

Válasz Dr. Bődör Csaba opponensi véleményére

Tisztelt Bíráló!

Szeretném megköszönni a dolgozatomról készített bírálatát, valamint a pozitív kritikákat és a támogatást.

Válaszok a kérdésekre:

- 1) A Jelölt a sejtvonalakat alkalmazó kísérletektől egészen az in vivo vizsgálatokig tartó spektrum mentén alkalmazott metodikákat eddigi munkája során. Figyelembe véve a sejtvonalak kapcsán felmerülő kritikákat azok reprezentativitásával kapcsolatban, valamint az állatkísérletek egyre szűkülő lehetőségeit, mit gondol hol van/lesz a helye ezeknek a modalitásoknak a mai modern alkalmazott (gyógyszercélpontok, biomarkerek azonosítását célzó) onkológiai kutatásokban, figyelembe véve a 3D bionyomatást, illetve egyéb in silico sejtmodellek térnyerését is?**

Válasz:

A helyes biológiai vizsgálómódszerek kiválasztása egy kérdés megválaszolására a megfelelő statisztikai kiértékelés mellett kulcsfontosságú a kutatásokban. A módszerek, különösen a nagy adathalmazt generáló mérési technikák rohamos terjedése, kombinálva a mesterséges intelligencia alkalmazhatóságával egyre gyakrabban próbálja megkérdőjelezni korábbi kísérletes technikák létjogosultságát a modern kutatásban. Azonban én ebből a szempontból a „konzervatívabb” kutatók közé tartozom, azaz nem hiszek kritika nélkül a még nem teljesen megalapozott új technikákban, és nem vetem el a „hagyományosnak” mondhatókat csak azért, mert már régóta használjuk azokat. Minden technikának/eszköznek megvannak az előnyei és a korlátai is. Azok az *in vitro* lehetőségek, amik háromdimenziós, akár többféle szöveti eredetű sejtekből álló struktúrákat tudnak létrehozni mindenképp valósabb modelleknek tekinthetők a 2D sejtenyészetekhez képest. Ráadásul, ha friss szöveti mintákat használunk a sejtek forrásul, az jobb lehet, mint ha több évtizede alapított, számtalan passzálon átesett, a szövettenyésztő kamra körülményeihez és a tápfolyadékok összetételéhez alkalmazkodott sejtekkel dolgozunk. Igaz ez az állatkísérletekre is, a sejtvonalakból indított xenograftokkal szemben a betegeredetű tumorxenograft-modellek (PDTX) használata előnyös, mivel a tumorsejtek körüli eredeti mátrixot és sejtes elemeket is modellezni tudjuk több generáción keresztül az állatokban. Ezeket a technikákat mi is alkalmazzuk már a laboratóriumunkban.

Az *in silico* modellezés sem teljesen újdonság a munkánk során, több vegyész kollégával dolgozunk együtt hatóanyagkeresésben, amelyeket nagy könyvtárból, szoftverek segítségével szűrnek, és a legígéretesebbek kerülnek be a biológiai vizsgálati rendszerekbe. Sőt, már biológiai rendszereket *in silico* prediktáló alkalmazások is használatban vannak, ezek nagy népszerűségnek örvendenek, jó a tőkevonzó képességük, de mindenképp indokolt az eredmények validálása (a fejlesztési fázisban mindenképp) más, hagyományosnak mondható vizsgálómódszerekkel. Igaz ez a nagyszámú esetet tartalmazó *in silico* „tumorbankok” esetében is: az ezekben tett szűrések eredményeit mindig vissza kell igazolni a saját tesztrendszerünkben hagyományos módszerekkel. Ezért meg tudom nyugtatni a fiatal kutatókat, hogy a pályájuk során biztos, hogy sokáig fogják tudni használni ezeket a technikákat, ugyanakkor biztatom Őket, hogy legyenek nyitottak az újak megismerésére, elfogadására, sőt, ha lehetőségük van rá, vegyenek részt a fejlesztésükben.

