

A mikro környezet és a tumor kölcsönhatásainak szerepe a melanóma progressziójában, különös tekintettel a tumort infiltráló immunsejtek jelentőségére

Doktori értekezés

**Dr. Mohos Anita**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Ladányi Andrea Ph.D, laboratórium vezető

Hivatalos bírálók: Dr. Holló Péter Ph.D, egyetemi docens  
Dr. Andrikovics Hajnalka Ph.D, laboratórium vezető

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina Ph.D, egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Simon Károly Ph.D, osztályvezető főorvos  
Dr. Hidvégi Bernadett Ph.D, egyetemi adjunktus

Budapest  
2015

## Tartalomjegyzék

<b>1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>5</b>
<b>2. BEVEZETÉS .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. A bőr malignus melanómája.....</b>	<b>7</b>
2.1.1. Prevalencia .....	7
2.1.2. A kialakulásra hajlamosító tényezők.....	7
2.1.3. A várható biológiai viselkedést befolyásoló legjelentősebb tényező: TNM stádiumbeosztás .....	8
2.1.4. A bőrmelanómák klinikai és szövettani típusai.....	10
2.1.5. Őrszem nyirokcsomók.....	11
<b>2.2. Gazdaszervezeti tényezők szerepe a melanóma progressziójában.....</b>	<b>11</b>
2.2.1. A tumorstróma és az angiogenezis szerepe a progresszióban.....	12
2.2.2. Immunológiai tényezők jelentősége, az immunválasz kialakulása.....	14
2.2.2.1. Tumorantigének.....	16
2.2.2.2. A tumorelles immunválasz elkerülése .....	17
2.2.2.3. A melanómákat infiltráló immunsejtek .....	18
2.2.2.3.1. Dendritikus sejtek.....	19
2.2.2.3.2. Limfociták .....	20
2.2.2.3.3. T-limfociták.....	21
2.2.2.3.4. Aktivált T-limfociták.....	22
2.2.2.3.5. Regulátor T-sejtek .....	22
2.2.2.3.6. B-limfociták .....	24
2.2.2.3.7. NK- és NKT-sejtek.....	24
2.2.2.3.8. Makrofágok .....	25
2.2.2.3.9. Granulociták és hízósejtek .....	26
2.2.2.4. Az őrszem nyirokcsomók immunológiai sajátosságai és ezek prognosztikai alkalmazhatósága.....	27
2.2.3. Hormonális tényezők.....	28

<b>3. CÉLKITŰZÉSEK.....</b>	<b>32</b>
<b>4. ANYAG ÉS MÓDSZER .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1. Beteganyag-jellemzők.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2. Az infiltráló sejtek immunhisztokémiai kimutatása melanómamintákban .</b>	<b>36</b>
<b>4.3. Az immunreakciók kiértékelése .....</b>	<b>37</b>
<b>4.4. Statisztikai elemzés .....</b>	<b>38</b>
<b>4.5. Kísérleti modell: a nemi különbség az áttétképzésben.....</b>	<b>39</b>
4.5.1. Sejtvonalak és tenyésztési körülményeik .....	39
4.5.2. Ki-67 antigént expresszáló emberi melanómasejtek kimutatása egérmájban.. .....	39
4.5.3. Citotoxicitási teszt .....	39
4.5.4. <i>In vivo</i> kísérletek .....	40
4.5.4.1. Állatok .....	40
4.5.4.2. Májkolonizáció .....	40
4.5.4.3. Tüdőkolonizáció .....	41
4.5.4.4. Intrakardiális oltás .....	41
4.5.5. Statisztikai elemzés .....	41
<b>5. EREDMÉNYEK.....</b>	<b>42</b>
<b>5.1. Primer melanómák vizsgálata .....</b>	<b>42</b>
5.1.1. CD1a <sup>+</sup> és DC-LAMP <sup>+</sup> dendritikus sejtek, CD20 <sup>+</sup> B-limfociták és FOXP3 <sup>+</sup> T-sejtek kimutatása.....	42
5.1.2. Összefüggés a dendritikus sejtek, B-limfociták, illetve regulátor T-sejtek denzitása és a tumorvastagság valamint egyéb klinikopatológiai paraméterek között	45
5.1.3. Összefüggés a dendritikus sejtek, B-limfociták, illetve regulátor T-sejtek sűrűsége és a metasztázisok kialakulása között.....	50

5.1.4.	A túlélés elemzése a dendritikus sejtek, B-limfociták, illetve regulátor T-sejtek denzitása függvényében.....	52
5.1.5.	A túléléssel való összefüggés vizsgálata az aktivált T-limfociták és a dendritikus sejtek, illetve B-sejtek mennyiségének együttes elemzésével .....	54
<b>5.2.</b>	<b>Őrszem nyirokcsomók vizsgálata.....</b>	<b>56</b>
5.2.1.	A vizsgált immunsejttípusok megjelenése a szentinel nyirokcsomókban ...	56
5.2.2.	A szentinel nyirokcsomók immunsejtdenzitásának elemzése a klinikopatológiai faktorok függvényében .....	58
5.2.3.	A szentinel nyirokcsomók immunsejtdenzitásának összefüggése a betegség progressziójával és a túléléssel .....	58
<b>5.3.</b>	<b>Kísérleti modell: a nemi különbség az áttétképzésben.....</b>	<b>60</b>
5.3.1.	Nemi különbségek a melanómasejtek májkolonizációjában.....	60
5.3.2.	A melanómasejt-kolonizáció nemi különbségének szervszelektivitása.....	61
5.3.3.	A Kupffer- és NK-sejtek szerepe a májkolonizációban .....	62
<b>6.</b>	<b>MEGBESZÉLÉS.....</b>	<b>65</b>
6.1.	A primer tumort infiltráló dendritikus sejtek jelentősége.....	65
6.2.	A primer tumort infiltráló B-limfociták jelentősége .....	66
6.3.	A primer tumort infiltráló FOXP3 <sup>+</sup> regulátor T-sejtek jelentősége .....	69
6.4.	A különböző immunsejttípusok jelentősége a szentinel nyirokcsomókban .	70
6.5.	Kísérleti modell: a nemi különbség az áttétképzésben.....	71
<b>7.</b>	<b>KÖVETKEZTETÉSEK .....</b>	<b>76</b>
<b>8.</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>77</b>
<b>9.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>78</b>

<b>10. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>79</b>
<b>11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....</b>	<b>99</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>100</b>

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>2ME<sub>2</sub></b>	2-metoxi-ösztadiol
<b>ADCC</b>	ellenanyagfüggő citotoxikus reakció (antibody-dependent cellular cytotoxicity)
<b>AEC</b>	3-amino-9-etilkarbazol
<b>AJCC</b>	American Joint Committee on Cancer
<b>ALM</b>	acrolentiginosus melanoma
<b>APC</b>	antigénprezentáló sejt
<b>bFGF</b>	bázikus fibroblaszt növekedési faktor
<b>CD</b>	differentiációs klaszter
<b>CTGF</b>	kötőszöveti növekedési faktor (connective tissue growth factor)
<b>DC</b>	dendritikus sejt
<b>DC-LAMP</b>	dendritikus sejt – lizoszóma-asszociált fehérje
<b>ECM</b>	extracelluláris mátrix
<b>FOXP3</b>	forkhead box P3 fehérje
<b>GM-CSF</b>	granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor
<b>HE</b>	hematoxin-eozin
<b>HEV</b>	magas endotél bélésű venula (high endothelial venule)
<b>HGF</b>	hepatocita növekedési faktor (hepatocyte growth factor)
<b>IDO</b>	indolamin 2,3-dioxigenáz
<b>IFN</b>	interferon
<b>IL</b>	interleukin
<b>LMM</b>	lentigo maligna melanoma
<b>MHC</b>	fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex)
<b>MMP</b>	mátrix metalloproteináz
<b>NK</b>	természetes ölő (natural killer)
<b>NM</b>	noduláris melanóma
<b>NSG</b>	NOD SCID gamma
<b>NSLN</b>	nem őrszem nyirokcsomó (non-sentinel lymph node)

<b>PCR</b>	polimeráz lánreakció (polymerase chain reaction)
<b>pDC</b>	plazmacitoid dendritikus sejt
<b>PDGF</b>	trombocita-eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor)
<b>PG</b>	prostaglandin
<b>RGP</b>	sugárirányú terjedés (radial growth phase)
<b>SCID</b>	severe combined immunodeficiency
<b>SNL</b>	őrszem nyirokcsomó (sentinel lymph node)
<b>SSM</b>	felszínesen terjedő melanóma (superficial spreading melanoma)
<b>TAM</b>	tumorasszociált makrofág
<b>TAN</b>	tumorasszociált neutrofil
<b>TCR</b>	T-sejt-receptor
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transzformáló növekedési faktor- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ )
<b>Th</b>	helper T-sejt
<b>TIL</b>	tumort infiltráló limfociták
<b>Treg</b>	regulátor T-sejt
<b>UV</b>	ultraibolya
<b>VEGF</b>	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
<b>VGP</b>	vertikális irányú terjedés (vertical growth phase)

## **2. BEVEZETÉS**

### **2.1. A bőr malignus melanómája**

#### **2.1.1. Prevalencia**

A melanóma a velőcső-eredetű melanociták rosszindulatú burjánzása. Túlnyomórészt a bőrből kiinduló daganat, azonban az esetek 4-5%-ában nyálkahártyákon, emésztőcsatornában, meningeálisan, illetve okulárisan is előfordulhat. Klinikai megjelenése változatos, kórlefolyása kedvezőtlen és gyakran kiszámíthatatlan, áttétképző tulajdonsága kifejezett. Gyakorisága világszerte és Európában is (1) jelentősen emelkedett, a Nemzeti Rákregiszter adatai szerint Magyarországon is növekvő tendenciát mutat (2001 és 2010 között az évente jelentett új betegek száma 1248-ról 2185-re emelkedett).

#### **2.1.2. A kialakulásra hajlamosító tényezők**

Melanómák kialakulására hajlamosító tényezők között a környezeti hatások közül a legfontosabbnak az UVA- és UVB-sugárzást tekintik, ami a sejtek genetikai károsodását okozza. Az UVB-sugárzás jellegzetes mutációkat okoz, megszakítja a DNS-replikációt és -transzkripciót, az UVA-sugár a kromofórokban adszorbeálódik, reaktív intermedierek által okoz DNS-töréseket. Az UV-sugárzás károsítja a DNS-t, pirimidindimereket képez, ami további mutációkat indukálhat, ha nincs megfelelő hibajavítás: károsítja az apoptózis egyik fő regulátora, a p53 gén funkcióját is. Az UV-sugárzás okozta genetikai károsodások kijavításában szereplő repair enzim hiánya xeroderma pigmentosumban gyakran szövődik melanóma kialakulásával. Az intermittáló erős napfénynek, a napágyak gyakori használatának, a főleg gyermekkorban elszenvedett többszöri, súlyos hólyagos leégésnek, a jellegzetes fenotípusnak, mint világos bőr, kék szem, vöröses haj, az egyénen található naevusok számának, diszpláziás, vagy atípusos naevusok, óriás kongenitális naevusok jelenlétének hajlamosító szerepe van a melanómák kialakulásában. Genetikai hajlam az esetek 10%-ában mutatható ki. A genetikai háttérre utal a CDKN2A és a CDKN4 gén ivarsejtes mutációja, a melanokortin-1-receptor gén bizonyos polimorfizmusai és néhány repair gén mutációja (2). Az immunrendszer működésének zavarára utal, hogy



immundeficiens egyénekben és a szervtranszplantáción átesett immunszupprimált betegekben a melanóma előfordulási gyakorisága nagyobb az átlagpopulációhoz képest: szervtranszplantáltakban a nagy esetszámú vizsgálatokat összegezve 2,4-szeres (3).

A melanómák prognózisának megítélésében általánosságban a fiatalabb életkor (preklímaktérium), a nemi jelleg tekintetében a női nem kedvezőbb. A tumor lokalizációját tekintve pedig a disztális, főként az alsó végtagra lokalizálódó melanómák elhelyezkedése jobb prognózist jelent az axiális elhelyezkedésű melanómákhoz képest (4, 5).

### **2.1.3. A várható biológiai viselkedést befolyásoló legjelentősebb tényező: TNM stádiumbeosztás**

A tumorvastagság a statisztikai elemzések eredményei alapján a legerősebb független prognosztikai faktor. Az AJCC (American Joint Committee on Cancer) legújabb, 2009-es ajánlatára a stádiumbeosztás megegyezik a 2002-ben a UICC, EORTC melanóma csoportja és a WHO által elfogadott rendszerrel, kiegészítve néhány elemmel. A primer melanómánál a maximális tumorvastagság (Breslow), kifekélyesedés jelenléte vagy hiánya mellett a pT1 stádiumban a mitózisok számát (küszöbérték:  $1/\text{mm}^2$ ) is meghatározzák. A mikro- és makrometasztázisok jelenléte fontos az őrszem nyirokcsomókban, az N kategóriánál a mikroszkopikus áttét hangsúlyosabbá vált; régebben a 0,2 mm határt adták meg, ma már azonban az immunhisztokémiával kimutatott izolált tumorsejt is N1a stádiumot jelent. Az M stádium a távoli metasztázisok megjelenéséről ad információt (**1. táblázat**) (6). A metasztázisok 85%-a korai áttét, a diagnózist követő 3 évben alakul ki. Azonban ez a daganat késői áttétképző tulajdonsággal is rendelkezik, akár 10 év után is megjelenhetnek metasztázisok.

**1. táblázat. AJCC stádiumbeosztás, 2009 (6)**

Tumor (T)	Vastagság (mm)	Kifekélyesedés/mitózis
Tis	in situ	-
T1	≤1	a: ulceráció nélkül és mitózis <1/mm <sup>2</sup> b: ulceráció vagy mitózis ≥1/mm <sup>2</sup>
T2	1,01-2,00	a: ulceráció nélkül b: ulcerációval
T3	2,01-4,00	a: ulceráció nélkül b: ulcerációval
T4	≥4	a: ulceráció nélkül b: ulcerációval
Nyirokcsomóáttét (N)	Nyirokcsomóáttétek száma	
N0	-	
N1	1	a: mikrometasztázis b: makrometasztázis
N2	2-3	a: mikrometasztázis b: makrometasztázis c: in tranzit/szatellita áttét, nyirokcsomó-érintettség nélkül
N3	≥4 vagy in tranzit/szatellita áttét nyirokcsomó-érintettséggel	
Távoli áttét (M)	elhelyezkedés	szérum LDH
M0	nincs távoli áttét	normális tartományban
M1a	távoli bőr-, szubkután vagy nyirokcsomóáttét	normális tartományban
M1b	tüdőáttétek	normális tartományban
M1c	egyéb távoli, ill. szervi áttét bármely szervi áttét	normális tartományban emelkedett

Klinikai stádiumbeosztás				Patológiai stádiumbeosztás			
	T	N	M		T	N	M
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0
	T1c	N0	M0		T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
III	Bármelyik T	N>N0	M0	IIIA	T1-4a	N1a	M0
					T1-4a	N2a	M0
				IIIB	T1-4b	N1a	M0
					T1-4b	N2a	M0
					T1-4a	N1b	M0
					T1-4a	N2b	M0
					T1-4a	N2c	M0
					T1-4a	N2c	M0
				IIIC	T1-4b	N1b	M0
					T1-4b	N2b	M0
					T1-4b	N2c	M0
					Bármelyik T	N3	M0
IV	Bármelyik T	Bármelyik N	M1	IV	Bármelyik T	Bármelyik N	M1

#### **2.1.4. A bőrmelanómák klinikai és szövettani típusai (4, 7, 8)**

##### **Felszínesen terjedő melanóma (superficial spreading melanoma, SSM)**

A leggyakrabban előforduló melanómatípus, az europid nagyrassznál az esetek 60-70%-át adja. Viszonylag lassú a progresszió, általában 1-2 év. Kezdetben sugárirányú felszínes terjedése jellemző: RGP (radial growth phase), ekkor még nincs áttétképző képességük, majd ezt a fázist a vertikális növekedési szak követi: VGP (vertical growth phase), ekkor már rendelkeznek metasztatikus potenciállal. Leggyakrabban 40-50 éves kor között, férfiakon elsősorban a hát bőrén, nőknél az alsó végtagon, nem ritkán festéksejtes anyajegy talaján jelennek meg. Gyakori bennük a regressziós jelenség.

##### **Noduláris melanóma (NM)**

Európában a második leggyakoribb altípus (15-20%). Már kezdetben is vertikális növekedési fázist mutat. Általában axiálisan: a törzsön, fejen, nyakon, ép bőrön, előzmények nélkül jelenik meg, gyorsan nő, korán metasztatizál. Szövettanilag, ha 3-nál kevesebb papilla érintett a radiális fázis által, a melanóma nodulárisnak véleményezhető.

##### **Lentigo maligna melanoma (LMM)**

Az esetek 4-15%-át adja az europid nagyrasszban. Idős emberek (70-80 év) napfénykárosodott bőrén lassan növekvő szabálytalan barnásfekete foltként jelenik meg. Kezdetben a bazális membránt nem töri át, *in situ* melanómaként viselkedik (lentigo maligna). Kifejezett regressziós folyamatok kialakulhatnak benne. Invazív átalakulásra a foltban kialakuló tumor megjelenése utal (lentigo maligna melanoma).

##### **Acrolentiginosus melanoma (ALM)**

Az europid nagyrasszban 5-8%-a, ázsiaiakban 30-46%-a, feketebőrűekben 60-70%-a a melanómáknak. Acralis területeken alakul ki: tenyéren, talpon, szub- és periunguálisan. Gyakran későn ismerik fel.

## **Desmoplasticus melanoma**

Kifejezett kötőszöveti komponenssel rendelkezik, általában amelanotikus tumor. Inkább idősebbekben, férfiakon, axiálisan: törzsön és fejen kialakuló, tömött plakkszerű daganat. Gyakori a lokális recidívára való hajlam.

### **2.1.5. Órszem nyirokcsomók**

Az órszem nyirokcsomó diagnosztikus szempontból különleges jelentőséggel bír. A primer tumor leszakadt daganatsejtjei nem véletlenszerűen, hanem meghatározott úton, szabályszerűen érik el a nyirokáramlással a sorban az első helyen álló drenáló nyirokcsomót. Ezt a nyirokrégió kapujában álló, a regionális áttétképződésnek leginkább kitett nyirokcsomót hívjuk órszem (szentinel) nyirokcsomónak. Bebizonyosodott, hogy ha az órszem nyirokcsomó áttétmentes, akkor az adott nyirokrégió többi nyirokcsomója – mintegy 97%-os valószínűséggel – szintén áttétmentes. A szentinel nyirokcsomó azonosítása, eltávolítása és patológiai feldolgozása része a rutin sebészeti ellátásnak a melanómás és emlőrákos betegek esetében. A tumorszövetbe vagy a tumor köré gamma-sugárzó izotópot vagy festéket intradermálisan bejuttatva, a jelzőanyag ugyanazt az utat járja be, mint a leszakadt daganatsejtek; a nyirokúton végighaladva eléri az órszem nyirokcsomót, amelyben elakad, felhalmozódik. A subcapsularis sinusokban elhelyezkedő makrofágok fagocitálják. Az áramlást gamma-kamerával követik, ezáltal a nyirokcsomó nukleáris mérőműszerrel detektálhatóvá, leképezhetővé válik. A peritumorális radiokolloid-befecskendezéssel feltérképezhetőek a drenáló nyirokrégiók, amelyek száma (így az órszem nyirokcsomók száma is) törzsi melanómák esetén gyakran 1-nél több. A szentinel nyirokcsomók áttétmentessége esetén 1,0-4,0 mm vastagságú melanómákban a regionális disszekció mellőzhető (9). A nodális stádiummegállapítás pontosabbá tehető, a nyirokcsomó alapos, immunhisztokémiával kiegészített feldolgozása során a mikrometasztázisok és az izolált tumorsejtek is kimutathatók.

### **2.2. Gazdaszervezeti tényezők szerepe a melanóma progressziójában**

A szolid tumorokat számos sejttípus alkotja, a daganatsejteken kívül stromális elemeket, endotél- és immunsejteket is tartalmaznak. Manapság nyert megfelelő figyelmet, hogy

ezeknek a – tumorsejteknél gyakran nagyobb mennyiségben jelenlevő – nem malignus elemeknek jelentős szerepük van a tumorprogresszióban és a terápiás következményekben. Számos bizonyítékát találták annak, hogy a szervezet és a daganat kapcsolata kétirányú.

