	5 (50)	n.s.	7 (54)	7 (41)	n.s.
FOXP3	6 (86)	1 (8)	0,0009	5 (56)	5 (50)	n.s.	7 (54)	3 (18)	0,0371
PD-1	5 (71)	5 (42)	n.s.	3 (33)	6 (60)	n.s.	6 (46)	8 (47)	n.s.
CD16	5 (71)	6 (50)	n.s.	7 (78)	3 (30)	0,0373	8 (62)	6 (35)	n.s.
CD68	4 (57)	5 (42)	n.s.	8 (89)	3 (30)	0,0094	11 (85)	8 (47)	0,0344
NKp46 ^a	6 (86)	4 (33)	0,0274	4 (50)	3 (30)	n.s.	10 (83)	7 (41)	0,0232

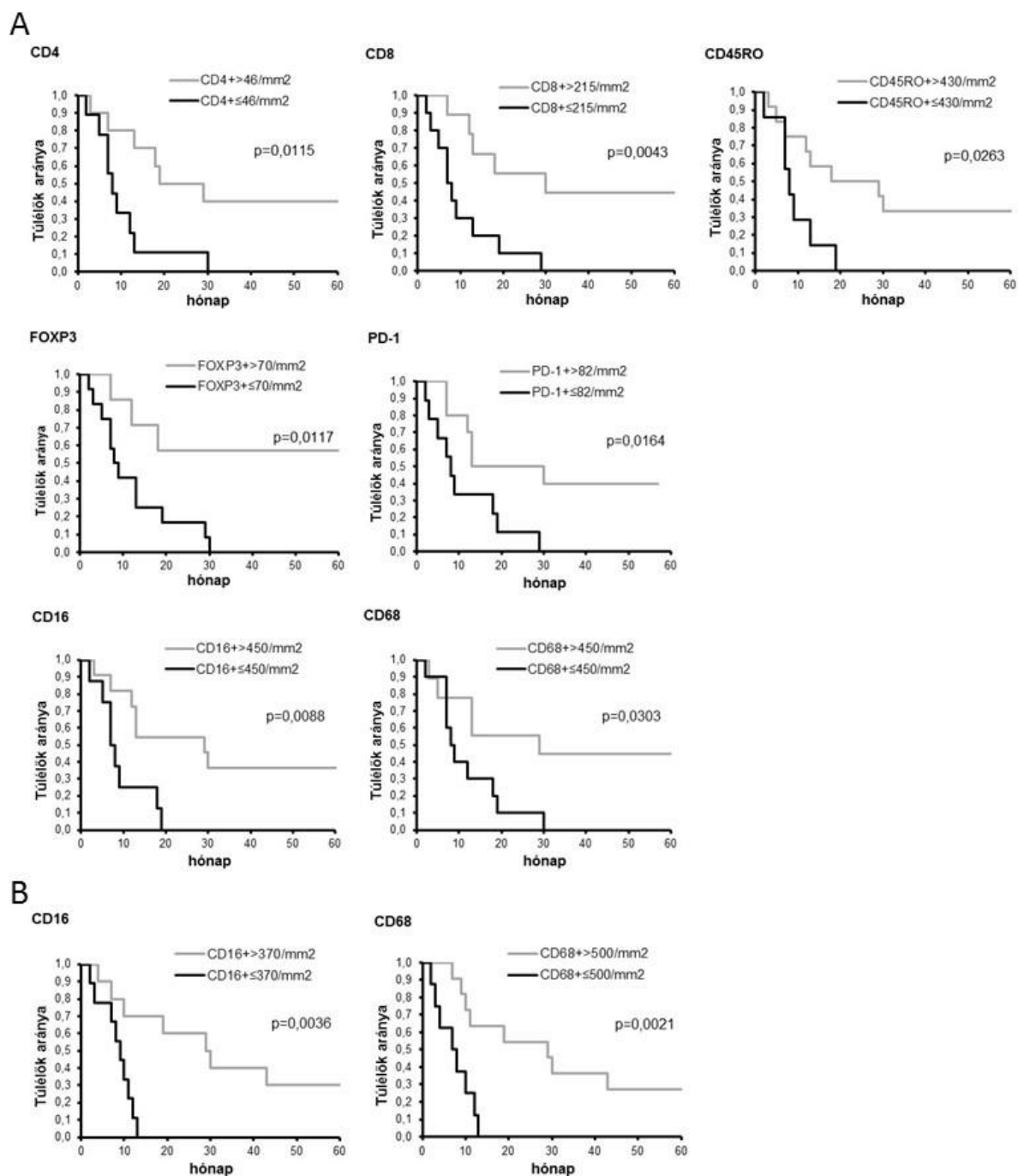
Betegek száma (%). Resp: a kezelésre reagálók, Nonresp: nem reagálók, n.s.: nem szignifikáns. ^aEgy esetet nem tudtunk értékelni

A vizsgált immunsejtípusok többsége esetén denzitásuk egymással korrelált, s gyakran mutattak együttes előfordulást. A nyirokcsomóáttétekben a tanulmányozott 11 markerből legalább 7-re erős expressziót találtunk a kezelésre reagáló 7 betegből 6-nál (86%), a 12 nem reagáló közül viszont csak 3-nál (25%) ($p=0,0106$).

4.10.3. A metasztázisok immunsejt-denzitásának kapcsolata a túléléssel

A nyirokcsomóáttétek átlagos immunsejtdenzitása alapján végzett Kaplan–Meier-analízis szerint a vizsgált 11 immunsejtípus közül 7 esetén nagy mennyiségük szignifikánsan hosszabb túléléssel járt (29.A ábra). Az immunsejtek denzitását folytonos változóként értékelve (a betegségstádiummal, a betegek korával és nemével, ECOG-státuszával, az áttétes szervek számával, az LDH-szinttel és a korábbi kezelésekkkel együtt) Cox-regressziós analízissel is vizsgáltuk prognosztikus hatásukat. Egyváltozós elemzéssel a $CD4^+$, $CD8^+$, $CD45RO^+$, $FOXP3^+$ és $CD16^+$ sejtek mennyisége szignifikáns összefüggést mutatott a túléléssel ($p=0,0290$, $p=0,0093$, $p=0,0180$, $p=0,0083$, ill. $p=0,0047$), az ECOG-státusz ($p=0,0009$) és az LDH-szint ($p=0,0227$) mellett. Az összes immunsejt-denzitási értéket és a klinikopatológiai paramétereket magába foglaló többváltozós analízis az ECOG-státuszt ($p=0,001$) és a $FOXP3^+$ sejtek mennyiségét ($p=0,004$) azonosította a túlélés szignifikáns független előjelzőjeként.

Hasonló összefüggéseket találtunk az összes áttét együttes értékelésekor, mind Kaplan–Meier- (nem mutatott eredmények), mind Cox-regressziós analízissel, mely szignifikánsan hosszabb túlélést mutatott a $CD4$, $CD8$, $CD45RO$, $FOXP3$, $CD16$, $CD68$, ill. $CD20$ markereket expresszáló sejtek nagy száma esetén ($p=0,0348$, $p=0,0136$, $p=0,0113$, $p=0,0121$, $p=0,0055$, $p=0,0168$, $p=0,0372$), továbbá a jobb ECOG-státuszú ($p=0,0026$) és normális LDH-szintű betegeknél ($p=0,0006$). Multivariáns elemzéssel az LDH-szint ($p=0,001$) és a $FOXP3^+$ sejtek denzitása ($p=0,016$) bizonyult a túlélés független prediktorának. A bőr-, ill. szubkután áttétek vizsgálatakor azonban csak a $CD16^+$ és a $CD68^+$ sejtek átlagos denzitása mutatott összefüggést a túléléssel mind Kaplan–Meier- (29.B ábra), mind Cox-regressziós analízissel ($p=0,0197$, ill. $p=0,0175$); ebben a csoportban csak az LDH-szint bizonyult független túlélési paraméternek ($p=0,002$). A betegségstádium, a betegek kora, ill. neme, az áttétes szervek száma és a korábbi kemo-, illetve sugárterápia nem volt prognosztikus egy- vagy többváltozós elemzéssel egyik csoportban sem.

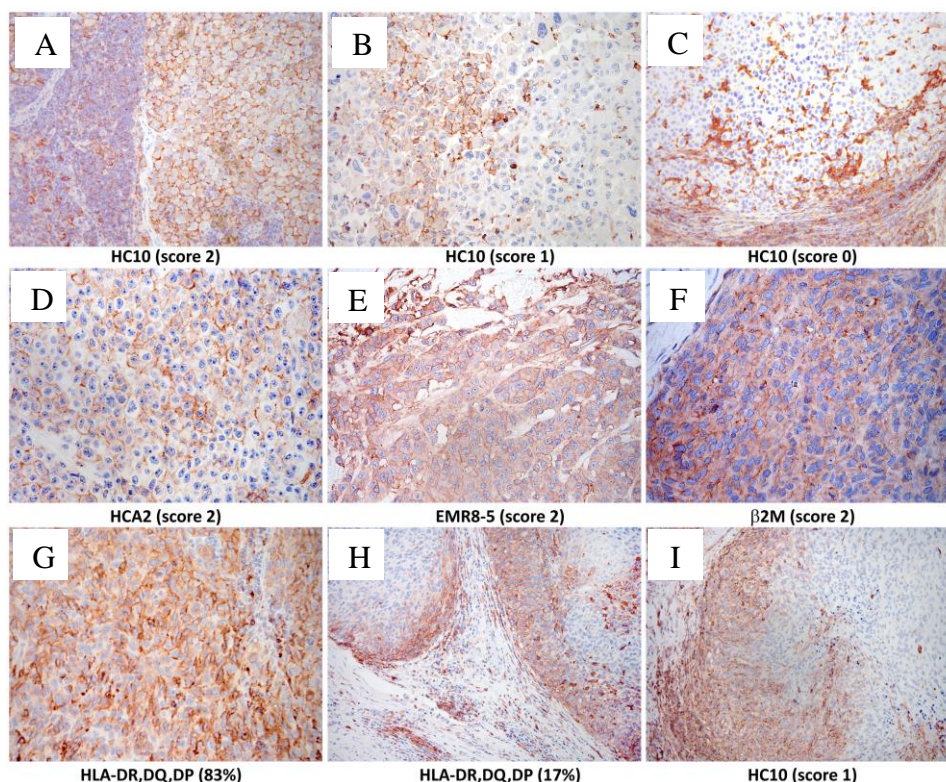


29. ábra. Kaplan–Meier teljes túlélési görbék az immunsejtek nyirokcsomóáttétekben (A), illetve a bőr/szubkután áttétekben (B) meghatározott átlagos denzitása szerinti csoportosításban

4.11. HLA-expresszió vizsgálata ipilimumabkezelésben részesülő metasztatikus melanómás betegek nyirokcsomó- és bőr/szubkután áttéteiben

4.11.1. HLA-I és -II molekulák expressziójának immunhisztokémiai kimutatása melanómasejteken

Az immunsejtdenzitás szempontjából is vizsgált 30 melanómás beteg 50 nyirokcsomó- és 35 bőr/szubkután áttétében elemeztük a melanómasejtek HLA-expresszióját négyféle HLA-I elleni (HCA2, HC10, EMR8-5, NAMB1) és egy HLA-II elleni antitest (LGII-612.14) segítségével. A HLA-I-expresszió szintjét jelző pontszámokban nem találtunk különbséget a nyirokcsomó- és a bőr/sc. metasztázisok között egyik ellenanyag esetében sem (HCA2: $1,3 \pm 0,8$ vs. $1,3 \pm 0,7$, HC10: $1,3 \pm 0,7$ vs. $1,2 \pm 0,8$, EMR8-5: $1,5 \pm 0,7$ vs. $1,6 \pm 0,6$, NAMB1: $1,2 \pm 0,8$ vs. $1,1 \pm 0,7$). A HLA-II esetén egy beteg kivételével, akinek nyirokcsomóáttéteiben a melanómasejtek jelentős része festődött (átlagosan 43%, tartomány 3–86%; 30.G ábra), a metasztázisok többsége (62%) lokalizációtól függetlenül negatívnak bizonyult. Legalább 1%-os expressziót a nyirokcsomóáttétek 41%-a és a bőr/sc. áttétek 34%-a, míg $\geq 10\%$ expressziót 16% és 8% mutatott. A HLA-I vagy -II molekulára heterogén festődést mutató daganatokban sok esetben az áttétek széli részein, a gyulladásozó sejtek közelében erősebb expresszió volt megfigyelhető, ami lokálisan indukált HLA-expresszióra utal (30.I, H ábra).



30. ábra. Melanómaáttétek immunhisztokémiai jelölése HLA-specifikus antitestekkel (AEC kromogén, vörös). A-I) Az aláírásban szereplő ellenanyaggal készült reakció és értékelése (pontszám, ill. %); H, I) heterogén festődés anti-HLA-DR,DQ,DP és HC10 antitesttel, főként az áttétek széli részein

4.11.2. A melanómasejtek HLA-expressziójának korrelációja a tumorinfiltráló immunsejtek denzitásával

A nyirokcsomóáttétekben a melanómasejtek HLA-I- és HLA-II-expressziójának mértéke pozitív korrelációt mutatott a CD8⁺ és a CD45RO⁺ T-sejtek és a PD-1 markert hordozó limfociták intratumorális sűrűségével (19. táblázat), míg a CD4⁺ és FOXP3⁺ sejtek mennyiségével nem láttunk összefüggést (nem mutatott adatok). A kután, illetve szubkután metasztázisokban ugyanakkor nem találtunk korrelációt a T-sejtek infiltrációja és a HLA-I-expresszió között, míg a HLA-II kifejeződése korrelált a CD8⁺, CD45RO⁺ és PD-1⁺ sejtek denzitásával (19. táblázat).

19. táblázat. Korreláció a tumorsejtek HLA-expressziója és az infiltráló sejtek denzitása között

	Korreláció a CD8 ⁺ sejtek denzitásával		Korreláció a CD45RO ⁺ sejtek denzitásával		Korreláció a PD-1 ⁺ sejtek denzitásával	
	r	p-érték	r	p-érték	r	p-érték
<i>Nyirokcsomóáttétek (n=50)</i>						
HC10	0,4493	<0,001	0,3913	<0,01	0,4111	<0,01
HCA2*	0,5092	<0,001	0,3542	<0,05	0,5121	<0,001
EMR8-5	0,3710	<0,01	0,3427	<0,02	0,3453	<0,02
anti-β2M	0,3339	<0,02	0,3204	<0,05	0,3145	<0,05
anti-HLA-DR,DQ,DP	0,4251	<0,01	0,3021	<0,05	0,4335	<0,01
<i>Bőr/sc. áttétek (n=35)</i>						
HC10	-0,0523	n.s.	-0,0698	n.s.	-0,1869	n.s.
HCA2*	0,1724	n.s.	0,1619	n.s.	0,0612	n.s.
EMR8-5	0,1794	n.s.	-0,2340	n.s.	-0,1674	n.s.
anti-β2M	-0,0299	n.s.	-0,0205	n.s.	-0,1067	n.s.
anti-HLA-DR,DQ,DP	0,6440	<0,001	0,3734	<0,05	0,5217	<0,001

r: Pearson-féle korrelációs együttható, n.s.: nem szignifikáns. *Két beteg 12 nyirokcsomóáttéteiben a HCA2-festődés nem volt értékelhető a normális sejtek negativitása következtében

4.11.3. A melanómasejtek HLA-expressziójának kapcsolata az ipilimumabterápiára adott válasszal

Az ipilimumabkezelésre adott klinikai válasz alapján két csoportba soroltuk a betegeket: „responderekre”, akik komplett vagy részleges válasszal, illetve több mint 6 hónapig tartó betegségstabilizációval reagáltak a kezelésre (11 beteg) és „nonresponderekre”, akik progressziót vagy ≤6 hónapos betegségstabilizációt mutattak (19 beteg). A responderek között szignifikánsan nagyobb volt a nyirokcsomóáttéteket tekintve magas átlagos HLA-I-pontszámmal jellemezhető esetek aránya, mint a kezelésre nem reagálókban a pan-HLA-A,B,C EMR8-5 ellenanyaggal értékelve, és hasonló, bár statisztikailag nem szignifikáns különbséget figyeltünk meg a főként HLA-B és -C alléleket felismerő HC10 és a β2M elleni

NAMB1 esetén (20. táblázat). Mindhárom komplett választ mutató és a parciális remissziót mutató egy beteg nyirokcsomóáttétei erős jelölődést adtak a HC10 ellenanyaggal, míg a stabil vagy progresszív betegséget mutató betegek között sokkal kisebb arányú volt a magas átlagos HC10-reaktivitás aránya (a 15-ből 6 esetben). Hasonló, bár statisztikailag nem szignifikáns eredményt kaptunk az EMR8-5-tel (20. táblázat). Nem találtunk ugyanakkor különbséget a terápiára reagáló és nem reagáló betegek között a bőr/sc. áttétek elemzésekor (20. táblázat). A négy HLA-I-alegység-specifikus antitesttel kapott eredményeket együttesen értékelve azt tapasztaltuk, hogy az antitestek többségével erősen festődő áttétek aránya magasabb volt a teljes vagy részleges remissziót mutató betegek csoportjában a stabil vagy progresszív betegséget mutatókhoz képest; a különbség mind a nyirokcsomó-, mind a bőr/sc. metasztázisok vizsgálatakor észlelhető volt, illetve a teljes betegcsoportban is. A HLA-II-expresszió azonban nem mutatott összefüggést a klinikai válasszal egyik vizsgált betegcsoportban sem. A HLA-I-, illetve HLA-II-expressziós pontszámok együttes elemzése a CD8⁺ vagy CD45RO⁺ T-sejtek denzitásértékeivel nem növelte a CD8⁺, ill. CD45RO⁺ sejtek mennyisége egyedüli vizsgálatának prediktív értékét (nem mutatott eredmények).

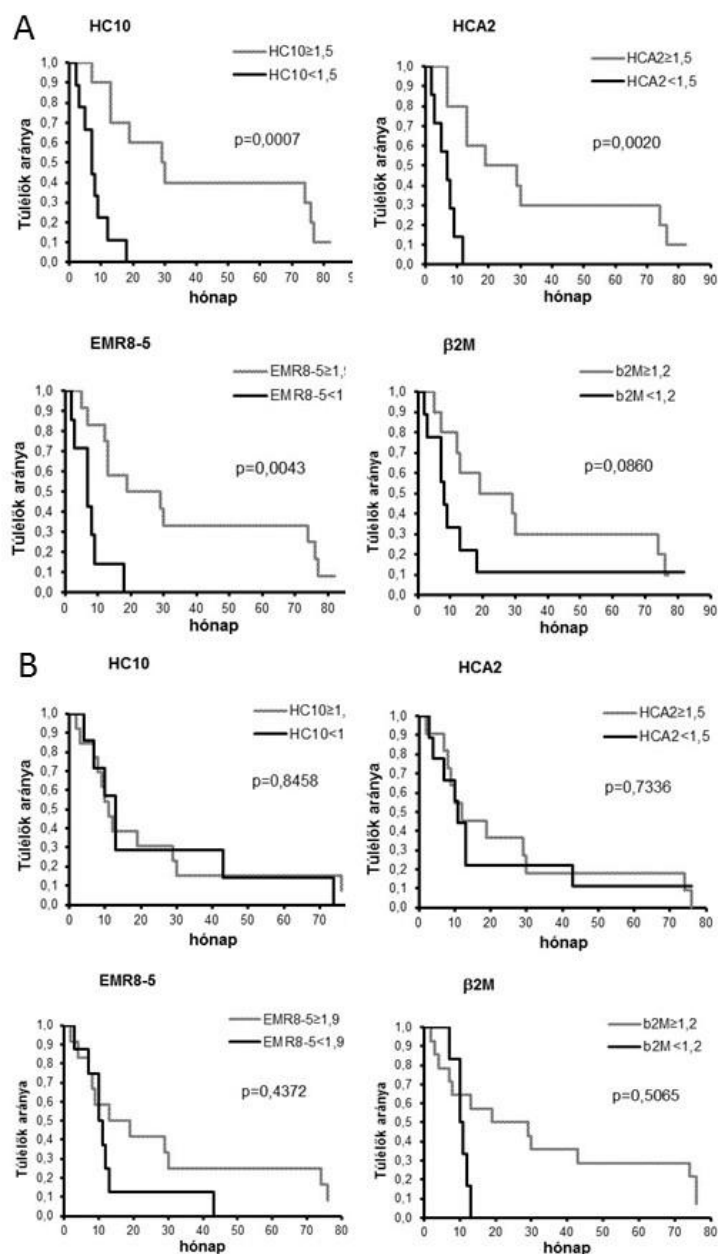
20. táblázat. A magas HLA-I-expressziójú esetek aránya és a terápiás válasz összefüggése

	CR+PR+ SD>6 hó	PD+ SD≤6 hó		CR+PR	PD+SD	
	esetek száma (%)		p-érték	esetek száma (%)		p-érték
<i>Nyirokcsomóáttétek (betegszám: 19)</i>						
HC10	5/6 (83)	5/13 (38)	0,0686	4/4 (100)	6/15 (40)	0,0327
HCA2*	4/5 (80)	6/12 (50)	0,2521	3/3 (100)	7/14 (50)	0,1103
EMR8-5	6/6 (100)	6/13 (46)	0,0237	4/4 (100)	8/15 (53)	0,0856
anti-β2M	5/6 (83)	5/13 (38)	0,0686	3/4 (75)	7/15 (47)	0,3133
≤1 mAb-vel alacsony reakció	5/6 (83)	5/13 (38)	0,0686	4/4 (100)	6/15 (40)	0,0327
<i>Bőr/sc. áttétek (betegszám: 20)</i>						
HC10	6/8 (75)	7/12 (58)	0,4439	3/4 (75)	10/16 (62)	0,6392
HCA2*	5/8 (62)	6/12 (50)	0,5820	3/4 (75)	8/16 (50)	0,3687
EMR8-5	5/8 (62)	7/12 (58)	0,8522	4/4 (100)	8/16 (50)	0,0679
anti-β2M	6/8 (75)	8/12 (67)	0,6903	4/4 (100)	10/16 (62)	0,1432
≤1 mAb-vel alacsony reakció	5/8 (62)	5/12 (42)	0,3613	4/4 (100)	6/16 (37)	0,0253
<i>Összes eset (betegszám: 30)</i>						
HC10	8/11 (73)	9/19 (47)	0,1768	5/6 (83)	12/24 (50)	0,1405
HCA2*	6/10 (60)	7/18 (39)	0,2831	4/5 (80)	9/23 (39)	0,0968
EMR8-5	8/11 (73)	9/19 (47)	0,1768	6/6 (100)	11/24 (46)	0,0166
anti-β2M	8/11 (73)	10/19 (53)	0,2789	5/6 (83)	13/24 (54)	0,1921
≤1 mAb-vel alacsony reakció	7/11 (64)	7/19 (37)	0,1563	6/6 (100)	8/24 (33)	0,0034

CR: komplett válasz, PR: részleges válasz, SD: betegségstabilizáció, PD: progresszív betegség, mAb: monoklonális antitest. *Két beteg 12 nyirokcsomóáttéteiben a HCA2-festődés nem volt értékelhető a normális sejtek negativitása következtében

4.11.4. A melanómasejtek HLA-expressziójának kapcsolata a túléléssel

A teljes túlélés Kaplan–Meier-analízise szignifikáns kapcsolatot tárt fel a HLA-I-expresszióval a nyirokcsomóáttétekben, míg a bőr/szubkután áttétek esetén nem volt összefüggés (31. ábra).