- 2) **A tumor mikrokörnyezet szerepe a daganatok progressziójában, sőt bizonyos terápiákra adott válaszában mára egyértelműnek tűnik, mégsem látjuk ezen megközelítések térnyerését a mindennapi terápiás gyakorlatban. Mit gondol mi a tumor mikrokörnyezetet célzó, moduláló terápiás megközelítések elterjedésének gátja, várható ennek kapcsán áttörés a közeljövőben?**

Válasz:

Ha tágabb értelemben vesszük a daganatok környezetét, akkor számos terápia van már a klinikai gyakorlatban napjainkban is. Ezek közül a legismertebbek az úgynevezett immunterápiák, de a tumorok mikrokörnyezetéhez sorolható a daganatos érhálózat is, aminek célzása már két évtizede bekerült a klinikai gyakorlatba (bevacizumab, 2004). Számtalan olyan hatóanyag van, amelyek az intratumorális ereket, vagy az érhálózat kialakulását befolyásolják. Ezek között vannak tirozinkináz-gátlók (sorafenib, sunitinib, pazopanib, everolimus), vagy antitestek. Mindezekon felül több hatóanyag van klinikai fázisvizsgálatokban, amelyek a tumort infiltráló fibroblasztokat, vagy a makrofágokat célozzák, de a hipoxia, a gyulladás, sőt még a tumorokból eredő mikrovezikulák is célpontok. Ezeken felül vannak kísérletek a daganatok mátrixemésztő képességének gátlására, a kollagénszintézis, a fibronektin és integrinek funkciói, Rho-kinázok gátlására, például Rac-inhibitorokkal folynak vizsgálatok, amelyek a sejtek mozgását gátolnák (1-6). Azonban tény, hogy az utóbbiakból még nincs a klinikai gyakorlatba bevezetett hatóanyag, aminek az egyik fő gátja az lehet, hogy ezek nem tumorspecifikus hatóanyagok még, ami miatt a mellékhatás-spektrumuk szélesebb, valamint a mátrix megbontása gyakran az ott kötött, a tumorok növekedését serkentő citokinek felszabadulásával jár. Ez pedig negatívan befolyásolhatja a terápia kimenetelét. De a próbálkozások széles spektrumot ölelnek fel, biztos vagyok benne, hogy hamarosan hatékony terápiák is születnek az erőfeszítésekből.

1. Roma-Rodrigues C, Mendes R, Baptista PV, Fernandes AR. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy Int J Mol Sci. 2019 Feb; 20(4): 840.
2. Albadari N, Deng S, Li W. The transcriptional factors HIF-1 and HIF-2 and their novel inhibitors in cancer therapy. Expert Opin Drug Discov. 2019;14:667–82.
3. Montalvo-Ortiz BL, Castillo-Pichardo L, Hernández E, Humphries-Bickley T, De la Mota-Peynado A, Cubano LA, et al. Characterization of EHOp-016, novel small molecule inhibitor of Rac GTPase. J Biol Chem. 2012;287:13228–38.
4. Yu M, Gong D, Lim M, Arutyunyan A, Groffen J, Heisterkamp N. Lack of bcr and abr promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. PLoS One. 2012;7:e49756.
5. Cardama GA, Comin MJ, Hornos L, Gonzalez N, Defelipe L, Turjanski AG, et al. Preclinical development of novel Rac1-GEF signaling inhibitors using a rational design approach in highly aggressive breast cancer cell lines. Anticancer Agents Med Chem. 2014;14:840–51.
6. Huang J, Zhang L, Wan D, Zhou L, Zheng S, Lin S, Qiao Y. Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. Signal Transduct Target Ther. 2021 Apr 23;6(1):153.