### **2.2.1. A tumorstróma és az angiogenezis szerepe a progresszióban**

Számos kölcsönhatás létezik a daganatsejtek és az őket körülvevő biológiai rendszerek, mint az immunrendszer, az erezettség, a környező stróma és az extracelluláris mátrix (ECM) között. A tumorszövetben található fibroblasztok és más mezenhimális eredetű sejtek heterogén populációt alkotnak, amelyek a környező normális szövetből és a csontvelőből származó sejtekből erednek. A melanómasejtek és a stróma közötti kommunikáció direkt heterotipikus sejt-sejt kapcsolaton, adhéziós molekulák által, extracelluláris mátrix proteineken, proteinázokon, proteinázinhibitorokon és lipid termékeken keresztül zajlik. A daganatsejtek onkogén változását a citokinprofilban bekövetkező egyensúlyváltozás követi, melynek hatására a tumorstróma is változik, ami pedig összefüggést mutat a betegség prognózisával. A stromális változások, a tumorok mikro környezetének kialakulása közvetlenül hozzájárulnak a karcinogenezishez, segítik a daganatok fejlődését a túlélési és antiapoptotikus útvonalak stimulálásával, illetve indirekt módon az angiogenezis, a migráció és az invázió támogatásával, megteremtve a megfelelő környezetet a tumornövekedéshez és a metasztatizáláshoz. A tumorsejtek különböző faktorokat termelnek (PDGF, TGF- $\beta$ 1, bFGF, CTGF, VEGF), amelyek segítik a reaktív strómaképződést. A stromális sejtekről viszont tudott, hogy metalloproteinázokat, ezek inhibitorait, növekedési faktorokat, hepatocita növekedési faktort (HGF/scatter faktor) és más faktorokat termelnek, amelyek hatással vannak a tumorsejtek szaporodására és a mobilitására (10, 11).

A tumorasszociált stromális sejtek genetikailag stabilabbak a tumorsejteknél, ezért kevésbé hajlamosak a gyógyszer-rezisztencia kifejllesztésére. Az utóbbi években az ECM szerepe a daganatnövekedés szabályozásában az egyik fő területe a daganatbiológiai kutatásoknak.

Az 1-2 mm<sup>3</sup>-nél nagyobb tumorok csak akkor növekedhetnek tovább, ha a környezetükben lévő kapilláris hálózatot is képesek növekedésre serkenteni. Az angiogenezis egy tipikus folyamata a gazdaszervezetnek számos tumor esetében. Az érződés döntő fontosságú a daganatok progressziójában, minthogy az érhálózaton keresztül jut el a táplálék és az oxigén a neoplasztikus sejtekhez, ennek segítségével távolítja el a citotoxikus anyagokat, továbbá az érhálózat segítségével kommunikál a primer tumor a metasztázisaival is.

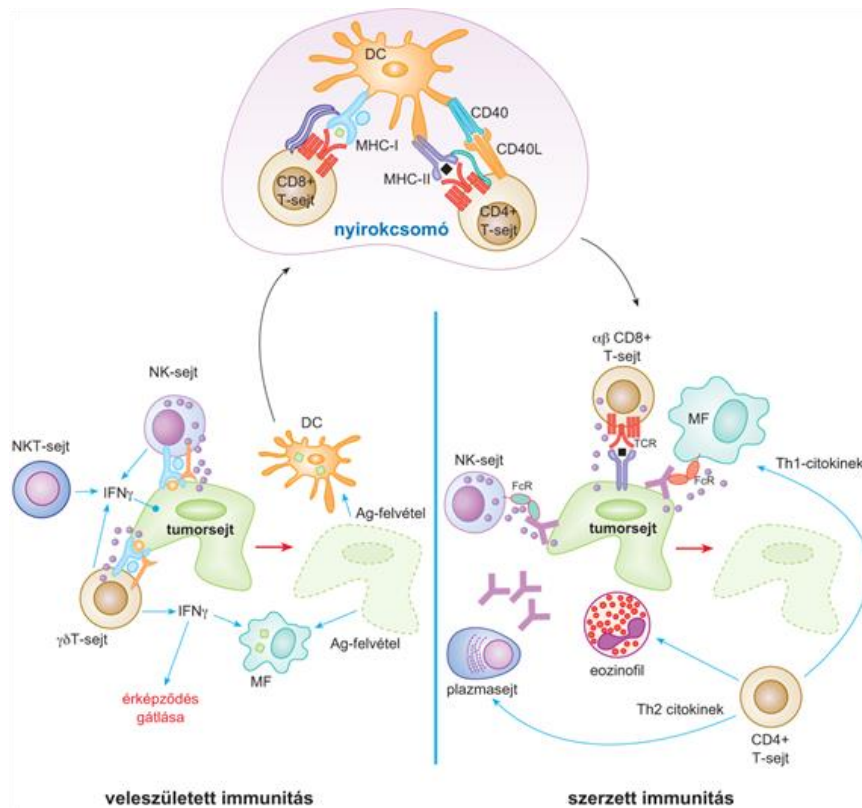
A daganattal infiltrált területeken a beereződés számos mechanizmusát megtalálhatjuk (12). A tumor-indukált neoangiogenezis során a daganat normális szöveti kapillárisok stimulálása révén új kapillárisnövedékeket indukál, melyek a daganatszövetbe növekedve létrehozzák a daganatot ellátó ereket. A posztnatális vaszkulogenezis folyamán a daganatok mobilizálják a csontvelői endotél-progenitorsejteket, melyek a daganatban lévő mikrokapillárisokba épülnek be. Az érinkorporáció során a daganat bekebelezi a meglévő kiérett kapillárisokat. Az intusszusceptív mikrovaszkuláris növekedés esetében a hálózat kialakulása új kötőszöveti lemezek közbeiktatása révén jön létre az erek lumenében. A glomeruloid angiogenezis során érgomolyagok jönnek létre, melyek körül különböző vastagságú bazális membránt és kevés pericitaborítást lehet kimutatni. A vaszkuláris mimikri azt jelenti, hogy a daganatban tumorsejt által határolt csatornák keletkeznek, melyek kapcsolatban állnak a kapillárisokkal, a daganatsejtek endotél karaktert vesznek fel endoteliális gének expressziója által (12).

A daganatsejtek és a környezetük a hipoxia hatására az angiogenezis folyamatát serkentő anyagok kiválasztására képesek. Az érképződést a serkentő és a gátló anyagok egyensúlya szabályozza. Proangiogénikus molekulák (pl. VEGF, IL-8, bFGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, MCP-1/CCL2, Tie2, prosztoglandin E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>) és antiangiogén faktorok (pl. angiosztatin, endosztatin, vazosztatin, trombospondin, interferon- $\alpha/\beta$ ) származhatnak a tumorsejtekből, illetve a környező stromális elemekből is, ezek arányos részvétele változik a daganatok progressziójával. Az angiogén aktiváció a tumorok progressziójának fontos lépése, ennek gátlása a daganatok terápiájának egyik célpontja (11-13). A daganatos sejteket ellátó erek mind szerkezetükben, mind funkciójukat tekintve különböznek az egészséges érhálózattól, faluk gyenge, pericita-, simaizomsejt-

borításuk, bazális membránjuk hiányos, permeabilitásuk fokozott. A daganatok elégtelen nyirokérellátása képtelen a megnövekedett intersticiális folyadékmennyiséget elvezetni, így a szöveti hipoxiát ez is fokozza, ami az angiogenezis további serkentésének irányába hat. A daganatsejtek képesek a hipoxiához és a savas közeghez alkalmazkodni, sőt képesek ebben a környezetben szaporodni, apoptózissal szemben ellenállóbbak (pl. a mutáns p53 expressziója kifejezettebb), genetikusan instabilabbak, angiogenetikus és áttétképző képességük megnő. A hipoxiás sejteknek a citosztatikus és sugárkezeléssel szembeni rezisztenciája nő (14).

### 2.2.2. Immunológiai tényezők jelentősége, az immunválasz kialakulása

Az immunrendszer különbséget tud tenni saját és nem saját struktúrák között; amit nem sajátként ismer fel, immunválaszt vált ki, míg a saját struktúra általában toleranciát okoz. A daganatsejtek kialakulásuk folyamán a szervezet egészséges sejtjeitől eltérő geno- és fenotípussal rendelkezővé válnak, így immunológiai szempontból azoktól megkülönböztethetőek lehetnek.



1. ábra. A daganatsejtek felismerésének és elpusztításának elvi lehetőségei (15)

A velük szemben kialakuló immunreakció, ami lehet velünk született – vagyis természetes – és lehet szerzett, tanult vagy adaptív, tartós védetséget biztosíthat a szervezet számára. A két védekező rendszer sejtes és molekuláris elemei – és a segítségükkel lejátszódó folyamatok – biztosítják szervezetünk védelmét. A patogén természetű anyagok a természetes immunitás sejtes elemeivel (makrofágok, dendritikus sejtek, természetes ölüsejtek, granulociták és hízósejtek) és humorális faktoraival (pl. komplementrendszer, számos citokin) találkoznak először. A nemspecifikus védekezőrendszer egyes elemei is részt vesznek a daganatok elleni védekezésben, részint saját citotoxikus potenciáljuk, részint a specifikus immunválasz sejtjeivel való aktív kölcsönhatás révén (16). A természetes immunitás elemei hatékonyan kapcsolódnak az adaptív immunrendszer elemeivel. Az adaptív immunrendszer sejtjei a csontvelői eredetű, a tímuszban kifejlődő T-limfociták és a csontvelőben kialakuló B-limfociták, melyek az antigéneket felismerő antigénkötő receptorokat hordoznak. Számos tumorasszociált antigént fedeztek fel, amelyek stimulálni tudják az immunrendszer sejtjeit. Az idegen struktúra először a szervezet számos pontján megtalálható antigénprezentáló sejtek (APC) fagocitózisának esik áldozatul. Az APC-k az antigénfragmentumokat MHC-molekuláikhoz kapcsoltnak mutatják be, s ezáltal aktiválják a CD4<sup>+</sup> helper T-sejteket, vagy keresztprezentáció esetén a CD8<sup>+</sup> citotoxikus T-limfocitákat. A CD4<sup>+</sup> limfociták citokinek és egyéb humorális faktorok termelésével képesek aktiválni a B-sejteket és ezzel beindítani a humorális immunválaszt is, és ez a válaszkészség tartósan a memória T-sejtekben is megőrződik (**1. ábra**).

Az, hogy a természetes immunválaszban részt vevő sejtek a celluláris, vagy humorális immunválaszt indítják-e be, nagymértékben függ az antigén természetétől, ill. az antigént feldolgozó sejtől is. A T-helper választ az adott aktivált CD4<sup>+</sup> sejtek által szekretált citokinek határozza meg. A Th1 típusú választ – egyebek mellett – az IL-2, IL-12 és IFN- $\gamma$  szekréciója jellemzi, melyek a T-sejtekre visszahatva autokrin módon segítik az antivirális és antitumorális választ, az IL-2 elősegíti a CD8<sup>+</sup> citotoxikus T-limfociták proliferációját, a celluláris immunválaszt. A Th2 válasz (IL-4-, IL-5-, IL-10-, IL-13-, TGF- $\beta$ -szekréció) az extracelluláris kórokozók elleni immunválasz kialakulását segíti, az ellenanyag-közvetített immunválasz támogatásával, így a humorális



immunválasz felé tolja el a védekezést (17). A Th17 válasz (egyebek mellett IL-17-szekréción) szerepe ellentmondásos az onkogenezis és tumorprogresszió folyamatában (18).

Az MHC fehérjék (Major Histocompatibility Complex) öröklött, kifejezett polimorfíát mutató sejt felszíni antigének. Az MHC I molekulák a szervezet minden magvas sejtjén megjelennek, míg az MHC II membránfehérjék elsősorban az immunrendszer működésében szerepet játszó professzionális antigénbemutató sejtek felszínén jelennek meg, amelyek közé tartoznak a dendritikus sejtek, makrofágok és B-limfociták, amelyek MHC I-et és II-t is expresszálnak. Az immunrendszer sejtjeit jellemzi, hogy sejt felszínükön az antigéneket MHC II típusú molekulák mutatják be, és olyan receptorokat fejtenek ki, melyek a patogénekre jellemző mintázatot képesek felismerni. A CD4<sup>+</sup> helper T-sejtek az MHC II, míg a CD8<sup>+</sup> citotoxikus T-limfociták az MHC I molekulával asszociált peptideket ismerik fel. Leegyszerűsítve, a CD8<sup>+</sup> citotoxikus T-limfociták a T-sejt-receptorokon keresztül felismert fertőzött sejtek és a tumorsejtek elpusztítását végzik, az aktivált CD4<sup>+</sup> T-sejtek különböző, mind a citotoxikus T-limfocitákat, mind egyéb immunsejteket stimuláló citokineket szekretálnak. Az antigén mellett a kostimulációs hatás is nélkülözhetetlen a hatékony immunválasz kialakításában (pl. T-sejt-válasz esetében a B7 (CD80, CD86)-CD28 kölcsönhatás). Ez nagymértékű fajlagosságot és a későbbiekben immunológiai memóriát is biztosíthat.

#### **2.2.2.1. Tumorantigének**

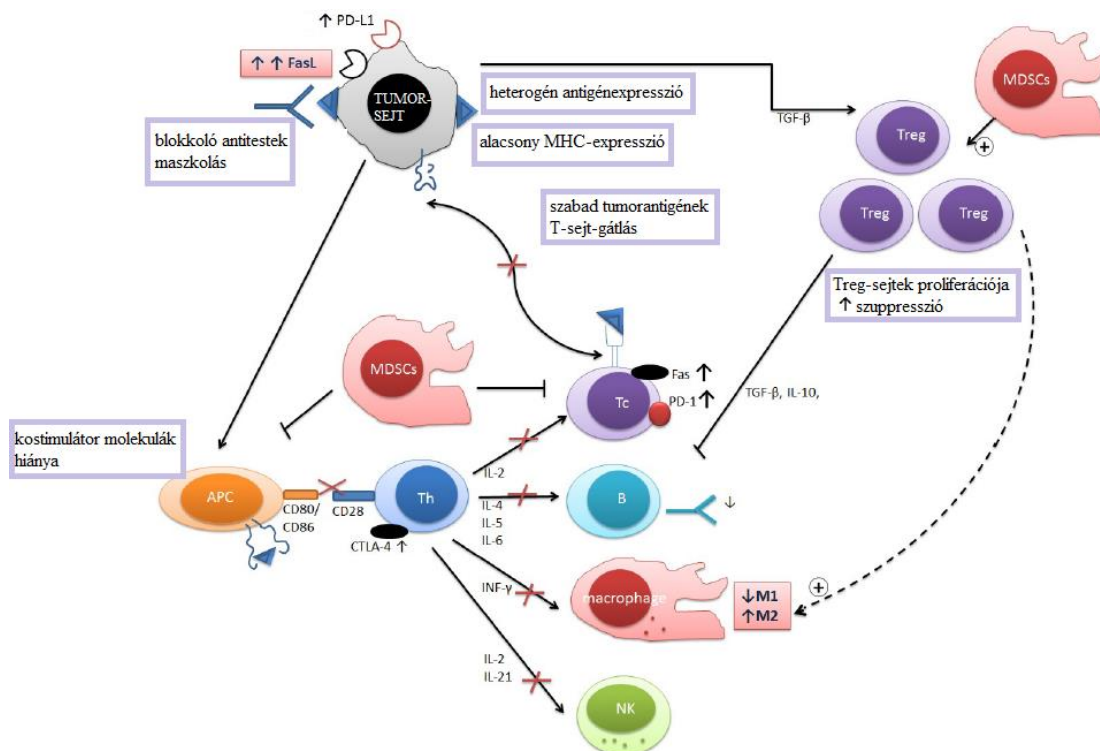
Az ismert antigének töredéke az, amely valóban tumorspecifikus, általában mutáció útján keletkeznek. A T-sejtek által felismert, tumorokban megjelenő antigéneket több csoportba sorolják.

A melanómák esetében a leglényegesebbek a következők: 1. ún. rák-here antigének (cancer-testis, CT), pl. NY-ESO-1, a MAGE és GAGE család tagjai; 2. differenciálódási antigének (amelyek melanocitákban is jelen vannak), pl. Melan-A/MART-1, gp100, tirozináz, TRP-1 és -2; 3. overexpresszált tumorasszociált antigének (normális szövetekben is megjelennek, de tumorokban fokozott expressziót mutatnak), pl.

PRAME, RAGE; 4. mutációval keletkező egyedi tumorspecifikus antigének, leírtak ilyet pl. béta-katenin, kaszpáz 8 és CDK4 esetén (19).

### 2.2.2.2. A tumorelles immunválasz elkerülése

A bőr malignus melanómáját tartják az egyik legimmunogénebb humán daganatnak, gyakran igen kifejezett immunsejtes infiltráció jellemzi, ennek ellenére igen rossz a prognózisa. A daganatsejtek az immunvédekezés előtt különböző utakon kibújhatnak (**2. ábra**). Képesek antigenitásukat változtatni a tumorantigének, MHC I és II és az ún. kostimulátor molekulák expressziójának csökkentésével. Kiszelektálódhatnak azok a daganatsejtek, amelyeket a citotoxikus sejtek nem képesek elpusztítani. A daganatsejtek vagy a tumorok mikrokörnyezetében található gazdaszervezeti sejtek számos olyan lokálisan, vagy általánosan ható citokint, szolubilis mediátort szekretálnak, amelyek immunszuppresszív hatásúak (pl. IL-10, IL-4, TGF- $\beta$ ), a T-sejtek hatékony citotoxicitását csökkentik, a limfociták proliferációját gátolják vagy apoptózist okoznak. A szervezetben aktív immuntolerancia alakulhat ki a tumorsejtekkel szemben (20, 21).



2. ábra. A tumorelles immunválasz elkerülésének lehetséges módjai (22)

### **A krónikus gyulladás hatása a karcinogenezisben**

Az utóbbi 1-2 évtizedben az is világossá vált, hogy az immunrendszer sejtjei nemcsak a tumorok ellen hathatnak, hanem például a daganatokhoz társuló gyulladásos folyamatok kialakulásában és fenntartásában szerepet játszva a daganatok növekedésére serkentő hatással is lehetnek. A gyulladás a különböző szervek, szövetek eredeti állapotának visszaállítását célozná meg, sajnos a daganatok környezetében észlelt gyulladásos folyamatok gyakran a tumor terjedésének kedveznek. A gyulladásos sejtek által termelt kemo- és citokinek a humán és a kísérletes tumorok mikrokörnyezetében kimutathatók. A krónikus gyulladás a daganatkeletkezés egyik régóta ismert kockázati tényezője, de a nem gyulladás talaján kialakult tumorok esetében is elősegítheti a progressziót (23-25). Állatkísérleti modellekben demonstrálták, hogy a daganatinváziót a sebgyógyulás strómája stimulálja. Megváltozik a redox folyamatok egyensúlya, felszaporodnak a peroxidok és a szabadgyökök. A krónikus gyulladás során keletkező TNF és IL-6 pl. az NF- $\kappa$ B, STAT3 jelátviteli utakon keresztül antiapoptotikus, transzkripcióaktiváló hatású, ami növeli a tumorkéletkezés kockázatát (13).

#### **2.2.2.3. A melanómákat infiltráló immunsejtek**

A gyulladásos és immunreakciók képesek mind pro-, mind antitumorális hatást kifejteni. Egyre nagyobb figyelem övezi a lokális, a daganat területére jellemző immunaktivitást, amelyről az infiltráló immunsejtek vizsgálata nyújthat információt (26). A melanómák immuninfiltrátumában mind a veleszületett (mononukleáris fagociták, dendritikus sejtek, granulociták, hízósejtek, NK-sejtek), mind az adaptív immunrendszer sejtjei (B-limfociták, T-limfociták) megtalálhatóak. A sejtek egy részét inkább immunszuppresszív tulajdonságúnak tartják, mint a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulátor T-sejtek, CD4<sup>+</sup> Th2 helper T-sejtek, mieloid-eredetű szuppresszor sejtek (MDSC), M2 makrofágok, N2 neutrofilek, plazmacitoid dendritikus sejtek, más részük pedig főként antitumorális hatású, mint a CD8<sup>+</sup> citotoxikus T-limfociták, Th1 helper T-limfociták, az antigénprezentáló dendritikus sejtek, M1 makrofágok és N1 neutrofilek.

### 2.2.2.3.1. Dendritikus sejtek

A dendritikus sejtek kifejezett heterogenitást mutató összetett sejtszerezt alkotnak mind fenotípusukat, mind anatómiai elhelyezkedésüket és működésüket tekintve (27). Két fő csoportot különíthetünk el, az egyik a konvencionális DC-k, a másik a plazmacitoid DC-k (pDC-k) csoportja.

A Langerhans-sejtek a mieloid eredetű, konvencionális dendritikus sejtek csoportjába tartozó, a bőrben és a nyálkahártyák felszínén található sejtek, melyeket a Birbeck-granulumok jelenléte, a CD1a, Langerin és az E-kadherin markerek expressziója jellemez (27, 28). Az intersticiális eredetű dendritikus sejtek szintén mieloid eredetűek és a konvencionális dendritikus sejtek csoportjába tartoznak, a bőrben a dermális dendritikus sejteknek felelnek meg. CD1b-t, CD1c-t és részben CD1a-t és XIIIa-faktort fejeznek ki (27, 28). A plazmacitoid dendritikus sejtek a jelenlegi elképzelés szerint mind mieloid, mind limfoid prekursorokból származhatnak (29). Nagy mennyiségben termelnek I-es típusú interferonokat virális antigének hatására, IL-3R $\alpha$  (CD123), BDCA-2 (CD303) molekulákat fejeznek ki (30). Az I-es típusú interferonok termelése révén a T- és NK-sejtek aktiválását segítik (31), azonban a daganatos mikro környezetben található pDC-k egyes feltételezések szerint inkább immunszuppresszív hatásúak (32).