31. ábra. Kaplan–Meier teljes túlélési görbék a nyirokcsomóáttétekben (A), illetve bőr/szubkután áttétekben (B) a melanómasejtek HLA-I-expressziója szerinti csoportosításban

A HLA-I-expresszió prognosztikai szerepét (folyamatos változóként értékelve) egyéb betegség és tumorjellemzőkkel (kor, nem, ECOG-státusz, LDH-szint, az áttétes szervek száma, betegségstádium) Cox-regressziós analízissel is elemeztük. A nyirokcsomó-áttétes esetek vizsgálatokor egyváltozós analízissel a HCA2 és a HC10 antitestekkel kimutatott expressziós szint ($p=0,0456$ és $p=0,0210$), valamint az ECOG-státusz ($p=0,0009$) és az LDH-szint ($p=0,0227$) mutatott szignifikáns összefüggést a túléléssel. Multivariáns elemzéssel csak az ECOG-státusz szerepe bizonyult szignifikánsnak ($p=0,001$). A bőr/sc. metasztázisos esetekben, illetve az összes beteg együttes vizsgálatokor a HLA-I-expresszió nem mutatott összefüggést a túléléssel sem egy-, sem többváltozós analízissel; e csoportokban az LDH-szint bizonyult az egyedüli független szignifikáns biomarkernek ($p=0,001$ és $p=0,000$). Amikor a négy HLA-I elleni alegység-specifikus antitesttel kapott eredmények helyett a kombinált score-ral végeztük az elemzést, a magas együttes expressziós szint a nyirokcsomóáttétekben szignifikánsan ($p=0,0017$) korrelált a túléléssel univariáns, de nem multivariáns analízisben. Hasonló eredményt kaptunk az összes beteg elemzésekor ($p=0,0240$). A HLA-II expressziója viszont egyik betegcsoportban sem mutatott összefüggést a túléléssel.

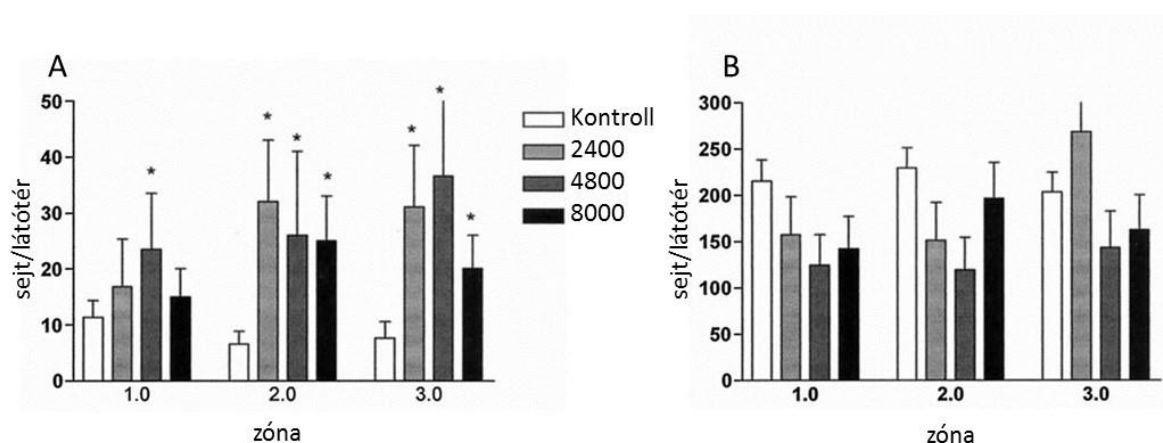
A HLA-I-expressziós pontszámokat a CD8⁺, ill. CD45RO⁺ T-sejtek mennyiségével együtt értékelve univariáns Cox-regressziós analízissel, a nyirokcsomóáttétek vizsgálata szerint a magas HLA-I-expresszió és magas T-sejt-denzitás kombinációja jelentősen kedvezőbb túléléssel járt a többi csoporthoz viszonyítva ($p=0,0001$, $p=0,0021$, $p=0,0033$, $p=0,0002$, $p=0,0053$ és $p=0,0012$ a CD45RO/HC10, CD45RO/HCA2, CD45RO/EMR8-5, CD8/HC10, CD8/HCA2 és CD8/EMR8-5 kombinációk esetén). Multivariáns elemzéssel a magas CD45RO/magas HC10 kombináció a jó prognózis szignifikáns független biomarkerének bizonyult ($p=0,000$). A bőr, illetve szubkután áttétek vizsgálatában a CD45RO/EMR8-5 és CD45RO/NAMB1 kombinációk szignifikáns (mindkettő $p=0,0128$) tényezőnek bizonyultak univariáns, de nem multivariáns analízissel.

4.12. Immunsejtek vizsgálata neoadjuváns leukocita-interleukin terápiában részesülő szájüregi laphámrákos betegek tumormintáiban

Két klinikai vizsgálat folyt – a CEL-SCI Corporation szponzorálásával, több magyarországi centrum részvételével – a lokális leukocita-interleukin (LI) neoadjuváns terápia hatásának felmérésére szájüregi laphámrákos betegekben. Az első, fázis I/II-es vizsgálatban három különböző LI-dózist hasonlítottak össze, míg a második, fázis II-es trial-ben nagy dózisban használták az LI-t.

4.12.1. Immunsejtek immunhisztokémiai kimutatása, LI-kezelt és kezeletlen tumorok összehasonlítása – első (fázis I/II-es) klinikai trial

A neoadjuváns LI-terápiában részesült betegek tumormintáiban tanulmányoztuk az infiltráló immunsejteket, kontrollként kezeletlen OSCC-s betegek daganatmintáit használva. Az egyes immunsejttípusok mennyiségének értékelése a stromális és intraepiteliális területeken külön-külön, ezen belül a daganatokat 3 régióra (tumorfelszín, -centrum, tumor-stróma határ) osztva, „hotspot” technikával történt. Az első klinikai vizsgálat betegeinek esetében a tanulmányozott immunsejttípusok közül (markerek: CD1a, CD3, CD8, CD20, CD25, CD45, CD68, mieloperoxidáz [MPO]) egyértelmű összefüggést a kezeléssel a CD3⁺ T-limfociták esetén találtunk. Ezek intraepiteliális mennyisége a kezelt tumorokban az LI-dózistól függetlenül szignifikánsan magasabb volt, különösen a tumorcentrumban és a strómahatáron, míg stromális denzitásukat statisztikailag nem szignifikáns csökkenő tendencia jellemezte (32. ábra).



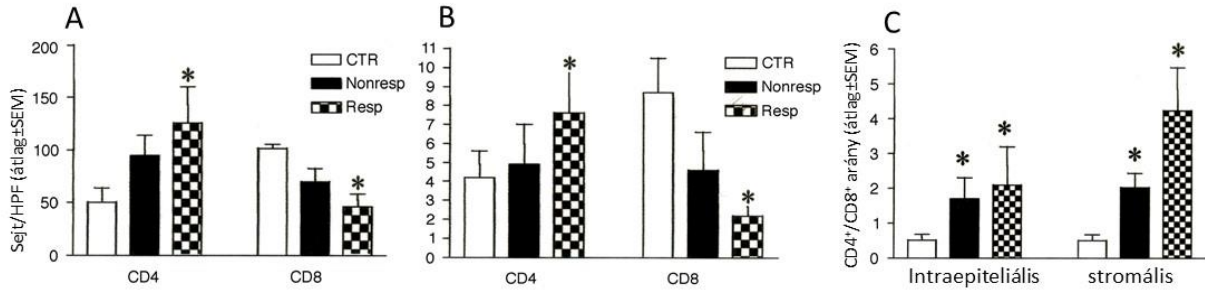
32. ábra. CD3⁺ T-sejtek intraepiteliális (A) és stromális (B) denzitása LI-kezelt és kontroll OSCC-kben (átlag±SEM; 1. zóna: tumorfelszín, 2. zóna: tumorcentrum, 3. zóna: tumor-stróma határ; *p<0,05)

A CD45 leukocita-markert hordozó sejtek intraepiteliális számának, továbbá a CD25 aktivációs markert (IL-2R α) hordozó limfociták stromális és intraepiteliális infiltrációjának szignifikáns növekedése csak a legkisebb LI-dózis esetén volt megfigyelhető, míg a CD1a⁺ dendritikus sejtek, CD8⁺ T-limfociták, CD20⁺ B-limfociták, CD68⁺ makrofágok és MPO⁺ neutrofil granulociták denzitásában nem találtunk szignifikáns különbséget az LI-kezelt és kontroll tumorok között. A CD1a⁺ DC-k mennyisége a tumorok területén (a kezeléstől függetlenül) alacsonyabb volt, mint a környező normális hámszövetben, hasonlóan a melanóma esetén megfigyeltekhez.

4.12.2. LI-kezelt és kezeletlen tumorok összehasonlítása, összefüggés a terápiás válasszal – második (fázis II-es) klinikai trial

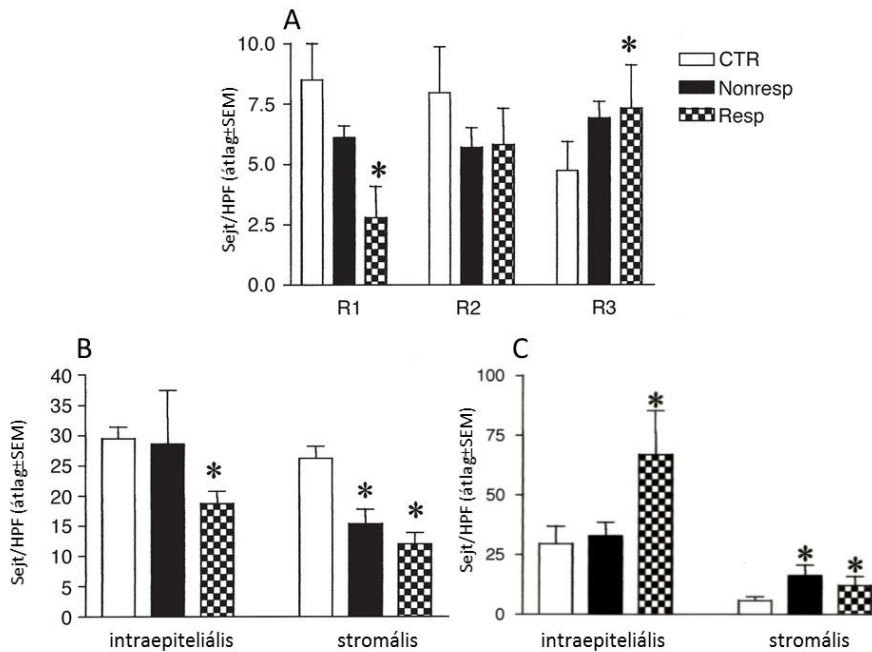
A második klinikai vizsgálatban részt vevő betegek (n=19) és kezeletlen kontrollok (n=20) tumormintáinak vizsgálata a korábbi trial esetén leírtakhoz hasonlóan történt. Az LI-terápia két betegnél komplett patológiai tumorválaszt, további két esetben jelentős (50%-ot meghaladó) képalkotói méretcsökkenést, míg 4 esetben 30–50% közötti kismértékű választ eredményezett, egy betegben progressziót, 10-nél pedig stabil betegséget írtak le (teljes válaszarány: 8/19, 42%). A komplett regressziót mutató daganatok a visszamaradó tumorszövet hiánya miatt kiestek az immunhisztokémiai vizsgálatokból, így 6 kezelésre reagáló és 11 nem reagáló daganat immunsejtjeinek eloszlását tudtuk elemezni a 20 kontrollal összehasonlítva.

Mind a stromális, mind az intraepiteliális infiltrátumban magasabb CD4⁺ T-sejt-szám, ezzel párhuzamosan alacsonyabb CD8⁺ T-limfocita-szám volt megfigyelhető az LI-kezelt daganatokban; a különbség érdekes módon csak a kezelésre reagáló betegek csoportjában volt szignifikáns (33.A,B ábra). E változások a CD4⁺/CD8⁺ arány jelentős emelkedéséhez vezettek, mely mindkét kezelt csoportban a kontrollokhoz viszonyítva szignifikánsnak bizonyult, a stromális lokalizáció esetén azonban a kezelésre reagálóknál a nonresponderekhez képest is szignifikáns emelkedés mutatkozott (33.C ábra).



33. ábra. $CD4^+$ és $CD8^+$ sejtek stromális (A) és intraepiteliális (B) denzitása, ill. a $CD4^+/CD8^+$ arány (C) kontroll (CTR) és LI-kezelt OSCC-kben (Nonresp: nem reagálók, Resp: reagálók, $*p < 0,05$)

A $CD45RO^+$ memória T-sejtek, a $CD25$, ill. $CD134$ aktivációs markert kifejező limfociták, valamint a $CD20^+$ B-sejtek denzitása nem mutatott összefüggést az LI-kezeléssel. A $CD1a^+$ dendritikus sejtek (melyek csaknem kizárólag a daganatsejtfészkeken belül fordultak elő) eloszlása különbözött az LI-kezelt és a kezeletlen daganatok között; a terápiára reagáló betegekben a tumorfelszíni DC-k számának csökkenése, míg a tumor-stróma határon számuk emelkedése volt látható (34.A ábra). A $CD68^+$ makrofágok mennyisége (stromálisan csak a responderekben, intraepiteliálisan mindkét LI-kezelt csoportban) kisebb volt a kezelt tumorokban a kontrollokhoz viszonyítva (34.B ábra). Ezzel ellentétes eredményt kaptunk az MPO^+ neutrofil granulociták esetében (34.C ábra).

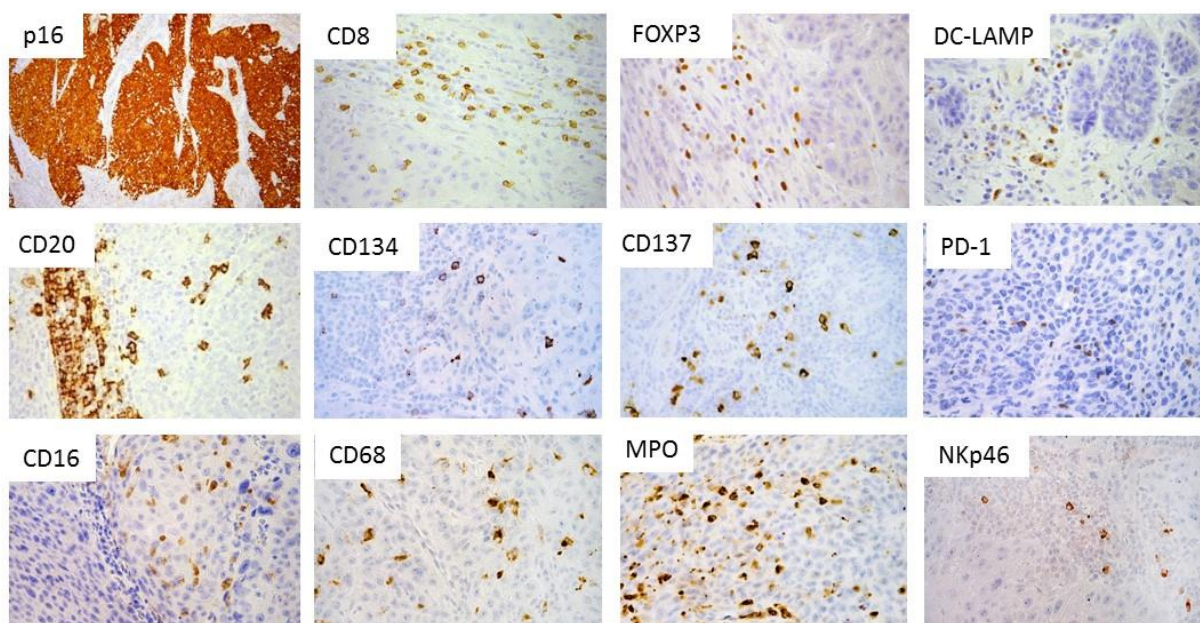


34. ábra. $CD1a^+$ dendritikus sejtek (A), $CD68^+$ makrofágok (B) és MPO^+ neutrofil granulociták (C) denzitása kontroll (CTR) és LI-kezelt OSCC-kben (Nonresp: nem reagálók, Resp: reagálók, R1: tumorfelszín, R2: tumorcentrum, R3: tumor-stróma határ, $*p < 0,05$)

4.13. Immunsejtek vizsgálata indukciós kemoterápiában (ICT) és cetuximabkezelésben részesülő fej-nyaki daganatos betegek tumorbiopsziás mintáiban

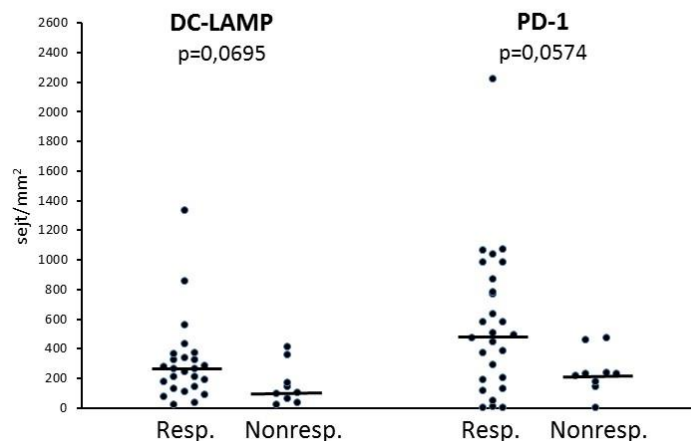
4.13.1. Az immunsejtek denzitásának kapcsolata a kezelésre adott válasszal és a túléléssel

Fej-nyaki daganatos betegek kezelés előtti biopsziás mintáiban vizsgáltuk a tumorasszociált immunsejtek ($CD8^+$ T-limfociták, $CD20^+$ B-sejtek, a $CD134$, $CD137$, ill. $PD-1$ aktivációs markereket expresszáló limfociták, $FOXP3^+$ regulátor T-sejtek, $NKp46^+$ NK-sejtek, $DC-LAMP^+$ érett dendritikus sejtek, $CD68^+$ makrofágok, a $CD16$ -ot (Fc γ receptor III) expresszáló sejtek, MPO^+ neutrofil granulociták) megjelenését immunhisztokémiai módszerrel (35. ábra).



35. ábra. p16 és immunsejtek immunhisztokémiai kimutatása HNSCC-s betegek ICT+cetuximab kezelés előtti tumorbiopsziás mintáiban (DAB kromogén, barna)

A sejtdenzitás-értékek lehetséges összefüggésének elemzése az indukciós kemoterápia + cetuximab kezelés eredményével azt mutatta, hogy a kezelésre reagálók tumorbiopsziáiban a $DC-LAMP^+$ érett dendritikus sejtek és a $PD-1$ aktivációs markert kifejező limfociták denzitása kissé nagyobb volt ($p=0,0685$, ill. $p=0,0574$) (36. ábra). A nagy mennyiségű $DC-LAMP^+$, ill. $PD-1^+$ sejtet tartalmazó tumoros betegek aránya szignifikánsan összefüggött a terápiás válasszal (21. táblázat). A többi vizsgált immunsejttípusra nézve nem találtunk korrelációt a kezelés kimenetelével. Az immunsejtek denzitását folytonos változóként elemző Cox-regressziós analízissel a $DC-LAMP^+$ érett dendritikus sejtek magas denzitása hosszabb progressziómentes túléléssel járt ($p=0,0402$); egyik lokális immunparaméter sem mutatott szignifikáns korrelációt a teljes túléléssel.



36. ábra. DC-LAMP⁺ érett dendritikus sejtek és PD-1⁺ limfociták infiltrációja a kezelésre reagáló (Resp.) és nem reagáló (Nonresp.) HNSCC-s betegek biopsziás mintáiban (pontok: az egyes betegek tumorának denzitásértékei, vízszintes vonalak: mediánértékek)

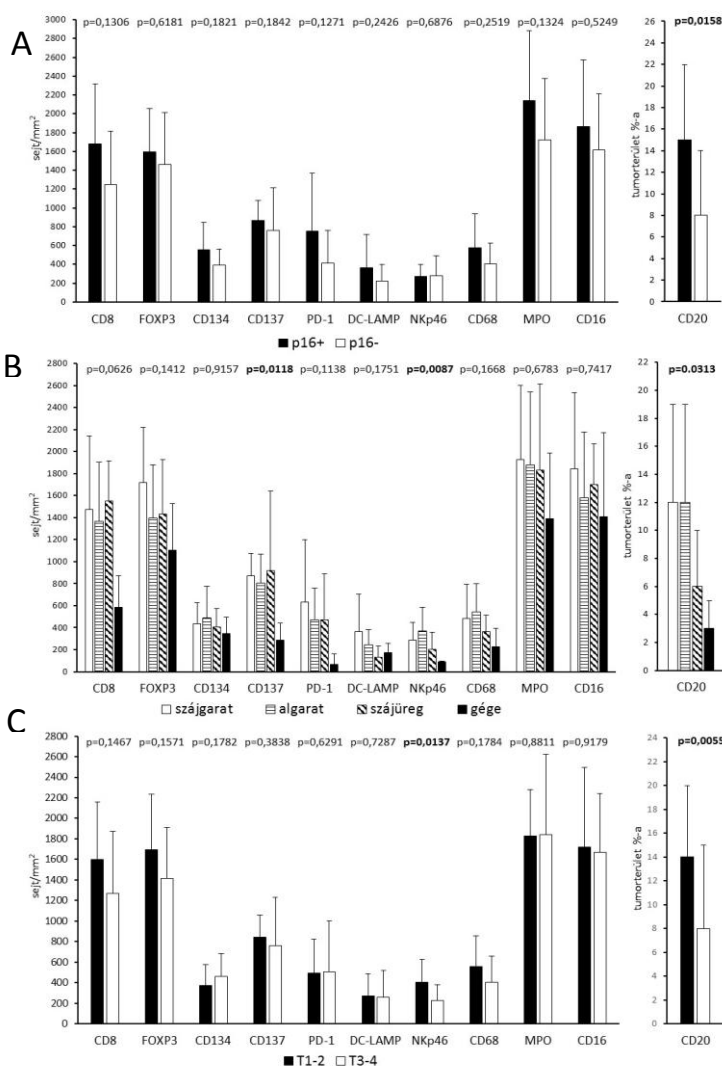
21. táblázat. Az infiltráló immunsejteket jelentős mennyiségben tartalmazó daganatos betegek arányának kapcsolata klinikopatológiai paraméterekkel és a terápiás válasszal

Paraméter	CD20	CD8	FOXP3	CD134	CD137	PD-1	DC-L.	NKp46	CD68	MPO	CD16
Kor											
≤56 év	11/22	13/22	14/22	14/20*	13/23	12/22	13/21	14/23	11/21	13/21	12/20
>56 év	8/16	7/17	6/17	4/17*	7/17	9/16	7/14	6/16	8/16	6/16	5/16
Nem											
Férfi	16/32	18/34	17/33	15/32	17/34	19/33	16/30	17/33	17/32	17/32	14/32
Nő	3/6	2/5	3/6	3/5	3/6	2/5	4/5	3/6	2/5	2/5	3/4
Dohányzás											
≤10 cs.é.	4/7	4/8	2/7	1/6	4/8	4/7	5/7	4/8	5/7	4/7	2/7
>10 cs.é.	15/31	16/31	18/32	17/31	16/32	17/31	15/28	16/31	14/30	15/30	15/29
Alk.fogy.											
0-1/nap	9/17	8/17	6/18	6/16	6/18	11/16	10/14	8/17	8/16	7/16	7/16
>1/nap	10/21	12/22	14/21	12/21	14/22	10/22	10/21	12/22	11/21	12/21	10/20
T stádium											
1-2	11/12*	9/11*	6/12	4/11	7/12	7/11	7/10	8/11	6/11	7/11	6/11
3-4	8/26*	11/28*	14/27	14/26	13/28	14/27	13/25	12/28	13/26	12/26	11/25
Lokalizáció											
Szájgarat	10/16*	9/15	11/16	8/15	10/16	9/15	10/14	10/16*	7/15	10/15	8/14
Algarat	8/11*	6/13	5/11	5/11	6/12	8/13	6/10	9/12*	7/11	5/11	5/11
Szájüreg	1/7*	5/7	3/7	3/6	4/7	4/7	1/7	1/7*	4/7	3/7	3/7
Gége	0/4*	0/4	1/5	2/5	0/5	0/3	3/4	0/4*	1/4	1/4	1/4
p16											
Pozitív	8/10	7/10	7/10	6/10	6/10	6/10	6/10	6/10	6/10	7/10	5/10
Negatív	11/28	13/29	13/29	12/27	14/30	15/28	14/25	14/29	13/27	12/27	12/26
ICT-válasz											
Igen	16/28	13/28	16/29	13/28	13/30	18/27*	18/25*	15/28	13/27	13/27	13/26
Nem	3/9	5/9	4/9	4/8	6/9	2/9*	2/9*	4/9	5/9	5/9	3/9

*szignifikáns különbség, cs.é.: csomagév, DC-L.: DC-LAMP

4.13.2. Az immunsejtek denzitásának kapcsolata a p16-státusszal és egyéb klinikopatológiai paraméterekkel

A p16-státuszra értékelhető 47 esetből 12 (26%) bizonyult p16-pozitívnak: 9/18 (50%) szájgarat- és 3/14 (21%) algaratdaganat, míg a 9 szájüregi és 6 gégerák p16-negatív volt ($p=0,0121$). A p16-státusz nem mutatott korrelációt az ICT-re adott válasszal, a túléléssel, vagy egyéb vizsgált beteg- és tumorparaméterekkel (kor, nem, dohányzás, alkoholfogyasztás, T-stádium). Több immunsejttípus esetén is tendencia volt megfigyelhető erősebb infiltrációra a p16⁺ esetekben, azonban a különbség csak a CD20⁺ B-sejtekre nézve volt szignifikáns ($p=0,0158$) (37.A ábra). A B-limfociták, továbbá az NKp46⁺ NK-sejtek és CD137⁺ sejtek esetén a tumorlokalizáció tekintetében is eltérést tapasztaltunk: a szájgarat- és algaratrákokat magas, míg a gégerákot alacsony denzitás jellemezte (37.B ábra, 21. táblázat). A B-, NK-sejtek és a CD8⁺ T-limfociták nagyobb mennyiségben voltak jelen a T1-2 tumorokban a T3-4 stádiumúakhoz viszonyítva (37.C ábra, 21. táblázat).