- 3) **A hipoxiához kapcsolódó vizsgálatoknál a Jelölt a normoxiára 21%-os O₂ érték mellett hivatkozik. Mit tekinthető normoxiának/hipoxiának in vivo körülmények között a sejtekben/szövetekben?**

Válasz:

A „hipoxia” kifejezés értelmezése nem mindig helytálló a biológiai vizsgálatokban. Igaz, ha csökkentjük a 21%-os légköri oxigénszintet, amin általánosságban tartjuk a szövettenyésztési sejtjeinket, akkor a

hipoxia irányába haladunk, de egy egészséges szervezetben sehol nincs 21%-os oxigénszint a sejtekben vagy a környezetükben. Sőt, vannak olyan sejtek, amik normálisan is 5%-os oxigénszint alatt léteznek és működnek (7, és hivatkozott táblázat). Emiatt az 5% O₂-szint feletti vizsgálati rendszereket én nem tartom a hipoxiás környezet valós modelljeinek. Sőt, talán még az is kijelenthető, hogy a légköri oxigénszinten mért jelenségekből nem biztos, hogy valós következtetéseket lehet levonni a szervezeten belül zajló folyamatokról.

7. Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. J Cell Mol Med. 2011 Jun;15(6):1239-53.

Az oxigénkoncentráció különböző szövetekben

Szövet	O₂ (%)	mmHg	Faj	Referencia (a citált cikkben)
Légköri oxigén	21.1	160	Human	[17]
Trahea	19.7	150	Human	[17]
Artériás vér	13.2	100	Human	[17]
Vénás vér	5.3	40	Human	[17]
Agy	4.4 ± 0.3	33.8 ± 2.6	Human	[4, 102]
Normál Tüdő	5.6	42.8	Human	[93]
Tüdőtumor	0.1–6.1	0.7–46	Human	[93]
Bőr (Epidermisz)	1.1 ± 0.42	8 ± 3.2	Human	[147]
Bőr (Dermalis Papilla)	3.15 ± 0.8 2	4 ± 6.4	Human	[147]
Máj	7.5 ± 0.7	40.6 ± 5.4	Human	[13, 94]
Vese	6.8 ± 0.8	52 ± 6	Human	[108]
Placenta	7.4 ± 0.4	56.2 ± 3.2	Human	[76]
Köldökzsínór artéria	1.3–1.9	10–15	Human	[47]
Csontvelő	7.22 ± 0.1	54.9 ± 0.98	Human	[60]
Pezefészek	11.6	88	Human	[43]
Lép	10 ± 2.4	80 ± 18	Rats	[65]
Nyirokcsomó	0.5–4.5	3.8–34.2	Mice	[16]
Vázizom	3.3 ± 0.58	25 ± 4.4	Human	[8]
Zsír szövet	4.7–8.9	36–68	Human	[40]

Forrás: Gan ES, Ooi EE. Oxygen: viral friend or foe? Virol J. 2020 Jul 27;17(1):115.

4) A Jelölt eredményei alapján az EPO kezelés sugárterápiára adott válaszbán is pozitív befolyásoló faktornak bizonyult. Mi lehet az emögött rejlő mechanizmus?

Válasz:

A sugárkezelés hatékonysága is nagyban függ az oxigénszinttől a daganatsejtekben, ami miatt nagy erőfeszítések történnek arra, hogy javítsák a tumorszövet oxigenizáltságát a terápia alatt (8-12). Többféle szöveti eredetű tumorxenograft-modellben is leírtuk, hogy az exogén rHuEPO-kezelés fokozta az intratumorális erek endotélsejtjeinek proliferációját és nagyobb átmérőjű ereket eredményezett a tumorokban. Ez azzal párosult, hogy nőtt a tumorszövetbe bejutó kemoterápiás szerek kimutatható

mennyisége. Ebből arra következtetünk (amit ugyan nem mértünk ki), hogy az oxigén mennyisége is nagyobb a tumorsejtekben az EPO-kezelt daganatokban, ami segíti a sugárterápia hatékonyságát is, nem csak a kemoterápiáét.

8. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(6):437–447.
9. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473(7347):298–307.
10. Horsman MR, Mortensen LS, Petersen JB, Busk M, Overgaard J. Imaging hypoxia to improve radiotherapy outcome. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(12):674–687.
11. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(6):393–410.
12. Li J, Shang W, Li Y, Fu S, Tian J, Lu L. Advanced nanomaterials targeting hypoxia to enhance radiotherapy. *Int J Nanomedicine*. 2018; 13: 5925–5936.