Fontos továbbá különbséget tennünk érett és éretlen dendritikus sejtek között, mert e két stádiumban a sejtek eltérő sejt felszíni receptorokkal rendelkeznek, s így más funkciókat látnak el. Az éretlen DC-k a legtöbb szerv kötőszöveti állományában megtalálhatóak. Nem képesek a T-sejtek hatékony aktiválására, elsődleges funkciójuk az antigének bekebelezése (fagocitózis). Főként a patogének felismerését és felvételét elősegítő receptorokat (Fc $\gamma$ R, CR3, CR4, TLR és C-lektin, DEC205, mannózreceptor, DC-SIGN) fejeznek ki nagy számban, míg az antigénprezentációhoz szükséges kostimulátor molekulákat alacsony szinten expresszálják. Antigénfelvétel, mikrobiális termékek, HSP (hősokkprotein), illetve citokinek, gyulladáshatóanyagok hatására aktiválódnak, a másodlagos nyirokszervekbe vándorolnak, ahol érési folyamaton mennek keresztül. Az érett DC-k már nem képesek hatékony fagocitózisra, azonban nagy mennyiségben jelennek meg a felszínükön az antigénprezentálást elősegítő molekulák, így az MHC-,

valamint a más immunsejtekkel kölcsönhatást biztosító kostimulátor molekulák (CD40, CD80, CD86). Ezeken kívül az érett DC-k a CD83 és CD208/DC-LAMP (DC-lysosome-associated membrane protein) markereket is expresszálják. Éretlen, vagy nem teljesen érett állapotban a dendritikus sejtek képesek immuntoleranciát is előidézni, amit melanómás betegek esetében is leírtak (33).

A tumoros gazdaszervezetben a dendritikus sejtek a tumorasszociált antigéneket felveszik, feldolgozzák és prezentálják a naiv és memória T-sejteknek. Ezért feltehetően jelentős szerepet játszanak a tumorelles immunválaszban. Mint a leghatékonyabb antigénprezentáló sejtek, kulcsszerepet játszanak a tumorelles immunválasz kialakulásában és fenntartásában. Ennek megfelelően fokozott infiltrációjuk a legtöbb daganattípus esetében pozitív összefüggést mutatott a betegek túlélésével (26). Meglepő, hogy a mi vizsgálatunkat megelőzően milyen kevés tanulmány elemezte a tumorinfiltráló DC-k klinikai jelentőségét melanómák esetében, és ezek is csekély számú beteg vizsgálatára támaszkodtak (34, 35). Egy nagyobb esetszámú tanulmány a Langerhans-sejtek számának csökkenését írta le vastagabb tumorokban, azonban nem vizsgálták az összefüggést sem a metasztatizáló képességgel, sem a betegek túlélésével (36). Egy későbbi, 186 primer melanómát feldolgozó vizsgálatban a plazmacitoid DC-k emelkedett denzitását a betegség kedvezőtlen prognosztikus faktorának találták (37).

#### **2.2.2.3.2. Limfociták**

A humán szolid daganatok gyakran infiltráltak limfocitákkal (TIL), jelenlétük a tumorban zajló immunfolyamatokra utalhat. Az adaptív immunválaszt a T- és B-limfociták közvetítik, az immunválasz nagyfokú fajlagosságát és az immunológiai memóriát ezek a sejtek tudják biztosítani, mivel rendelkeznek az antigént specifikusan felismerő receptorstruktúrákkal (TCR – T-cell receptor, BCR – B-cell receptor).

Több tumortípus esetében a limfoid infiltrátum jelenléte (alcsoportok megkülönböztetése nélkül), illetve a T-sejtes infiltráció intenzitása a betegség kedvező kimenetelével mutatott összefüggést (26). Vastag- és végbélrákmintákon egy nagy esetszámú ( $n > 600$ ) vizsgálatban a tumorfészkeket infiltráló, illetve azokat körülvevő  $CD8^+$  citotoxikus és  $CD45RO^+$  memória T-sejtek mennyiségét meghatározva

kialakítottak egy immunpontszámot, ami erősebb prognosztikus faktornak bizonyult, mint a TNM-stádium (38-41).

Melanómák esetében a TIL jelenléte (alcsoportok megkülönböztetése nélkül) prognosztikai jelentőségét tekintve ellentmondásos (42). Több nagy esetszámú tanulmány szerint a nagy mennyiségű TIL a kedvező prognózis független prediktora (43, 44); egyes kutatók szerint csak abban az esetben, ha a vertikális növekedési fázis infiltrációját veszik figyelembe (45, 46). Mások azonban, részben hasonló metodológiát alkalmazva, nem találtak szignifikáns összefüggést, illetve a limfocitainfiltráció mértéke nem volt független prognosztikai marker (47-52). Egy feltételezés szerint az ellentmondás hátterében az állhat, hogy a különböző vizsgálatok a tumorvastagság tekintetében nem összehasonlíthatóak, mivel a pozitív eredményt adó vizsgálatokban az 1,7, illetve 2,0 mm-nél vastagabb, a negatív eredménnyel zárulóknál ezzel szemben a vékonyabb daganatok voltak többségben. Taylor és Mandalà tanulmányában a tumort infiltráló limfociták hiánya az őrszemnyirokcsomó-pozitivitás független prediktorának bizonyult, a túléléssel azonban nem mutatott szignifikáns összefüggést. Nem volt különbség sem a helyi recidívák, sem a távoli áttétek gyakoriságában sem, ez viszont magyarázhatja a túléléssel való kapcsolat hiányát (50, 51).

#### **2.2.2.3.3. T-limfociták**

A csontvelői és magzati máj multipotens hematopoetikus őssejtjeiből származó limfoid progenitorsejtek a tímuszba kerülnek, ahol pozitív (azok a sejtek aktiválódnak és osztódnak, amelyek valamely saját MHC-molekulához kötött antigént képesek felismerni) és negatív szelekciót (a saját MHC - saját peptid komplexek felismerésére képes sejtek elpusztulnak) követően érésük befejeződik. Azok a limfociták, amelyek specifikitásuknak megfelelő antigénnel találkoznak és aktiválódnak a megfelelő TCR által, effektor-, memória-, vagy regulátor T-sejtekké alakulnak.

A T-limfociták az immunsejtek változatos csoportjait ölelik fel, melyek közös jellemzője a T-sejt-receptor és néhány ehhez kapcsolódó szignálmolekula, köztük a CD3 expressziója. A melanómák esetében a T-sejt-szubpopulációk immunhisztokémiai kiértékeléséről néhány, kis esetszámokra támaszkodó tanulmány (53-55)

ellentmondásos eredménnyel zárult. Munkacsoportunk 52 tumormintán végzett vizsgálata a CD3<sup>+</sup> és a CD8<sup>+</sup> T-sejtek peritumorális száma és a túlélés között nem talált szignifikáns összefüggést, bár számuk valamivel alacsonyabb volt az áttétképző daganatok esetében (56). Később Jensen munkacsoportja 186 beteg anyagának a vizsgálatakor szintén nem talált összefüggést az intra- és peritumorális CD8<sup>+</sup> limfociták denzitása és a túlélés között (37).

#### **2.2.2.3.4. Aktivált T-limfociták**

A tumorok progressziója gyakran megfigyelhető kifejezett limfoid infiltrátum jelenlétében is. Számos lehetséges magyarázata lehet ennek a jelenségnek, mint például a T-sejtek nem megfelelő aktivációja: 1. a tumorantigének vagy az MHC I molekulák down-regulációja, 2. a nem megfelelő antigénbemutató, 3. a kostimuláció hiánya, vagy 4. a tumor környezetében termelt immunszuppresszív faktorok miatt. A tumor környezetében megjelenő T-sejtek inkomplettan aktiváltak vagy válaszképtelenek lehetnek, csökkent proliferációs kapacitással, tumorellenes citotoxicitással, illetve citokintermeléssel rendelkezhetnek. Fontos ezért a T-sejtek prognosztikai jelentőségének meghatározásakor az al csoportok elkülönítése mellett a funkcionális és aktiváltsági állapotot is jellemezni. Kutatócsoportunk a T-limfociták aktiváltsági állapotának meghatározására a CD25 (IL-2-receptor- $\alpha$ ) és a CD134 (OX40 – a tumornekrózis-faktor szupercsaládba tartozó transzmembrán glikoprotein) markereket használta, melyeket a nemrégiben aktivált T-sejtek expresszálnak. Mindkettő funkcionális szempontból is jelentős, a CD25 a sejtosztódás szabályozásában játszik szerepet, a CD134 kostimulációs receptor. Az e markereket hordozó T-limfociták nagyobb részben a peritumorális infiltrátumban, de intratumorálisan a tumorfészkekben is előfordultak. Magas peritumorális denzitásuk kedvező prognózissal járt együtt, a CD134<sup>+</sup> sejtek száma a túlélés független prediktorának bizonyult (57).

#### **2.2.2.3.5. Regulátor T-sejtek**

A tumorellenes immunválasz kialakulását gátló szuppresszor sejt típusok közül a legjobban jellemzett a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (FOXP3: forkhead box P3 fehérje) regulátor T-sejtek (Treg). Funkcionálisan egyedülálló csoportját képezik a T-limfocitápopulációnak, fontos szerepet játszva a perifériás tolerancia kialakításában a többi

CD4<sup>+</sup>, valamint a CD8<sup>+</sup> T-sejtek és NK-sejtek proliferációjának és aktivitásának gátlásán keresztül. A természetes Treg-ek a tímuszban keletkeznek, de adaptív Treg-ek a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> sejtek konverziójával a periférián is keletkezhetnek. A regulátor T-sejtek létfontosságúak az autoimmun folyamatok megelőzésében, valamint az allograftok kilökődésében, a graft-versus-host reakciókban, az allergiákban, valamint a tumorelles immunválasz gátlásában. A daganatos betegségekben játszott szerepüket intenzíven vizsgálták. Mennyiségük megemelkedett a daganatos betegek perifériás vérében az egészséges kontrollokhoz képest, számos tumortípusban megfigyelték akkumulációjukat (58). Bár a tumorok mikro környezetében található nagyszámú funkcionális regulátorsejt helyi T-sejtes immunszuppressziót jelezhet, a patofiziológiai jelentőségüket tekintve maradtak kétségek. Az adatok a tumort infiltráló Treg-ek prognosztikus szerepéről ellentmondások; néhány ráktípusnál megemelkedett szintjük igen rossz betegségkimenetellel korrelált, más esetekben azonban nem találtak szignifikáns összefüggést, sőt, pl. kolorektális és fej-nyaki daganatokban a kifejezett Treg-infiltráció szignifikánsan jobb túléléssel függött össze (26, 59). Ennek oka lehet az egyes tumortípusok eltérő viselkedése; a gyulladással asszociált daganatok esetében a gyulladásgátló hatással is bíró Treg-sejtek kedvezően befolyásolhatják a betegség kimenetelét. Vizsgálatunk előtt csak néhány tanulmányt szenteltek melanómákban a regulátor T-sejtek jelenléte klinikai hatásainak, többnyire csekély betegszámú minta adataira támaszkodva és ellentmondásos eredménnyel. Mourmouras munkacsoportja alacsonyabb százalékban talált Treg-eket a vertikális növekedési fázist (VGP) mutató melanómákban, mint a radiális fázisban (RGP) lévőkben (60). Ezzel ellentétben egy másik kis esetszámú tanulmányban magasabb Treg-prevalenciát írtak le VGP-ben az RGP-hez képest, és úgyszintén III-IV-es stádiumú melanómákban az I-es stádiumhoz képest (61). Miracco és munkacsoportja vertikális növekedési fázisban lévő melanómákat vizsgálva azt találta, hogy a regulátor T-sejtek magas intra- és peritumorális mennyisége a lokális recidíva előjele volt (62). Hillen csoportja nem talált összefüggést a FOXP3<sup>+</sup> limfocitaszám és a Breslow-index, illetve a betegek túlélése között (55).



### 2.2.2.3.6. B-limfociták

A B-limfociták csontvelői pluripotens őssejtből keletkező limfoid előalakokból származnak, fejlődésük a májban, majd a csontvelőben indul meg, mely szöveteket burzaekvivalens szöveteknek nevezünk (a B-limfocitákat először a madarak bursa Fabricii nevű szervében mutatták ki), itt válnak elkötelezetté, itt történik az immunglobulin gének átrendeződése. Antigénstimulusra a B-sejtek proliferálnak és differenciálódnak, plazmasejteké alakulnak, immunglobulinokat termelnek.

Az ellenanyag-közvetített immunválasz szerepe a tumorok elleni védekezésben nem tisztázott, és vitatott, hogy a szisztémás B-sejt-válasz vagy a lokális B-sejt-akkumuláció miként befolyásolja a daganatok biológiai viselkedését (63-66).

A legtöbb tumortípusban, köztük a melanómákban a limfoid infiltrátum főként T-sejtekből áll, jóval kisebb arányban B- és NK-sejtekből. A primer bőrmelanómák gyulladással infiltrátumának összetételét elemző, igen kis esetszámú korábbi munkákban a B-sejtek hiányát, vagy ritka előfordulását írták le (67, 68). Későbbi tanulmányok ~15-20%-ra tették a B-sejtek arányát az összes infiltráló limfocita viszonylatában (55, 69). A mi vizsgálatunkat megelőzően egyetlen, 58 beteg szövetmintáját elemző tanulmány értékelte e sejtek prognosztikai jelentőségét, mely nem talált szignifikáns összefüggést az infiltráló B-limfociták mennyisége és a túlélés között (55).

### 2.2.2.3.7. NK- és NKT-sejtek

A természetes ölósejtek (natural killer – NK-sejtek) a T- és B-limfociták mellett a harmadik fő limfocita-populációt képezik. A csontvelőben NK-progenitor sejtekből differenciálódnak. Az NK-sejtek a veleszületett immunrendszer elemei, aktivációs stimulusra, mint pl. fertőzött sejt vagy daganatsejt jelenlétére azonnal reagálnak és elpusztítják azokat. A dendritikus sejtekkel kölcsönhatásba lépve az adaptív immunreakciók szabályozásában is részt vesznek (70). Különbséget tudnak tenni a szervezet ép, saját sejtjei és az MHC I molekulákat nem megfelelő mennyiségben expresszáló (fertőzött, vagy tumorosan átalakult sejtek – ezeket ugyanis sokszor alacsonyabb MHC I-expresszió jellemzi) között. A célsejt elpusztítása többféle mechanizmussal történhet: 1. citotoxikus reakciókban az NK-sejtek granulumaiból felszabaduló perforin és más proteázok, granzimek vesznek részt; 2. az apoptotikus

folyamatok is beindulnak, így a programozott sejthalál következtében pusztulnak a sejtek (71); 3. ellenanyagfüggő citotoxikus reakcióval (antibody-dependent cellular cytotoxicity – ADCC).

A limfociták kis csoportját alkotó NKT (natural killer T) sejtek NK- és T-sejt-markereket is hordoznak: CD56- és CD3-pozitívak.

A szolid tumorokban NK- és NKT-sejtek általában kis mennyiségben vannak jelen, elsősorban a keringésben a szisztémás védekezés részeként, a hematogén áttétképzés megelőzésében játszhatnak szerepet. A tumorokban található NK-sejtek esetében gyakran figyelték meg az aktiváló receptorok csökkent expresszióját, valamint csökkent funkcionális aktivitásukat (72-74). Ennek háttérében a daganatos környezetben található egyes faktorok (TGF- $\beta$ , IL-10, PGE2, IDO) jelenléte állhat, ezt melanómák esetén is leírták (71, 75, 76). Ennek ellenére egyes daganatokban az NK-sejtes infiltráció kedvező prognosztikai jelnek bizonyult (26, 74). Meg kell azonban jegyezni, hogy a vizsgálatokban többnyire a CD56, illetve CD57 markereket alkalmazták, melyek nem teljesen specifikusak az NK-sejtekre; újabban a specifikusabbnak tartott NKp46 marker használata kezd tért nyerni (73).

#### **2.2.2.3.8. Makrofágok**

A tumorszövetet infiltráló makrofágoknak régen daganatellenes hatást tulajdonítottak. A hemopoézis során a csontvelői eredetű sejtekből differenciálódó monociták a véráramba jutnak, ahonnan megfelelő stimulusok hatására a különböző szövetekben megtelepedve más-más funkcionális sajátosságokkal bíró makrofággá érnek.

A makrofágokat az aktiválódásuk módja szerint egyszerűsítve M1 és M2 csoportokra oszthatjuk. Az ún. klasszikus úton aktivált M1 makrofágok az I-es típusú T-sejt-választ (Th1) stimulálják. Jó antigénprezentáló funkciójuk mellett szerepük van a vírus- és mikrobiális fertőzések és a daganatok elleni immunvédekezésben. Közvetlen tumorsejtölő hatást fejtenek ki különböző toxikus anyagok termelésén keresztül (77, 78). Az alternatív mechanizmussal aktiválódott M2 makrofágok antigénprezentáló képessége gyenge, inkább a sejtörmelékeltávolító (scavenger), a károsodott szöveteket újraépítő, a daganatok fennmaradását segítő és érképződést támogató

funkciójuk áll előtérben, proteázaik (MMP) előkészítik a kötőszövetet a tumoros invázióhoz (77-81). Továbbá immunszuppresszív faktorok kibocsátásával gátolják az adaptív immunválaszt. A T-sejtek Th2 és Treg irányú differenciációját segítik elő, ami serkenti a B-sejtek ellenanyag-termelését, azonban gátolja a CD8<sup>+</sup> T- és az NK-sejtes aktivitást (77-79). Az előbbi sematikus beosztás egy széles spektrum végpontjait jelenti, melyek között az átmenet folyamatos. A tumorasszociált makrofágok (TAM) a jelenlegi nézetek szerint mindenesetre a tumorok mikrokörnyezetében termelődő, az M2 irányú polarizációnak kedvező faktorok következtében az utóbbi típushoz állnak közelebb. Elősegítik a daganat fennmaradását, növekedését, így fokozott infiltrációjuk a legtöbb daganattípusban kedvezőtlen prognosztikus tényezőnek bizonyult (26). A melanómákon végzett vizsgálatok (53, 55, 56, 82, 83) a túlélés tekintetében ellentmondásos eredményre vezettek, míg néhány tanulmány korrelációt mutatott a makrofágok mennyisége és a daganatok érdenzitása között (56, 83).

#### **2.2.2.3.9. Granulociták és hízósejtek**

A granulociták mieloid progenitorból származó gyulladásozó sejtek, melyek a veleszületett immunrendszer részeként az akut gyulladásozó folyamatokban vesznek részt. A sejtek citoplazmatikus primer vagy azurofil és szekunder granulumai sejtpusztításra alkalmas enzimeket és antimikrobás anyagokat tartalmaznak. A granulocitákat patogén eredetű anyagok és különböző citokinek (pl. GM-CSF, TNF- $\alpha$ ) stimulálják. A mikrokörnyezet hatására különböző fenotípussal és funkcionális aktivitással rendelkező formáik alakulnak ki (84, 85). Az aktivált formáikból, valamint a sérült szövetekből felszabaduló anyagok további sejteket – makrofágokat, hízósejteket, endotélsejteket – stimulálnak. Az M1/M2 polarizáció analógiájára bevezetett N1/N2 tipizálást esetén feltételezik, hogy nem az aktiváció különböző útjaitól, hanem annak mértékétől függően alakul ki (N1: erősen aktivált, N2: mérsékelten aktivált). A neutrofil granulociták aktivált állapotban citotoxikus mediátorok útján, például reaktív oxigéngyökök felszabadításán keresztül képesek a tumorsejtek elpusztítására. A tumorasszociált neutrofilek (TAN) esetében viszont a tumornövekedést segítő anyagokon, érképződést serkentő faktorokon, mátrixbontó proteázokon keresztül a tumor progressziójának kedvező hatások dominálnak (80, 84, 85). Így a neutrofil

granulociták jelenléte a daganatokban általában – melanómában is – rossz prognózist jelent (26, 82).

Az eozinofil granulociták jelenléte a tumorokban többnyire kedvező prognózissal járt (26). Feltételezik, hogy daganatellenes hatásukat az általuk termelt, granulumaikban található citotoxikus anyagok közvetítésével, illetve más effektor sejtek aktiválásán keresztül fejtik ki. Melanómákban az eozinofil granulociták előfordulása nagyon ritka, jelentőségüket nem vizsgálták.