37. ábra. Immunsejtek denzitása (átlag±SD) a p16-státusz (A), tumorlokalizáció (B) és T-stádium (C) szerint

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Primer melanómákat infiltráló immunsejtek prognosztikai vizsgálata, kapcsolat az erzettséggel

A daganatok mikrokörnyezetét a malignus sejtek és – a szolid tumorok integráns részét képező – gazdaszervezeti sejtek kölcsönhatásai formálják. Az immunsejtek mind pozitív, mind negatív hatást gyakorolhatnak a betegség kimenetelére. A – fehérvérsejtek akkumulációjával, az ezek és egyéb sejtek által termelt citokinek és kemokinek jelenlétével, aktív szövetátépüléssel és angiogenezissel jellemzett – tumorasszociált gyulladás a daganat növekedésének, inváziójának és áttétképzésének kedvező feltételeket teremt. Az e folyamatokban fontos szerepet játszó tumorasszociált makrofágok, hízósejtek és neutrofil granulociták esetén a daganatprogressziót támogató hatások dominálnak, s nagyfokú infiltrációjuk a tumorba többnyire rossz prognózissal jár. A hatékony tumorelles immunválasz kialakulása viszont csökkenti a daganatkiújulás és az áttétképzés valószínűségét, így pozitívan befolyásolja a betegség kimenetelét. Ennek megfelelően az adaptív immunitásban kulcsszerepet játszó antigénprezentáló dendritikus sejtek és T-limfocita-alcsoportok nagy mennyisége a tumorban általában kedvező prognózissal jár együtt. A prognosztikai hatás az immunsejtek típusa mellett függhet a tumortípustól, -stádiumtól, továbbá az infiltrátum lokalizációjától is a lézió belül, illetve körülötte, s befolyásolja az immunsejtek funkcionális, aktivációs állapota, valamint kölcsönhatásuk egymással és a tumor mikrokörnyezetében található egyéb sejtekkel. A tumorinfiltráló immunsejtek vizsgálata egy adott időpillanatban csak pillanatfelvételt jelent a tumor-mikrokörnyezet aktuális állapotáról, mely folyamatosan változik a betegség lefolyása és a kezelések során (16).

Melanóma esetén a legtöbb, immunsejtekre fókuszáló prognosztikai vizsgálat a primer tumor limfoid infiltrációjának elemzésére irányult (az egyes limfocita-szubpopulációk megkülönböztetése nélkül: hematoxilin-eozin festett metszeteken a TIL értékelése), s meglehetősen ellentmondásos eredményt hozott. A néhány, többnyire kis esetszámra támaszkodó vizsgálatból, mely a T-limfociták mennyiségének prognosztikai relevanciáját elemezte, szintén nem vonható le határozott következtetés (22. táblázat) (63, 204).

22. táblázat. A primer melanómát infiltráló immunsejtek prognosztikai összefüggései

Vizsgálat	Betegszám	T-sejt	Aktivált T-sejt	Treg (FOXP3)	B-sejt (CD20)	Dendritikus sejt	pDC (CD123)	Makrofág
Ladányi 2004	76		jó (CD25, OX40)					
Piras 2005	47	jó (CD4, CD8)						nincs (CD68)
Ladányi 2007	82					jó (CD1a, DC-LAMP)		
Kiss 2007	52	nincs (CD3, CD8)						nincs (CD68)
Hillen 2008	58	rossz (CD3), nincs (CD8)	nincs (CD69)	nincs	nincs			nincs (CD68)
van Houdt 2008	34	jó (CD4, CD8)	jó (GrB)					
Jensen 2009	190							rossz (CD68, CD163)
Ladányi 2010	97			nincs				
Ladányi 2011	106				jó			
Jensen 2012	186	nincs (CD8)				jó (DC-LAMP)	rossz	
Storr 2012	202							nincs (CD68)
Emri 2013	46					jó (CD1a)		rossz (CD68, CD163)
Garg 2016	98				jó			
Weiss 2016	210	nincs (CD3)		nincs				
Melsted 2017	200			nincs				
Sebestyén 2018	118	nincs (CD8, CD45RO)	jó (CD25, OX40)	nincs	jó (1 kohorsz)	jó (DC-LAMP)		

Forrás: Ladányi A. Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma. Pigment Cell Melanoma Res 28:490–500, 2005 (módosításokkal). pDC: plazmacitoid dendritikus sejt

A T-sejtek funkcionális/aktiváltsági állapota nagyban befolyásolhatja tumorellenes hatékonyságukat, ennek prognosztikai értékét azonban kevesen elemezték (22. táblázat). Vizsgálataink egyik célkitűzése ezért két T-sejt-aktivációs marker, a CD25 (IL-2R α) és a CD134 (OX40) expressziójának értékelése volt malignus melanómákat infiltráló limfoid sejteken a tumorprogresszióval és a betegek túlélésével összefüggésben. A markereket hordozó T-limfociták magasabb denzitással voltak jelen azokban a melanómákban, melyek az 5 éves követési idő alatt nem vagy csak a regionális nyirokcsomókba adtak áttétet, mint a zsigeri áttétet is adó tumorokban, s magas peritumorális denzitásuk kedvezőbb túléléssel járt együtt; az OX40⁺ sejtek mennyisége multivariáns analízisben is szignifikáns prognosztikai tényezőnek bizonyult. Az intratumorális denzitás ugyanakkor nem mutatott összefüggést a betegek túlélésével. Ennek egyik oka lehet, hogy az aktivált T-sejtek intratumorális sűrűsége sokkal alacsonyabb volt, mint a peritumorális mennyiségük, s – néhány kiugró értéktől

eltekintve – a betegek közti variabilitás alacsony volt, így ezek a változók nem differenciáltak megfelelően a minták között. Emellett a CD25⁺ és OX40⁺ limfociták intratumorális infiltrációja hatásának hiánya arra is utalhat, hogy e sejtek többsége CD4⁺ T-limfocita, melyek funkciójuk betöltéséhez nem igényelnek közvetlen kapcsolatot a tumorsejtekkel. Irodalmi adatok szerint az OX40 preferenciálisan expresszálódik CD4⁺ T-sejteken (205), s a CD25-ről is több tumortípus esetén kimutatták, hogy a TIL-en belül nagyobb arányban fejeződnek ki a CD4⁺, mint a CD8⁺ sejteken (206). A mi vizsgálatunkban is gyakrabban volt megfigyelhető az aktivációs markerek expressziója CD4⁺, mint CD8⁺ T-limfocitákon.

A FOXP3 markert kifejező sejtek is nagyobb mennyiségben voltak jelen a peritumorális, limfocitában gazdag területeken, mint a tumorsejtfészkeken belül. Bár e transzkripciós faktor aktiváció hatására indukálódhat CD4⁺CD25⁻ és CD8⁺ T-sejteken is, korábbi tanulmányok szerint a tumorokat infiltráló FOXP3⁺ sejtek túlnyomó többsége CD4⁺CD25⁺, szuppresszív potenciállal rendelkező Treg-sejt (154, 207). Az archív mintákon végzett vizsgálatunkban nem volt lehetséges a FOXP3⁺ sejtek funkcionális jellemzése, mindazonáltal eredményeink azt sugallják, hogy a primer melanómákat infiltráló FOXP3-pozitív limfociták szuppresszor aktivitása nem nyilvánul meg a betegség későbbi lefolyásában, minthogy mennyiségük nem mutatott szignifikáns összefüggést az áttétek kialakulásával, illetve a betegek túlélésével. Prognosztikai szerepük hiányát egy korábbi, kisebb mintaszámú vizsgálat (150), valamint későbbi, nagyobb betegkohorszokra támaszkodó tanulmányok (152, 208) is alátámasztották (22. táblázat).

Vizsgáltuk a leghatékonyabb antigénprezentáló sejtek, a dendritikus sejtek, ezen belül a CD1a-t expresszáló DC-k és a DC-LAMP markert kifejező érett DC-k megjelenését és klinikopatológiai összefüggéseit is primer melanómákban. A CD1a⁺ dendritikus sejtek hasonló mennyiségben voltak jelen a melanómasejt-fészkekben és a peritumorális kompartmentben, míg a DC-LAMP⁺ érett DC-k szinte kizárólag a peritumorális területeken jelentek meg. Az érett DC-k preferenciális lokalizációja a limfocitákban gazdag peritumorális régiókban annak lehet köszönhető, hogy e területek emlékeztetnek a másodlagos nyirokszervekre, ahol egészséges szervezetben e sejtek általában megtalálhatók. Az érett dendritikus sejtek jelenléte a tumorszövetben, valamint a DC-k és az aktivált T-sejtek kolokalizációja és a denzitásuk közt észlelt korreláció arra utal, hogy antigénprezentáció és T-sejt-priming a tumorok mikrokörnyezetében is végbemehet. Mind a CD1a⁺ sejtek intra- és peritumorális, mind a DC-LAMP⁺ DC-k peritumorális denzitása erős fordított korrelációt mutatott a daganatvastagsággal, a CD1a-t tekintve megerősítve egy korábbi vizsgálat

eredményét (156). Nem találtunk összefüggést a DC-sűrűség és a szövettani típus, lokalizáció, illetve a betegek kora vagy neme között, az ulcerált melanómák azonban kevesebb dendritikus sejtet tartalmaztak, valószínűleg az ulceráció vastagabb daganatokban mutatott gyakoribb előfordulása következtében. Végül, a követési periódusban zsigeri áttétet (is) adó melanómákat alacsonyabb peritumorális DC-denzitás jellemezte, s ennek hatása tükröződött a DC-mennyiség és a túlélés összefüggésében is, különösen az érett dendritikus sejtek esetén, melyek denzitása a túlélés független prediktorának bizonyult. A dendritikus sejtek infiltrációjának prognosztikai szerepére vonatkozó eredményeinket későbbi vizsgálatok megerősítették (151, 159) (22. táblázat). A dendritikus sejtek és a – szintén kedvező prognosztikus hatású – aktivált T-limfociták mennyiségének kombinált elemzését is elvégeztük a 2-2 sejtípusmarkerrel. Vizsgálataink szerint valamennyi magas DC/magas aktivált T-sejt denzitás kombináció szignifikánsan jobb prognózist jelzett a többi alcsoporthoz viszonyítva, s a magas DC-LAMP/OX40 expresszió a túlélés független prediktorának bizonyult többváltozós analízissel. Eredményeink arra utalnak, hogy az antigénprezentáló dendritikus sejtek jelenléte a primer tumorban, különösen az érett DC-ké aktivált T-sejtekkel együttesen a melanóma progresszióját fékező funkcionális immunválasz jele lehet, s prognosztikus értékkel bír.

Más daganattípusokhoz hasonlóan, a primer melanóma infiltrátumában is a T-limfociták a domináns limfoid sejtípus, de jelentős mennyiségű CD20⁺ B-sejtet is megfigyeltünk az általunk vizsgált minták többségében, döntően peritumorális lokalizációban. A B-limfociták száma nem mutatott összefüggést a vizsgált klinikopatológiai paraméterekkel a tumorlokalizáció tekintetében megnyilvánuló különbség kivételével, melynek oka ismeretlen. Mind az intra-, mind a peritumorális B-sejt-denzitás magasabb volt azokban a melanómákban, melyek az 5 éves követési idő alatt nem képeztek zsigeri áttétet, s ennek megfelelően nagy mennyiségük kedvező túléléssel járt együtt. Egy korábbi, kisebb mintaszámot magába foglaló tanulmányban (150) nem találtak összefüggést a B-sejtek mennyisége és a túlélés között, későbbi vizsgálatok azonban alátámasztották e sejtek prognosztikai jelentőségét (209, 210) (22. táblázat). Hasonlóan a dendritikus sejtek esetén tapasztaltakhoz, megfigyelhető volt a melanómák peritumorális infiltrátumában a B-sejtek és az aktivációs markereket hordozó T-limfociták kolokalizációja, továbbá erős korreláció mutatkozott denzitásértékeik között (különösen az OX40 marker esetén). E megfigyelések felvetik annak lehetőségét, hogy a B-limfociták primer melanómákban antigénprezentáló sejt-ként működhetnek és részt vehetnek a T-sejtek aktivációjában. A B-sejtek e szerepét számos vizsgálat alátámasztja (44, 45), s egyik

lehetséges mechanizmusaként leírták az aktivált B-limfocitákon megjelenő OX40-ligandumon keresztüli kostimulációt (211). Elemeztük a B- és az aktivált T-sejtek denzitásértékei kombinációjának prognosztikus hatását; a B- és aktivált T-sejtek együttes alacsony peritumorális denzitása igen kedvezőtlen túléléssel járt, ami arra utal, hogy a B-limfociták – az antigénprezentáló dendritikus sejtek és az aktivált T-limfociták mellett – szintén részt vehetnek a tumor területén zajló immunreakciókban, mely prognosztikai hatásukban is megnyilvánul.

A vizsgált melanómák mintegy negyedében a B-sejteknek a nyirokcsomók follicusaira emlékeztető aggregátumait is megfigyeltük az általában tapasztalható elszórt peritumorális megjelenésük mellett. A B-sejtek csoportjaihoz T-limfociták kapcsolódtak, s CD21⁺ folliculáris dendritikus sejtek hálózata is megfigyelhető volt a vizsgált minták kb. egyharmadában. Hasonló összetételű ektópiás nyirokstruktúrákat (vagy az utóbbi időben elterjedt nevükön terciér limfoid struktúrákat, TLS) számos tumortípusban leírták (49–51). Melanómaáttétekben is megfigyelték előfordulásukat (47, 48). Primer melanómákban Cipponi és mtsai (47) nem találták nyomukat, amit azonban az általuk vizsgált esetek igen alacsony száma (n=10) mellett (a közleményben nem megadott) tumorvastagság szerinti megoszlásuk is okozhatott, minthogy anyagunkban tendenciát láttunk e struktúrák gyakoribb előfordulására vastagabb melanómákban. A B-sejt-aggregátumokhoz csatlakozó T-sejt-csoportok területén DC-LAMP⁺ érett DC-eket is megfigyeltünk, ezek jelenléte azonban nem korlátozódott az ektópiás limfoid struktúrákra, vagy az azokat tartalmazó tumorokra, ellentétben a tüdőráknál leírt preferenciális lokalizációjukkal (212). Tüdőrákban a magas endotélborítású venulák megjelenése is a TLS-ekhez köthető (213); bár az ektópiás nyirokstruktúrák szomszédságában mi is megfigyeltünk HEV-szerű ereket az esetek többségében, jelenlétük a TLS-t nem tartalmazó tumorok limfocitagazdag területein is kimutatható volt, más, primer melanómáról közölt beszámolókhöz hasonlóan (47, 114). A daganatokhoz asszociált TLS-ek funkcionális jelentőségét kevesen vizsgálták (47, 50); feltételezik, hogy szerepet játszanak az *in situ* tumorelles immunválasz kialakulásában. Ennek megfelelően jelenlétüket kedvező prognosztikus paraméternek találták több tumortípus esetén, néhány esetben azonban ezzel ellentétes eredményeket közöltek; úgy tűnik, hogy a prognosztikus képességet több paraméter is befolyásolja, köztük a TLS-ek lokalizációja és jellemzői (pl. folliculáris dendritikus sejtek, ill. csíráközpont jelenléte), valamint a vizsgált daganat típusa (49, 51, 214). Eredményeink szerint primer melanómában az ektópiás nyirokstruktúrák megjelenése nem mutat összefüggést a betegség kimenetelével.

A magas endotéllel borított venulák (HEV) jelenlétét a tumor területén a limfociták beáramlása, illetve a TLS-képződés és a lokális T-sejt-priming jelének tekintik (49, 213, 215). Primer melanómán végzett vizsgálataink eredménye megerősíti a korábbi megfigyeléseket a HEV-ek és a T-, ill. B-limfociták mennyisége közti erős korrelációról (113–115). Az aktivációs markereket (CD25, CD134, CD137) expresszáló limfociták számával ugyanakkor sokkal gyengébb korrelációt találtunk, azaz eredményeink nem utalnak kapcsolatra a HEV-ek jelenléte és a T-sejt-aktiváció között. Továbbá, ahogy fentebb említettem, a HEV-szerű erek megjelenése nem korlátozódott a TLS-ek területére, s a MECA-79⁺ erek és T-, ill. B-limfociták denzitása közötti korreláció az ektópiás nyirokstruktúrák jelenlététől függetlenül megfigyelhető volt. A tanulmányozott klinikopatológiai jellemzők közül a MECA-79⁺ erek denzitása a legerősebb összefüggést a daganatlokalizációval mutatta: a törzs, fej, ill. nyak bőrén található elváltozások sokkal nagyobb mennyiségben tartalmaztak ilyen ereket, mint a végtagokon elhelyezkedők, korábbi beszámolókhhoz hasonlóan (114, 115). Emellett a férfiak daganatai is nagyobb HEV-denzitást mutattak a nőkhöz képest, amit magyarázhat a törzsi lokalizációjú melanómák gyakoribb előfordulása férfiakban. A HEV-ek jelenlétének prognosztikai jelentőségéről viszonylag kevés és egymásnak részben ellentmondó adat áll rendelkezésre. Emlődaganatos betegekben a HEV-denzitás hosszabb progressziómentes és teljes túléléssel járt (113), kolorektális rák esetén viszont nem találtak ilyen összefüggést (216). Mindkét, korábban melanómán végzett vizsgálatban (114, 115) korrelációt találtak a HEV-denzitás és a tumorregresszió között, azonban melanóma esetén a regresszió és a prognózis kapcsolata kérdéses (217). A mi vizsgálatunk nem tárt fel összefüggést a HEV-szerű erek mennyisége és az áttétképzés vagy a túlélés között, hasonlóan egy korábbi megfigyeléshez (115). Az ellentmondásos prognosztikai összefüggések lehetséges magyarázata, hogy a tumorelles immunválaszban részt vevő immunsejtek mellett a HEV-ek immunszuppresszív sejtek tumorba áramlását is elősegíthetik (116). Ezt alátámasztja az a megfigyelésünk is, mely szerint a MECA-79⁺ erek mennyisége erősebb korrelációt mutatott a FOXP3⁺ sejtek infiltrációjával, mint a többi T-sejt-alcsoportéval.

A primer melanómák mikroérsűrűségét (MVD) CD34-expresszió alapján vizsgálva szintén nem találtunk különbséget az áttétképző képesség, illetve a túlélés szerint csoportosított daganatok között. Hasonlóan a MECA-79⁺ ereknél tapasztaltakhoz, a peritumorális MVD is korrelációt mutatott a limfociták sűrűségével, bár ez (a CD3⁺ T-sejtek kivételével) inkább a vastagabb, illetve a zsigeri áttétet adó daganatok esetén volt jelentős, mely csoportokban a makrofágok, illetve a dendritikus sejtek infiltrációjával is szignifikáns korrelációt láttunk.

Ugyanakkor a makrofágok intra- és peritumorális mennyisége nagyobb volt a 2 mm-t meghaladó melanómákban (nem mutatott adatok). Eredményeink alapján a makrofágok (illetve az általuk termelt angiogén faktorok) szerepet játszhatnak a magas rizikójú melanómák vaszkularizációjában, más daganattípusoknál leírtakkal összhangban (22). Az általános megfigyelésünk, hogy az immunsejtek denzitásával való korreláció nagyobb mértékű volt az előrehaladott melanómákban, arra enged következtetni, hogy e kölcsönhatás elősegítheti a tumorprogressziót.

Egy kisebb betegcsoport (n=28) melanómamintáján tanulmányoztuk a VAP-1 adhéziós fehérje expresszióját is. A peritumorális erek az összes vizsgált tumormintában pozitívan jelölődtek, míg az intratumorális ereket alacsonyabb VAP-1-expresszió jellemezte. Korábbi megfigyelések szerint melanómában a legaktívabb angiogenezis a peritumorális területeket jellemzi (109), s eredményeink arra utalnak, hogy a VAP-1 expressziója is e területeken kifejezettebb. Ebben a kis esetszámú mintában nem tudtunk kimutatni korrelációt intratumorálisan a VAP-1-expresszió és a citotoxikus T-sejtek, illetve a DC-k denzitása között (peritumorálisan nem vizsgáltuk ezek kapcsolatát). Megfigyelhető volt ugyanakkor egy tendencia az alacsony intratumorális VAP-1-expresszió és a kedvezőtlen 5 éves túlélés összefüggésére, ami arra utal, hogy a tumoron belüli erek fenotípusának szerepe lehet a melanóma progressziójában.