5) A Jelölt eredményei alapján a magasabb EPOR szint jobb túléléssel társult NSCLC betegek esetében. Ismert volt az NSCLC betegek molekuláris profilja, a legfőbb driver eltérések tekintetében? Volt olyan betegek, akinél célzott terápiát alkalmaztak? Elképzelhető korrelációt ezen paraméterek függvényében?

Válasz:

Ezt a kérdést a 6-os kérdéssel együtt válaszolom meg.

6) Hasonló kérdés merül fel az endoteliális prekurzorsejtek prognosztikus szerepével kapcsolatban NSCLC-ben, ismert volt-e a betegek fő driver mutációs státusza (EGFR, ALK1, ROS1, BRAF, KRAS eltérések), és elképzelhető-e összefüggés ennek mentén?

A betegminták gyűjtése az endoteliális prekurzorsejtes (EPC) kísérletek esetében 2006 előtt történt, amikor még a klinikai gyakorlatban nem volt benne a tüdőrákos esetek molekuláris biológiai karakterizálása. Ekkor még nem merült fel ilyen összefüggés keresése bennünk. Az EPOR-expressziós vizsgálatok mintái 2009-2010 között keletkezett kefebiopsziák voltak. Ekkor már néhány esetben nézték a klinikai gyakorlatban is az EGFR- és a KRAS-mutációk jelenlétét, de nem minden esetben végezték azt el, az igazi felfutása e genetikai eltérések meghatározásának 2012-re tehető. Így ebben a betegpopulációban sem volt annyi adatunk, amivel érdemes lehetett volna megnézni az esetleges korrelációkat. Az azóta eltelt idő irodalmát vizsgálva sem találtam olyan kutatási eredményt, ahol a ma használatos genetikai eltérések és az EPOR megjelenése közti összefüggéseket vizsgálnák. Érdekességgéppen, ami az első kérdésre is visszautal, egy 2022-es cikkben nagy tumoradatbázisokban (TCGA, GTEx, CCLE) történt *in silico* vizsgálatban tüdő-adenokarcinómában hasonló eredményt kaptak az alacsony EPOR-pozitivitás és a rosszabb kimenetel között, mint amit mi is leírtunk (13). Ebben az elemzésben 33, különböző szöveti eredetű tumor és számos sejtvonal adatait elemezték, összefüggéseket keresve a klinikai kimenettel (OS, PFS stb.), a tumor-mikrokörnyezettel, beleértve az immunsejtek megjelenését a daganatokban, kemokinek expressziójával, mikroszatelita-instabilitással, metilációval, mismatch repair génekkel. Az elemzés azt mutatta, hogy nagyon eltérő az EPOR

megjelenése az egyes daganattípusokban, tüdő-adenokarcinómában például alacsonyabb, mint más daganatok esetében összehasonlítva az egészséges szövetekkel, de itt a magasabb expresszió jobb túléléssel társult. Ez volt a helyzet például mezoteliómák esetében is, de kolon-adenokarcinómákban pont a magas EPOR-expresszió korrelált a rosszabb túléléssel. Viszont ebben a vizsgálatban sem találtam adatokat a kérdésben felvetett gének és az EPOR megjelenése közti lehetséges kapcsolatokra. Amiknek a vizsgálata ma már rutinszerűen elvégezhető lenne, köszönhetően a rohamosan fejlődő genetikai vizsgálatoknak, amik rengeteg új információt adnak az egyes tumorok akár személyre lebontott jellegzetességeiről.

13. Zhang Y, Wang S, Han S, Feng Y. Pan-Cancer Analysis Based on EPOR Expression With Potential Value in Prognosis and Tumor Immunity in 33 Tumors. *Front Oncol.* 2022; 12: 844794.

Végezetül még egyszer köszönöm a bírálatot, és kérem, fogadja el a válaszaim!

2023. 06. 25.



Dr. Tóvári József