A vérben keringő bazofil granulociták a szöveti hízósejtek megfelelőinek tekinthetők, infiltrációjuk nem jellemző a daganatokra (80, 86). A hízósejtek a keringésben nincsenek jelen, különböző szövetekbe vándorolnak. A veleszületett és az adaptív immunválaszban és az allergiás reakciókban is szerepet játszanak. A daganatokban prognosztikai szerepük egyelőre ellentmondásos (26, 86, 87). Gyakran megtalálhatók daganatok környezetében, jelentős szerepük van a gyulladáshoz és immunfolyamatok szabályozásában. Részt vesznek a tumorsejtek elpusztításában citotoxikus molekulák kibocsátásával, közvetve antigénprezentáló sejtekként, vagy más immunsejtek mozgósítása révén. Másfelől növekedési faktorok, citokinek termelése által, a krónikus gyulladás kialakulásával, fenntartásával a daganat progresszióját segítik. Számos angiogén faktor, citokin, mátrixbontó enzim termelése révén a tumorok éréskedését, invázióját és metasztatizálását segítik.

#### **2.2.2.4. Az őrszem nyirokcsomók immunológiai sajátosságai és ezek prognosztikai alkalmazhatósága**

Melanómás betegeknél a szentinel nyirokcsomók (SLN) érintettségének patológiai meghatározása jó prognosztikai jelző a túlélés szempontjából. Az őrszem nyirokcsomónak kiemelt jelentősége van a T-sejtek aktivációjában, és lehetséges vizsgálati célpontja lehet a tumorelles immunválasz mechanizmusainak. Ennek ellenére viszonylag kevés közlemény célozta a szentinel nyirokcsomók immunstátusza meghatározásának prognosztikai alkalmazhatóságát (88-93), illetve a potenciális összefüggéseket a klinikopatológiai tényezők és az immunsejtek denzitása között (89, 90, 93). Egy tanulmányban melanómák pozitív szentinel nyirokcsomóiban a DC-LAMP<sup>+</sup> érett dendritikus sejtek akkumulációja gyenge, bár statisztikailag szignifikáns

hatást mutatott a túlélésre, de nem bizonyult független prognosztikai faktornak (92). Az érett DC-k nagyobb száma összefüggött a további nyirokcsomóáttétek hiányával mind melanómák, mind emlőrákok esetében (94, 95). Speeckaert és csoportjának egy újabb keletű tanulmánya szerint melanómás betegek szentinel nyirokcsomóiban Kaplan-Meier analízissel a magasabb FOXP3<sup>+</sup> denzitású csoportban a túlélés szignifikánsan alacsonyabb volt, azonban a FOXP3<sup>+</sup> sejtek független prognosztikai szerepét nem sikerült bizonyítani (90). Egy tanulmány gyomorrák esetén a FOXP3<sup>+</sup> sejtek denzitását a nem-szentinel nyirokcsomó-metasztázis független prediktív faktorának találta (89). Nakamura csoportjának tanulmánya szerint a szentinelnegatív emlőrákos betegek esetén a magas regulátor T-sejtszám szignifikánsan rövidebb betegségmentes túléléssel függött össze (93). Gerlini munkacsoportja melanómás betegekben a pazmacitoid dendritikus sejtek emelkedettebb számát találta a metasztázist hordozó szentinel nyirokcsomók eseteiben, a metasztázist nem tartalmazókkal szemben (96).

### **2.2.3. Hormonális tényezők**

A tradicionálisan hormonfüggőnek tartott tumorer, mint az emlő-, endometrium-, vagy a prosztatarák mellett számos más tumortípus mutat nemenként különböző viselkedést, jelezve ezzel az endokrin faktorok lehetséges szerepét a betegség kimenetelében. Amellett, hogy a férfiakban a legtöbb daganattípus előfordulási valószínűsége nagyobb (97, 98), a prognózis is rosszabb, mint a nőkben (99-101). Az EUROCARE-4 adatbázisban szereplő 1,6 millió rákbeteg populációalapú, kor és régió szerinti igazítás szerinti elemzése alapján a relatív túlélés szignifikánsan magasabb volt nőkben 25-ből 15 daganattípus esetén, magába foglalva a 10 leggyakoribb lokalizációból 8-at (98). A bőrmelanómákat tekintve a nőknél jóval kedvezőbb prognózist bizonyítottak, ami részben magyarázható olyan különbségekkel, melyek ismert prognosztikai faktorok, mint például a tumorvastagság, vagy a lokalizáció (102, 103). A nők hamarabb, vékonyabb léziókkal jelentkeznek, inkább végtagi lokalizációkkal, a férfiaknál gyakoribbak a kifeléyesedett, vastagabb, noduláris típusú, valamint az axiális elhelyezkedésű tumorer (102-108). A tumornövekedés, metasztázis mintázat is különböző a két nembn, a férfiakra jellemzőbb az agresszívebb tumornövekedés, a metasztázisok elsődlegesen inkább a zsigerekben, a nők esetében pedig inkább a bőrben

és a regionális nyirokcsomókban alakulnak ki (109). Ezek a tényezők hozzájárulnak a férfiaknál látott rosszabb kimenetelhez, bár a nemet független prognosztikai faktorként hozta ki számos tanulmány (102, 104-108). Az életkor szerepe a prognózis tekintetében nem teljesen tisztázott. Néhány közlemény arról számol be, hogy idősebb betegek esetében (>50 év, nőknél a menopauza elfogadott határa) a különbség a nemek között csökken (102, 103), bár a legtöbb tanulmány szerint a nők kedvezőbb túlélése fennmarad minden korcsoportban (98, 105, 107, 108, 110).

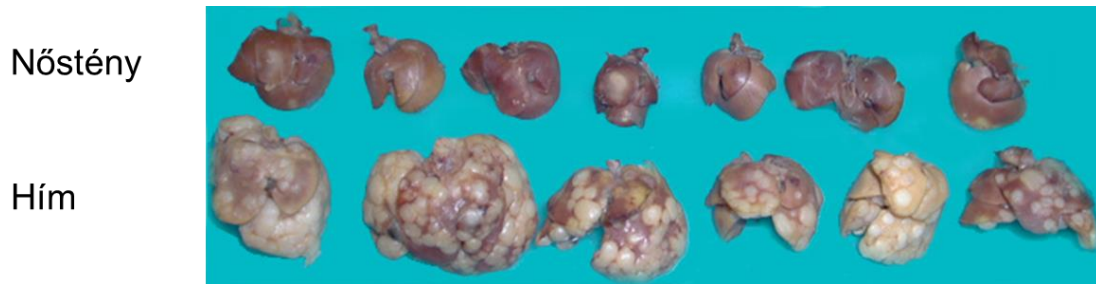
A nők jobb túlélési adatai azt a lehetőséget vetik fel, hogy az endokrin faktorok befolyásolhatják a melanómák klinikai viselkedését. Ennek ellenére a humán bőrmelanómák nemihormon-receptor státuszának vizsgálatai ellentmondásos eredményre vezettek. Korábbi tanulmányok, melyekben a szteroidkötő kapacitást biokémiai módszerekkel vizsgálták a melanómás szövetekben, pozitív eredményt adtak néhány esetben (111, 112). Ezzel ellentétben monoklonális antitestek használatával általánosságban sikertelen volt az ösztrogén- és progeszteronreceptorok kimutatása melanómászövetekben (102, 113). Feltételezhetően számos melanóma expresszál funkcionális receptorokat, azonban immunhisztokémiai módszerekkel nem kimutatható, alacsony koncentrációban. Atípusos specificitású androgénreceptorokat kimutattak melanómasejtek nukleóluszában és metasztatikus melanómákban (114). Összhangban az ösztrogénreceptorok hiányával, illetve kimutathatósági küszöb alatti szintjével, a legtöbb kutató *in vitro* kísérletben az ösztrogének befolyásának a hiányát mutatta ki a melanómasejtek proliferatív aktivitására (115, 116). Néhány esetben a melanómasejtekre gyakorolt progeszteron- és androgénhatást leírtak *in vitro* körülmények között (114, 116).

Munkacsoportunk humán melanóma-sejtvonalak vizsgálatával fehérjeszinten áramlási citometriás vizsgálattal ösztrogénreceptor-expressziót igen alacsony szinten, androgénreceptor-expressziót pedig nem tudott kimutatni. mRNS-szinten mind az ösztrogén-, a progeszteron- és az androgénreceptor esetében számos melanómavonalat vizsgálva a pozitív kontrollokhöz (emlő-, illetve prosztatárak-sejtvonalak) képest jóval alacsonyabb expressziót találtunk. A sejtek *in vitro* tulajdonságait vizsgálva, mint proliferáció, mátrixadherencia, a nemi hormonok ezeket jelentősen nem befolyásolták

(117). Glükokortikoidreceptor mind fehérje-, mind mRNS-szinten kimutatható volt melanómavonalakon, humán tumormintákon. Azonban a dexametazon a kimutatható glükokortikoidreceptor-expresszió ellenére is csak igen nagy koncentrációban, hosszú ideig alkalmazva befolyásolta *in vitro* a humán melanómasejtek proliferációját, adherenciáját, illetve migrációját (118).

A tumorhordozó állatok nemének a melanómák növekedésében és progressziójában játszott szerepére irányuló *in vivo* kísérletek az irodalomban fellelhető adatok szerint ellentmondásos eredményeket adtak. A B16 melanóma szubkután oltást követően gyorsabb (119), lassabb (120), illetve egyforma (121) növekedést mutatott hím és nőstény egerekben. A kasztráció szerepe sem tisztázott, okozott nagyobb tumormasszát (121), illetve volt, ahol nem jelentett különbséget (119). Nyirokcsomó- és tüdőmetasztázis gyorsabb megjelenését írták le hímekben B16-F10 sejteknek az állatok fülébe történt injektálása után (122). Humán melanómasejtek gyorsabb növekedést mutattak hím egerekben, mint nőstényekben (115, 123).

Munkacsoportunk egy korábbi tanulmányában (124) magasabb májkolonizáló potenciált írt le hím SCID egerekben kétféle emberi melanóma-sejtvonal lépbe történő oltása után (**3. ábra**).



**3. ábra.** SCID egerekben  $5 \times 10^5$  HT168-M1 sejt lépbeoltását követően a kolóniák megjelenése a máj felszínén (117)

Vizsgálataink alapján a nemi különbség szervspecifikus és a májra korlátozódik, ezért munkacsoportunk – minthogy a nemi hormonok direkt melanómasejteket befolyásoló hatását kimutatni nem tudta – tanulmányozta az elsősorban a májban termelődő ösztrogénmetabolit, a 2-metoxi-ösztadiol (2ME<sub>2</sub>) melanómasejtekre gyakorolt hatását

is. A 2ME<sub>2</sub> tumorellenes hatását nem a szteroidreceptorokon keresztül fejtí ki. Különbözö humán melanóma-sejtvonalakon a 2ME<sub>2</sub> sejtciklusgátlást és apoptózist idézett elő. SCID egerekben a melanómasejtek lépbe oltását követően csökkentette a primer tumor méretét, a májmetasztázisok számát, és növelte az áttétekben az apoptotikus alakok számát (125).



### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során az immunsejteknek a malignus melanóma progresszióját befolyásoló szerepét vizsgálva a következő kérdésekre kerestünk választ:

1. A primer melanómát infiltráló egyes immunsejttípusok, mint a DC-LAMP<sup>+</sup> érett dendritikus sejtek, a CD20-at expresszáló B-limfociták, és a T-limfociták egy alcsoportja, a FOXP3<sup>+</sup> regulátor T-sejtek mennyisége összefügg-e a klinikopatológiai paraméterekkel és a betegség kimenetelével?
2. Vajon az őrszem nyirokcsomókban a különböző immunsejttípusok, mint az OX40<sup>+</sup> aktivált T-limfociták, DC-LAMP<sup>+</sup> érett dendritikus sejtek, illetve a FOXP3<sup>+</sup> regulátor T-sejtek és CD123<sup>+</sup> plazmacitoid dendritikus sejtek jelenléte prognosztikus lehet-e a tumor progressziójára és a betegek túlélésére vonatkozóan?
3. Van-e jelentősége a gazdaszervezet nonspecifikus védekező rendszerének, ezen belül a makrofágoknak és az NK-sejteknek az egérekísérletek során a májban észlelt nemek közti áttétképző különbség kialakulásában?

## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1. Beteganyag-jellemzők

A primer melanómákban a dendritikus sejtek vizsgálatát 82, a B-sejtek vizsgálatát 106, a FOXP3<sup>+</sup> regulátor T-limfociták vizsgálatát 97, míg az ektópiás limfoid struktúrák vizsgálatát 147, 1980 és 2001 között a Semmelweis Egyetem Bőr- és Nemikórtani Klinikán és az Országos Onkológiai Intézetben primer kután melanóma miatt sebészeti műtéten átesett beteg archivált szövettani mintáján végeztük.

A vizsgálatba igyekeztünk a normális előfordulási arányuknál nagyobb számban bevonni közepes vastagságú, illetve vastag melanómás eseteket (>1,0 mm), melyek prognózisa kétségesebb a vékony tumorokénál. A betegek nem kaptak semmiféle daganatellenes kezelést a műtét előtt. A klinikai és patológiai jellemzőket a **2-4. táblázat** foglalja össze. A tumorokat vastagságuk szerint 4 csoportba osztottuk ( $\leq 1,0$ , 1,01-2,0, 2,01-4,0, >4,0 mm), illetve három kategóriába soroltuk a betegség progressziójától függően (az 5 éves követési idő alatt nem volt metasztázis, csak regionális nyirokcsomóáttét volt, távoli szervi áttét is volt). Minden beteg tumorát épből távolították el. A túlélő betegeket legalább 5 éven keresztül követtük, az ezidő alatt elveszített betegek a melanóma és szövődményei miatt haláloztak el.

**2. táblázat.** A dendritikus sejtek vizsgálatában részt vevő tumorminták és betegek klinikopatológiai jellemzői

Betegcsoport	Összes beteg	Nincs áttét	Nyirokcsomóáttét*	Zsigeri áttét
Életkor				
≤50	38	18	7	13
>50	44	20	6	18
Nem				
férfi	34	13	7	14
nő	48	25	6	17
Elhelyezkedés				
végtag	32	17	3	12
törzs	44	20	8	16
fej	6	1	2	3
Szövettani típus				
SSM	52	28	7	17
NM	27	9	5	13
ALM	2	1	1	-
LMM	1	-	-	1
Tumorvastagság (mm)				
<1,0	18	16	2	-
1,01-2,0	14	5	3	6
2,01-4,0	29	10	4	15
>4,0	21	7	4	10
Kifekélyesedés				
van	37	13	6	18
nincs	45	25	7	13
5 éves túlélés (%)	53/82 (65)	38/38 (100)	13/13 (100)	2/31 (6)

\*csak regionális nyirokcsomóáttét az 5 éves követési idő alatt

**3. táblázat.** A B-sejtek vizsgálatában részt vevő tumorminták és betegek klinikopatológiai jellemzői

Betegcsoport	Összes beteg	Nincs áttét	Nyirokcsomóáttét*	Zsigeri áttét
Kor – 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
Elhelyezkedés				
végtag	42	23	5	14
törzs	57	28	9	20
fej	7	2	2	3
Szövettani típus				
SSM	66	38	9	19
NM	37	14	6	17
ALM	2	1	1	-
LMM	1	-	-	1
Tumorvastagság (mm)				
<1,0	17	15	2	-
1,01-2,0	23	11	5	7
2,01-4,0	38	17	5	16
>4,0	28	10	4	14
Kifekélyesedés				
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)

\*csak regionális nyirokcsomóáttét az 5 éves követési idő alatt

**4. táblázat. A FOXP3<sup>+</sup> sejtek vizsgálatában részt vevő tumorminták és betegek klinikopatológiai jellemzői**

Betegcsoport	Összes beteg	Nincs áttét	Nyirokcsomóáttét*	Zsigeri áttét
Kor – medián (tartomány)	54 (27-76)	50 (27-76)	58 (45-76)	56 (32-76)
Nem				
férfi	43	16	4	23
nő	54	29	4	21
Elhelyezkedés				
végtag	41	21	4	16
törzs	53	23	4	26
fej	3	1	-	2
Szövettani típus				
SSM	58	30	5	23
NM	33	13	2	18
ALM	4	1	1	2
LMM	1	-	-	1
desmoplasticus	1	1	-	-
Tumorvastagság (mm)				
<1,0	11	10	1	-
1,01-2,0	21	12	3	6
2,01-4,0	37	14	3	20
>4,0	28	9	1	18
Kifekélyesedés				
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)

\*csak regionális nyirokcsomóáttét az 5 éves követési idő alatt

A szentinel nyirokcsomók tanulmányozásához (engedélyszám: 8461/20081018EKU) 60 primer kután melanómás beteg archivált szövettani mintáját vizsgáltuk, akik 1999-2001 között őrszemnyirokcsomó-eltávolításon estek át az Országos Onkológiai Intézetben. A primer tumor vastagsága >1 mm volt. A betegek a műtéti eltávolítás előtt nem részesültek daganatellenes kezelésben. A szentinel nyirokcsomó eltávolítása az esetek nagy részében (n=47) a primer tumor eltávolításával egyidőben történt, a többi esetben 2-10 héttel (átlag 4 hét) a primer tumor eltávolítása után. Az őrszemnyirokcsomó-biopsziát kettős jelöléssel (<sup>99m</sup>Tc-humán kolloid szérumalbumin és patentkék festéssel) végezték, amit dinamikus limfoszcintigráfiával kombináltak. A szentinel nyirokcsomók hisztológiai értékelése HE-festett sorozatmetszeteken, illetve immunhisztokémiai módszerrel MART-1/Melan-A-val jelölt metszeteken történt.

38 esetben az 5 éves követési idő alatt nem volt tumorprogresszió; e betegek közül 28-an negatív szentinel nyirokcsomóval bírtak, 4 esetben izolált tumorsejteket, vagy 0,1 mm-nél kisebb metasztázist találtak, 3 esetben a metasztázis 0,1-1 mm közötti volt, és 3 esetben 1 mm-nél nagyobb volt a metasztázis nagysága a legnagyobb átmérőt tekintve. 22 esetben különböző szerveket érintő progressziót észleltünk; e betegek közül 7

örszem nyirokcsomója tumormentes, 15-é pozitív volt (6 esetben 0,1-1 mm, 9 esetben >1 mm legalább egy metszetben). A 60 betegből összesen 100 szentinel nyirokcsomót (69 tumornegatív, 31 tumorpozitív) vizsgáltunk. A klinikai és patológiai paramétereket az **5. táblázat** foglalja össze. A túlélő betegek utánkövetése 5 éves volt, az időtartam alatt az elhalálozott betegeknél a halál a melanómas alapbetegség következménye volt. A 22 progrediáló beteg közül 17 az 5 éves követési időn belül halt meg, 5 beteg életben volt, ebből 3-an a betegség tüneteivel.

**5. táblázat.** *A szentinel nyirokcsomók vizsgálatában részt vevő tumorminták és betegek klinikopatológiai jellemzői*

Betegcsoport	Összes beteg	SLN-negatív	SLN-pozitív
Kor – medián (tartomány)	54 (27-79)	54 (27-79)	54 (27-76)
Nem			
férfi	27	16	11
nő	33	19	14
Tumorvastagság (mm)			
1,01-2,0	29	21	8
2,01-4,0	20	8	12
>4,0	11	6	5
Elhelyezkedés			
végtag	31	18	13
törzs	29	17	12
Szövettani típus			
SSM	37	24	13
NM	19	10	9
ALM	4	1	3
Kifekélyesedés			
van	20	9	11
nincs	37	26	11
ismeretlen	3	-	3
Progresszió 5 éven belül			
van	38	28	10
nincs	22	7	15
5 éves túlélés (%)	43/60 (72)	31/35 (89)	12/25 (48)

**4.2. Az infiltráló sejtek immunhisztokémiai kimutatása melanómamintákban**

A vizsgálathoz 3 µm vastag, formalinban fixált, paraffinba ágyazott metszeteket használtunk. A deparaffinált metszeteken mikrohullámos antigénfeltárást követően az endogén peroxidáz-aktivitást metanolban hígított 3%-os hidrogén-peroxiddal (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) blokkoltuk. A nem specifikus kötőhelyek gátlása 3%-os borjú szérumalbuminnal történt.

A vizsgálatoknál a következő primer ellenanyagokat használtuk: monoklonális anti-CD1a és anti-DC-LAMP (Coulter-Immunotech, Marseille, Franciaország), anti-CD45RO és anti-CD20cy (DakoCytomation, Glostrup, Dánia), anti-FOXP3 (236A/E7; Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), anti-CD134 és anti-CD123 (BD Biosciences Eastern Europe, Heidelberg, Németország), anti-CD25 (Novocastra Laboratories, Newcastle Upon Tyne, Anglia), anti-CD21 (BioGenex, Fremont, CA, USA). Ezt biotin/sztreptavidin-peroxidáz módszer (LSAB2 System, HRP; DakoCytomation) vagy polimer-konjugált másodlagos antitest (SS<sup>TM</sup> One-Step Polymer-HRP IHC Detection System, BioGenex) alkalmazása követte. Az antitestek kötődését 3-amino-9-etilkarbazollal tettük láthatóvá (AEC; Vector Laboratories), majd hematoxilinnel háttérfestést végeztünk.