5.2. Immunsejtek vizsgálata melanómás betegek őrszemnyirokcsomóiban

Retrospektív vizsgálatunkban több immunsejttípus: OX40⁺ aktivált T-limfociták, FOXP3⁺ regulátor T-sejtek, DC-LAMP⁺ érett dendritikus sejtek és CD123⁺ plazmacitoid DC-k mennyiségét határoztuk meg melanómás betegek őrszemnyirokcsomóiban. Az egyes sejttípusok denzitásértékeit összehasonlítottuk a szentinel- (SLN) és a blokkdisszekcióból származó nem szentinel nyirokcsomókban (NSLN), illetve a tumormentes és áttétes SLN-ekben. Az SLN-eredményeket klinikopatológiai paraméterekkel, továbbá a betegség kimenetelével mutatott kapcsolat szempontjából is elemeztük.

100 őrszemnyirokcsomóra kiterjedő tanulmányunkban a vizsgált immunsejttípusok közül a FOXP3⁺ limfociták voltak jelen a legnagyobb számban, nagymértékben meghaladva az OX40⁺ aktivált T-sejteket. E megfigyelést az immunszuppresszió jeleként lehetne értékelni, azonban figyelembe kell venni, hogy az OX40 egy nagyon specializált marker, mely elsősorban az újonnan aktivált CD4⁺ T-limfocitákon fejeződik ki, s minthogy nem az összes

aktivált T-sejten jelen levő, általános aktivációs marker, expressziója korlátozott. Továbbá (csoportszinten összehasonlítva) a legtöbb vizsgált sejttípus nagyobb mennyiségben volt megtalálható az SLN-ekben a betegek egy részéből származó NSLN-ekhez képest, nem csak a FOXP3⁺ Treg-ek, hanem az OX40⁺ aktivált T-sejtek és a DC-LAMP⁺ érett DC-k is. Ugyanazon betegekből származó SLN- és NSLN-minták páronkénti statisztikai összehasonlítására nem volt lehetőségünk, minthogy csak 7 beteg esetén állt rendelkezésre mindkét típusú nyirokcsomóminta, azonban ezek elemzése is arra utalt, hogy az őrszemnyirokcsomók funkcionálisan aktívak, vagy legalábbis nem mutatták az immunzsuppresszió egyértelmű jelét.

Az őrszemnyirokcsomók immunológiai kompetenciájáról egymásnak ellentmondó eredmények láttak napvilágot. Cochran munkacsoportja szerint a melanómát és emlőrákot drenáló SLN-ek immunzsuppresszió jeleit mutatják, pl. kisebb számban vannak jelen bennük a parakortikális DC-k és ezeken a kostimulátor molekulák expressziója is alacsonyabb, mint az NSLN-ekben (126, 127). Mások azonban – különféle DC-markereket vizsgálva – vagy magasabb, vagy hasonló mennyiségben mutattak ki dendritikus sejteket az SLN-ekben NSLN-ekhez, illetve kontroll nyirokcsomókhoz viszonyítva (128, 129, 132). Az ellentmondások hátterében egyrészt a vizsgálatok egy részének viszonylag alacsony esetszáma állhat, másrészt az, hogy néhány esetben külön vizsgálták a metasztatikus és a tumormentes nyirokcsomókat, míg más tanulmányokban ezeket nem különítették el, ami megnehezíti az eredmények összehasonlítását. A korábbi vizsgálatok többsége mindamelllett azt valószínűsíti, hogy az őrszemnyirokcsomók nem immunzsupprimáltak. Újabb vizsgálatok felhívták a figyelmet a nyirokcsomókba migráló és a rezidens DC-k megkülönböztetésének jelentőségére; emlőrákos betegeknél például csak az utóbbiak esetén figyeltek meg különbséget az SLN-ek és kontroll nyirokcsomók között (218). Fel kell továbbá hívni a figyelmet arra, hogy az immunaktiváció és -szuppresszió jelei egyidőben is megfigyelhetők egyes tanulmányokban, így a miénkben is, továbbá ezek egyensúlya valószínűleg változik a tumorok progressziója során.

A tumorpozitív és -negatív őrszemnyirokcsomók összehasonlítása nem mutatott szignifikáns különbséget a vizsgált négy markerből három esetén, beleértve a FOXP3-at, ami ellentmond néhány (nem mindegyik) korábbi melanóma-SLN-vizsgálat eredményének (130, 131, 137). Az eltérések hátterében részben metodológiai különbségek állhatnak. Vizsgálatunk szerint ugyanakkor a pozitív SLN-ek a tumormentesekhez viszonyítva nagyobb mennyiségben tartalmaztak OX40⁺ aktivált T-limfocitákat, amit a tumorantigéneket felismerő T-sejtek *in situ*

aktivációja magyarázhat. Ezzel összhangban álló eredményre vezetett egy korábbi, emlőrákos betegek axilláris nyirokcsomóin végzett tanulmány, mely csak a pozitív nyirokcsomókban tárta fel az OX40⁺ sejtek akkumulációját (219). A DC-LAMP⁺ érett dendritikus sejtek és a CD123⁺ plazmacitoid DC-k denzitásában nem találtunk különbséget az áttétes és tumormentes SLN-ek között. A DC-alcsoportokra nézve ellentmondásos eredmények láttak napvilágot melanóma és más tumortípusok esetén is (130–132, 136, 220).

Az általunk vizsgált betegcsoportban az érett dendritikus sejtek, a plazmacitoid DC-k, továbbá az OX40⁺ aktivált T-sejtek mennyisége az őrszemnyirokcsomókban nem mutatott szignifikáns összefüggést a betegség progressziójával, illetve a túléléssel. A pDC-k és az aktivált T-limfociták SLN-beli denzitásának prognosztikus hatását más tanulmányban korábban nem elemezték, míg a tumorpozitív SLN-ekben a DC-LAMP⁺ dendritikus sejtek akkumulációjának statisztikailag szignifikáns, de gyenge hatását igazolták a túlélésre melanómás betegek vizsgálatában (134).

A FOXP3⁺ regulátor T-sejtek magas átlagos denzitásának kedvezőtlen prognosztikai hatását igazoltuk, korábbi, emlő- és gyomorrákban, illetve melanómában szenvedő betegek SLN-mintáin végzett kutatások eredményeihez hasonlóan (135–137); melanómás betegekben azonban nem bizonyult független prognosztikus tényezőnek (137), ellentétben a mi eredményeinkkel. Új, érdekes megfigyelése vizsgálatunknak, hogy a FOXP3⁺ sejtek mennyisége az őrszemnyirokcsomókban csak a pozitív SLN-státuszú betegek esetén mutatott összefüggést a rövidebb betegségmentes és teljes túléléssel mind Kaplan–Meier-, mind egy- és többváltozós Cox-regressziós analízis alkalmazásával. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a regulátor T-sejtek szuppresszor funkciójukat hatékonyabban fejthetik ki áttétes nyirokcsomókban, legalábbis olyan mértékben, ami tükröződik a betegség kimenetelének befolyásolásában. A különbség oka lehet egyrészt a Treg-ek – egyes tanulmányokban megfigyelt – viszonylag nagyobb mennyisége az áttétes nyirokcsomókban (130, 136, 137), másrészt a tumorspecifikus immunreakciók fokozott aktivitása a tumorantigének jelenlétében.

5.3. Ipilimumabkezelésben részesülő metasztatikus melanómás betegek áttéteit infiltráló immunsejtek denzitásának és a tumorsejtek HLA-expresszójának prediktív szerepe

A CTLA-4-gátló ipilimumab, az immunellenőrzőpont-gátló ágensek első reprezentánsának bevezetése forradalmasította a metasztatikus melanóma terápiáját és utat nyitott más immunmoduláns ellenanyagok, így a PD-1/PD-L1 inhibitorok alkalmazása előtt, kiszélesítve ezzel a megcélzott tumortípusok palettáját. Azonban még a leghatékonyabb immunterápiás

modalitás is csak a betegek egy kisebb részében effektív, mellékhatások viszont a nem reagáló betegekben is kialakulhatnak. Emellett több tumortípus esetén a terápiás arzenál az utóbbi években kibővült új, potenciálisan hatásos kezelésmódok, mint pl. célzott terápiák bevezetésével, ami még fontosabbá teszi olyan, klinikailag alkalmazható prediktív markerek azonosítását, melyek segíthetnek az adott beteg számára optimális kezelési stratégia kiválasztásában.

Vizsgálatunkban CD4⁺, CD8⁺ illetve CD45RO⁺ T-limfociták, CD20⁺ B-sejtek, a CD134, CD137, ill. PD-1 aktivációs markereket kifejező limfociták, FOXP3⁺ regulátor T-sejtek, NKp46⁺ NK-sejtek, CD68⁺ makrofágok és a CD16-ot (Fcγ-receptor III) expresszáló sejtek mennyiségét határoztuk meg ipilimumabkezelésben részesülő melanómás betegek kezelés előtti sebészi tumormintáiban. Az egyes sejttípusok denzitásértékeit elemeztük a terápiás válasz és a betegség kimenetele függvényében. A vizsgálatban a mintagyűjtést az ipilimumabterápia előtt egy éven belül operált metasztázisokra korlátoztuk, annak érdekében, hogy minimalizáljuk az immunológiai tényezők változásának esélyét a műtét és az ipilimumabkezelés között eltelt idő alatt. Továbbá sebészi tumormintákat (nem kis biopsziákat) és – amikor hozzáférhető volt – betegenként több áttétet értékeltünk a betegen belüli heterogenitás zavaró hatásának kiküszöbölésére. Tudomásunk szerint ez volt az első vizsgálat, mely egy széles immunsejtpanel denzitásértékeit kísérelte meg korreláltatni az ipilimumab hatásosságával mindennapi klinikai környezetben (nem klinikai vizsgálat keretén belül).

Több immunsejttípus esetén is összefüggést találtunk az intratumorális denzitás és az ipilimumabterápiára adott válasz között. A nyirokcsomóáttéteket infiltráló CD4⁺, CD8⁺ T-limfociták, FOXP3⁺ sejtek, a CD134 aktivációs markert hordozó limfociták, valamint a CD20⁺ B-sejtek és NKp46⁺ NK-sejtek mennyisége magasabb volt a kezelésre reagálóknál, mint a nem reagálóknál; a legkifejezettebb különbség a FOXP3 marker esetén volt látható. A CD45RO⁺, PD-1⁺, CD16⁺, illetve CD68⁺ sejtek denzitása a terápiás válasszal nem, azonban a túléléssel korrelált. A bőr-, ill. szubkután áttétek vizsgálata ugyanakkor csak a CD16⁺ és a CD68⁺ sejtek denzitása esetén tárt fel szignifikáns kapcsolatot a klinikai válasszal és a túléléssel. Melanómás betegek metasztázisaiban a CD8⁺ T-limfociták és CD20⁺ B-sejtek infiltrációját egy korábbi (nem immunterápiás) tanulmány prognosztikusnak találta, míg a FOXP3⁺ sejtek esetén nem figyeltek meg összefüggést a túléléssel (164).

A T-sejtek denzitásának és az ipilimumab hatásosságának a kapcsolatát mutató eredményeink jól illeszkednek a hipotézishez, mely szerint a T-sejtekben gazdag, illetve azokat csekély mennyiségben tartalmazó tumorok immunterápiás érzékenysége eltérő, előbbiek nagyobb eséllyel reagálnak az immunszuppresszív mechanizmusokat blokkoló terápiás stratégiákra (221). Eredményeink szerint a terápiás választ leginkább befolyásoló tényező a nyirokcsomóáttétekben a FOXP3⁺ sejtek denzitása volt. Hasonlóképpen, az erős FOXP3- ésIDO-festődés egy másik vizsgálatban is korrelált az ipilimumabkezelés hatásosságával (84). Az immunszuppresszív elemek felszabályozása a tumorokban szintén kapcsolatos lehet az aktív immun-mikrokörnyezettel, valószínűleg negatív visszacsatolásos szabályozó mechanizmusként. Spranger és mtsai korrelációt állapítottak meg az IDO, PD-L1 és FOXP3 expressziója és a CD8⁺ T-limfociták mennyisége között melanómaáttétekben, s rágszálómodellekben igazolták, hogy ezen inhibitor mechanizmusok jelenléte az infiltráló CD8⁺ T-sejtek következménye (222). A mi vizsgálatunkban is szoros korrelációt találtunk a FOXP3⁺ sejtek és a CD8⁺ vagy CD45RO⁺ T-limfociták denzitása között ($p < 0,001$). Feltételezhető, hogy a T-sejt-gazdag tumorokban az immunaktivációval szimultán jelenlevő szuppresszív mechanizmusok felelnek a T-sejtek daganatellenes hatásának gátlásáért, s az e mechanizmusokat blokkoló terápiás stratégiák, mint az immunellenőrzőpont-gátlók, jótékony hatást gyakorolhatnak ezen esetekben.

Az utóbbi években több tanulmány felvetette az intratumorális regulátor T-sejtek ADCC-közvetített elpusztítását Fc γ -receptort expresszáló monociták/makrofágok által, mint az anti-CTLA-4 antitest-terápia lehetséges hatásmechanizmusát (223–225). Ipilimumabterápiában részesülő melanómás betegek kezelés előtt operált áttéteiben a CD16⁺CD68⁺ sejtek denzitása magasabb volt a terápiára reagálók, mint a nem reagálók esetén (225). 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. A terápiás válasz és a FOXP3⁺ sejtek denzitása között mutatott összefüggéssel együttesen (a mi vizsgálatunk és 84) ezek az eredmények alátámasztani látszanak a Treg-sejtek CD16⁺ effektorok általi elpusztításának lehetséges szerepét az ipilimumab hatásában. Egy másik potenciális ADCC-effektor, az NK-sejtek mennyisége is összefüggést mutatott a klinikai válasszal vizsgálatunkban, ezek denzitása azonban igen alacsony volt, ami megkérdőjelezheti biológiai jelentőségüket.

A T-sejtekben gazdag tumorok nagyobb immunterápiás érzékenységének fent említett hipotézisét (221) támasztja alá a különféle daganattípusok esetén észlelt korreláció az immunellenőrzőpont-gátló terápia utáni kedvező betegségkimenetel és immunaktivitással kapcsolatos gének expressziója között (83, 92–94). Továbbá a CD4⁺, illetve CD8⁺ T-sejtek denzitása alapján megjósolható volt az anti-PD-1-terápiára adott válasz melanómás és tüdőrákos betegekben (90, 91). Nem találtak ugyanakkor összefüggést az egyes T-sejt-altípusok infiltrációja és a klinikai aktivitás között más, PD-1/PD-L1 ágenseket vagy CTLA-4-blokkoló antitestet alkalmazó vizsgálatokban (84, 87, 92, 226). A T-sejt-denzitás prediktív potenciálja néhány tanulmányban tapasztalt hiányának egy lehetséges magyarázata, hogy ezekben különböző lokalizációjú áttéteket, sőt egyes esetekben különböző daganattípusokat is együttesen analizáltak. Vizsgálatunk egyik potenciálisan fontos megállapítása, hogy melanómás betegekben az immunsejtek denzitása és ennek prediktív hatása különbözik nyirokcsomó- és bőr/szubkután áttétek vizsgálata esetén, ami arra utal, hogy az áttétek együttes elemzése a lokalizációjukra való tekintet nélkül nem feltétlenül optimális az immunterápiára reagálók és nem reagálók közti különbségek feltárása szempontjából.

Szintén csak a nyirokcsomóáttétek vizsgálatokor figyeltünk meg korrelációt a T-limfociták intratumorális sűrűsége és a melanómasejtek HLA-I-expressziója között, valamint utóbbi és az ipilimumabkezelésre adott válasz, illetve a betegek túlélése között. Ezek az eredmények a nyirokcsomó- és a nem limfoid áttéteknek – feltehetően a különböző immunológiai környezet miatt kialakuló – eltérő biológiai sajátosságaira utalnak. A tumor-mikrokörnyezet szövetspecifikus különbségei befolyásolhatják a daganatok növekedését és progresszióját, továbbá terápiás érzékenységét (16, 227). Az immunsejtek infiltrációjának és az antigénexpresszióinak a metasztázis helyétől függő eltéréseit leírták melanóma és egyéb daganatok esetén is (16, 166, 228). Az immunterápiás biomarker-vizsgálatok ennek ellenére általában nem veszik figyelembe a tumorok anatómiai elhelyezkedését a léziók vizsgálatba való beválasztásánál, pedig az csökkenthetné az eredmények variabilitását (229).

A HLA-I kifejeződésével ellentétben eredményeink szerint a melanómasejtek HLA-II-expressziója nem mutatott összefüggést az ipilimumabterápia kimenetelével, korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan, melyekben a HLA-II-expresszió alapján megjósolható volt a PD-1-ellenes, de nem a CTLA-4-ellenes kezelésre adott válasz (102, 230). Kutatásaink érdekes eredménye volt, hogy a tumorsejtek HLA-I-expressziójának a CD8⁺ vagy CD45RO⁺ T-sejtek denzitásával kombinációban történő elemzése hatékonyabbnak bizonyult a túlélés előrejelzésében, mint akár a HLA-expresszió, akár a T-sejt-denzitási értékek önmagukban. Ez

felhívja a figyelmet arra, hogy több biomarker együttes vizsgálata nagyobb prediktív erővel bírhat az immunterápiák hatékonyságának megjósolásában.

5.4. Immunsejtek vizsgálata neoadjuváns leukocita-interleukin terápiaiban részesülő szájüregi laphámrákos betegek tumormintáiban

A lokális leukocita-interleukin (LI) neoadjuváns terápia hatását szájüregi laphámrákos betegekben tesztelő két – egy fázis I/II-es, három különböző LI-dózist összehasonlító és egy fázis II-es, nagy dózist használó – klinikai vizsgálatból származó tumormintákat tanulmányoztunk, kezeletlen kontroll OSCC-tumorszövet mintákkal összevetve. A két vizsgálatból úgy tűnik, hogy a limfociták infiltrációját jobban befolyásolta az LI-kezelés, mint a gyulladáshoz vezető sejtekét. A legszembetűnőbb különbség a kontroll és az LI-kezelt daganatok között a T-limfociták, ezen belül a CD4⁺ sejtek megnövekedett infiltrációja volt az utóbbiakban, míg a CD8⁺ T-sejtek mennyisége nem változott szignifikánsan, illetve csökkent (a második, nagy LI-dózist alkalmazó trial-ben), ami jelentősen magasabb CD4⁺/CD8⁺ arányt eredményezett. Érdekes módon ez különösen az LI-kezelésre reagáló tumorokban volt számottevő, ami arra utal, hogy a hatékony immunválasz OSCC-ben az eredetileg alacsony CD4⁺/CD8⁺ arány megfordítását igényelheti. A CD4⁺ T-sejtek nagy mennyisége, illetve a magas CD4⁺/CD8⁺ arány jó prognózissal vagy immunterápiás válasszal járt több daganattípus esetén (231, 232). A CD4⁺ T-limfociták központi helyet foglalnak el a tumorelles immunválasz iniciálásában és fenntartásában helper funkciójuk és az immunológiai memória fenntartásában játszott szerepük révén, továbbá citokinszekréció és közvetlen citolízis segítségével effektor funkciót is betölthetnek (233, 234).

Megfigyeléseink szerint a T-sejtek egy része hordozta a CD25 aktivációs markert, míg az OX40, mely főként a frissen aktivált CD4⁺ T-limfocitákon jelenik meg, ritkán volt detektálható mintáinkban. Ez azt jelzi, hogy az LI által stimulált T-sejtek zömmel egy későbbi aktivációs stádiumban lehettek, annak következményeként, hogy a (fázis II-es) vizsgálatban viszonylag hosszú idő (medián: 22 nap, tartomány: 14–54 nap) telt el az LI-terápia befejezése és a tumorok műtéti eltávolítása között. A CD25⁺ sejtek infiltrációjának emelkedése csak (az első vizsgálatban alkalmazott) legkisebb LI-dózis esetén volt megfigyelhető. Nagy dózisu LI alkalmazásakor a dendritikus sejtek eloszlása megváltozott a kezeletlen kontrollokhoz képest, a tumor-stróma határon volt látható feldúsulásuk, különösen a terápiára reagálóban. Hasonlóképpen, egy korábbi, lokálisan alkalmazott IL-2 hatását vizsgáló tanulmányban főként a CD4⁺ T-sejtekre és a dendritikus sejtekre gyakorolt hatást írtak le, míg a CD25⁺ sejtek felszaporodása csak alacsony IL-2-dózisnál volt megfigyelhető (235). Egy, az LI-hez

hasonló citokinkeverék (IRX-2) neoadjuváns, perilimfatikus adagolását követően operált fej-nyaki daganatokban a T-sejtek megnövekedett infiltrációját írták le (a CD4⁺ és CD8⁺ alcsoportok esetén nem vizsgálták a változást); a kezelés utáni T-sejt-szám korrelációt mutatott a túléléssel (236).

A nagy dóziszú LI-terápiát alkalmazó vizsgálatunkban kisebb mértékű makrofáginfiltrációt, ezzel szemben megnövekedett mennyiségű neutrofil granulocitát észleltük a kezelt daganatokban, ami egy elsődlegesen neutrofilek által közvetített akut gyulladásos folyamatra utal. A neutrofilek felszaporodása háttérben a Multikine preparátumban található GM-CSF állhat.

A két vizsgálatból nyert eredmények nagyobb esetszámon való tesztelése egy nemrég lezárult fázis III-as trial betegeinek prospektíven gyűjtött tumormintáin folyamatban van.

5.5. Immunsejtek vizsgálata indukciós kemoterápiában (ICT) és cetuximabkezelésben részesülő fej-nyaki daganatos betegek tumorbiopsziás mintáiban

Az utóbbi évtized kutatásai fényt derítettek arra, hogy a gazdaszervezet immunvédekezése szerepet játszik mind a kemoterápia, mind a tumort célzó monoklonális antitestek hatásában, s a tumorinfiltráló immunsejtek, elsősorban T-limfociták mennyisége prediktívnek bizonyult a kezelés hatékonysága tekintetében különböző daganattípusokban, így HNSCC-ben is (104–106). Az általunk vizsgált, TPF indukciós kemoterápiával és cetuximabbal kezelt betegcsoportban a vizsgált 11 immunsejtmarker közül csak kettő, a DC-LAMP és a PD-1 esetén találtunk összefüggést a terápiás válasszal. A DC-LAMP⁺ érett dendritikus sejtek mennyisége a progressziómentes túléléssel is korrelált, míg a teljes túléléssel egyik vizsgált marker sem mutatott szignifikáns összefüggést. Egy másik munkacsoport a limfocitás szöveti reakciót ugyan prediktívnek találta TPF indukciós kemoterápiában részesült HNSCC-s betegekben, a CD3⁺, CD8⁺ T-sejtek, illetve a B-sejtek tumorbeli mennyisége és a terápia kimenetele között azonban nem észleltek korrelációt (192, 237), ami összhangban áll a mi eredményeinkkel.