Az esetek egy részén kettős jelölést is végeztünk a dendritikus sejtek (CD1a, DC-LAMP) vagy B-sejtek (CD20) és az aktivált T-limfociták (CD25, CD134) együttes detektálására. Az első elsődleges antitesttel az inkubációt biotin/sztreptavidin-peroxidáz (LSAB2 System, HRP; DakoCytomation) reakció követte, kromogénként Vector SG (Vector Laboratories) alkalmazásával. Ezt követte a második elsődleges antitest, majd sztreptavidin-alkalikus foszfatáz reakció (LSAB2 System, Alkaline Phosphatase; DakoCytomation), kromogénként fukszint (Vector Laboratories) alkalmazva.

#### **4.3. Az immunreakciók kiértékelése**

A primer melanómák metszeteinek vizsgálatát 10x10-es négyzetháló segítségével végeztük, 200x-os nagyítás mellett, ahol a négyzetháló területe 0,25 mm<sup>2</sup> volt. A számolást 2 kutató egymástól függetlenül végezte, a klinikai adatok ismerete nélkül. Mivel a festődő sejtek eloszlása a daganatokban igen heterogén volt, az egész tumoros területet számoltuk és elemeztük minden esetben, és sejt/mm<sup>2</sup>-ben adtuk meg a denzitásértéket. Az infiltráló sejteket külön regisztráltuk intratumorálisan (a melanómasejtfészkeket infiltrálók) és peritumorálisan (a tumornak a széli és a bazális részén elhelyezkedő infiltrátum). A kifeléyesedő tumorokban az ulcerált területeken a sejtdenzitást nem értékeltük. A B-sejtes aggregátumok területeit nem vontuk be a B-limfociták mennyiségének értékelésébe, mivel ezeken a területeken e sejtek

mennyiségének pontos meghatározása nehézséget jelentett az extrém magas sejtdenzitási értékek és a sejthatárok nehéz megállapíthatósága miatt.

Az egyes sejttípusokra denzitási küszöbértéket az adott változónak a teljes vizsgált csoportra vonatkozó középértéke alapján állítottunk be, esetenként kis módosításokkal. Az intra- és peritumorális sejtsűrűségekre külön küszöbértékeket alkalmaztunk, melyek a következők voltak: CD1a<sup>+</sup> dendritikus sejtek (25, illetve 30 sejt/mm<sup>2</sup>), CD20<sup>+</sup> B-sejtek (3, illetve 170 sejt/mm<sup>2</sup>), FOXP3<sup>+</sup> limfociták (30, illetve 220 sejt/mm<sup>2</sup>); a csak peritumorálisan értékelt DC-LAMP<sup>+</sup> érett DC-k esetében a küszöbszint 13 sejt/mm<sup>2</sup> volt. E küszöbértékek alkalmazásával meghatároztuk azon betegek csoportját, akiknek az átlagos sejtdenzitásértékei a küszöbérték felett voltak. A FOXP3<sup>+</sup> T-limfociták százalékos arányát is meghatároztuk az összes sejt arányában, 400x-os nagyítás mellett a 3 legnagyobb pozitív sejt denzitású területen, melyre a küszöbérték 11% volt.

A T-sejt-aktivációs markerek denzitási eredményei munkacsoportunk korábbi vizsgálatából származtak (57). A peritumorális CD25<sup>+</sup> és OX40<sup>+</sup> sejtekre a küszöbérték 75, illetve 20 sejt/mm<sup>2</sup> volt.

A szentinel nyirokcsomók vizsgálatánál a metszeteket kis nagyítással végigtekintettük, majd az 5 legnagyobb pozitív sejt denzitású területet leszámoltuk (hot spots) 400x-os nagyítás mellett. Az OX40- és a CD123-jelölt metszetek közül 1-1 esetben nem kaptunk értékelhető eredményt. Azoknál a betegeknél, akiknél több mint 1 SLN-minta volt hozzáférhető, az összes SLN-ből származó átlagértéket regisztráltuk. Minden markerre küszöbértéket számoltunk (a FOXP3, OX40, CD123, illetve a DC-LAMP jelöléseknél 1900, 73, 480 és 936 sejt/mm<sup>2</sup>).

#### **4.4. Statisztikai elemzés**

Az egyes immunsejttípusok sejtdenzitás-értékeinek a különböző tumorcsoportok közötti összehasonlítására Mann-Whitney U-tesztet és Kruskal–Wallis-tesztet használtunk, míg a magas sejtdenzitást mutató esetek részarányának összehasonlítására a  $\chi^2$ -tesztet. Az összefüggést a tumorvastagság és a sejtsűrűség-értékek között a Pearson-tesztel, illetve a dendritikus sejtek esetén Spearman-rangkorrelációval is vizsgáltuk. A túlélés egyváltozós elemzését Kaplan–Meier-módszerrel végeztük. A többváltozós elemzésben

a független prognosztikai faktorok meghatározására Cox-féle regressziós analízist alkalmaztunk.

A szentinel nyirokcsomók vizsgálatánál egy- és többváltozós Cox-féle regressziós analízist is végeztünk, az átlagos immunsejtdenzitási értékeket, a Breslow-indexet és a betegek életkorát folytonos változóként, a tumor lokalizációját, szövettani típusát, kifeléelyesedését, a szentinelstátuszt és a betegek nemét diszkrét változóként értékelve. A statisztikai számításokat BMDP Statisztikai Szoftvercsomaggal végeztük.

#### **4.5. Kísérleti modell: a nemi különbség az áttétképzésben**

##### **4.5.1. Sejtvonalak és tenyésztési körülményeik**

A HT168-M1 sejtvonal (126) az A2058 (L. A. Liotta, NCI, Bethesda, MD, USA) humán melanóma-sejtvonal származéka. A HT199 melanómavonalat (124) laboratóriumunkban alapítottuk. A B16 egér melanómasejteket intramuszkulárisan növekvő tumorból izoláltuk, és rövid *in vitro* tenyésztés után használtuk. A melanóma-sejtvonalakat 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó atmoszférában, RPMI 1640 tápfolyadékban (Sigma, St. Louis, MO, USA) tartottuk fenn, ami 5% főtális borjúsavót (Sigma) és 50 µl/ml gentamycint tartalmazott.

##### **4.5.2. Ki-67 antigént expresszáló emberi melanómasejtek kimutatása egérmájban**

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott minták 3 µm vastagságú metszeteinek deparaffinálása után endogén peroxidáz blokkolás következett 3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmazó metanolban, melyet citrátpufferben (pH 6) mikrohullámú antigénfeltárás követett. A metszeteket a primer antitesttel (anti-Ki-67, DakoCytomation) 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk, majd polimerkonjugált másodlagos antitesttel (EnVision System, peroxidáz; DakoCytomation) 1 órás inkubáció, AEC-vel (Vector) detektálás és hematoxilinnel magfestés történt.

##### **4.5.3. Citotoxicitási teszt**

8-10 hetes hím és nőstény SCID egerekből nyertünk lépsejteket. Az egereket 1 nappal a sejtek begyűjtése előtt 100 µg poliinozin-policitidinsavval (poly(I:C), Sigma) kezeltük, a sejteket Hypaque-1077 (Sigma) grádienssel szeparáltuk. A célsejteket (HT168-M1



melanóma) 22 órán keresztül együtt tenyésztettük a lépsejtekkel, 100:1, 50:1, 25:1 és 12,5:1 effektor:target arány mellett. A citotoxicitás mérésére LDH-kibocsátási tesztet alkalmaztunk (Cytotox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay; Promega, Madison, WI, USA) a gyártó protokollja szerint.

#### **4.5.4. *In vivo* kísérletek**

##### **4.5.4.1. Állatok**

A Charles River Laboratóriumból (Wilmington, MA, USA) származó C57BL/6, SCID (CB17/1cr-Prkdc<sup>scid</sup>) és NOD/SCID IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> (NSG; NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tmlWfi</sup>/SzJ) egereket az Országos Onkológiai Intézet patogénmentes állatházában nevelték és szaporították. Az állatkísérleteket a publikált daganatkutatási útmutatók szerint végeztük (127). A kísérleti protokollt az Országos Onkológiai Intézet munkahelyi állatvédelmi bizottsága engedélyezte. (Fővárosi és Pest Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal, Élelmiszerlánc-Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság, Járványügyi és Állatvédelmi Osztály engedélye alapján; Ikt.sz.: 22.1/722/3/2010.)

##### **4.5.4.2. Májkolonizáció**

A melanómasejtek monolayer tenyészeiből EDTA-kezeléssel egysejtes szuszpenziót készítettünk, majd Medium 199 tápfolyadékkal (Sigma) történő mosást és hígítást követően a tumorsejteket 50  $\mu$ l térfogatban az egerek lépébe oltottuk. A kísérleteket 22–29 (HT168-M1), illetve 16 (B16) nappal a tumorsejtek beoltása után zártuk le. Az állatok lépének és májának tömegét megmértük, majd 4%-os formalinban fixáltuk. A felszíni májkolóniákat sztereomikroszkóp alatt számoltuk meg. A Kupffer-sejteket és NK-sejteket blokkoló kísérletekben 1 nappal a melanómasejtek beoltása előtt 40 mg/kg GdCl<sub>3</sub>-at (Sigma), illetve 20  $\mu$ l anti-asialo GM1 antitestet (Wako Chemical GmbH, Neuss, Németország) adtunk intraperitoneálisan 200  $\mu$ l fiziológiás sóoldatban, kontrollként fiziológiás sóoldatot használva. A májkolonizáció kinetikájának meghatározására 5x10<sup>5</sup> HT168-M1 sejtet oltottunk SCID egerek lépébe, majd az állatokat 1 órával, 1 nappal, illetve 1 héttel az oltás után vizsgáltuk. Esetenként 3 hím és 3 nőstény egér máját 4%-os formalinban fixáltuk, majd szövetszöveti feldolgozásukat követően a Ki-67 antigén immunhisztokémiai kimutatásával az aktív osztódó

melanómasejtek 1 mm<sup>2</sup>-re eső denzitását fénymikroszkóppal 20x nagyításnál számoltuk.

#### **4.5.4.3. Tüdőkolonizáció**

SCID egerek farokvénájába 10<sup>6</sup> melanómasejtet oltottunk. Oltás után 6 héttel a kísérletet lezártuk, az állatok tüdejét 4%-os formalinban fixáltuk, majd a felszíni kolóniák számát sztereomikroszkóp alatt meghatároztuk.

#### **4.5.4.4. Intrakardiális oltás**

A hím és a nőstény egereket sebészi úton kasztráltuk (orchidektómia, ovariektómia). A kontroll egerek álműtétnek lettek kitéve. A műtét után 2-4 héttel 50 µl-ben 10<sup>6</sup> életképes tumorsejtet oltottunk a szív bal kamrájába (128). Csoportonként 6-10 SCID egeret használtunk a kísérletekben, az oltás átlagos sikeressége 60%-os volt. A kísérleteket a tumorsejtek beoltása után 3-4 héttel fejeztük be. Eltávolítottuk, majd 4%-os formalinban fixáltuk a májat, agyat, szívet, tüdőt, veséket, mellékveséket és a combcsontot. A májkolóniák számát sztereomikroszkóp alatt, a többi szerv áttéteinek számát fénymikroszkóppal határoztuk meg.

#### **4.5.5. Statisztikai elemzés**

Az eredményeket Mann-Whitney U-teszt és  $\chi^2$ -teszt segítségével értékeltük ki.

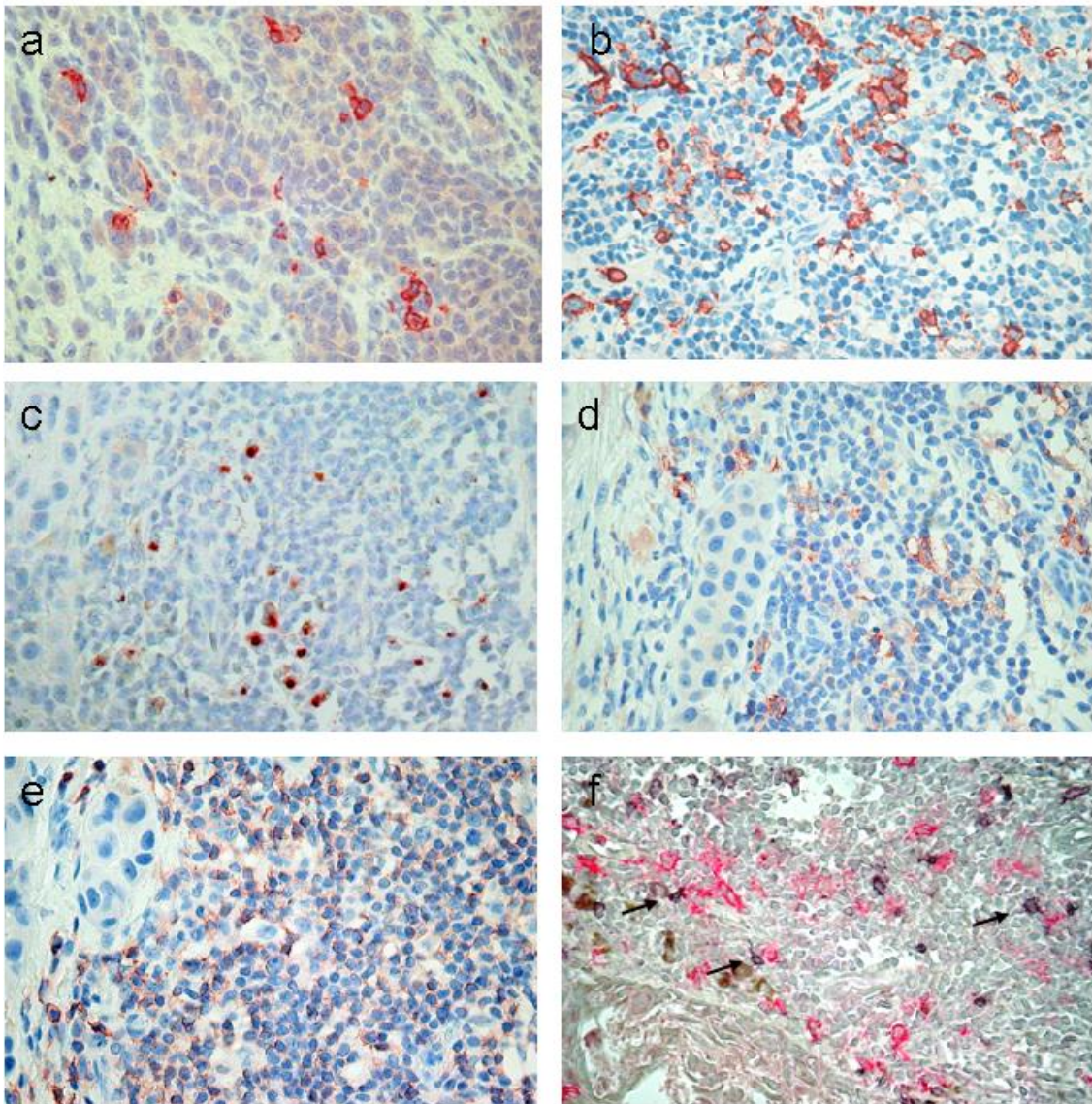
## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Primer melanómák vizsgálata

#### 5.1.1. CD1a<sup>+</sup> és DC-LAMP<sup>+</sup> dendritikus sejtek, CD20<sup>+</sup> B-limfociták és FOXP3<sup>+</sup> T-sejtek kimutatása

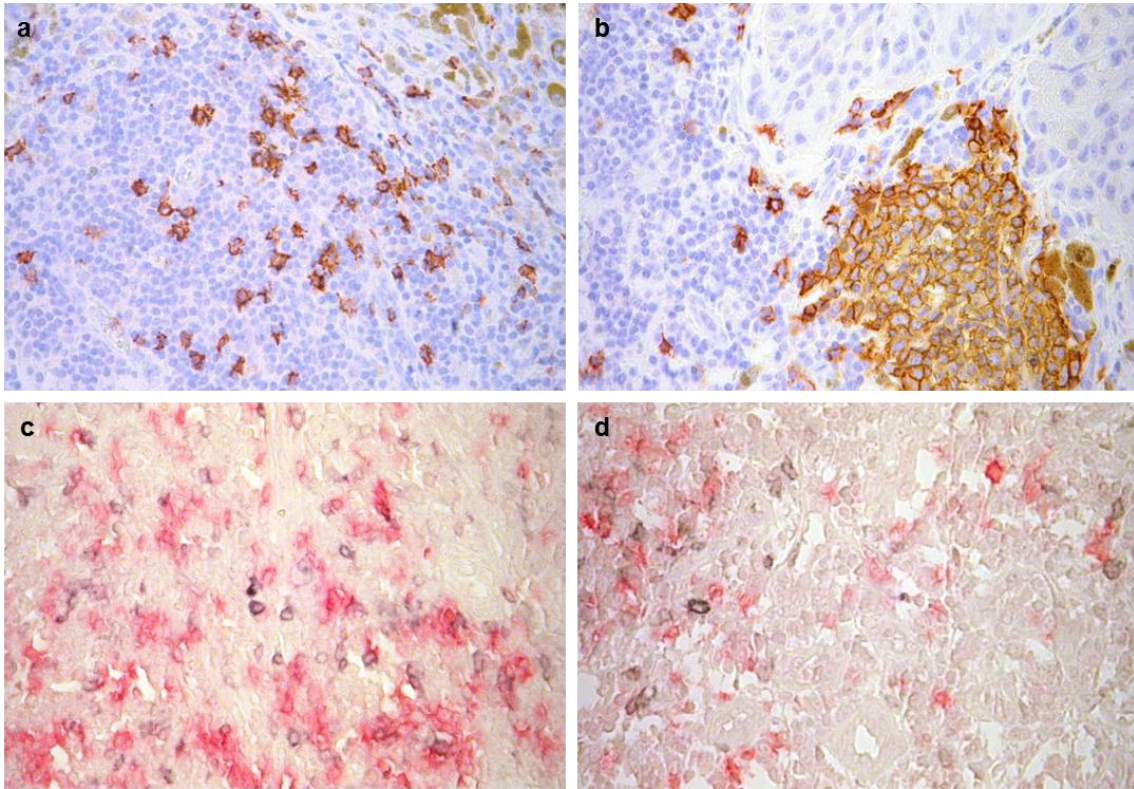
A CD1a<sup>+</sup>, illetve DC-LAMP<sup>+</sup> dendritikus sejtek vizsgálatát 82 beteg tumormintáján végeztük el (**2. táblázat**) (129). Összehasonlítva a tumor melletti normális epidermis és a melanómák fölött elhelyezkedő hámréteg CD1a<sup>+</sup> sejtjeinek a számát, az utóbbiban alacsonyabb értékeket találtunk. Ez a jelenség az SSM vertikális növekedési fázisa és a noduláris melanómák fölött volt a legkifejezettebb (átlagos sejtdenzitás-csökkenés: VGP 61,6%, RGP 25,6%, noduláris melanómánál 66,4%). A melanómákban a CD1a<sup>+</sup> DC-eket mind peritumorálisan (a tumort körülvevő strómában), mind intratumorálisan (a tumorsejtek közé ékelve) megtaláltuk (**4.a-b ábra**), hasonló sűrűségben (átlag±SD az egész betegpopulációt nézve: 26,6±33,7, illetve 30,5±37,0 sejt/mm<sup>2</sup>). Azokban az SSM-ekben, melyek mind radiális, mind vertikális növekedési fázist tartalmaztak, a VGP-t általában alacsonyabb DC-denzitás jellemezte (intratumorálisan: RGP 47,0±42,4 vs. VGP 22,1±30,3 sejt/mm<sup>2</sup>, p=0,0049; peritumorálisan: RGP 47,5±37,6 vs. VGP 22,3±28,6 sejt/mm<sup>2</sup>, p=0,0032).

A dendritikus sejtek érési markere, a DC-LAMP juxt nukleáris pontszerű festődést mutatott, szinte kizárólag peritumorális lokalizációban, limfocita-aggregátumokkal összefüggésben (**4.c ábra**) (denzitás: 19,5±23,3 sejt/mm<sup>2</sup>). Melanóma-sejtfészkeket infiltráló DC-LAMP<sup>+</sup> sejteket az összes esetből mindössze 5-nél találtunk (a teljes intratumorális denzitás: 0,7±3,1 sejt/mm<sup>2</sup>). Párhuzamos metszeteket megfestve megfigyelhető, hogy a peritumorális CD1a<sup>+</sup> és DC-LAMP<sup>+</sup> DC-k sokszor a T-sejtekben gazdag területeken helyezkednek el (**4.c-e ábra**). CD1a és CD25, illetve OX40 kettős jelöléssel látható egyes esetekben a dendritikus sejtek és a T-sejt-aktivációs markert expresszáló limfociták kapcsolódása (**4.f ábra**). A DC-k és az aktivált T-limfociták denzitása között szignifikáns korreláció mutatható ki. A legerősebb összefüggést a peritumorális CD1a<sup>+</sup> vagy DC-LAMP<sup>+</sup> sejtek és a CD25<sup>+</sup> limfociták között találtuk (r=0,4384, n=73, p<0,001, illetve r=0,5637, n=56, p<0,001).



**4. ábra.** Melanómasejt-fészkeket (a) és a peritumorális területet (b) infiltráló  $CD1a^+$  dendritikus sejtek. Ugyanazon melanómaminta párhuzamos metszetein a  $DC-LAMP^+$  (c), illetve  $CD1a^+$  (d) dendritikus sejtek kolokalizációja a limfocitás infiltrátumban (a memória T-limfociták  $CD45RO$ -jelölése) (e).  $OX40$  (Vector SG, szürke) és  $CD1a$  (fukszin, piros) kettős jelöléssel az  $OX40^+$  sejtek szoros kapcsolatát látjuk a  $CD1a^+$  dendritikus sejtekkel (f)

A **B-sejtek** 106 primer melanóma mintán (**3. táblázat**) végzett immunhisztokémiai vizsgálatával CD20-expressziót főként a tumordepozitumok körüli strómában elszórt limfocitákon észleltünk (**5.a ábra**) (130). A minták 26%-ában (28/106 eset) a tumorsejtfészkekkel szomszédosan B-sejt-csoportokat is megfigyeltünk, körülbelül 0,1-0,8 mm közötti méretű, denz, follikulusszerű aggregátumokként (**5.b ábra**).

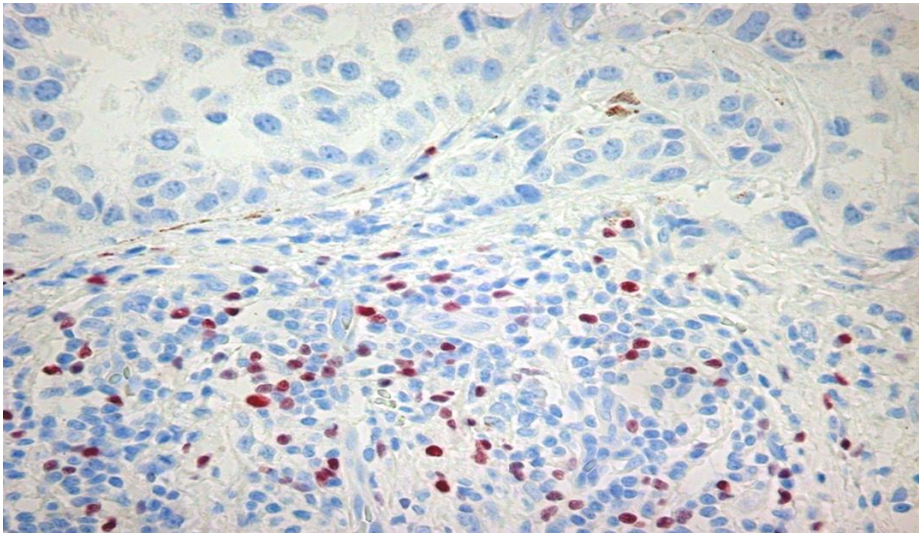


**5. ábra.**  $CD20^+$  B-limfociták (AEC-jelölés, piros) megtalálhatók szétszórtan a melanómasejt-fészkek között a limfoid infiltrátumban (a) és denz, follikulusszerű aggregátumokat képezve (b).  $CD20^+$  és  $CD25^+$  (c), illetve  $CD20^+$  és  $OX40^+$  (d) kettős jelölt B- és aktivált T-limfociták szoros kapcsolata látható ( $CD20^+$ : fukszin, piros;  $CD25^+$ , ill.  $OX40^+$ : Vector SG, szürke).

Az esetek döntő többségében a jelölt sejtek peritumorális denzitása jelentősen, átlagban 36-szorosan meghaladta az intratumorális sejtsűrűséget ( $178,7 \pm 156,1$  vs.  $4,9 \pm 6,9$  sejt/ $mm^2$ ). Minden minta legalább néhány stromális  $CD20^+$  limfocitát tartalmazott, a denzitásuk a 106-ból 91 esetben magasabb volt  $10$  sejt/ $mm^2$ -nél, amíg az intratumorális B-sejt-infiltráció  $1$  sejt/ $mm^2$  alatt maradt az esetek 62%-ában (66/106). A dendritikus sejtek esetében tapasztaltakhoz hasonlóan kettős jelöléssel (CD20 és CD25 vagy OX40)

kapcsolat mutatható ki a B-sejtek és az aktivált T-limfociták között (**5.c-d ábra**). Szignifikáns összefüggést találtunk a B-sejtek és az aktivált T-limfociták peritumorális denzitása között ( $r=0,3062$ ,  $p<0,02$ , illetve  $r=0,4105$ ,  $p<0,001$  CD25<sup>+</sup> és OX40<sup>+</sup> sejtekre,  $n=67$ ); az aktivált T-sejtekre vonatkozó denzitásértékek korábbi munkánkból származtak (57).

A **FOXP3<sup>+</sup> T-sejtek** 97 melanómamintán (**4. táblázat**) történt vizsgálatokor (131) a magi FOXP3-festődés főként limfocitákban volt kimutatható (**6. ábra**). A limfociták jelölődése a tumorstrómában kifejezettebb volt, átlagosan 6-szoros különbséget észleltünk az intratumorális denzitással összehasonlítva ( $292,2\pm 211,5$  vs.  $48,8\pm 63,2$  sejt/mm<sup>2</sup>). A 3 legnagyobb FOXP3<sup>+</sup> sejt denzitású területen a jelölt limfociták százalékos aránya az összes sejtre vonatkoztatva  $11,9\pm 5,8\%$  volt.



**6. ábra.** FOXP3<sup>+</sup> sejtek immunhisztokémiai jelölése primer melanómában

### 5.1.2. Összefüggés a dendritikus sejtek, B-limfociták, illetve regulátor T-sejtek denzitása és a tumorvastagság valamint egyéb klinikopatológiai paraméterek között

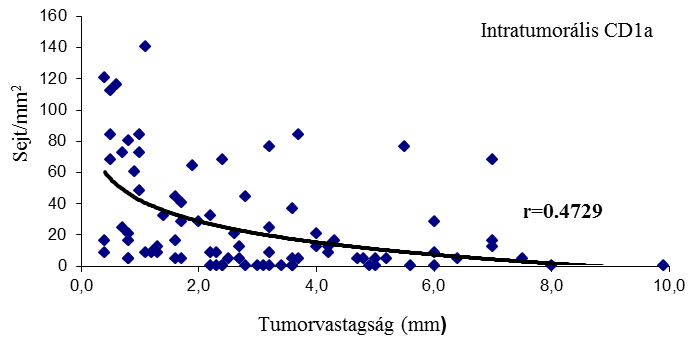
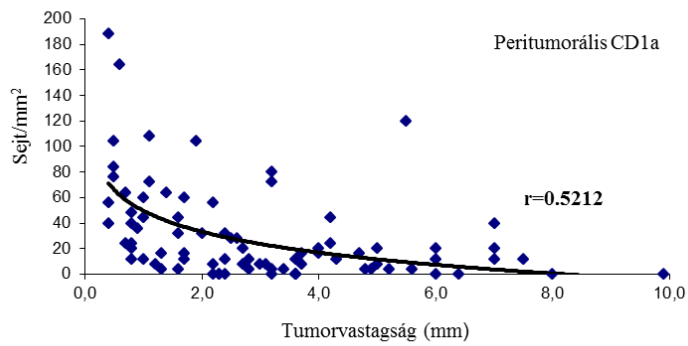
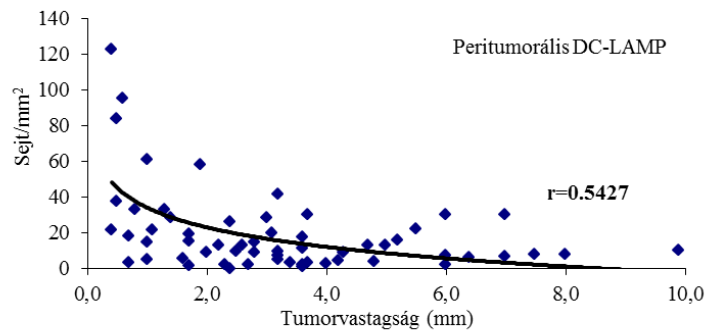
A CD1a<sup>+</sup> és DC-LAMP<sup>+</sup> DC-k infiltráltsági mértéke és a melanómák vastagsága fordítottan aránylott egymáshoz ( $p<0,001$ ) (**7. ábra**) (129). Kiértékeljük az összefüggést a Breslow-index és a kifejezett DC-sűrűséget mutató (az Anyag és módszer fejezetben leírt módon meghatározott küszöbértéket meghaladó CD1a<sup>+</sup>, illetve DC-LAMP<sup>+</sup>

sejtdenzitású) esetek részaránya között is. Hasonlóan az átlagos sejtdenzitásbeli változáshoz, ezek az értékek szintén csökkentek a melanómák vastagságának növekedésével (**6. táblázat**). E küszöbértékeket használva a jelentős DC-denzitást mutató melanómás esetek megoszlását egyéb klinikopatológiai faktorok szerint is elemeztük. Nem volt szignifikáns különbség a magas CD1a<sup>+</sup> és DC-LAMP<sup>+</sup> sejtdenzitást mutató esetek gyakoriságában a tumor lokalizációja, a betegek életkora vagy neme szerint szétválasztott csoportokban. A szövettani típus esetén (SSM vs. NM, csak a 2 mm-nél vastagabb melanómákat értékelve, mivel ez alatt a vastagság alatt noduláris melanóma nem fordult elő) nem találtunk különbséget a DC-tartalomban. A kifeléyesedést mutató tumorokban az intenzív dendritikus sejtes infiltráció előfordulási gyakorisága alacsonyabb volt (intratumorális CD1a<sup>+</sup> DC: p=0,0579, peritumorális CD1a<sup>+</sup> DC: p=0,0004, peritumorális DL-LAMP<sup>+</sup> DC: p=0,0011).

**6. táblázat.** A magas DC-sűrűséget mutató esetek megoszlása a beteg- és tumorjellemzők függvényében

Betegcsoport	Intratumorális CD1a <sup>+</sup> (>25 sejt/mm <sup>2</sup> )		Peritumorális CD1a <sup>+</sup> (>30 sejt/mm <sup>2</sup> )		Peritumorális DC-LAMP <sup>+</sup> (>13 sejt/mm <sup>2</sup> )	
	No. (%)	p-érték	No. (%)	p-érték	No. (%)	p-érték
Összes beteg	29/82 (35)		28/82 (34)		29/59 (49)	
Kor						
≤50 év	14/38 (39)		16/38 (42)		15/28 (54)	
>50 év	14/44 (32)	n.s.	12/44 (27)	n.s.	14/31 (45)	n.s.
Nem						
férfi	12/34 (35)		11/34 (32)		10/24 (42)	
nő	17/48 (35)	n.s.	17/48 (35)	n.s.	19/35 (54)	n.s.
Elhelyezkedés						
végtag	10/32 (31)		9/32 (28)		8/23 (35)	
axiális (törzs+fej)	19/50 (38)	n.s.	19/50 (38)	n.s.	21/36 (58)	n.s.
Szövettani típus*						
SSM	6/22 (27)		5/22 (23)		7/17 (41)	
NM	4/27 (15)	n.s.	2/27 (7)	n.s.	6/21 (29)	n.s.
Kifeléyesedés						
van	9/37 (24)		5/37 (14)		8/29 (28)	
nincs	20/45 (44)	0,0579	23/45 (51)	0,0004	21/30 (70)	0,0011
Tumorvastagság (mm)						
≤1,0	12/18 (67)		13/18 (72)		9/11 (82)	
1,01-2,0	7/14 (50)		8/14 (57)		6/9 (67)	
2,00-4,0	7/29 (24)		4/29 (14)		9/23 (39)	
>4,0	3/21 (14)	0,0021	3/21 (14)	0,0000	5/16 (31)	0,0324
Áttétképzés						
nincs + csak LN	19/51 (37)		22/5 (43)		19/31 (61)	
zsigeri	10/31 (32)	n.s.	6/31 (19)	0,0277	10/28 (36)	0,0497

\*Az ALM és LMM esetek nem szerepeltek az értékelésben; csak a 2 mm-nél vastagabb melanómákat értékeltük; n.s.: nem szignifikáns

**a****b****c**

**7. ábra.** Összefüggés az (a) intratumorális CD1a<sup>+</sup>, (b) peritumorális CD1a<sup>+</sup>, (c) peritumorális DC-LAMP<sup>+</sup> dendritikus sejtek és a tumorvastagság között. Minden pont egy-egy tumort jelöl;  $r$  a korrelációs együttható



A **CD20<sup>+</sup> B-limfociták** sűrűségének az intenzitása nem korrelált a tumor vastagságával (intratumorálisan:  $r=0,0723$ , peritumorálisan:  $r=0,0730$ ;  $p>0,05$ ) (139). Az intra- és peritumorális sejtsűrűsége bevezetett (3, illetve 170 sejt/mm<sup>2</sup>) küszöbértéket meghaladó B-sejt-denzitású daganatok előfordulási gyakoriságában szignifikáns különbséget a vizsgált klinikopatológiai paraméterek közül csak a tumor elhelyezkedését tekintve találtunk, axiális lokalizációban magasabb volt (**7. táblázat**).

**7. táblázat.** A magas B-sejt-sűrűséget mutató esetek megoszlása a beteg- és tumorjellemzők függvényében

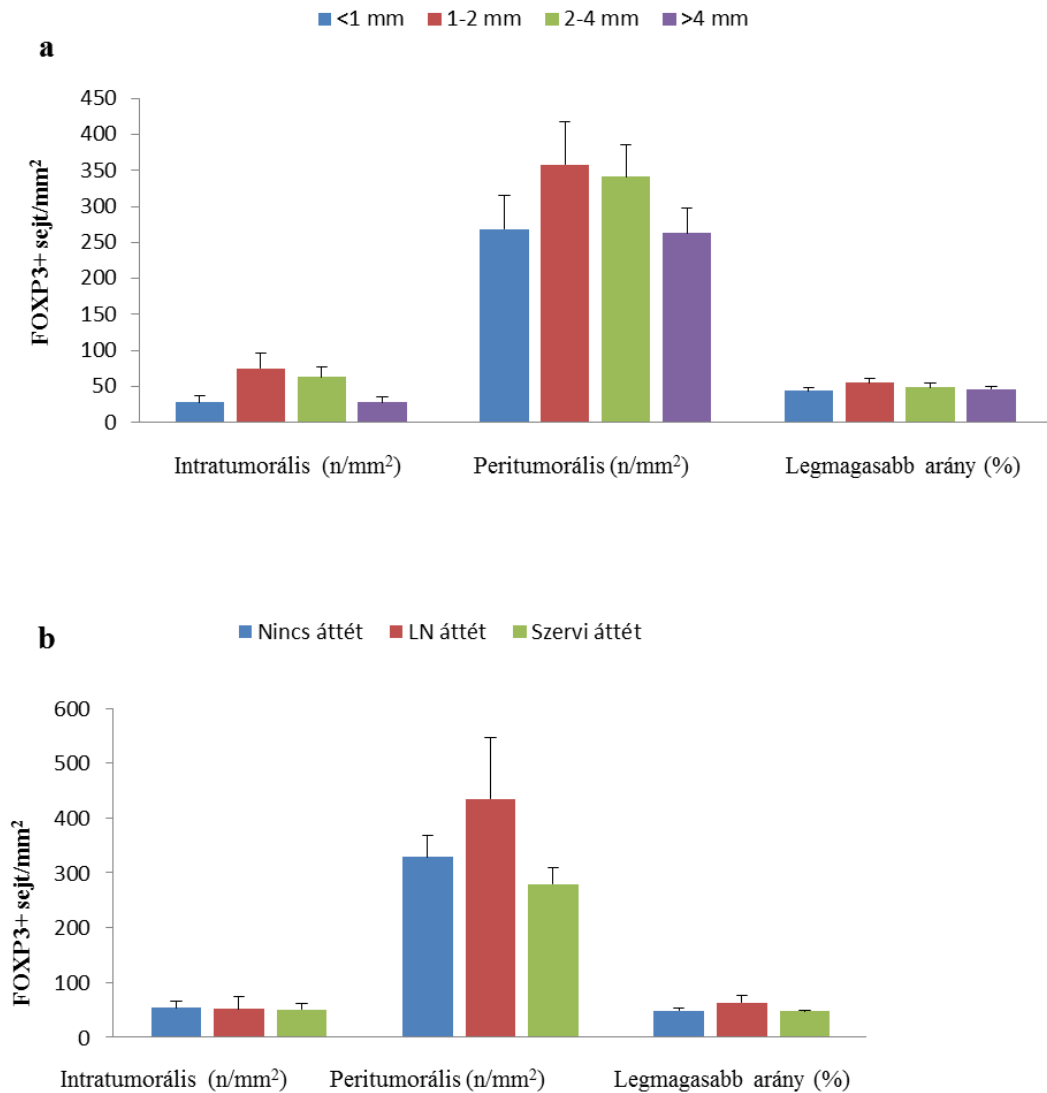
	Beteg-szám	Intratumorális(>3 sejt/mm <sup>2</sup> )		Peritumorális(>170 sejt/mm <sup>2</sup> )		B-sejtes aggregátumok jelenléte	
		No.(%)	p	No.(%)	p	No.(%)	p
Összes beteg	106	45(42)		42(40)		28(26)	
Kor							
<53 év	53	26(49)	n.s.	20(38)	n.s.	9(17)	0.0276
>53 év	53	19(36)		22(42)		19(36)	
Nem							
nő	45	21(47)	n.s.	19(42)	n.s.	15(33)	n.s.
férfi	61	24(39)		23(38)		13(21)	
Elhelyezkedés							
végtag	42	19(45)	n.s.	10(24)	0.0070	6(14)	0.0218
axiális(törzs+fej)	64	26(41)		32(50)		22(34)	
Típus							
SSM	29	10(34)	n.s.	12(41)	n.s.	8(28)	n.s.
NM	36	17(47)		17(47)		14(39)	
Vastagság							
<1.0	17	6(35)	n.s.	6(35)	n.s.	1(6)	0.0494
1.01-2.0	23	12(52)		7(30)		5(22)	
2.01-4.0	38	17(45)		15(39)		10(26)	
>4.0	28	10(36)		14(50)		12(43)	
Kifekélyesedés							
van	46	18(39)	n.s.	17(37)	n.s.	14(30)	n.s.
nincs	60	27(45)		25(42)		14(23)	
Áttétképzés							
Nincs+csak LN	69	35(51)	0.018	34(49)	0.0055	16(23)	n.s.
viszcerális	37	10(27)	6	8(22)		12(32)	
Túlélés							
>5 év	71	35(49)	0.042	34(48)	0.0132	16(23)	n.s.
<5 év	35	10(29)	3	8(23)		12(34)	

\*Az ALM és LMM esetek nem szerepeltek az értékelésben; csak a 2 mm-nél vastagabb melanómákat értékeltük; n.s.: nem szignifikáns

A B-sejtek folliculusszerű elrendeződését is gyakrabban észleltük az axiális elhelyezkedésű melanómákban, különösen a fej-nyaki lokalizációban (6/10, 60%) (132). Gyakoriságuk a tumorvastagság növekedésével emelkedett, míg egyéb klinikopatológiai paraméterekkel nem találtunk összefüggést (**7. táblázat**).

A **FOXP3<sup>+</sup> limfociták** intra- és peritumorális infiltrációjának mértéke, illetve a pozitív sejtek aránya nem mutatott szignifikáns összefüggést a Breslow-indexszel ( $r=-0,1285$ ,  $r=-0,1193$ , illetve  $r=-0,0048$ ;  $p>0,05$ ) (131). A közepes vastagságú tumorok esetében (1–4 mm között) az intratumorális denzitás emelkedését figyeltük meg ( $p=0,0039$  a

Kruskal–Wallis-tesztel), azonban hasonló különbséget sem a peritumorális denzitásban, sem a pozitív sejtek arányában nem észleltünk (**8.a ábra**). Nem figyeltünk meg szignifikáns összefüggést a magas FOXP3<sup>+</sup> sejtsűrűségű minták prevalenciája és a vizsgált klinikopatológiai jellemzők között (**8. táblázat**).