A tumorsejtek p16-expressziója sem bizonyult prediktívnek vizsgálatunkban, hasonlóan a legtöbb, az ICT hatását vizsgáló tanulmányhoz (237). Továbbá az elsővonalbeli kemo- vagy radioterápiához a cetuximab hozzáadásának haszna sem függött a HPV- vagy p16-pozitivitástól (172). A HPV és az immunrendszer kölcsönhatása jól ismert (193), ugyanakkor a tumorinfiltráló immunsejtekkel való kapcsolat inkább csak az orofaringeális daganatok

csoportjában egyértelmű (194–196). Az általunk vizsgált betegkohorszabban csak a CD20⁺ B-limfociták esetén észleltünk szignifikáns korrelációt a p16-pozitivitással. Amennyiben csak a szájgarattumorokat elemeztük, tendencia mutatkozott a CD8⁺ és a PD-1⁺ sejtek magasabb denzitására is a p16⁺ esetekben, ezeket az eredményeket azonban az alacsony esetszám (n=15) miatt óvatosan kell értékelni. A limfoid szövetek közelsége folytán a HPV által kiváltott immunválasz a szájgarati régióban eltérést mutathat más régióktól (193).

Az antitestfüggő sejtközvetített citotoxicitás szerepét kimutatták a cetuximab terápiás hatásában (70). Több effektorsejttípus közvetítheti a terápiás ellenanyagok tumorelles hatását, így makrofágok, NK-sejtek és neutrofil granulociták (72, 238–240). Vizsgálatainkba bevontuk ezek markereit (CD68, NKp46 és mieloperoxidáz), valamint a CD16-ot az ADCC-ben részt vevő Fc-receptor (FcγRIII) kimutatására, de nem találtunk szignifikáns korrelációt az ezeket hordozó sejtek mennyisége és a terápiás válasz vagy a túlélés között. A CD16-jelölődés nagy részéért valószínűleg a neutrofilek felelhetnek, mivel ezek denzitása mutatta a legerősebb korrelációt a CD16⁺ sejtekével, s a másik két sejtípus sokkal kisebb mennyiségben volt jelen.

Az ADCC mellett a T-sejt-közvetített adaptív immunválasz is hozzájárulhat a cetuximab tumorelles hatásához. Ennek lehetséges mechanizmusaként leírták a dendritikus sejtek és NK-sejtek kölcsönhatását, mely fokozott antigénprezentációt és T-sejt-aktivációt eredményez (71). Mi nem találtunk összefüggést az infiltráló NKp46⁺ NK-sejtek mennyisége és a terápiás válasz között, azonban a DC-LAMP⁺ érett DC-k és a PD-1⁺ limfociták denzitása nagyobb volt a kezelésre reagáló betegek tumorában, mint a nem reagálókéban. A legtöbb tumortípushoz hasonlóan az infiltráló dendritikus sejtek nagy száma szájüregi laphámrákban is jobb prognózissal társult (191), érett DC-k tekintetében azonban nem írtak le hasonló kapcsolatot (241). A kezelésre reagáló betegek tumorában a PD-1⁺ limfociták megnövekedett mennyiségéről tett megfigyelésünkkel kapcsolatban fontos megemlíteni, hogy bár a PD-1 expressziója a T-sejtek kimerülésének egyik jele, ugyanakkor aktivációs markernek is bizonyult, mely elsősorban a tumorreaktív infiltráló T-sejteken jelenik meg (242–244). Ellentmondásos eredmények láttak napvilágot a tumorinfiltráló immunsejteken kimutatott expressziója prognosztikus hatásáról a különböző ráktípusokban (245–247); HNSCC-ben kedvező prognosztikus markernek bizonyult (248, 249).

5.6. Következtetések, a kutatások korlátai és értékei

A gazdaszervezet immunsejtjei pozitív és negatív hatást is kifejthetnek a daganatos betegségek kimenetelére. A primer melanómát infiltráló immunsejteken belül a T-limfociták prognosztikai értékének kutatása ellentmondásos eredményeket hozott. Saját vizsgálataink szerint az aktivált T-sejtek magas peritumorális denzitása hosszabb túléléssel mutatott összefüggést. Hasonló eredményre vezettek a B-limfociták és az érett dendritikus sejtek infiltrációjának prognosztikai értékét célzó kutatásaink. Immunhisztokémiai vizsgálataink inherens korlátja retrospektív természetük, valamint egy részükben a viszonylag korlátozott (100 alatti) esetszám. Eredményeinket azonban későbbi, többnyire nagyobb mintaszámra alapozott kutatások megerősítették (151, 152, 208, 209). A HEV és a tumort infiltráló immunsejtek kapcsolatára és prognosztikai szerepére vonatkozó saját, több kohorszos tanulmányunk is alátámasztotta a CD134⁺, CD25⁺ limfociták, a DC-LAMP⁺ dendritikus sejtek, illetve részben a B-sejtek denzitásának pozitív összefüggését a betegek túlélésével, míg a CD8⁺, CD45RO⁺, valamint a FOXP3⁺ sejtek esetén nem találtunk ilyen kapcsolatot, korábbi vizsgálatainkkal, illetve az irodalmi adatokkal összhangban.

Melanómás betegek őrszemnyirokcsomóiban négyféle immunsejttípus (CD134⁺ aktivált T-limfociták, FOXP3⁺ T-sejtek, DC-LAMP⁺ érett dendritikus sejtek és CD123⁺ plazmacitoid DC-k) vizsgálata a betegek egy részéből származó nem szentinel nyirokcsomókkal összehasonlítva az SLN-ek funkcionális kompetenciáját támasztotta alá, immunaktivációra és -szuppresszióra utaló jelek egyidejű jelenlétével. A FOXP3⁺ limfociták magas denzitása a pozitív SLN-státuszú betegekben a betegség progressziójával és rövidebb túléléssel mutatott összefüggést, míg a többi vizsgált immunsejttípus jelenléte nem bizonyult prognosztikusnak. Összevetve ezeket az eredményeket a primer melanóma vizsgálatok kapottakkal, úgy tűnik, az immunaktivációval kapcsolatos markerek megjelenése a primer tumorban nagyobb hatással van a betegség kimenetelére, mint jelenlétük az őrszemnyirokcsomókban. A FOXP3⁺ sejtek denzitása ezzel szemben a metasztatikus SLN-ekben prediktívnek bizonyult, ellentétben a tumor-negatív SLN-ekben, illetve primer melanómákban meghatározott számukkal.

A tumorelleses T-sejtek elsődleges aktiválása (priming) az általános nézet szerint elsődlegesen a drenáló nyirokcsomókban történik a primer tumorból származó tumorantigéneket a nyirokcsomókba vándorolva ott prezentáló dendritikus sejtekkel való találkozást követően. Kísérletes modellekben azonban a nyirokcsomókban a T-sejteknek tumorsejtek általi közvetlen aktiválását is leírták (250). Érdekes módon a III/IV-es stádiumú

melanómás betegek perifériás vérében a melanocita-differenciációs antigén epitópot felismerő T-sejtek prekursorfrekvenciája jóval magasabb volt az I/II-es stádiumú betegekéhez képest, ami a nyirokcsomóáttétek kialakulásának fontosságára utaló jelként értékelhető a T-sejtközvetített tumorelles immunreakció létrejöttében (251). Másrészt azt is kimutatták, hogy a DC-k általi T-sejt-aktiváció extranodálisan, a tumor területén is végbemehet (252). Ezzel összhangban a T-sejtek klonotípusának elemzése rávilágított, hogy a tumornegatív SLN-ekben a T-limfociták többsége nem mutat klonális felszaporodást, a primer melanómákkal és metasztázisokkal ellentétben, melyekben több klonotípusos TCR-transzkriptumot találtak (253, 254). Ezen adatok fényében eredményeink a daganattal érintett szövetek, ezen belül a primer tumor, illetve az áttétes őrszemnyirokcsomók immunaktivitással összefüggő markereinek prognosztikus jelentőségére utalnak. SLN-vizsgálatunk értékelését korlátozza, hogy – bár más hasonló kutatásokkal összevetve jelentős számú mintán történt – a pozitív és negatív szentinelstátuszú betegek elkülönített túlélésanalízisének az esetszámok alacsonyabbak voltak.

Prognosztikai értéke mellett a daganatok immunsejtes infiltrátuma komponenseinek elemzése az immunterápiában részesülő betegekből a kezelés hatását, illetve a kezelést követően a betegség kimenetelét megjósolni képes biomarkereket is szolgáltat (63, 64). Ebbe az irányba mutatnak ipilimumabterápiában részesülő melanómás betegek kezelés előtti áttéti tumormintáin végzett vizsgálatunk eredményei is, egyben felhívva a figyelmet a különböző lokalizációjú áttétek eltérő immunológiai jellemzőire, illetve a lokális immunjellemzők esetlegesen eltérő prognosztikai potenciáljára. Eredményeink szerint a nyirokcsomóáttétekben gyakorlatilag valamennyi vizsgált immunsejt-típus mennyisége korrelált a terápiás válasszal és/vagy a betegek túlélésével, míg a bőr/szubkután áttétekben meghatározva az immunsejtdenzitásokat csak a CD16⁺ sejtek és CD68⁺ makrofágok esetén találtunk összefüggést. Szintén csak a nyirokcsomóáttétek vizsgálatakor figyeltünk meg korrelációt a T-limfociták intratumorális sűrűsége és a melanómasejtek HLA-I-expressziója között, valamint utóbbi és az ipilimumabkezelésre adott válasz, illetve a betegek túlélése között. Vizsgálatunk korlátja retrospektív volta mellett az, hogy a megfelelő sebészi minta elérhetősége korlátozta az immunhisztokémiai elemzésbe bevonható esetek számát. Analízisünk értékeként könyvelhető el ugyanakkor, hogy számos immunmarkert tesztelt egy nagyjából „real world” betegkohorszon, továbbá kezelés előtti paramétereket vizsgált, lehetővé téve a kezelési döntést megkönnyítő prediktív markerek azonosítását. A lokális immunaktivitással kapcsolatos potenciális biomarkereket nagyobb betegcsoportokon végzett

prospektív elemzések validálhatják, s ezek prediktív értéke a PD-1-útvonalat blokkoló terápiák, illetve az anti-CTLA-4/anti-PD-1 kombináció esetén is vizsgálandó.

Szájüregi laphámrákokban vizsgáltuk egy kísérleti immunterápiás megközelítés, a neoadjuváns lokálisan adott leukocita-interleukin kezelést követően operált daganatokban többféle immunsejt-típus megoszlását kezeletlen kontroll tumorokkal összehasonlítva. A legszembetűnőbb különbség a CD4⁺ sejtek felszaporodása és a magasabb CD4⁺/CD8⁺ arány volt. A viszonylag kis mintaszámon (egy fázis I/II-es és egy fázis II-es klinikai vizsgálatba bevont betegek tumormintáin) alapuló eredmények érvényességének értékelése folyamatban van egy nemrég lezárult fázis III-as trial prospektíven gyűjtött tumormintáin.

Az immunterápiák mellett a konvencionális tumorelles kezelésmódok (kemo-, sugár-, célzott terápia) hatásában is kimutatták az immunmechanizmusok szerepét, s a tumorinfiltráló immunsejtek vizsgálata ezek esetében is a kezelés hatását, a betegség kimenetelét megjósolni képes biomarkereket eredményezhet (30–32, 64). Indukciós kemoterápiával és cetuximabbal kezelt HNSCC-s betegeink kezelés előtti tumorbiopsziáinak tanulmányozása a vizsgált 11-ből mindössze két immunsejtmarker, az érett dendritikus sejteket jellemző DC-LAMP és a PD-1 esetén mutatott ki összefüggést a terápiás válasszal, illetve a túléléssel. Ebben a vizsgálatunkban, bár prospektív klinikai trial-ben részt vevő betegek tumormintáin végeztük, az elemzés retrospektíven történt, s a fázis II-es vizsgálatba bevont betegek száma limitálta a rendelkezésre álló minták számát, ami egyes alcsoportok tanulmányozásakor viszonylag alacsony esetszámokat eredményezett; indokolt lehet ezért a kapott adatok érvényességének prospektív értékelése nagyobb betegcsoporton. Továbbá a neoadjuváns kezelési séma következtében nem sebészi, hanem – esetenként kisméretű – biopsziás minták álltak rendelkezésre, ami valószínűleg kevésbé megbízható immunhisztokémiai eredményt ad, mint a tumor nagyobb részét tartalmazó metszetek elemzése. A vizsgálat előnye ugyanakkor a nagyszámú markerből álló immunsejtpanel alkalmazása s az eredmények értékelése számos klinikopatológiai paraméter függvényében.

6. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. Elsőként mutattuk ki a primer melanómákat infiltráló, OX40, illetve CD25 aktivációs markert hordozó T-limfociták, DC-LAMP⁺ dendritikus sejtek, továbbá CD20⁺ B-limfociták mennyiségének összefüggését az áttétképzéssel és a túléléssel. Az aktivált T-sejtek és a dendritikus sejtek magas peritumorális denzitása, míg a B-sejtek esetén mind az intra-, mind a peritumorális sűrűség a későbbi zsigeri áttétek hiányával és kedvező túléléssel járt. E markerek túlélésre gyakorolt hatását kombinációban is vizsgálva a DC-LAMP/OX40, illetve a CD20/OX40 kombináció (külön-külön vizsgálva) többváltozós analízisben szignifikáns prognosztikai tényezőnek bizonyult.

2. Elsőként igazoltuk primer melanómákban ektópiás limfoid struktúrák jelenlétét, ami nem mutatott összefüggést a betegség kimenetelével. Más daganattípusban megfigyelttel ellentétben a DC-LAMP⁺ érett dendritikus sejtek és a MECA-79⁺ HEV-szerű erek előfordulása melanómában nem korlátozódott az ektópiás nyirokstruktúrák területére, illetve az ezeket tartalmazó daganatokra.

3. A primer melanómákhoz asszociált MECA-79⁺ HEV-ek mennyisége (korábbi publikációk eredményével összehangban) erősen korrelált a B- és T-limfociták peritumorális mennyiségével, jóval gyengébb korreláció volt ugyanakkor megfigyelhető az aktivált T-sejtek, illetve az érett DC-k denzitásával. A CD34-pozitivitás alapján megállapított mikroérsűrűség a vastag, valamint a szervi áttétet adó melanómákban mutatott korrelációt a T-sejtek és a makrofágok peritumorális infiltrációjával.

4. Elsőként közöltük a melanómás betegek őrszemnyirokcsomóiban a FOXP3⁺ T-sejtek magas denzitásának független negatív prognosztikus hatását, mely csak a pozitív SLN-státuszú betegek esetén volt megfigyelhető. Az OX40⁺ aktivált T-limfociták, DC-LAMP⁺ érett DC-k és a plazmacitoid dendritikus sejtek mennyisége nem mutatott kapcsolatot a túléléssel.

5. Elsőként elemeztük nagy (11 markert tartalmazó) immunsejtpanel vizsgálatával melanómás betegek ipilimumabkezelés előtti áttéti tumorában a különböző immunsejtek infiltrációjának prediktív szerepét. Megállapítottuk, hogy a legtöbb immunsejttípusra nézve az infiltráció erőssége és ennek összefüggése a terápiás válasszal és a betegség kimenetelével különbözik a nyirokcsomó-, illetve a bőr/szubkután áttétek vizsgálatakor. Nyirokcsomóáttétekben a vizsgált immunsejttípusok többsége (FOXP3⁺ sejtek, CD4⁺, CD8⁺, OX40⁺ T-limfociták, CD20⁺ B-

sejtek és NKp46⁺ NK-sejtek) esetén magasabb sejtdenzitást tapasztaltunk a kezelésre reagáló betegekben, míg a CD45RO⁺, PD-1⁺, CD16⁺ sejtek és CD68⁺ makrofágok mennyisége a terápiás válasszal nem korrelált, a túléléssel azonban igen. Bőr- és szubkután áttétek esetén ugyanakkor csak a CD16⁺ és CD68⁺ sejtek infiltrációjának prediktív hatása igazolódott. Szintén csak a nyirokcsomóáttétek vizsgálatakor figyeltünk meg korrelációt a T-limfociták intratumorális sűrűsége és a melanómasejtek HLA-I-expressziója között, valamint utóbbi és az ipilimumabkezelésre adott válasz, illetve a betegek túlélése között.

6. Szintén elsőként tanulmányoztuk többféle immunsejttípus infiltrációját lokális neoadjuváns leukocita-interleukinnal (Multikine) kezelt szájüregi laphámrákokban, kezeletlen kontrollokkal összehasonlítva. A legfeltűnőbb különbségként a CD4⁺ T-sejtek nagyobb denzitását és a magas CD4⁺/CD8⁺ arányt írtuk le az LI-kezelt daganatokban, különösen a terápiára reagálóknál.

7. Elsőként vizsgáltuk indukciós kemoterápiával és cetuximabbal kezelt fej-nyaki laphámrákos betegekben a tumorinfiltráló immunsejtek prediktív szerepét. A vizsgált 11 immunsejtmarker közül csak kettő, a DC-LAMP és a PD-1 esetén találtunk összefüggést a terápiás válasszal. A DC-LAMP⁺ érett dendritikus sejtek mennyisége a progressziómentes túléléssel is korrelációt mutatott.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Legelőször szeretnék köszönetet mondani Tímár József professzor úrnak, aki a kezdeti „szárnypróbálgatásoktól” kezdve sok évig nyújtott inspiráló légkört és támogatást a kutatómunkámhoz, és akiben azóta is értékes kollaborátort tisztelhetek. Hálás vagyok Lapis Károly professzor úrnak, aki a SOTE I. Sz. Patológia és Kísérleti Rákkutató Intézet igazgatójaként felismerte annak fontosságát, hogy a fiatal kollégák nemzetközi kutatási tapasztalatokat szerezzenek, és ehhez minden segítséget megadott, s sok év elteltével is megtisztel azzal, hogy figyelemmel kíséri pályafutásomat. Köszönettel tartozom az intézet későbbi igazgatóinak, Szende Béla és Kopper László professzor uraknak, hogy támogató légkörben végezhettem a kutatómunkám. Az intézet számos munkatársa nyújtott segítséget a munkákban, amit szívből köszönök mindegyik kollégának; név szerint is szeretném megemlíteni Kovalszky Ilona és Schaff Zsuzsa professzorasszonyokat, Jeney András professzor urat, Dr. Rásó Erzsébetet, Dr. Pápay Juditot, Dr. Paku Sándort, Dr. Tóvári Józsefet, Dr. Tímár Ferencet, Csorba Gézáné Maricát, Oláh Lászlóné Julit és Laczik Cecíliát.

Sokat köszönhetek a National Cancer Institute-beli Surgery Branch vezetőjének, Steven A. Rosenbergnek és munkatársainak, elsősorban Michael Nishimurának, James C. Yangnak és Donna Lalley-nek az ott töltött két év alatti segítségért és azért, hogy részese lehettem egy élvonalbeli tumorimmunológiai kutatóbázis mindennapjainak.

A disszertációban szereplő legtöbb közlemény az Országos Onkológiai Intézetben végzett kutatómunka eredménye; ezúton szeretném megköszönni a korábbi és a jelenlegi főigazgatónak, Kásler Miklós és Polgár Csaba professzor uraknak, továbbá a patológiai osztály (később központ) vezetőinek, Szentirmay Zoltán professzor úrnak, Dr. Tóth Erikának és Dr. Szőke Jánosnak, hogy ezt lehetővé tették és támogatták. Köszönöm a patológus kollégáknak a sok segítséget, az említettek mellett elsősorban Dr. Plótár Vandának. Köszönet illeti a klinikus kollégákat is, akik kollaborációja nélkülözhetetlen volt a kutatásokhoz; itt szeretném megemlíteni Prof. Liskay Gabriellát, Dr. Gilde Katalint, Dr. Fejős Zsuzsannát és Dr. Remenár Évát, illetve az intézeten kívüli kollaborátorok közül Dr. Somlai Beátát, Prof. Oláh Juditot, Dr. Lengyel Zsuzsannát és Dr. Emri Gabriellát. Sokat köszönhetek TDK- és PhD-hallgatóimnak is, Dr. Diczházi Csabának, Dr. Forster-Horváth Csabának, Dr. Dobos Juditnak, Dr. Kiss Juditnak, Dr. Mohos Anitának, Dr. Sebestyén Tímeának és Dr. Balatoni Tímeának.

Kiemelt köszönet illeti Parragné Derecskei Katalint, aki mind a Semmelweis Egyetemen, mind az OOI-ben töltött évek alatt segítségemre volt főként az immunhisztokémiai vizsgálatok kivitelezésében. Köszönöm Gaudi Istvánnak a statisztikai analízisben, Kónya Miklósnak a fotódokumentációban nyújtott segítséget, Csordás Pálnének az adminisztratív teendők megkönnyítését, Horváth Lászlóné Siha Monikának a pályázati pénzügyek, valamint Faragó Dániel és Frankó Orsolya könyvtárosoknak a közleményeim rendben tartását.