**8. ábra.** Intra- és peritumorális FOXP3<sup>+</sup> sejtsűrűség és a legnagyobb FOXP3<sup>+</sup> sejtsűrűségű területeken a pozitív sejtek aránya (átlag±SE) a melanómák vastagsága (a) és metasztatizálása (b) szerint csoportosítva

**8. táblázat. A magas FOXP3<sup>+</sup> sejtsűrűséget mutató esetek megoszlása a beteg- és tumorjellemzők függvényében**

	Betegszám	Intratumorális <sup>a</sup>		Peritumorális		FOXP3 <sup>+</sup> sejtek aránya	
		≥30 sejt/mm <sup>2</sup>		≥220 sejt/mm <sup>2</sup>		≥11%	
		No. (%)	p-érték	No. (%)	p-érték	No. (%)	p-érték
Összes beteg	97	47 (50)		49 (51)		47 (48)	
Kor							
<54 év	50	28 (57)	n.s.	26 (52)	n.s.	24 (48)	n.s.
>54 év	47	19 (42)		23 (49)		23 (49)	
Nem							
férfi	43	21 (47)	n.s.	22 (51)	n.s.	19 (44)	n.s.
nő	54	24 (39)		27 (50)		28 (52)	
Elhelyezkedés							
végtag	41	18 (46)	n.s.	18 (44)	n.s.	19 (46)	n.s.
axiális (törzs+fej)	56	29 (53)		31 (55)		28 (50)	
Szövettani típus <sup>b</sup>							
SSM	31	17 (55)	n.s.	16 (52)	n.s.	14 (45)	n.s.
NM	31	11 (38)		14 (45)		13 (42)	
Tumorvastagság							
<1,0	11	4 (36)	0,0072	5 (45)	n.s.	6 (55)	n.s.
1,01-2,0	21	14 (70)		13 (62)		13 (62)	
2,01-4,0	37	22 (61)		20 (54)		17 (46)	
>4,0	28	7 (26)		11 (39)		11 (39)	
Kifekélyesedés							
van	48	26 (55)	n.s.	27 (56)	n.s.	24 (50)	n.s.
nincs	49	21 (45)		22 (45)		23 (47)	
Áttétképzés							
nincs + csak LN	53	27 (51)	n.s.	29 (55)	n.s.	24 (45)	n.s.
zsigeri	44	20 (47)		20 (45)		23 (52)	
Túlélés							
>5 év	55	28 (53)	n.s.	29 (53)	n.s.	24 (44)	n.s.
<5 év	42	19 (46)		20 (48)		23 (55)	

<sup>a</sup>3 esetet nem tudunk kiértékelni; <sup>b</sup>az ALM, LMM és dezmoplasztikus esetek nem szerepeltek az értékelésben; csak a 2 mm-nél vastagabb melanómákat értékeltük; n.s.: nem szignifikáns

**5.1.3. Összefüggés a dendritikus sejtek, B-limfociták, illetve regulátor T-sejtek sűrűsége és a metasztázisok kialakulása között**

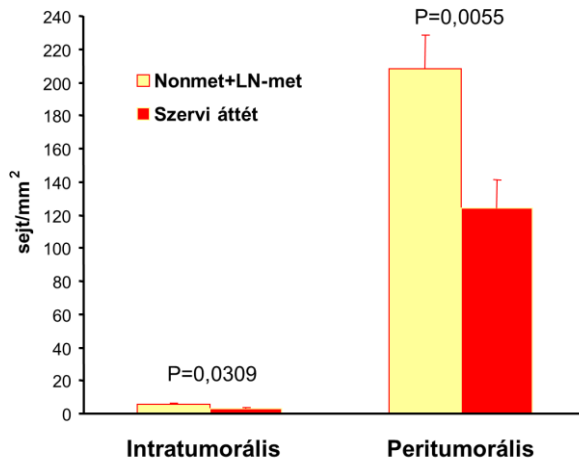
Az egyes immunsejttípusok infiltrációját összehasonlítottuk az utánkövetési idő alatt (5 év) metasztázist nem adó, csak regionális nyirokcsomóáttétet adó, illetve távoli szervi áttétet (is) adó primer melanómákban. A **dendritikus sejtek** markereinek vizsgálatakor a metasztázist nem adók csoportjában kifejezettebb peritumorális CD1a<sup>+</sup> DC-infiltrációt találtunk a viscerális áttétet adó tumorokhoz viszonyítva (38,9±44,1 vs. 19,9±28,3 sejt/mm<sup>2</sup>, p=0,0262) (129). Hasonló tendenciát figyeltünk meg mind az intratumorális CD1a<sup>+</sup>, mind a peritumorális DC-LAMP<sup>+</sup> sejtszámot tekintve, bár a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns (32,5±38,1 vs. 19,2±28,3 sejt/mm<sup>2</sup> és 28,0±32,7 vs. 13,5±12,5 sejt/mm<sup>2</sup>, p=0,1426, illetve p=0,1850). A regionális nyirokcsomóáttétet adó tumorokban minden vizsgált jellemző köztes értéket adott, ami nem tért el szignifikánsan a többi csoporttól. Annak meghatározására, hogy a DC-denzitási értékek

alapján különbséget lehet-e tenni a különböző metasztatizálási képességgel rendelkező melanómák között a közepesen vastag és vastag tumorok csoportjában, melyek általánosságban a vékony melanómákénál bizonytalanabb kimenetellel bírnak, az 1 mm-nél vékonyabb melanómák kizárásával is elemeztük az eseteket. A vékony melanómák e csoportja legnagyobbbrészt áttétet nem adó esetekből állt (**2. táblázat**), másrésztől a legnagyobb DC-denzitást mutatta (**7. ábra, 6. táblázat**), ami igen erősen befolyásolja az egész betegcsoport vizsgálatában a metasztatizáló képességgel való korrelációt. Amikor a fennmaradó 64 (>1 mm vastagságú) melanómás esetet elemeztük, nem találtunk különbséget a DC-denzitásban a nem metasztatizáló és a metasztatizáló tumorok csoportjai között. Hasonlóképpen, a Breslow-kategóriákon belül értékelve a DC-denzitás nem mutatott szignifikáns összefüggést az áttétképzéssel.

A magas DC-denzitással bíró esetek arányát vizsgálva a különböző metasztatikus viselkedést mutató melanómák csoportjaiban, a CD1a<sup>+</sup> sejtek intratumorális infiltrációja tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget, a magas peritumorális CD1a<sup>+</sup> és DC-LAMP<sup>+</sup> sejtsűrűségű minták gyakorisága viszont a zsigeri áttétet adók csoportjában szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az áttétet nem adók és a csak regionális nyirokcsomóáttétet adók között (**6. táblázat**). Az utóbbi két kategóriát együtt értékeltük, minthogy hasonló arányban tartalmaztak jelentős DC-infiltrátumot az egyes sejttípusok esetében, és hasonló biológiai viselkedést mutattak a túlélés tekintetében (100% 5 éves túlélési ráta). Amikor csak az 1 mm-nél vastagabb melanómák eseteit elemeztük, nem volt különbség a DC-denzitási értékekben e csoportok között.

A **B-sejtes infiltráció** intenzitása tekintetében is összehasonlítottuk az 5 éves követési időszakban metasztatizist nem, vagy csak a regionális nyirokcsomókba adó tumorokat a viszcerális áttétet adókkal (130). Mind az intra-, mind a peritumorális CD20<sup>+</sup> limfociták infiltrációja kifejezettebb volt a nem metasztatizáló vagy csak regionális nyirokcsomóáttétet adó csoportokban, összehasonlítva a zsigeri áttétet adó csoporttal (p=0,0309, illetve p=0,0055) (**9. ábra**). Hasonlóképpen, a kifejezett intra- és peritumorális B-sejtes infiltrátumot tartalmazó daganatok előfordulási gyakoriságában kétszeres különbséget észleltünk a két csoport között (**7. táblázat**). A B-sejt-

follikulusok megjelenése nem mutatott összefüggést a metasztázisok kialakulásával (**7. táblázat**) (132).



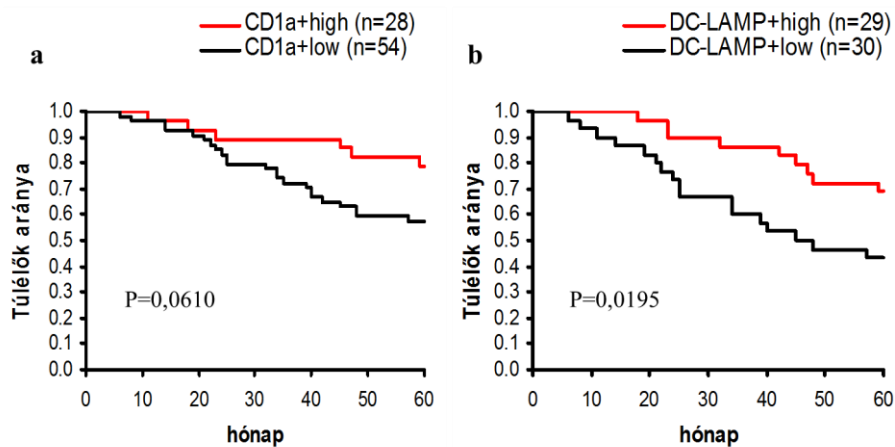
**9. ábra.** Primer melanómát infiltráló CD20<sup>+</sup> B-sejtek denzitása az áttétképzés függvényében

A FOXP3<sup>+</sup> T-sejtek infiltrációja a primer melanómákban nem mutatott összefüggést a követési idő alatti áttétképzéssel (intra-, peritumorális denzitás és a pozitív sejtek aránya:  $p=0,8292$ ,  $p=0,2337$ , illetve  $p=0,1803$ ) (**8.b ábra**) (131). A magas FOXP3<sup>+</sup> sejtsűrűségű minták részaránya sem különbözött szignifikánsan az egyes áttétképzési csoportokban (**8. táblázat**).

#### 5.1.4. A túlélés elemzése a dendritikus sejtek, B-limfociták, illetve regulátor T-sejtek denzitása függvényében

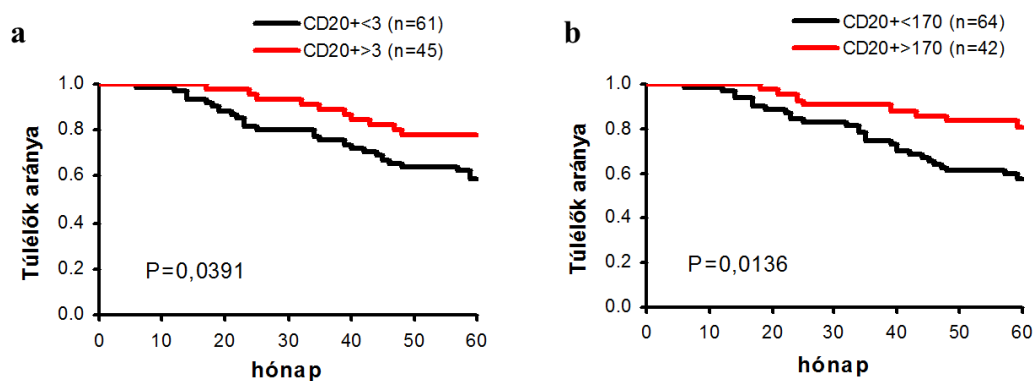
A dendritikus sejtek infiltrációja prognosztikus szempontból történő kiértékeléséhez Kaplan–Meier-elemzést végeztünk, a fent említett küszöbértékeket alkalmazva (129). Az intratumorális CD1a<sup>+</sup> sejtek mennyisége nem mutatott összefüggést a túléléssel. Az erős peritumorális CD1a<sup>+</sup> sejt infiltráció határérték-szignifikanciájú túlélési előnyt jelentett ( $p=0,0610$ ), míg a DC-LAMP<sup>+</sup> érett dendritikus sejtek magas denzitása szignifikánsan ( $p=0,0195$ ) jobb prognózissal függött össze (**10. ábra**). Az 5 éven túl élő betegek aránya magasabb volt azon esetekben, amelyeket magasabb peritumorális CD1a<sup>+</sup> és DC-LAMP<sup>+</sup> sejtszám jellemzett (79% vs. 57%,  $p=0,0573$ , illetve 69% vs. 43%,  $p=0,0472$ ). Hasonlóan a viszcerális metasztázisok kialakulásának gyakoriságához,

a túlélésbeli különbség és a DC-k denzitása közötti összefüggés szignifikanciája megszűnt ( $p=0,1191$ ), amennyiben a  $\leq 1$  mm vastagságú tumorokat kihagytuk az összehasonlító vizsgálatból.



**10. ábra.** Melanómás betegek túlélése a  $CD1a^+$ , illetve  $DC-LAMP^+$  dendritikus sejtek peritumorális sűrűségének függvényében (Kaplan–Meier túlélési görbék)

A  $CD20^+$  B-limfociták vizsgálatakor kiderült, hogy a magas sejtszám túlélési előnyt jelent ( $p=0,0391$ , illetve  $p=0,0136$  az intra- és peritumorális infiltrátumot tekintve) (**11.a-b ábra**) (130). Az 5 éven túl élő betegek aránya nagyobb volt a magas intra-, vagy peritumorális B-sejt-denzitás esetén (78% vs. 59%,  $p=0,0423$ , illetve 81% vs. 58%,  $p=0,0132$ ). A B-sejtes aggregátumok jelenléte nem mutatott összefüggést a túléléssel (**7. táblázat**) (132).



**11. ábra.** Melanómás betegek Kaplan–Meier túlélési görbéi a  $CD20^+$  sejtek intra- (a) és peritumorális (b) denzitása szerint csoportosítva

A **FOXP3<sup>+</sup> T-sejteket** vizsgálva sem az intra- vagy peritumorális infiltrációt, sem a pozitív sejtek arányát tekintve nem találtunk szignifikáns összefüggést a betegek túlélésével ( $p=0,4890$ ,  $p=0,6245$ , illetve  $p=0,2711$ ) (131). Az 5 éven túl élő betegek aránya szintén független volt a FOXP3<sup>+</sup> sejtek mennyiségétől (60% vs. 53%,  $p=0,5327$ , 59% vs. 54%,  $p=0,6181$  és 51% vs. 62%,  $p=0,2773$  a magas vagy alacsony intra- és peritumorális sejtdenzitást, illetve a pozitív sejtek arányát figyelembe véve).

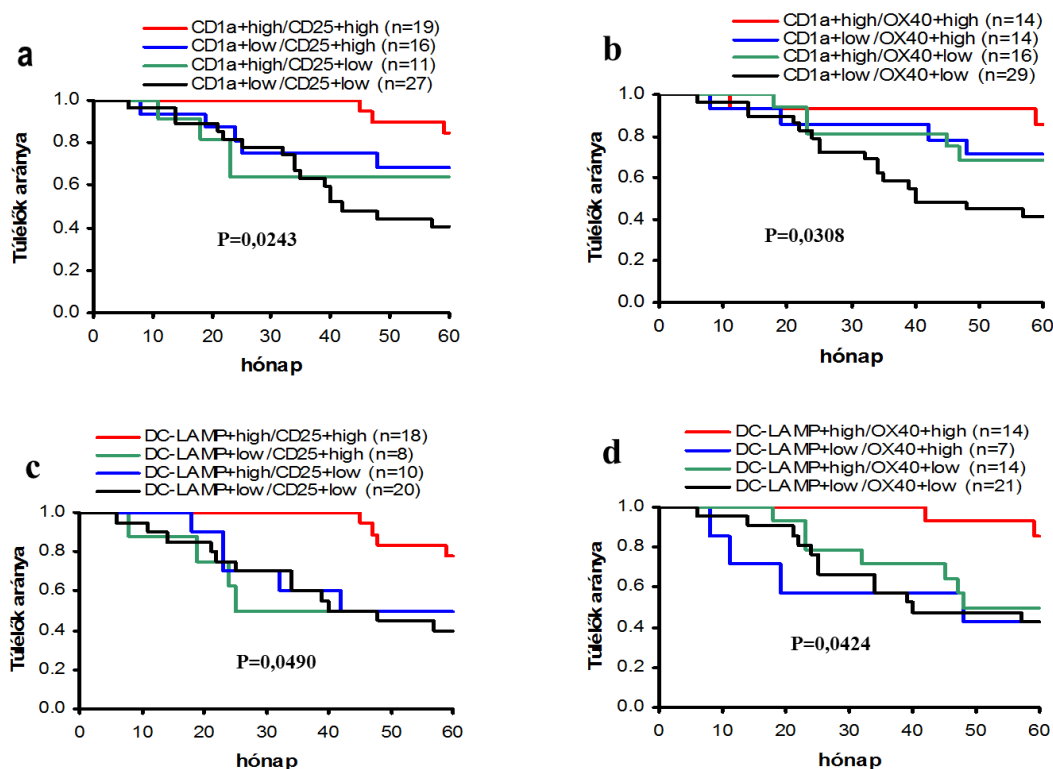
#### **5.1.5. A túléléssel való összefüggés vizsgálata az aktivált T-limfociták és a dendritikus sejtek, illetve B-sejtek mennyiségének együttes elemzésével**

Munkacsoportunk korábbi munkájában szignifikáns összefüggést mutatott ki a betegek túlélése és a CD25<sup>+</sup> vagy OX40<sup>+</sup> aktivált T-limfociták peritumorális infiltrációja között (57). Bár a DC-k és az aktivált T-sejtek, illetve a B-sejtek és az aktivált T-sejtek denzitási értékei erős összefüggést mutattak, a különböző sejtpopulációkra nézve a magas denzitású mintákat tekintve nem volt mindig teljes átfedés. A túlélési görbékért ezért az egyes immunsejttípusok magas, illetve alacsony denzitásértékeinek kombinációjával jellemzett alcsoportokban is tudtuk elemezni, külön-külön a DC-markerek és a B-sejtek esetén.

A **dendritikus sejtek és az aktivált T-limfociták** együttes magas peritumorális denzitása jó túlélési potenciált jelentett a többi csoporttal összehasonlítva ( $p=0,0243$ ,  $p=0,0490$ ,  $p=0,0308$  és  $p=0,0424$  a CD1a/CD25, DC-LAMP/CD25, CD1a/OX40 és DC-LAMP/OX40 kombinációk eseteiben) (**12. ábra**) (129). A DC-LAMP<sup>magas</sup>/aktivált T-sejt<sup>magas</sup> kombináció mutatta a legkedvezőbb túlélési előnyt a többi csoporttal összehasonlítva, amelyek szignifikánsan nem különböztek egymástól ( $p=0,0057$ , illetve  $p=0,0097$  a DC-LAMP<sup>magas</sup>/CD25<sup>magas</sup>, illetve DC-LAMP<sup>magas</sup>/OX40<sup>magas</sup> alcsoportok vs. a többi alcsoport együttesen). Másrészt a CD1a<sup>alacsony</sup>/aktivált T-sejt<sup>alacsony</sup> csoportosítás mutatta a legrosszabb prognózist, összehasonlítva akár a CD1a<sup>alacsony</sup>/aktivált T-sejt<sup>magas</sup>, akár a CD1a<sup>magas</sup>/aktivált T-sejt<sup>alacsony</sup> kombinációkkal ( $p=0,0086$ , illetve  $p=0,0044$  a CD1a<sup>alacsony</sup>/CD25<sup>alacsony</sup>, illetve CD1a<sup>alacsony</sup>/OX40<sup>alacsony</sup> vs. az összes többi alcsoport együttesen).

Az összes vizsgált paramétert (DC-, aktivált T-sejt-markerekkel denzitásértékeket és ezek kombinációit) többváltozós elemzéssel együtt teszteltük egyéb potenciális

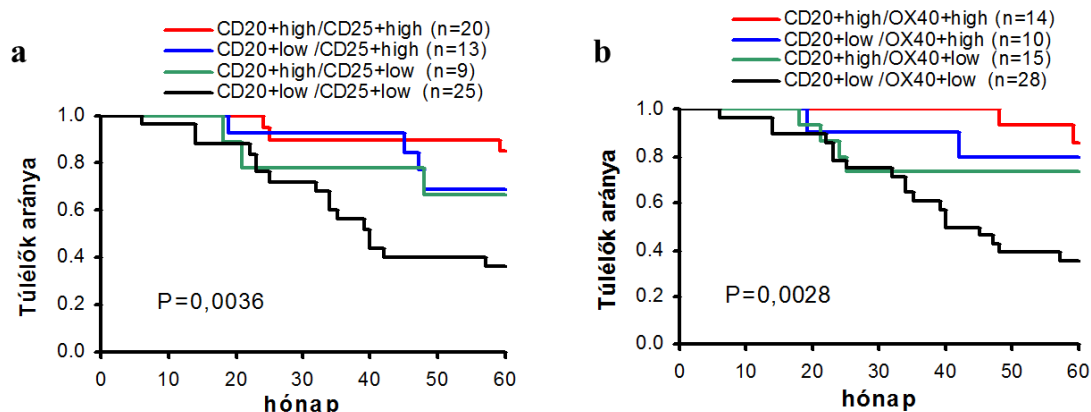
prognosztikai faktorokkal (tumorvastagság, lokalizáció, szövettani típus, kifekélyesedés, a beteg életkora, neme). A DC-LAMP<sup>magas</sup>/OX40<sup>magas</sup> kombináció (relatív kockázat: 0,215, p=0,010) és a tumorvastagság (relatív kockázat: 1,238, p=0,001) bizonyultak a prognózis szignifikáns független prediktorainak.