Végül szeretnék köszönetet mondani családomnak a feltétel nélküli támogatásért.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Valkenburg KC, de Groot AE, Pienta KJ (2018) Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 15:366–381
2. Lengyel E, Makowski L, DiGiovanni J, Kolonin MG (2018) Cancer as a matter of fat: the crosstalk between adipose tissue and tumors. *Trends Cancer* 4:374–384
3. Erdei A, Sármay G, Prechl J (szerk.). *Immunológia. Medicina*, 2012. https://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_524_Immunologia/adatok.html
4. Robbins PF, Lu YC, El-Gamil M, Li YF, Gross C, Gartner J, Lin JC, Teer JK, Clifton P, Tycksen E, et al (2013) Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med* 19:747–752
5. van Rooij N, van Buuren MM, Philips D, Velds A, Toebes M, Heemskerk B, van Dijk LJ, Behjati S, Hilkmann H, El Atmioui D, et al (2013) Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *J Clin Oncol* 31:e439–442
6. Chen DS, Mellman I (2013) Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 39:1–10
7. Ladányi A (2019) A T-sejtek szerepe a tumorimmunológiában és –immunoterápiában. *Magy Onkol* 63:165–171
8. Salama AKS, Hodi S (2011) Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4. *Clin Cancer Res* 17:4622–4628
9. Pardoll DM (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12:252–264
10. Ladányi A, Balatoni T (2013) Az immunválasz “akadálymentesítése”: újabb lehetőségek a melanoma immunoterápiájában. *Magy Onkol* 57:100–107
11. Mocellin S, Benna C, Pilati P (2013) Coinhibitory molecules in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 24:147–161
12. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S (2000) Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 74:181–273
13. Munn DH, Bronte V (2016) Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* 39:1–6
14. Gajewski T (2007) Failure at the effector phase: Immune barriers at the level of the melanoma tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 13:5256–5261
15. Salmon H, Franciszkiewicz K, Damorre D, Dieu-Nosjean MC, Validire P, Trautmann A, Mami-Chouaib F, Donnadieu E (2012) Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest* 122:899–910
16. Ladányi A, Timár J (2020) Immunologic and immunogenomic aspects of tumor progression. *Semin Cancer Biol* 60:249–261
17. Timár J, Ladányi A (2019) A tumorprogresszió immungenomikai aspektusai. *Magy Onkol* 63:173–182
18. Cai L, Michelakos T, Yamada T, Fan S, Wang X, Schwab JH, Ferrone CR, Ferrone S (2018) Defective HLA class I antigen processing machinery in cancer. *Cancer Immunol Immunother* 67:999–1009
19. Angelova M, Mlecnik B, Vasaturo A, Bindea G, Fredriksen T, Lafontaine L, Buttard B, Morgand E, Bruni D, Jouret-Mourin A, et al (2018) Evolution of metastases in space and time under immune selection. *Cell* 175:1–15
20. Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420:860–867

21. Solinas G, Marchesi F, Garlanda C, Mantovani A, Allavena P (2010) Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 29:243–248
22. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A (2008) The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 66:1–9
23. Coffelt SB, Hughes R, Lewis CE (2009) Tumor-associated macrophages: Effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1796:11–18
24. Ribatti D, Crivellato E (2009) Immune cells and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 13:2822–2833
25. Houghton AM (2010) The paradox of tumor-associated neutrophils. Fueling tumor growth with cytotoxic substances. *Cell Cycle* 9:1732–1737
26. Khazaie K, Blatner NR, Khan MW, Gounari F, Gounaris E, Dennis K, Bonertz A, Tsai FN, Strouch MJ, Cheon E, et al (2011) The significant role of mast cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 30:45–60
27. Ladányi A (2004) Emberi daganatokot infiltráló immunsejtek funkcionális és prognosztikai jelentősége. *Magy Onkol* 48:49–56
28. Gooden MJM, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW (2011) The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer* 105:93–103
29. Senovilla L, Vacchelli E, Galon J, Adjemian S, Eggermont A, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Ma Y, Tartour E, Zitvogel L, et al (2012) Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *OncoImmunology* 1:1323–1343
30. Denkert C, Darb-Esfahani S, Loibl S, Anagnostopoulos I, Jöhrens K (2011) Anti-cancer immune response mechanisms in neoadjuvant and targeted therapy. *Semin Immunopathol* 33:341–351
31. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, André F, Tesniere A, Kroemer G (2008) The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J Clin Invest* 118:1991–2001
32. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G (2011) Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol* 8:151–160
33. Novellino L, Castelli C, Parmiani G (2005) A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother* 54:187–207
34. Nakano O, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orikasa S, Aizawa M, Suzuki Y, Shintaku I, Nagura H, Ohtani H (2001) Proliferative activity of intratumoral CD8⁺ T- lymphocytes as prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res* 61:5132–5136
35. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, et al (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960–1964
36. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F, Galon J (2011) Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* 29:610–618
37. Galon J, Pagès F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, Zlobec I, Berger A, Bifulco C, Botti G, et al (2012) Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med* 10:205
38. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, Lugli A, Zlobec I, Rau TT, Berger MD, et al (2018) International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* 391:2128–2139
39. Anichini A, Vegetti C, Mortarini R (2004) The paradox of T cell-mediated antitumor immunity in spite of poor clinical outcome in human melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 53:855–864

40. van Houdt IS, Sluijter BJR, Moesbergen LM, Vos WM, de Gruijl TD, Molenkamp BG, van den Eertwegh AJM, Hooijberg E, van Leeuwen PAM, Maijer CJLM, Oudejans JJ (2008) Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression. *Int J Cancer* 123:609–615
41. Petty JK, He K, Corless CL, Vetto JT, Weinberg AD (2002) Survival in human colorectal cancer correlates with expression of the T-cell costimulatory molecule OX-40 (CD134). *Am J Surg* 183:512–518
42. Knutson KL, Disis ML, Salazar LG (2007) CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis. *Cancer Immunol Immunother* 56:271–285
43. deLeeuw RJ, Kost SE, Kakal JA, Nelson BH (2012) The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: A critical review of the literature. *Clin Cancer Res* 18:3022–3029
44. Nelson BH (2010) CD20⁺ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 185:4977–4982
45. Guy TV, Terry AM, Bolton HA, Hancock DG, Shklovskaya E, Fazekas de St Groth B (2016) Pro- and anti-tumour effects of B cells and antibodies in cancer: a comparison of clinical studies and preclinical models. *Cancer Immunol Immunother* 65:885–896
46. Sharonov GV, Serebrovskaya EO, Yuzhakova DV, Britanova OV, Chudakov DM (2020) B cells, plasma cells and antibody repertoires in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 20:294–307
47. Cipponi A, Mercier M, Seremet T, Baurain JF, Théate I, van den Oord J, Stas M, Boon T, Coulie PG, van Baren N (2012) Neogenesis of lymphoid structures and antibody responses occur in human melanoma metastases. *Cancer Res* 72:3997–4007
48. Messina JL, Fenstermacher DA, Eschrich S, Qu X, Berglund AE, Lloyd MC, Schell MJ, Sondak VK, Weber JS, Mulé JJ (2012) 12-chemokine gene signature identifies lymph node-like structures in melanoma: Potential for patient selection for immunotherapy? *Sci Rep* 2:765
49. Colbeck EJ, Ager A, Gallimore A, Jones GW (2017) Tertiary lymphoid structures in cancer: drivers of antitumor immunity, immunosuppression, or bystander sentinels in disease? *Front Immunol* 8:1830
50. Germain C, Gnjjatic S, Dieu-Nosjean MC (2015) Tertiary lymphoid structure-associated B cells are key players in anti-tumor immunity. *Front Immunol* 6:67
51. Sautès-Fridman C, Petitprez F, Calderaro J, Fridman WH (2019) Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 19:307–325
52. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H (2002) New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2:850–861
53. Degli-Esposti MA, Smyth MJ (2005) Close encounters of different kinds: Dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol* 5:112–124
54. Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, André P, Dieu-Nosjean MC, Alifano M, Régnard JF, et al (2011) Profound alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res* 71:5412–5422
55. Fregni G, Messaoudene M, Fourmentraux-Neves E, Mazouz-Dorval S, Chanal J, Maubec E, Scheer-Senyarich I, Cremer I, Avril MF, Caignard A (2013) Phenotypic and functional characteristics of blood natural killer cells from melanoma patients at different clinical stages. *PLoS One* 8:e76928
56. Yanofsky VR, Mitsui H, Felsen D, Carucci, JA (2013) Understanding dendritic cells and their role in cutaneous carcinoma and cancer immunotherapy. *Clin Dev Immunol* 2013:624123
57. Facchetti F, Vermi W, Mason D, Colonna M (2003) The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells. *Virchows Arch* 443:703–717

58. Salio M, Cella M, Vermi W, Facchetti F, Palmowski MJ, Smith CL, Shepherd D, Colonna M, Cerundolo V (2003) Plasmacytoid dendritic cells prime IFN- γ -secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *Eur J Immunol* 33:1052–1062
59. Demoulin S, Herfs M, Delvenne P, Hubert P (2013) Tumor microenvironment converts plasmacytoid dendritic cells into immunosuppressive/tolerogenic cells: insight into the molecular mechanisms. *J Leukoc Biol* 93:343–352
60. Dirix AEM, Oude Egbrink MGA, Wagstaff J, Griffioen AW (2006) Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *J Leukoc Biol* 80:1183–1196
61. Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ, Zhao YW, Wei YQ (2012) Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One* 7:e50946
62. Ladányi A (2003) A malignus melanoma immunoterápiájának lehetőségei. *Magy Onkol* 47:113–117
63. Ladányi A (2015) Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 28:490–500
64. Ladányi A (2016) Immunológiai biomarkerek a rákellenes kezelés hatásának megjósolásában. *Magy Onkol* 60:4–10
65. Rubin JT, Elwood LJ, Rosenberg SA, Lotze MT (1989) Immunohistochemical correlates of response to recombinant interleukin-2-based immunotherapy in humans. *Cancer Res* 49:7086–7092
66. Håkansson A, Gustafsson B, Krysanter L, Håkansson L (1996) Tumour-infiltrating lymphocytes in metastatic malignant melanoma and response to interferon alpha treatment. *Br J Cancer* 74:670–676
67. Weiss GR, Grosh WW, Chianese-Bullock KA, Zhao Y, Liu H, Slingluff CL Jr, Marincola FM, Wang E (2011) Molecular insights on the peripheral and intratumoral effects of high-dose rIL-2 (aldesleukin) administration for the treatment of metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 17:7440–7450
68. Ulloa-Montoya F, Louahed J, Dizier B, Gruselle O, Spiessens B, Lehmann FF, Suciú S, Kruit WH, Eggermont AM, Vansteenkiste J, Brichard VG (2013) Predictive gene signature in MAGE-A3 antigen-specific cancer immunotherapy. *J Clin Oncol* 31:2388–2395
69. Tjin EPM, Krebbers G, Meijlink KJ, van de Kastele W, Rosenberg EH, Sanders J, Nederlof PM, van de Wiel BA, Haanen JBAG, Melief CJM, et al (2014) Immune-escape markers in relation to clinical outcome of advanced melanoma patients following immunotherapy. *Cancer Immunol Res* 2:538–546
70. Trivedi S, Concha-Benavente F, Srivastava RM, Jie HB, Gibson SP, Schmitt NC, Ferris RL (2015) Immune biomarkers of anti-EGFR monoclonal antibody therapy. *Ann Oncol* 26:40–47
71. Srivastava RM, Lee SC, Andrade Filho PA, Lord CA, Jie HB, Davidson HC, López-Albaitero A, Gibson SP, Gooding WE, Ferrone S, Ferris RL (2013) Cetuximab-activated natural killer and dendritic cells collaborate to trigger antigen-specific T-cell immunity in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 19:1858–1872
72. Maréchal R, De Schutter J, Nagy N, Demetter P, Lemmers A, Devière J, Salmon I, Tejpar S, Van Laethem JL (2010) Putative contribution of CD56 positive cells in cetuximab treatment efficacy in first-line metastatic colorectal cancer patients. *BMC Cancer* 10:340
73. Loi S, Michels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Kataja V, Desmedt C, et al (2014) Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol* 25:1544–1550
74. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME (2008) Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 8:299–308

75. Sim GC, Chacon J, Haymaker C, Ritthipichai K, Singh M, Hwu P, Radvanyi L (2014) Tumor-infiltrating lymphocyte therapy for melanoma: rationale and issues for further clinical development. *BioDrugs* 28:421–437
76. Spear T, Nagato K, Nishimura MI (2016) Strategies to genetically engineer T cells for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 65:631–649
77. Radvanyi LG, Bernatchez C, Zhang M, Fox PS, Miller P, Chacon J, Wu R, Lizee G, Mahoney S, Alvarado G, et al (2012) Specific lymphocyte subsets predict response to adoptive cell therapy using expanded autologous tumor-infiltrating lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res* 18:6758–6770
78. Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, et al (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363:711–723
79. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O’Day S, Weber J, Garbe C, Lebbe C, Baurain JF, Testori A, Grob JJ, et al (2011) Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated melanoma. *N Engl J Med* 364:2517–2526
80. Gong J, Chehrazi-Raffle A, Reddi S, Salgia R (2018) Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *J Immunother Cancer* 6:8
81. Ascierto PA, Kalos M, Schaer DA, Callahan MK, Wolchok JD (2013) Biomarkers for immunostimulatory monoclonal antibodies in combination strategies for melanoma and other tumor types. *Clin Cancer Res* 19:1009–1020
82. Blank CU, Enk A (2014) Therapeutic use of anti-CTLA-4 antibodies. *Int Immunol* 27:3–10
83. Ji RR, Chasalow SD, Wang L, Hamid O, Schmidt H, Cogswell J, Alaparthi S, Berman D, Jure-Kunkel M, Siemers NO, et al (2012) An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother* 61:1019–1031
84. Hamid O, Schmidt H, Nissan A, Ridolfi L, Aamdal S, Hansson J, Guida M, Hyams DM, Gómez H, Bastholt L, et al (2011) A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. *J Transl Med* 9:204
85. Tímár J, Ladányi A (2017) A daganatok immunterápiájának prediktív markerei, a PD-L1-meghatározás gyakorlati kérdései. *Magy Onkol* 61:158–166
86. Lotz G, Smuk G, Kocsmár É, Kocsmár I, Tímár J (2019) A programozott sejthalál fehérje 1 (PD-1) – programozott sejthalál ligandum 1 (PD-L1) gátlás prediktív diagnosztikája. *Magy Onkol* 63:183–191
87. Taube JM, Klein A, Brahmer JB, Xu H, Pan X, Kim JH, Chen L, Pardoll DM, Topalian SL, Anders RA (2014) Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res* 20:5064–5074
88. Sunshine J, Taube JM (2015) PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 23:32–38
89. Carbognin L, Pilotto S, Milella M, Vaccaro V, Brunelli M, Calìo A, Cuppone F, Sperduti I, Giannarelli D, Chilosì M, et al (2015) Differential activity of nivolumab, pembrolizumab and MPDL3280A according to the tumor expression of programmed death-ligand-1 (PD-L1): sensitivity analysis of trials in melanoma, lung and genitourinary cancers. *PLoS One* 10:e0130142
90. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, et al (2014) PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515:568–571
91. Uryvaev A, Passhak M, Hershkovits D, Sabo E, Bar-Sela G (2018) The role of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) as a predictive biomarker of response to anti-PD1 therapy in patients with metastatic non-small cell lung cancer or metastatic melanoma. *Med Oncol* 35:25

92. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, et al (2014) Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515:563–567
93. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, Albright A, Cheng JD, Kang SP, Shankaran V, et al (2017) IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest* 127:2930–2940
94. Prat A, Navarro A, Paré L, Reguart N, Galván P, Pascual T, Martínez A, Nuciforo P, Comerma L, Alos L, et al (2017) Immune-related gene expression profiling after PD-1 blockade in non-small cell lung carcinoma, head and neck squamous cell carcinoma, and melanoma. *Cancer Res* 77:3540–3550
95. Brown SD, Warren RL, Gibb EA, Martin SD, Spinelli JJ, Nelson BH, Holt RA (2014) Neoantigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival. *Genome Res* 24:743–750
96. Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hacohen N (2015) Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell* 160:48–61
97. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, Walsh LA, Postow MA, Wong P, Ho TS, et al (2014) Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 371:2189–2199
98. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, Sucker A, Hillen U, Foppen MHG, Goldinger SM, et al (2015) Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science* 350:207–211
99. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, et al (2015) Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 348:124–128
100. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, Torrejon DY, Abril-Rodriguez G, Sandoval S, Barthly L, et al (2016) Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 375:819–829
101. Sade-Feldman M, Jiao YJ, Chen JH, Rooney MS, Barzily-Rokni M, Eliane JP, Bjorgaard SL, Hammond MR, Vitzthum H, Blackmon SM, et al (2017) Resistance to checkpoint blockade therapy through inactivation of antigen presentation. *Nat Commun* 8:1136
102. Rodig SJ, Gusenleitner D, Jackson DG, Gjini E, Giobbie-Hurder A, Jin C, Chang H, Lovitch SB, Horak C, Weber JS, et al. (2018) MHC proteins confer differential sensitivity to CTLA-4 and PD-1 blockade in untreated metastatic melanoma. *Sci Transl Med* 10:eaar3342
103. Formenti SC, Demaria S (2009) Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet Oncol* 10:718–726
104. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, Budczies J, Darb-Esfahani S, Kronenwett R, Hanusch C, et al (2010) Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 28:105–113
105. Liu H, Zhang T, Ye J, Li H, Huang J, Li X, Wu B, Huang X, Hou J (2012) Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 61:1849–1856
106. Balcermpas P, Michel Y, Wagenblast J, Seitz O, Weiss C, Rödel F, Rödel C, Fokas E (2014) Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer. *Br J Cancer* 110:501–509
107. Borg C, Terme M, Taïeb J, Ménard C, Flament C, Robert C, Maruyama K, Wakasugi H, Angevin E, Thielemans K, et al (2004) Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. *J Clin Invest* 114:379–388
108. Frederick DT, Piris A, Cogdill AP, Cooper ZA, Lezcano C, Ferrone CR, Mitra D, Boni A, Newton LP, Liu C, et al (2013) BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma

- antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 19:1225–1231
109. Döme B, Paku S, Somlai B, Tímár J (2002) Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J Pathol* 197:355–362
110. Döme B, Hendrix MJC, Paku S, Tóvári J, Tímár J (2007) Alternative vascularization mechanisms in cancer pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* 170:1–15
111. Young MR (2012) Endothelial cells in the eyes of an immunologist. *Cancer Immunol Immunother* 61:1609–1616
112. Labiano S, Palazon A, Melero I (2015) Immune response regulation in the tumor microenvironment by hypoxia. *Semin Oncol* 42:378–386
113. Martinet L, Garrido I, Filleron T, Le Guellec S, Bellard E, Fournie JJ, et al (2011) Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res* 71:5678–5687
114. Martinet L, Le Guellec S, Filleron T, Lamant L, Meyer N, Rochaix P, et al (2012) High endothelial venules (HEVs) in human melanoma lesions. Major gateways for tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology* 1:829–839
115. Avram G, Sánchez-Sendra B, Martín JM, Terrádez L, Ramos D, Monteagudo C (2013) The density and type of MECA-79-positive high endothelial venules correlate with lymphocytic infiltration and tumour regression in primary cutaneous melanoma. *Histopathology* 63:852–861
116. Ager A, May MJ (2015) Understanding high endothelial venules: Lessons for cancer immunology. *Oncoimmunology* 4:e1008791
117. Salmi M, Jalkanen S (2011) Homing-associated molecules CD73 and VAP-1 as targets to prevent harmful inflammations and cancer spread. *FEBS Lett* 585:1543–1550
118. Matthews NH, Li WQ, Qureshi AA, Weinstock MA, Cho E (2018) Epidemiology of melanoma. In: *Cutaneous Melanoma*. Eds. Ward WH, Farma JM, Codon Publications, Brisbane, pp. 3–22
119. Sacchetto L, Zanetti R, Comber H, Bouchardy C, Brewster DH, Broganelli P, Chirlaque MD, Coza D, Galceran J, Gavin A, et al (2018) Trends in incidence of thick, thin and *in situ* melanoma in Europe. *Eur J Cancer* 92:108–118
120. Bastian BC (2014) The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol* 9:239–271
121. Reddy BY, Miller DM, Tsao H (2017) Somatic driver mutations in melanoma. *Cancer* 123:2104–2117
122. The Cancer Genome Atlas Network (2015) Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* 161:1681–1696
123. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Dong S, et al (2009) Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 27:6199–6206
124. Plótár V, Liskay G, Ladányi A, Tóth E (2013) A malignus melanóma új TNM-klasszifikációja (AJCC, 2009) és az őrszemnyirokcsomó-biopszia patológiai jelentősége. *Magy Onkol* 57:68–72
125. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, Lazar AJ, Faries MB, Kirkwood JM, McArthur GA, et al (2017) Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin* 67:472–492
126. Huang RR, Wen DR, Guo J, Giuliano AE, Nguyen M, Offodile R, Stern S, Turner R, Cochran AJ (2000) Selective modulation of paracortical dendritic cells and T-lymphocytes in breast cancer sentinel lymph nodes. *Breast J* 6:225–232

127. Cochran AJ, Morton DL, Stern S, Lana AM, Essner R, Wen DR (2001) Sentinel lymph nodes show profound downregulation of antigen-presenting cells of the paracortex: implications for tumor biology and treatment. *Mod Pathol* 14:604–608
128. Botella-Estrada R, Dasi F, Ramos D, Nagore E, Herrero MJ, Giménez J, Fuster C, Sanmartín O, Guillén C, Aliño S (2005) Cytokine expression and dendritic cell density in melanoma sentinel nodes. *Melanoma Res* 15:99–106
129. Bembenek A, Li J, Loddenkemper C, Kemmner W, Stein H, Wernecke KD, Schlag PM (2008) Presence of mature DC-Lamp⁺ dendritic cells in sentinel and non-sentinel lymph nodes of breast cancer patients. *Eur J Surg Oncol* 34:514–518
130. Ma MW, Medicherla RC, Qian M, Vega Saenz de Miera E, Friedman EB, Berman RS, Shapiro RL, Pavlick AC, Ott PA, Bhardwaj N, et al (2012) Immune response in melanoma: an in-depth analysis of the primary tumor and corresponding sentinel lymph node. *Mod Pathol* 25:1000–1010
131. Mansfield AS, Holtan SG, Grotz TE, Allred JB, Jakub JW, Erickson LA, Markovic SN (2011) Regional immunity in melanoma: immunosuppressive changes precede nodal metastasis. *Mod Pathol* 24:487–494
132. Poindexter NJ, Sahin A, Hunt KK, Grimm EA (2004) Analysis of dendritic cells in tumor-free and tumor-containing sentinel lymph nodes from patients with breast cancer. *Breast Cancer Res* 6:R408–415
133. Cochran AJ, Wen DR, Huang RR, Wang HJ, Elashoff R, Morton DL (2004) Prediction of metastatic melanoma in nonsentinel nodes and clinical outcome based on the primary melanoma and the sentinel node. *Mod Pathol* 17:747–755
134. Elliott B, Scolyer RA, Suci S, Lebecque S, Rimoldi D, Gugerly O, Musat E, Sharma RN, Lienard D, Keilholz U, et al (2007) Long-term protective effect of mature DC-LAMP⁺ dendritic cell accumulation in sentinel lymph nodes containing micrometastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 13:3825–3830
135. Nakamura R, Sakakibara M, Nagashima T, Sangai T, Arai M, Fujimori T, Takano S, Shida T, Nakatani Y, Miyazaki M (2009) Accumulation of regulatory T cells in sentinel lymph nodes is a prognostic predictor in patients with node-negative breast cancer. *Eur J Cancer* 45:2123–2131
136. Lee HE, Park DJ, Kim WH, Kim HH, Lee HS (2011) High FOXP3⁺ regulatory T-cell density in the sentinel lymph node is associated with downstream non-sentinel lymph-node metastasis in gastric cancer. *Br J Cancer* 105:413–419
137. Speckaert R, Vermaelen K, van Geel N, Autier P, Lambert J, Haspleslagh M, van Gele M, Thielemans K, Neyns B, Roche N, et al (2012) Indoleamine 2,3-dioxygenase, a new prognostic marker in sentinel lymph nodes of melanoma patients. *Eur J Cancer* 48:2004–2011
138. Cipponi A, Wieers G, van Baren N, Coulie PG (2011) Tumor-infiltrating lymphocytes: apparently good for melanoma patients. But why? *Cancer Immunol Immunother* 60:1153–1160
139. Sondergaard K, Schou G (1985) Survival with primary cutaneous malignant melanoma, evaluated from 2012 cases. A multivariate regression analysis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 406:179–195
140. Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, Moncrieff M, Murali R, McCarthy SW, Saw RP, Thompson JF (2012) Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 30:2678–2683
141. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D IV., Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC (1989) Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 81:1893–1904

142. Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrada S, Collini P, Cascinelli N (1996) Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77:1303–1310
143. Barnhill RL, Fine JA, Roush GC, Berwick M (1996) Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study. *Cancer* 78:427–432
144. Taylor RC, Patel A, Panageas KS, Busam KJ, Brady MS (2007) Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 25:869–875
145. Larsen TE, Grude TH (1978) A retrospective histological study of 669 cases of primary cutaneous malignant melanoma in clinical stage I. 3. The relation between the tumour-associated lymphocyte infiltration and age and sex, tumour cell type, pigmentation, cellular atypia, mitotic count, depth of invasion, ulceration, tumour type and prognosis. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 86A:523–530
146. Thörn M, Pontén F, Bergström R, Sparén P, Adami HO (1994) Clinical and histopathologic predictors of survival in patients with malignant melanoma: a population-based study in Sweden. *J Natl Cancer Inst* 86:761–769
147. Mandalà M, Imberti GL, Piazzalunga D, Belfiglio M, Labianca R, Barberis M, Marchesi L, Poletti P, Bonomi L, Novellino L, et al (2009) Clinical and histopathological risk factors to predict sentinel lymph node positivity, disease-free and overall survival in clinical stages I–II AJCC skin melanoma: Outcome analysis from a single-institution prospectively collected database. *Eur J Cancer* 45:2537–2545
148. Burton AL, Roach BA, Mays MP, Chen AF, Ginter BAR, Vierling AM, Scoggins CR, Martin RCG, Stromberg AJ, Hagendoorn L, McMasters KM (2011) Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in melanoma. *Am Surg* 77:188–192
149. Piras F, Colombari R, Minerba L, Murtas D, Floris C, Maxia C, Corbu A, Perra MT, Sirigu P (2005) The predictive value of CD8, CD4, CD68 and human leukocyte antigen-D-related cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase. *Cancer* 104:1246–1254
150. Hillen F, Baeten CIM, van de Winkel A, Creytens D, van der Schaft DWJ, Winnepeninckx V, Griffioen AW (2008) Leukocyte infiltration and tumor cell plasticity are parameters of aggressiveness in primary cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 57:97–106
151. Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, Donskov F, Høyer M, Sjoegren P, Christensen IJ, Steiniche T (2012) Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer* 118:2476–2485
152. Weiss SA, Han SW, Lui K, Tchack J, Shapiro R, Berman R, Zhong J, Krogsgaard M, Osman I, Darvishian F (2016) Immunologic heterogeneity of tumor-infiltrating lymphocyte composition in primary melanoma. *Hum Pathol* 57:116–125
153. Krönig H, Falchner KJ, Odendahl M, Brackertz B, Conrad H, Muck D, Hein R, Blank C, Pexchel C, Haller B, et al (2012) PD-1 expression on Melan-A-reactive T cells increases during progression to metastatic disease. *Int J Cancer* 130:2327–2336
154. Miracco C, Mourmouras V, Biagioli M, Rubegni P, Mannucci S, Monciatti I, Cosci E, Tosi P, Luzi P (2007) Utility of tumour-infiltrating CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cell evaluation in predicting local recurrence in vertical growth phase cutaneous melanoma. *Oncol Rep* 18:1115–1122
155. Hussein MR, Elasers DAH, Fadel SA, Omar AEM (2006) Immunohistological characterization of tumour infiltrating lymphocytes in melanocytic skin lesions. *J Clin Pathol* 59:316–324
156. Bröcker EB, Zwadlo G, Holzmann B, Macher E, Sorg C (1988) Inflammatory cell infiltrates in human melanoma at different stages of tumor progression. *Int J Cancer* 41:562–567

157. Vermi W, Bonecchi R, Facchetti F, Bianchi D, Sozzani S, Festa S, Berenzi A, Cella M, Colonna M (2003) Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J Pathol* 200:255–268
158. Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, Høyer M, Maniecki MB, Sjoegren P, Christensen IJ, Steiniche T (2009) Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. *J Clin Oncol* 27:3330–3337
159. Emri E, Egervari K, Varvolgyi T, Rozsa D, Miko E, Dezso B, Veres I, Mehes G, Emri G, Remenyik E (2013) Correlation among metallothionein expression, intratumoural macrophage infiltration and the risk of metastasis in human cutaneous malignant melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 27:e320–327
160. Storr SJ, Saufan S, Mitra A, Elliott F, Walker C, Vasko MJ, Ho B, Cook M, Mohammed RAA, Patel PM, et al (2012) Objective assessment of blood and lymphatic vessel invasion and association with macrophage infiltration in cutaneous melanoma. *Mod Pathol* 25:493–504
161. Schadendorf D, Kohlmus C, Gawlik C, Suter L, Czarnetzki BM (1995) Mast cells in melanocytic tumours. *Arch Dermatol Res* 287:452–456
162. Tóth T, Tóth-Jakatics R, Jimi S, Takebayashi S, Kawamoto N (2000) Cutaneous malignant melanoma: Correlation between neovascularization and peritumor accumulation of mast cells overexpressing vascular endothelial growth factor. *Hum Pathol* 31:955–960
163. Mihm MC Jr, Clemente CG, Cascinelli N (1996) Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: A histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest* 74:43–47
164. Bogunovic D, O'Neill DW, Belitskaya-Levy I, Vacic V, Yu YL, Adams S, Darvishian F, Berman R, Shapiro R, Pavlick AC, et al (2009) Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:20429–20434
165. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, Chen S, Klein AP, Pardoll DM, Topalian SL, Chen L (2012) Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 4:127ra37
166. Erdag G, Schaefer JT, Smolkin ME, Deacon DH, Shea SM, Dengel LT, Patterson JW, Slingluff CL Jr (2012) Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. *Cancer Res* 72:1070–1080
167. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136:E359–386
168. Garavello W, Bertuccio P, Levi F, Lucchini F, Bosetti C, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C (2010) The oral cancer epidemic in central and eastern Europe. *Int J Cancer* 127:160–171
169. Chatenoud L, Garavello G, Pagan E, Bertuccio P, Gallus S, La Vecchia C, Negri E, Bosetti C (2016) Laryngeal cancer mortality trends in European countries. *Int J Cancer* 138:833–842
170. Rákregiszter statisztika. stat.nrr.hu
171. Lewis A, Kang R, Levine A, Maghami E (2015) The new face of head and neck cancer: the HPV epidemic. *Oncology (Williston Park)* 29:616–626
172. Bonner JA, Mesia R, Giralt J, Psyri A, Keilholz U, Rosenthal DI, Beier F, Schulten J, Vermorken JB (2017) p16, HPV, and cetuximab: What is the evidence? *Oncologist* 22:1–12
173. Tóth E (2018) Humán papillómavírus asszociált orofaringeális laphámkarcinóma patológiája. *Magy Onkol* 62:139–144
174. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El_hariry I, McConkey C, Paleri V, Roberts S (2013) Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck

- cancer – systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck* 35:747–755
175. Combes JD, Franceschi S (2014) Role of human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers. *Oral Oncol* 50:370–379
176. Takácsi-Nagy Z (2018) Változó tendenciák a human papillómavírus okozta szájgaratdaganatok lezélésében. *Magy Onkol* 62:145–152
177. Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, Stewart JS, Jelic S, Betka J, Preiss JH, et al (2007) Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med* 357:1695–1704
178. Argiris A (2013) Current status and future directions in induction chemotherapy for head and neck cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 88:57–74
179. Szturz P, Vermorken JB (2017) Immunotherapy in head and neck cancer: aiming at EXTREME precision. *BMC Medicine* 15:110
180. Mesía R, Vázquez S, Grau JJ, García-Sáenz JA, Lozano A, García C, Carles J, Irigoyen A, Mañós M, García-Paredes B, et al (2016) A phase 2 open label, single-arm trial to evaluate the combination of cetuximab plus Taxotere, cisplatin, and 5-fluorouracil as an induction regimen in patients with unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 94:289–296
181. Specenier PM, Remenar E, Buter J, Schrijvers DL, Bergamini C, Licitra LF, Awada A, Clement PM, Fortpied C, Menis J, Vermorken JB (2017) TPF plus cetuximab induction chemotherapy followed by biochemoradiation with weekly cetuximab plus weekly cisplatin or carboplatin: a randomized phase II EORTC trial. *Ann Oncol* 28:2219–2224
182. Ferris RL, Blumenschein G, Jr, Fayette J, et al (2016) Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 375:1856–1867
183. Seiwert TY, Burtneß B, Mehra R, Weiss J, Berger R, Eder JP, Heath K, McClanahan T, Luceford J, Gause C, et al (2016) Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicenter, phase 1b trial. *Lancet Oncol* 17:956–965
184. Bellyei Sz, Bakó P, Orosz É, Molnár K, Remenár É, Mangel L (2018) Immunoterápia első hatékony alkalmazása Magyarországon lokálisan kiújult fej-nyaki laphámkarzinómás betegnél. *Magy Onkol* 62:175–178
185. Solomon B, Young RJ, Rischin D (2018) Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin Cancer Biol* 52:228–240
186. Whiteside TL (2017) Head and neck cancer immunotherapy: facts and hopes. *Clin Cancer Res* 24:6–13
187. Qureshi HA, Lee SM (2019) Immunotherapy approaches beyond PD-1 inhibition: the future of cellular therapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol* 20:31
188. de Ruyter EJ, Ooft ML, Devriese LA, Willems SM (2017) The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology* 6:e1356148
189. Balcermpas P, Michel Y, Wagenblast J, Seitz O, Weiss C, Rödel F, Rödel C, Fokas E (2014) Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer. *Br J Cancer* 110:501–509
190. Balcermpas P, Rödel F, Rödel C, Krause M, Linge A, Lohaus F, Baumann M, Tinhofer I, Budach V, Gkika E, et al (2016) CD8+ tumour-infiltrating lymphocytes in relation to HPV status and clinical outcome in patients with head and neck cancer after postoperative chemoradiotherapy: A multicentre study of the German cancer consortium radiation oncology group (DKTK-ROG). *Int J Cancer* 138:171–181

191. Reichert TE, Scheuer C, Day R, Wagner W, Whiteside TL (2001) The number of intratumoral dendritic cells and ζ -chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer* 91:2136–2147
192. Karpathiou G, Casteillo F, Giroult JB, Forest F, Fournel P, Monaya A, Froudarakis M, Dumollard JM, Prades JM, Peoc'h M (2017) Prognostic impact of immune microenvironment in laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinoma: Immune cell subtypes, immune-suppressive pathways and clinicopathologic characteristics. *Oncotarget* 8:19310–19322
193. Andersen AS, Koldjær-Sølling AS, Ovesen T, Rusan M (2014) The interplay between HPV and host immunity in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 134:2755–2763
194. Näsman A, Romanitan M, Nordfors C, Grün N, Johansson H, Hammarstedt L, Marklund L, Munck-Wikland E, Dalanis T, Ramqvist T (2012) Tumor infiltrating CD8⁺ and Foxp3⁺ lymphocytes correlate to clinical outcome and human papillomavirus (HPV) status in tonsillar cancer. *PLoS ONE* 7:e38711
195. Nordfors C, Grün N, Tertipis N, Ährlund-Richter A, Haegglblom L, Sivars L, Du J, Nyberg T, Marklund L, Munck-Wikland E, et al (2013) CD8⁺ and CD4⁺ tumour infiltrating lymphocytes in relation to human papillomavirus status and clinical outcome in tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 49:2522–2530
196. Ward MJ, Thirdborough SM, Mellows T, Riley C, Harris S, Suchak K, Webb A, Hampton C, Patel NN, Randall CJ, et al (2014) Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. *Br J Cancer* 110:489–500
197. Keck MK, Zuo Z, Khattri A, Stricker TP, Brown CD, Imanguli M, Rieke D, Endhardt K, Fang P, Brägelmann J, et al (2014) Integrative analysis of head and neck cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes. *Clin Cancer Res* 21:870–881
198. Liskay G, Péley G, Sinkovics I, Péter I, Orosz Z, Fejös Z, Horváth B, Köves I, Gilde K (2003) Clinical significance of sentinel lymph node involvement in malignant melanoma. *Pathol Oncol Res* 9:184–187
199. Liskay G, Orosz Z, Péley G, Csuka O, Plótár V, Sinkovics I, Bánfalvi T, Fejös Z, Gilde K, Kásler M (2005) Relationship between sentinel lymph node status and regression of primary malignant melanoma. *Melanoma Res* 15:509–513
200. Wolchok JD, Hoos A, O'Day S, Weber JS, Hamid O, Lebbé C, Maio M, Binder M, Bosenick O, Nichol G, et al (2009) Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin Cancer Res* 15:7412–7420
201. Irjala H, Salmi M, Alanen K, Grenman R, Jalkanen S (2001) Vascular adhesion protein 1 mediates binding of immunotherapeutic effector cells to tumor endothelium. *J Immunol* 166:6937–6943
202. Moldenhauer G, Popov SW, Wotschke B, Bröderlein S, Riedl P, Fissolo N, Schirmbeck R, Ritz O, Möller P, Leithäuser F (2006) AID expression identifies interfollicular large B cells as putative precursors of mature B-cell malignancies. *Blood* 107:2470–2473
203. Bombardieri M, Barone F, Humby F, Kelly S, McGurk M, Morgan P, Challacombe S, De Vita S, Valesini G, Spencer J, Pitzalis C (2007) Activation-induced cytidine deaminase expression in follicular dendritic cell networks and interfollicular large B cells supports functionality of ectopic lymphoid neogenesis in autoimmune sialoadenitis and MALT lymphoma in Sjögren's syndrome. *J Immunol* 179:4929–4938
204. Ladányi A (2013) A tumort infiltráló immunsejtek prognosztikai értéke melanómában. *Magy Onkol* 57:85–95
205. Weinberg AD, Vella AT, Croft M (1998) OX-40: life beyond the effector T cell stage. *Semin Immunol* 10:471–480
206. Diederichsen AC, Zeuthen J, Christensen PB, Kristensen T (1999) Characterization of tumour-infiltrating lymphocytes and correlations with immunological surface molecules in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 35:721–726

207. Kryczek I, Liu R, Wang G, Wu K, Shu X, Szeliga W, Vatan L, Finlayson E, Huang E, Simeone D, et al (2009) FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease. *Cancer Res* 69:3995–4000
208. Melsted WN, Johansen LL, Lock-Andersen J, Behrendt N, Eriksen JO, Bzorek M, Scheike T, Hviid TVF (2017) HLA class Ia and Ib molecules and FOXP3+ TILs in relation to the prognosis of malignant melanoma patients. *Clin Immunol* 183:191–197
209. Garg K, Maurer M, Griss J, Brügger MC, Wolf IH, Wagner C, Willi N, Mertz KD, Wagner SN (2016) Tumor-associated B cells in cutaneous primary melanoma and improved clinical outcome. *Hum Pathol* 54:157–164
210. Selitsky SR, Mose LE, Smith CC, Chai S, Hoadley KA, Dittmer DP, Moschos SJ, Parker JS, Vincent BG (2019) Prognostic value of B cells in cutaneous melanoma. *Genome Med* 11:36
211. Linton PJ, Bautista B, Biederman E, Bradley ES, Harbertson J, Kondrack RM, Padrick RC, Bradley LM (2003) Costimulation via OX40L expressed by B cells is sufficient to determine the extent of primary CD4 cell expansion and Th2 cytokine secretion in vivo. *J Exp Med* 197:875–883
212. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, de Chaisemartin L, et al (2008) Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol* 26:4410–4417
213. de Chaisemartin L, Goc J, Damotte D, Validire P, Magdeleinat P, Alifano M, Cremer I, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Dieu-Nosjean MC (2011) Characterization of chemokines and adhesion molecules associated with T cell presence in tertiary lymphoid structures in human lung cancer. *Cancer Res* 71:6391–6399
214. Engelhard VH, Rodriguez AB, Mauldin IS, Woods AN, Peske JD, Slingluff CL (2018) Immune cell infiltration and tertiary lymphoid structures as determinants of antitumor immunity. *J Immunol* 200:432–442
215. Weinstein AM, Storkus WJ (2016) Biosynthesis and functional significance of peripheral node addressin in cancer-associated TLO. *Front Immunol* 7:301
216. Bento DC, Jones E, Junaid S, Tull J, Williams GT, Godkin A, Ager A, Gallimore A (2015) High endothelial venules are rare in colorectal cancers but accumulate in extra-tumoral areas with disease progression. *Oncoimmunology* 4:e974374
217. Ribero S, Moscarella E, Ferrara G, Piana S, Argenziano G, Longo C (2016) Regression in cutaneous melanoma: a comprehensive review from diagnosis to prognosis. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 30:2030–2037
218. van Pul KM, Vuylsteke RJCLM, van de Ven R, Te Velde EA, Rutgers EJT, van den Tol PM, Stockmann HBAC, de Gruijl TD (2020) Selectively hampered activation of lymph node-resident dendritic cells precedes profound T cell suppression and metastatic spread in the breast cancer sentinel lymph node. *J Immunother Cancer* 7:133
219. Ramstad T, Lawnicki L, Vetto J, Weinberg A (2000) Immunohistochemical analysis of primary breast tumors and tumor-draining lymph nodes by means of the T-cell costimulatory molecule OX-40. *Am J Surg* 179:400–406
220. Gerlini G, Urso C, Mariotti G, Di Gennaro P, Palli D, Brandani P, Salvadori A, Pimpinelli N, Reali UM, Borgognoni L (2007) Plasmacytoid dendritic cells represent a major dendritic cell subset in sentinel lymph nodes of melanoma patients and accumulate in metastatic nodes. *Clin Immunol* 125:184–193
221. Gajewski TF, Woo SR, Zha Y, Spaapen R, Zheng Y, Corrales L, Spranger S (2013) Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* 25:268–276
222. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, Gajewski TF (2013) Up-regulation of PD-L1, IDO, and T_{regs} in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8⁺ T cells. *Sci Transl Med* 5:200ra116

223. Bulliard Y, Jolicoeur R, Windman M, Rue SM, Ettenberg S, Knee DA, Wilson NS, Dranoff G, Brogdon JL (2013) Activating Fc γ receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *J Exp Med* 210:1685–1693
224. Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, Roddie C, Henry JY, Yagita H, Wolchok JD, et al (2013) Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med* 210:1695–1710
225. Romano E, Kusio-Kobialka M, Foukas PG, Baumgaertner P, Meyer C, Ballabeni P, Michielin O, Weide B, Romero P, Speiser DE (2015) Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients. *Proc Natl Acad Sci* 112:6140–6145
226. Huang RR, Jalil J, Economou JS, Chmielowski B, Koya RC, Mok S, Sazegar H, Seja E, Villanueva A, Gomez-Navarro J, et al (2011) CTLA4 blockade induces frequent tumor infiltration by activated lymphocytes regardless of clinical responses in humans. *Clin Cancer Res* 17:4101–4109
227. Oliver AJ, Lau PKH, Unsworth AS, Loi S, Darcy PK, Kershaw MH, Slaney CY (2018) Tissue-dependent tumor microenvironments and their impact on immunotherapy responses. *Front Immunol* 9:70
228. Bartlett EK, Fetsch PA, Filie AC, Abati A, Steinberg SM, Wunderlich JR, White DE, Stephens DJ, Marincola FM, Rosenberg SA, Kammula US (2014) Human melanoma metastases demonstrate nonstochastic site-specific antigen heterogeneity that correlates with T-cell infiltration. *Clin Cancer Res* 20:2607–2616
229. Hegde PS, Karanikas V, Evers S (2016) The where, the when, and the how of immune monitoring for cancer immunotherapies in the era of checkpoint inhibition. *Clin Cancer Res* 22:1865–1874
230. Johnson DB, Estrada MV, Salgado R, Sanchez V, Doxie DB, Opalenik SR, Vilgelm AE, Feld E, Johnson AS, Greenplate AR, et al (2016) Melanoma-specific MHC-II expression represents a tumour-autonomous phenotype and predicts response to anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Nat Commun* 7:10582
231. Håkansson A, Gustafsson B, Krysanter L, Håkansson L (1996) Tumour-infiltrating lymphocytes in metastatic malignant melanoma and response to interferon alpha treatment. *Br J Cancer* 74:670–676
232. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lin RH, Torng PL, Huang SC (1999) Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma. *Cancer* 86:1537–1543
233. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H (1998) The central role of CD4⁺ T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 188:2357–2368
234. Borst J, Ahrends T, Bąbala N, Melief CJM, Kastenmüller W (2018) CD4⁺ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 18:635–647
235. Salter J, MacLennan KA, Moore J, Dadian G, Riches PG, Gore ME (1995) The phenotypic changes in tumour infiltrating lymphocytes and tumour cells following intra-arterial infusion of interleukin-2 in patients with squamous cell carcinoma. *J Pathol* 176:167–173
236. Berinstein NL, Wolf GT, Naylor PH, Baltzer L, Egan JE, Brandwein HJ, Whiteside TL, Goldstein LC, El-Naggar A, Badoual C, et al (2012) Increased lymphocyte infiltration in patients with head and neck cancer treated with the IRX-2 immunotherapy regimen. *Cancer Immunol Immunother* 61:771–782
237. Karpathiou G, Giroult JB, Forest F, Fournel P, Monaya A, Froudarakis M, Dumollard JM, Prades JM, Gavid M, Peoc'h M (2016) Clinical and histologic predictive factors of response to induction chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 146:546–553

238. Braster R, O'Toole T, van Egmond M (2014) Myeloid cells as effector cells for monoclonal antibody therapy of cancer. *Methods* 65:28–37
239. Weiskopf K, Weisman IL (2015) Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer. *mAbs* 7:303–310
240. Trivedi S, Srivastava RM, Concha-Benavente F, Ferrone S, Garcia-Bates TM, Li J, Ferris RL (2016) Anti-EGFR targeted monoclonal antibody isotype influences anti-tumor cellular immunity in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 22:5229–5237
241. Ni YH, Huang XF, Ding L, Wang ZY, Hu QG, Hou YY (2014) Accumulation of CD208⁺ mature dendritic cells does not correlate with survival time in oral squamous cell carcinoma patients. *J Oral Maxillofac Surg* 72:2178–2185
242. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, Rosenberg SA (2009) Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114:1537–1544
243. Haymaker C, Wu R, Bernatchez C, Radvanyi L (2012) PD-1 and BTLA and CD8⁺ T-cell „exhaustion” in cancer. „Exercising” an alternative viewpoint. *OncoImmunology* 1:735–738
244. Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, Tran E, Wunderlich JR, Mixon A, Farid S, Dudley ME, et al (2014) PD-1 identifies the patient-specific CD8⁺ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest* 124:2246–2259
245. Muenst S, Soysal SD, Gao F, Obermann EC, Oertli D, Gillanders WE (2013) The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 139:667–676
246. Li Y, Liang L, Dai W, Cai G, Xu Y, Li X, Li Q, Cai S (2016) Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *Mol Cancer* 15:55
247. Paulsen EE, Kilvaer TK, Khanekhenari MR, Al-Saad S, Hald SM, Andersen S, Richardsen E, Ness N, Busund LT, Bremnes RM, Donnem T (2017) Assessing PDL-1 and PD-1 in non-small cell lung cancer: a novel immunoscore approach. *Clin Lung Cancer* 18:220–233
248. Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda N, Levionnois E, Nizard M, Si-Mohamed A, Besnier N, et al (2013) PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res* 73:128–138
249. Balermipas P, Rödel F, Krause M, Linge A, Lohaus F, Baumann M, Tinhofer I, Budach V, Sak A, Stuschke M, et al (2017) The PD-1/PD-L1 axis and human papilloma virus in patients with head and neck cancer after adjuvant chemoradiotherapy: A multicentre study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG). *Int J Cancer* 141:598–603
250. Ochsenbein AF, Sierro S, Odermatt B, Pericin M, Karrer U, Hermans J, Hemmi S, Hengartner H, Zinkernagel RM (2001) Roles of tumour localization, second signals and cross-priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* 411:1058–1064
251. Mortarini R, Piris A, Maurichi A, Molla A, Bersani I, Bono A, Bartoli C, Santinami M, Lombardo C, Ravagnani F, et al (2003) Lack of terminally differentiated tumor-specific CD8⁺ T cells at tumor site in spite of antitumor immunity to self-antigens in human metastatic melanoma. *Cancer Res* 63:2535–2545
252. Kirk CJ, Hartigan-O'Connor D, Mulé JJ (2001) The dynamics of the T-cell antitumor response: Chemokine-secreting dendritic cells can prime tumor-reactive T cells extranodally. *Cancer Res* 61:8794–8802
253. thor Straten PT, Becker JC, Guldborg P, Zenthen J (1999) In situ T-cells in melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 34:386–395
254. thor Straten P, Dahl C, Schrama D, Østergaard Pedersen L, Andersen MH, Seremet T, Bröcker E-B, Guldborg P, Becker JC (2006) Identification of identical TCRs in primary

melanoma lesions and tumor free corresponding sentinel lymph nodes. *Cancer Immunol Immunother* 55:495–502

9. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

9.1. Az értekezés alapját képező, a PhD fokozat elnyerése (1996) után született közlemények

9.1.1. Lektorált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

1. Tímár J, Forster-Horváth C, Lukits J, Döme B, **Ladányi A**, Remenár E, Kásler M, Bencsik M, Répássy G, Szabó G, Velich N, Suba Z, Élő J, Balatoni Z, Bajtai A, Chretien P, Talor E (2003) The effect of leukocyte interleukin injection (Multikine®) treatment on the peritumoral and intratumoral subpopulation of mononuclear cells and on tumor epithelia: A possible new approach to augmenting sensitivity to radiation therapy and chemotherapy in oral cancer – A multicenter phase I/II clinical trial. *Laryngoscope* 113:2206–2217, *IF 1,449*
2. **Ladányi A**, Somlai B, Gilde K, Fejős Z, Gaudi I, Tímár J (2004) T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 10:521–530, *IF 5,623*
3. Forster-Horváth C, Döme B, Paku S, **Ladányi A**, Somlai B, Jalkanen S, Tímár J (2004) Loss of vascular adhesion protein-1 expression in intratumoral microvessels of human skin melanoma. *Melanoma Res* 14:135–140, *IF 1,735*
4. Tímár J, **Ladányi A**, Forster-Horváth C, Lukits J, Döme B, Remenár E, Gódeány M, Kásler M, Bencsik M, Répássy G, Szabó G, Velich N, Suba Z, Élő J, Balatoni Z, Pócza K, Zemplén B, Chretien P, Talor E (2005) Neoadjuvant immunotherapy of oral squamous cell carcinoma modulates intratumoral CD4⁺/CD8⁺ ratio and tumor microenvironment: a multicenter phase II clinical trial. *J Clin Oncol* 23:3421–3432, *IF 11,810*
5. **Ladányi A**, Kiss J, Somlai B, Gilde K, Fejős Z, Mohos A, Gaudi I, Tímár J (2007) Density of DC-LAMP⁺ mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol Immunother* 56:1459–1469, *IF 3,728*
6. Kiss J, Tímár J, Somlai B, Gilde K, Fejős Z, Gaudi I, **Ladányi A** (2007) Association of microvessel density with infiltrating cells in human cutaneous malignant melanoma. *Pathol Oncol Res* 13:21–31, *IF 1,272*
7. **Ladányi A**, Mohos A, Somlai B, Liskay G, Gilde K, Fejős Z, Gaudi I, Tímár J (2010) FOXP3⁺ cell density in primary tumor has no prognostic impact in patients with cutaneous malignant melanoma. *Pathol Oncol Res* 16:303–309, *IF 1,483*
8. **Ladányi A**, Kiss J, Mohos A, Somlai B, Liskay G, Gilde K, Fejős Z, Gaudi I, Dobos J, Tímár J (2011) Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 60:1729–1738, *IF 3,701*
9. Mohos A, Sebestyén T, Liskay G, Plótár V, Horváth S, Gaudi I, **Ladányi A** (2013) Immune cell profile of sentinel lymph nodes in patients with malignant melanoma – FOXP3⁺ cell density in cases with positive sentinel node status is associated with unfavorable clinical outcome. *J Transl Med* 11:43, *IF 3,990*

10. **Ladányi A**, Sebestyén T, Mohos A, Liskay G, Somlai B, Tóth E, Tímár J (2014) Ectopic lymphoid structures in primary cutaneous melanoma. *Pathol Oncol Res* 20:981-985, 2014, *IF 1,855*
11. **Ladányi A** (2015) Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 28:490–500, *IF 4,163*
12. Balatoni T, Mohos A, Papp E, Sebestyén T, Liskay G, Oláh J, Varga A, Lengyel Z, Emri G, Gaudi I, **Ladányi A** (2018) Tumor-infiltrating immune cells as potential biomarkers predicting response to treatment and survival in patients with metastatic melanoma receiving ipilimumab therapy. *Cancer Immunol Immunother* 64:141–151, *IF 4,900*
13. Sebestyén T, Mohos A, Liskay G, Somlai B, Gaudi I, **Ladányi A** (2018) Correlation with lymphocyte infiltration, but lack of prognostic significance of MECA-79-positive high endothelial venules in primary malignant melanoma. *Melanoma Res* 28:304–310, *IF 2,381*
14. **Ladányi A**, Kapuvári B, Papp E, Tóth E, Lövey J, Horváth K, Gődény M, Remenár É (2019) Local immune parameters as potential predictive markers in head and neck squamous cell carcinoma patients receiving induction chemotherapy and cetuximab. *Head Neck* 41:1237–1245, *IF 2,538*
15. Balatoni T, **Ladányi A**, Fröhlich G, Czirbesz K, Kovács P, Pánczél G, Bence E, Plótár V, Liskay G (2020) Biomarkers associated with clinical outcome of advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Pathol Oncol Res* 26:317-325, *IF 2,826*
16. **Ladányi A**, Tímár J (2020) Immunologic and immunogenomic aspects of tumor progression. *Semin Cancer Biol* 60:249-261, *IF 11,090*
17. **Ladányi A**, Papp E, Mohos A, Balatoni T, Liskay G, Oláh J, Varga A, Lengyel Z, Emri G, Ferrone S (2020) Role of the anatomic site in the association of HLA class I antigen expression level in metastases with clinical response to ipilimumab therapy in melanoma patients. *J Immunother Cancer* 8:e000209, *IF 10,252*

9.1.2. Magyar nyelvű közlemények

1. Répássy G, Forster-Horváth Cs, **Ladányi A**, Döme B, Tímár J (2002) A fej-nyaki tumorokat infiltráló sejtek jellemzése. *Fül-, Orr-, Gégegyógyászat* 48:206–212
2. **Ladányi A** (2004) Emberi daganatokat infiltráló immunsejtek funkcionális és prognosztikai jelentősége. *Magy Onkol* 48:49–56
3. **Ladányi A** (2013) A tumort infiltráló immunsejtek prognosztikai értéke melanómában. *Magy Onkol* 57:85–95
4. **Ladányi A**, Balatoni T (2013) Az immunválasz “akadálymentesítése”: újabb lehetőségek a melanóma immunterápiájában. *Magy Onkol* 57:100–107
5. **Ladányi A** (2016) Immunológiai biomarkerek a rákellenes kezelés hatásának megjóslásában. *Magy Onkol* 60:4–10
6. **Ladányi A** (2017) Tumorimmunológia – state of the art. *Immunol Szle* 9:15–17

7. Tímár J, **Ladányi A** (2017) A daganatok immunterápiájának prediktív markerei, a PD-L1-meghatározás gyakorlati kérdései. *Magy Onkol* 61:158–166
8. **Ladányi A** (2019) A T-sejtek szerepe a tumorimmunológiában és –immunterápiában. *Magy Onkol* 63:165–171
9. Tímár J, **Ladányi A** (2019) A tumorprogresszió immungenomikai aspektusai. *Magy Onkol* 63:173–182

9.2. Egyéb, a PhD fokozat elnyerése után született közlemények

9.2.1. Lektorált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

1. Tóvári J, Paku S, Rásó E, Pogány G, Kovalszky I, Ladányi A, Lapis K, Tímár J (1997) Role of sinusoidal heparan sulfate proteoglycan in liver metastasis formation. *Int J Cancer* 71:825–831, *IF* 3,362
2. **Ladányi A**, O Nagy J, Jeney A, Tímár J (1998) Cytokine sensitivity of metastatic human melanoma cell lines – simultaneous inhibition of proliferation and enhancement of gelatinase activity. *Pathol Oncol Res* 4:108–114, 1998
3. Price MR, **Ladányi A**, Uray K, Ma Y, Sekowski M, Durrant LG (1999) Separation of distinct MUC2 mucin glycoforms using two anti-peptide monoclonal antibodies. *Int J Oncol* 15:803–809, *IF* 1,381
4. **Ladányi A**, Nishimura MI, Rosenberg SA, Yang JC (2000) Tumorigenicity and immunogenicity of murine tumor cells expressing an MHC class II molecule with a covalently bound antigenic peptide. *J Immunother* 23:36–47, *IF* 3,027
5. Ádám Z, Ádány R, **Ladányi A**, Tímár J, Balázs M (2000) Liver metastatic ability of human melanoma cell line is associated with losses of chromosomes 4, 9p21-pter and 10p. *Clin Expl Metastasis* 18:295–302, *IF* 1,845
6. Forster-Horváth C, Bocsi J, Rásó E, Orbán TI, Olah E, Tímár J, **Ladányi A** (2001) Constitutive intracellular expression and activation-induced cell surface up-regulation of CD44v3 in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 31:600–608, *IF* 4,990
7. Döme B, Somlai B, **Ladányi A**, Fazekas K, Zöller M, Tímár J (2001) Expression of CD44v3 splice variant is associated to the visceral metastatic phenotype of human melanoma. *Virchow Arch* 439:628–635, *IF* 1,709
8. Aszalos A, **Ladányi A**, Bocsi J, Szende B (2001) Induction of apoptosis in MDR1 expressing cells by daunorubicin with combinations of suboptimal concentrations of P-glycoprotein modulators. *Cancer Lett* 167:157–162, *IF* 1,741
9. **Ladányi A**, Gallai M, Paku S, Nagy JO, Dudás J, Tímár J, Kovalszky I (2001) Expression of a decorin-like molecule in human melanoma. *Pathol Oncol Res* 7:260–266
10. Tímár J, Rásó E, Döme B, **Ladányi A**, Bánfalvi T, Gilde K, Raz A (2002) Expression and function of the AMF receptor by human melanoma in experimental and clinical systems. *Clin Expl Metastasis* 19:225–232, *IF* 2,080

11. Trikha M, Timar J, Zacharek A, Nemeth JA, Cai Y, Dome B, Somlai B, Raso E, **Ladanyi A**, Honn KV (2002) Role for $\beta 3$ integrins in human melanoma growth and survival. *Int J Cancer* 101:156–167, *IF* 4,056
12. Tímár J, **Ladányi A**, Peták I, Jeney A, Kopper L (2003) Molecular pathology of tumor metastasis III. Target array and combinatorial therapies. *Pathol Oncol Res* 9:49–72
13. Lövey J, Fazekas K, **Ladányi A**, Németh G, Tímár J (2003) Low-dose irradiation and short-exposure suboptimal-dose paclitaxel adversely modulate metastatic potential of squamous carcinoma cells. *Strahlenther Onkol* 179:812–818, *IF* 2,634
14. Forster-Horváth C, Mészáros L, Rásó E, Döme B, **Ladányi A**, Morini M, Albini A, Tímár J (2004) Expression of CD44v3 protein in human endothelial cells in vitro and in tumoral microvessels in vivo. *Microvasc Res* 68:110–118, *IF* 2,359
15. Dobos J, Tímár J, Bocsi J, Burián Z, Nagy K, Barna G, Peták I, **Ladányi A** (2004) *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 2-methoxyestradiol on human melanoma. *Int J Cancer* 112:771–776, *IF* 4,416
16. Döme B, Rásó E, Dobos J, Mészáros L, Varga N, Puskás LG, Fehér LZ, Lőrincz T, **Ladányi A**, Trikha M, Honn KV, Tímár J (2005) Parallel expression of α IIb β 3 and α v β 3 integrins in human melanoma cells upregulates bFGF expression and promotes their angiogenic phenotype. *Int J Cancer* 116:27–35, *IF* 4,700
17. Rásó E, Tóvári J, **Ladányi A**, Varga N, Tímár J (2005) Ligand-mimetic anti- α IIb β 3 antibody PAC-1 inhibits tyrosine signaling, proliferation and lung colonization of melanoma cells. *Pathol Oncol Res* 11:218–223, *IF* 1,162
18. Treszl A, **Ladanyi A**, Rakosy Z, Buczko Z, Adany R, Balazs M (2006) Molecular cytogenetic characterization of a novel cell line established from a superficial spreading melanoma. *Front Biosci* 11:1844–1853, *IF* 3,226
19. Dome B, Timar J, Dobos J, Meszaros L, Raso E, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Magyar M, **Ladanyi A**, Bogos K, Tovari J (2006) Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 66:7341–7347, *IF* 7,656
20. Tímár J, Mészáros L, **Ladányi A**, Puskás LG, Rásó E (2006) Melanoma genomics reveals signatures of sensitivity to bio- and targeted therapies. *Cell Immunol* 244:154–157, *IF* 1,558
21. Lukits J, Remenár É, Rásó E, **Ladányi A**, Kásler M, Tímár J (2007) Molecular identification, expression and prognostic role of estrogen- and progesterone receptors in head and neck cancer. *Int J Oncol* 30:155–160, *IF* 2,295
22. Dome B, Timar J, **Ladanyi A**, Paku S, Renyi-Vamos F, Klepetko W, Lang G, Dome P, Bogos K, Tovari J (2009) Circulating endothelial cells, bone marrow-derived endothelial progenitor cells and proangiogenic hematopoietic cells in cancer: From biology to therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 69:108–124, *IF* 5,269

23. Dobos J, Kenessey I, Tímár J, **Ladányi A** (2011) Glucocorticoid receptor expression and antiproliferative effect of dexamethasone on human melanoma cells. *Pathol Oncol Res* 17:729–734, *IF* 1,366
24. Kenessey I, Bánki B, Márk Á, Varga N, Tóvári J, **Ladányi A**, Rásó E, Tímár J (2012) Revisiting CB1 receptor as drug target in human melanoma. *Pathol Oncol Res* 18:857–866, *IF* 1,555
25. Dobos J, Mohos A, Tóvári J, Rásó E, Lőrincz T, Zádori G, Tímár J, **Ladányi A** (2013) Sex-dependent liver colonization of human melanoma in SCID mice – role of host defense mechanisms. *Clin Exp Metastasis* 30:497–506, *IF* 3,725
26. Nikolovska K, Spillmann D, Haier J, **Ladányi A**, Stock C, Seidler DG (2017) Melanoma cell adhesion and migration is modulated by the urolysin 2-O sulfotransferase. *PLoS One* 12:e0170054, *IF* 2,766
27. Burián Z, **Ladányi A**, Barbai T, Piurkó V, Garay T, Rásó E, Tímár J (2020) Selective inhibition of HIF1 α expression by ZnSO₄ has antitumoral effects in human melanoma. *Pathol Oncol Res* 26:673–679, *IF* 2,826
28. Dudás J, **Ladányi A**, Ingruber J, Steinbichler TB, Riechelmann H (2020) Epithelial to mesenchymal transition: a mechanism that fuels cancer radio/chemoresistance. *Cells* 9:428, *IF*: 4,366
29. Küronya Z, Szőnyi MD, Nagyiványi K, Gyergyay F, Gécz L, Budai B, Martin T, **Ladányi A**, Kiss E, Biró K (2020) Predictive markers of first line pazopanib treatment in kidney cancer. *Pathol Oncol Res* 26:2475–2481, *IF* 2,826

9.2.2. Magyar nyelvű közlemények

1. Liszka Gy, Petrányi Á, Udvarhelyi N, Demeter J, Bodó M, Besznyák I, **Ladányi A**, Vargha P, Döbrössy L (1999) Mammográfiával felismert rákok morfológiai paramétereinek összehasonlítása a területileg szervezett szűrés során és alkalomszerűen vizsgáltakkal. *Orv Hetil* 140:1533–1536
2. **Ladányi A** (2003) A malignus melanoma immunterápiájának lehetőségei. *Magy Onkol* 47:113–117
3. Liszkay G, **Ladányi A**, Kotlán B, Plótár V, Mátrai Z, Egyed ZsI (2012) A melanoma malignum diagnosztikája és terápiája napjainkban. *Onkológia* 2:230–233
4. Plótár V, Liszkay G, **Ladányi A**, Tóth E (2013) A malignus melanóma új TNM-klasszifikációja (AJCC, 2009) és az őrszemnyirokcsomó-biopszia patológiai jelentősége. *Magy Onkol* 57:68–72
5. Pusztai L, **Ladányi A**, Székely B, Dank M (2016) Új immunterápiás lehetőségek az emlőrák kezelésében. *Magy Onkol* 60:34–40
6. Gécz L, **Ladányi A**, Vajdics T, Küronya Zs, Biró K, Gyergyay F, Martin T, Nagyiványi K (2016) Immunterápia az urológiai daganatok kezelésében. *Magy Onkol* 60:41–45

9.3. Egyéb, a PhD fokozat elnyerése előtt született közlemények

1. Paku S, Rot A, **Ladányi A**, Lapis K (1989) Demonstration of the organ preference of liver-selected "high metastatic" Lewis lung tumor cell line. *Clin Expl Metastasis* 7:599–607, *IF* 1,551
2. Tímár J, Moczar E, **Ladányi A**, Lapis K (1989) Galactose residues on glycans of metastatic cells positively correlate with the recognition by host non-specific effectors. *Acta Paediatr Hung* 29:59–62
3. Tímár J, **Ladányi A**, Lapis K, Moczar E (1990) Galactosylated glycan expression and macrophage sensitivity of Lewis lung tumor cells with different metastatic phenotype. *J Cancer Res Clin Oncol* 116:264–270, *IF* 1,153
4. Tímár J, **Ladányi A**, Moczar M, Lapis K, Moczar E (1990) Heparin-binding proteins from human melanoma cells. *Biochem Soc Transact* 18:495–496, *IF* 2,851
5. Lapis K, Tímár J, Pápay J, Paku S, Szende B, **Ladányi A** (1990) Experimental metastasis inhibition by pretreatment of the host. *Arch Geschwulstforsch* 60:97–102
6. Tímár J, Pogány G, Balázs M, Szöllösi J, **Ladányi A**, Oláh J, Timár F, Lapis K, Jeney A (1990) Modulation of membrane phenotype, matrix adhesion and microinvasiveness of metastatic tumor cells by HUdR. *Cell Biochem Funct* 8:211–220, *IF* 0,658
7. **Ladányi A**, Tímár J, Paku S, Molnár G, Lapis K (1990) Selection and characterization of human melanoma lines with different liver-colonizing capacity. *Int J Cancer* 46:456–461, *IF* 2,825
8. Nagy P, Török N, **Ladányi A**, Kopper L (1991) Expression of transforming growth factor-beta 1 in human non-Hodgkin's lymphoma xenografts. *J Natl Cancer Inst* 83:1174–1175, *IF* 7,181
9. Tímár J, **Ladányi A**, Lapis K, Moczar M (1992) Differential expression of proteoglycans on the surface of human melanoma cells characterized by altered experimental metastatic potential. *Am J Pathol* 141:467–474, *IF* 5,656
10. **Ladányi A**, Tímár J, Lapis K (1993) Effect of lentinan on macrophage cytotoxicity against metastatic tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 36:123–126, *IF* 1,668
11. Price MR, Sekowski M, **Ladányi A**, Uray K, Ma Y, Durrant L, Tendler SJB (1993) Immune recognition of human colonic tumor-associated MUC-2 mucins using anti-peptide antibody. *Int J Cancer* 55:753-759, *IF* 2,923
12. Kopper L, **Ladányi A**, Mihalik R, Nagy P (1994) Loss of transforming growth factor beta 1 regulatory activity in human non Hodgkin lymphomas. *Anticancer Res* 14:119–122, *IF* 1,066

13. Tímár J, Diczházi C, Bartha I, **Ladányi A**, Tarcsafalvi A, Lapis K (1994) PMA induces shift from chondroitin to heparan sulphate on proteoglycans correlating with fibronectin adhesion of MDS human leukemia cells. *Anticancer Res* 14:1227–1231, *IF* 1,066
14. **Ladányi A**, Tímár J, Bocsi J, Tóvári J, Lapis K (1995) Sex-dependent liver metastasis of human melanoma lines in SCID mice. *Melanoma Res* 5:83–86, *IF* 1,570
15. Tímár J, Diczházi C, Bartha I, Pogány G, Paku S, Rásó E, **Ladányi A**, Lapis K, Jeney A, Kopper L (1995) Modulation of heparan-sulphate/chondroitin-sulphate ratio by glycosaminoglycan biosynthesis inhibitors affects liver metastatic potential of tumor cells. *Int J Cancer* 62:755–761, *IF* 3,403
16. Tímár J, Diczházi C, **Ladányi A**, Rásó E, Hornebeck W, Robert L, Lapis K (1995) Interaction of tumor cells with elastin and the metastatic phenotype. *Ciba Found Symp* 192:321–335, *IF* 1,354
17. Tímár J, Tóvári J, Pogány G, **Ladányi A**, Paku S, Rásó E, Bocsi J, Jeney A, Lapis K (1996) The antimetabolite Tiazofurin (TR) inhibits glycoconjugate biosynthesis and invasiveness of tumour cells. *Eur J Cancer* 32A:152–159, *IF* 2,017
18. Tóth Á, Schnur J, **Ladányi A**, Kopper L (1996) Intracerebral human lymphoma – an experimental model. *Pathol Oncol Res* 2:174–176
19. Tóvári J, Bocsi J, **Ladányi A**, Lapis K, Tímár J (1996) The antitumor effect of Tiazofurin (TR) consists of anti-proliferative and anti-invasive elements. *Anticancer Res* 16:3307–3312, *IF* 1,049

9.4. Tudománymetriai adatok

Ladányi Andrea tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztály (2021.05.19)

Tudományos és oktatási közlemények	Száma		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk²	77	---	---	---
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	54	1250	1487
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	1	0	0
szakcikk, magyar nyelvű	---	5	6	8
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	0	0	0
összefoglaló közlemény	---	14	143	160
rövid közlemény	---	3	13	17
II. Könyv	0	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	2	---	9	14
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	0	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV.)	---	79	1421	1686
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	79	---	1421	1686
V. További tudományos művek	4	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is	---	3	0	2
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	1	0	0
Oltalmak, szabadalmak	---	0	0	0
VI. Hivatkozott absztraktok⁵	5	---	1	8
Összes hivatkozás¹	---	---	1422	1696
Hirsch index⁶	23	---	---	---
g index⁶	39	---	---	---

Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	21	661
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	11	189
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (1996) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	60	1355
Az utolsó 10 év (2011 - 2021) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	27	307
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	182	10,73%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	16
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0

Megjegyzések:

1. a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli, a WoS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok
2. lektorált, tudományos folyóiratban
3. a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja
4. konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben
5. nem-hivatkozott absztrakt itt nem kerül az összesítésbe
6. a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli összes hivatkozással számolva. A Hirsch és a g index definíciója
7. közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények hivatkozottsága külön értékelendő, és nem számítható be az összesített hivatkozások közé

n.a. = nincs adat

Készült: 2021. május 19. 11:35