**12. ábra.** Melanómás betegek Kaplan–Meier túlélési görbéi a DC-k és aktivált T-sejtek peritumorális sűrűségének kombinációja alapján csoportosítva. a) CD1a<sup>+</sup> és CD25<sup>+</sup>, b) CD1a<sup>+</sup> és OX40, c) DC-LAMP<sup>+</sup> és CD25<sup>+</sup>, d) DC-LAMP<sup>+</sup> és OX40<sup>+</sup> sejtek

A **B-sejtek és az aktivált T-limfociták** denzitásértékeinek kombinálásával alkotott alsocsoportok összehasonlításával is elemeztük a túlélési görbéket, melyek mind CD25, mind OX40 esetében szignifikáns különbséget mutattak (p=0,0036, illetve p=0,0028) (**13. ábra**) (130). Az alacsony peritumorális B-sejt-denzitást kombinálva alacsony aktivált T-sejt-számmal mindkét marker esetén megdöbbentően rossz túlélési arányt találtunk (36% 5 éves túlélés, p=0,0004), míg a B-sejt<sup>magas</sup>/aktivált T-sejt<sup>magas</sup> denzitási arányt mutató csoport messze a legjobb 5 éves túlélést mutatta (85% és 86% a CD25 és OX40 markerekre).





**13. ábra.** Melanómás betegek Kaplan–Meier túlélési görbéi a CD20<sup>+</sup> és CD25<sup>+</sup> (a), illetve CD20<sup>+</sup> és OX40<sup>+</sup> (b) sejtek peritumorális denzitása szerint csoportosítva

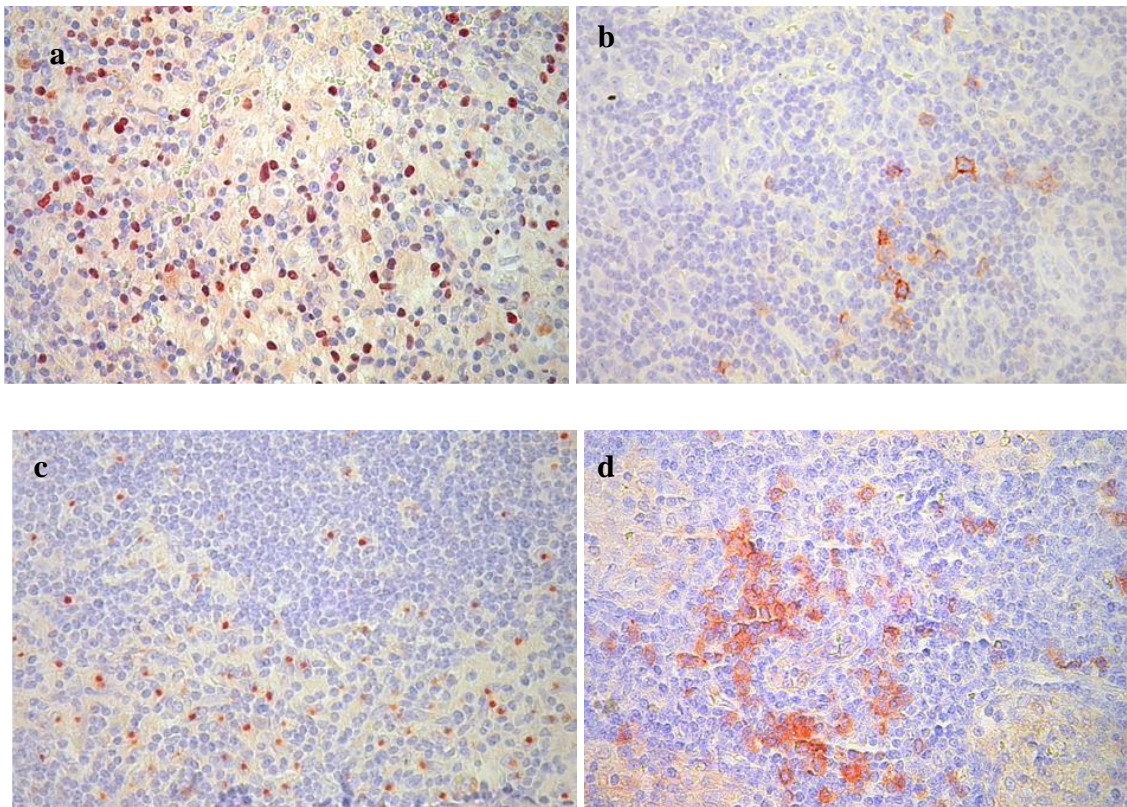
Itt is teszteltük többváltozós elemzéssel az összes vizsgált paramétert (B-limfociták és aktivált T-sejtek denzitása és ezek kombinációi) egyéb beteg-, illetve tumorparaméterekkel együtt (tumorvastagság, lokalizáció, szövettani típus, kifekélyesedés, a beteg életkora, neme). A tumorvastagság (relatív kockázat: 1,275, p=0,000) és a CD20<sup>alacsony</sup>/OX40<sup>alacsony</sup> kombináció (relatív kockázat: 1,696, p=0,001) a rossz prognózis szignifikáns független előjelzőjének bizonyultak.

## 5.2. Órszem nyirokcsomók vizsgálata

### 5.2.1. A vizsgált immunsejttípusok megjelenése a szentinel nyirokcsomókban

Melanómás betegek szentinel nyirokcsomóiból vett mintákban immunhisztokémiai úton mutattuk ki a következő immunsejttípusokat: OX40<sup>+</sup> aktivált T-limfociták, FOXP3<sup>+</sup> regulátor T-sejtek, DC-LAMP<sup>+</sup> érett dendritikus sejtek és CD123<sup>+</sup> plazmacitoid dendritikus sejtek (133). A magi FOXP3-pozitivitást, illetve OX40 membránfestődést mutató limfociták többsége a paracortex T-sejtes állományában diffúzan helyezkedett el. A pontszerű juxtanukleáris DC-LAMP-festődést mutató érett dendritikus sejtek szintén a paracortexben voltak megtalálhatóak, a T-sejtes területeket körülvevé. A CD123<sup>+</sup> plazmacitoid dendritikus sejtek a paracortexben szétszóródva, illetve aggregátumok formájában jelentek meg, legnagyobb részük a HEV-ek mellett, amelyek sejteji szintén CD123-festődést mutattak (**14. ábra**) Az áttétes nyirokcsomók egy részében, főként a kiterjedt metasztázist hordozókban OX40<sup>+</sup> limfociták és DC-LAMP<sup>+</sup>

dendritikus sejtek a metasztázisok szomszédságában is megfigyelhetőek voltak, helyenként még a tumort is infiltrálva. Ezt a jelenséget a FOXP3<sup>+</sup> limfociták és CD123<sup>+</sup> pDC-k esetében jóval kisebb arányban figyeltük meg. Az immunhisztokémiai eredmények kvalitatív elemzése során minden mintában a legtöbb pozitív festődést mutató immunsejtet tartalmazó 5 területet értékeltük nagy nagyítással. A FOXP3<sup>+</sup> limfociták száma volt a legmagasabb (átlag±SD, 2003±720 sejt/mm<sup>2</sup>), ezt követte a DC-LAMP<sup>+</sup> érett dendritikus sejtek (938±280 sejt/mm<sup>2</sup>) és a CD123<sup>+</sup> pDC-k denzitása (650±434 sejt/mm<sup>2</sup>), míg a legkisebb értéket az OX40<sup>+</sup> aktivált T-limfociták adták (100±68 sejt/mm<sup>2</sup>). A különböző sejttípusok denzitásértékei között nem találtunk összefüggést.



**14. ábra.** FOXP3<sup>+</sup>(a), OX40<sup>+</sup>(b), DC-LAMP<sup>+</sup>(c) és CD123<sup>+</sup>(d) sejtek melanómák szentinel nyirokcsomóiban

### 5.2.2. A szentinel nyirokcsomók immunsejtdenzitásának elemzése a klinikopatológiai faktorok függvényében

A jelölt sejtek átlagos sűrűségét értékelve az egyes betegek szentinel nyirokcsomóiban nem találtunk összefüggést a beteg-, illetve tumorparaméterekkel (Breslow-index, hisztológiai típus, ulceráció, tumorlokalizáció, beteg neme, életkora) egyetlen immunsejttípus esetében sem. A küszöbértéknél magasabb átlagdenzitással jellemzett esetek aránya szintén nem mutatott összefüggést a fenti paraméterekkel, azzal a kivétellel, hogy a fiatalabb betegek esetében a CD123<sup>+</sup> sejtek magas átlagos denzitása nagyobb arányban fordult elő (**9. táblázat**).

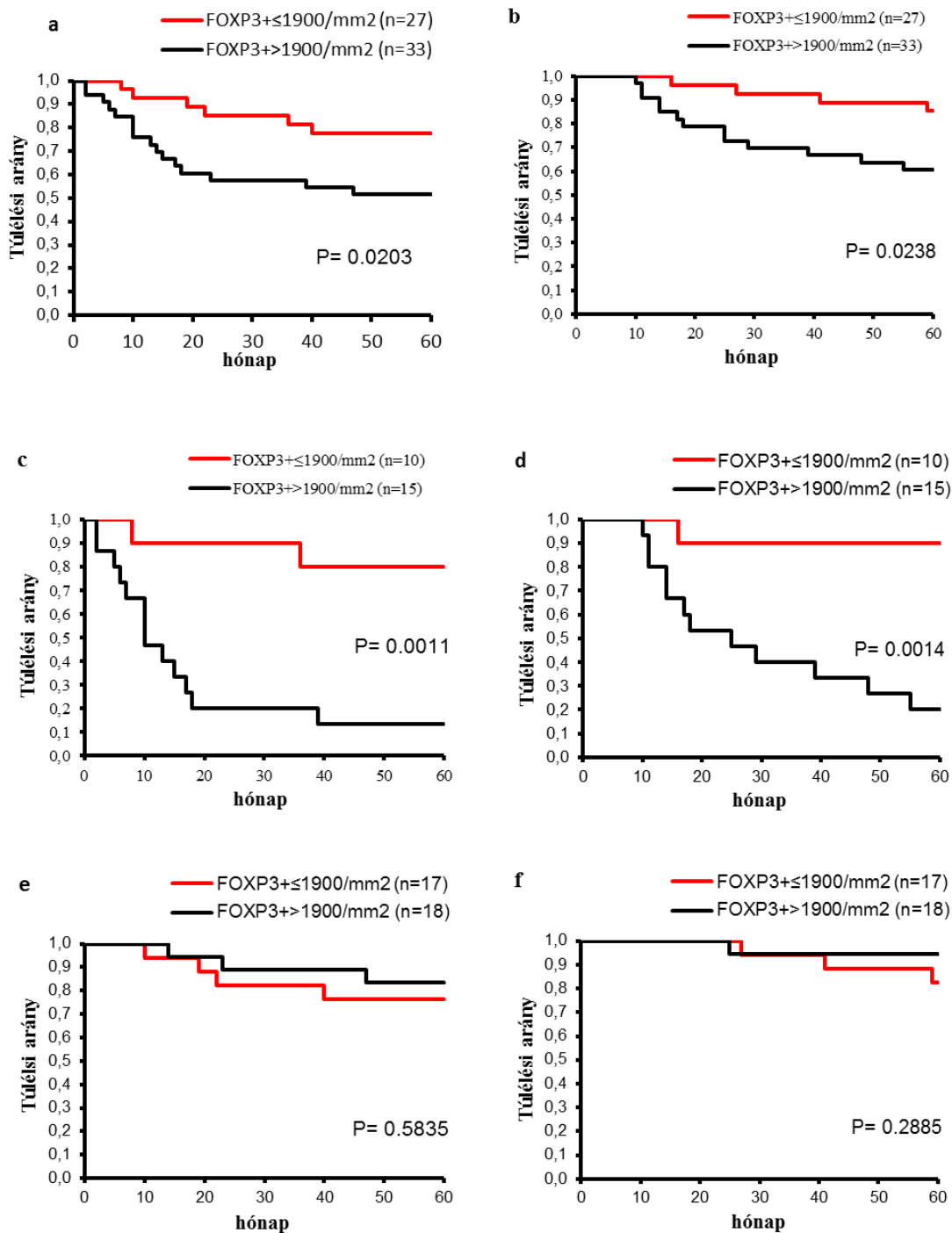
**9. táblázat.** Az egyes immunsejttípusok magas denzitását mutató esetek megoszlása a beteg- és tumorjellemzők függvényében

	Betegszám	FOXP3 (>1900 sejt/mm <sup>2</sup> )		OX40 (>73 sejt/mm <sup>2</sup> )		CD123 (>480 sejt/mm <sup>2</sup> )		DC-LAMP (>936 sejt/mm <sup>2</sup> )	
		No. (%)	p	No. (%)	p	No. (%)	p	No. (%)	p
Összes beteg	60	33 (55)		34 (48)		34 (58)		30 (50)	
Életkor									
<53 év	30	15 (50)		18 (60)		21 (72)		13 (43)	
>53 év	30	18 (60)	n.s.	16 (55)	n.s.	13 (43)	0,0238	17 (57)	n.s.
Nem									
férfi	27	17 (63)		18 (69)		14 (52)		15 (56)	
nő	33	16 (48)	n.s.	16 (48)	n.s.	20 (62)	n.s.	15 (45)	n.s.
Elhelyezkedés									
végtag	31	18 (58)		20 (65)		16 (52)		13 (42)	
törzs	29	15 (52)	n.s.	14 (50)	n.s.	18 (64)	n.s.	17 (59)	n.s.
Szövettani típus									
SSM	37	19 (51)		22 (61)		21 (58)		19 (51)	
NM	19	10 (53)	n.s.	9 (47)	n.s.	13 (68)	n.s.	11 (58)	n.s.
Tumorvastagság (mm)									
1,01-2,0	29	14 (48)		13 (46)		16 (57)		15 (52)	
2,01-4,0	20	11 (55)		14 (70)		13 (65)		8 (40)	
>4,0	11	8 (73)	n.s.	7 (64)	n.s.	5 (45)	n.s.	7 (64)	n.s.
Kifekélyesedés									
van	37	19 (51)		18 (50)		21(58)		20 (54)	
nincs	20	12 (60)	n.s.	13 (65)	n.s.	12 (60)	n.s.	10 (50)	n.s.
SLN-státusz									
negatív	35	18 (51)		19 (54)		19 (56)		16 (46)	
pozitív	25	15 (60)	n.s.	15 (62)	n.s.	15 (60)	n.s.	14 (56)	n.s.

### 5.2.3. A szentinel nyirokcsomók immunsejtdenzitásának összefüggése a betegség progressziójával és a túléléssel

Kaplan–Meier-módszerrel történő elemzés alapján a FOXP3<sup>+</sup> T-sejtek magas átlagos denzitása rövidebb progressziómentes és teljes túléléssel járt (**15. ábra**). Külön értékelve a pozitív, illetve negatív SLN-státuszú eseteket kiderült, hogy ez az eltérés a szentinel-positív esetek alcsoportjában megfigyelhető prominens különbségből adódott;

a szentinel-negatív betegek esetében nem volt túlélésbeli különbség. A többi immunsejtípust tanulmányozva nem találtunk szignifikáns összefüggést a túléléssel.



**15. ábra.** A progressziómentes (a, c, e) és teljes túlélés (b, d, f) Kaplan–Meier-görbéi melanómás betegekben (a, b: összes beteg; c, d: pozitív SLN-státusz; e, f: negatív SLN-státusz) a szentinel nyirokcsomók átlagos FOXP3<sup>+</sup> sejtsűrűsége szerint

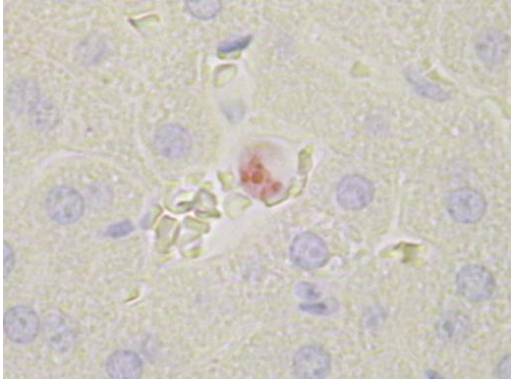
Az immunsejtek – folytonos változóként kezelt – denzitásának lehetséges prognosztikus hatását, egyéb klinikopatológiai faktorokkal együtt (primer tumor vastagsága, lokalizációja, szövettani típusa, kifekélyesedése, SLN-státusz, a beteg neme és életkora) szintén kiértékeljük a Cox-féle regressziós modellben. Az összes eset egyváltozós analízise az ulceráció, Breslow-index, SLN-státusz és hisztológiai típus összefüggését mutatta mind a progressziómentes, mind a teljes túléléssel (progressziómentes túlélés:  $p=0,000$ ,  $p=0,001$ ,  $p=0,003$ ,  $p=0,033$ , teljes túlélés:  $p=0,000$ ,  $p=0,000$ ,  $p=0,002$ ,  $p=0,028$  a felsorolás sorrendjében). Többváltozós modell szerint a kifekélyesedés, Breslow-index, SLN-státusz és a beteg neme volt a túlélés független prognosztikai faktora (progressziómentes túlélés:  $p=0,000$ ,  $p=0,005$ ,  $p=0,005$ ,  $p=0,017$ , teljes túlélés:  $p=0,000$ ,  $p=0,005$ ,  $p=0,016$ ,  $p=0,008$  a felsorolás sorrendjében). A vizsgált immunsejtípusok mennyisége sem a progressziómentes túlélés, sem a teljes túlélés viszonylatában nem mutatott prognosztikai jelentőséget. A pozitív SLN-státuszú betegeket elemezve azonban szignifikáns, vagy majdnem szignifikáns összefüggést találtunk a FOXP3<sup>+</sup> sejtek átlagos denzitása és a túlélés között (egyváltozós elemzéssel  $p=0,054$  és  $p=0,038$ , multivariációs elemzéssel  $p=0,046$  és  $p=0,069$  a progressziómentes és a teljes túlélés tekintetében), az ulcerációval, Breslow-indexszel és a beteg nemével, mint egyéb kovariánsokkal. Az SLN-negatív esetekben csak a tumor szövettani típusa és kifekélyesedése mutatott összefüggést a progressziómentes és a teljes túléléssel.

### **5.3. Kísérleti modell: a nemi különbség az áttétképzésben**

#### **5.3.1. Nemi különbségek a melanómasejtek májkolonizációjában**

Korábbi kísérletünkben két humán melanóma-sejtvonal (HT168 és HT199) lépbe oltást követően jóval magasabb számú májkolóniát adott hím SCID egerekben, mint nőstényekben (124). Jelen vizsgálatunkban (117) HT168-M1 sejtvonalat használtunk, a HT168 variánsát, ami kifejezett májkolonizáló képességgel bír (126); e vonal esetében is feltűnő különbség észlelhető a hím és nőstény állatokban kialakult májkolóniák számában. Megerősítendő, hogy ez a jelenség nem csak SCID egereknél figyelhető meg, B16 egér melanómasejtek C57BL/6 egerek lépébe történő oltásának hatását is teszteltük, ami hasonló különbséget eredményezett a májkolóniák számában a két nem között (átlag $\pm$ SEM: 150 $\pm$ 26 vs. 9 $\pm$ 3).

SCID egér modellben ennek a folyamatnak a kinetikáját meghatározandó, megszámoltuk a proliferáló, Ki-67<sup>+</sup> HT168-M1 sejteket a májban 1 órával, 1 nappal és 1 héttel a tumorsejtek lépbe oltása után (**16. ábra**).



**16. ábra.** *Ki-67-jelölt HT168-M1 humán melanómasejt egérmájban 1 órával a lépbe oltást követően*

Kiderült, hogy a nemi különbség a májkolónia-képzésben az első napon kialakul. Míg 1 órával az oltás után a hím egerek májában a jelölt sejtek denzitása átlagosan csak 27%-kal haladta meg a nőstényekben megfigyelt értéket, 1 nappal később már 3,6-szeres különbséget észleltünk a hímek javára. Az oltás utáni első napon a proliferáló melanómasejtek száma a nőstények májában nyolcadára, míg a hímekében harmadára csökkent. 1 héttel később hasonló különbséget észleltünk a mikroszkopikus tumorsejtkolóniák számában (117).

### **5.3.2. A melanómasejt-kolonizáció nemi különbségének szervszelektivitása**

Vizsgáltuk, hogy a nemek közötti kolonizációs képességbeli különbség megfigyelhető-e a máj mellett más szervek esetében is. Lépbe oltást követően nem találtunk szignifikáns különbséget a léptumorkok tömegében a nőstény és a hím egyedek között egyetlen vizsgálatunk során sem. Az átlagos tumortömegek aránya nőstényekben vs. hímekben 1,05 volt a HT168-M1 és 1,13 a B16 sejtek beoltása után (5-5 különböző kísérlet eredményének átlaga). Továbbá 10<sup>6</sup> HT168-M1 sejt SCID egerek farokvénájába történő beoltása után a tüdőben a tumorkolóniák száma hasonló volt a két nemből (16±5 vs. 20±7 hímekben és nőstényekben) (117).

A kolóniaképzés nemek szerinti különbözőségének szervpreferenciáját egy olyan modellben is vizsgáltuk, amely számos szervben lehetővé teszi a kolóniaképződést. Kétféle emberi melanóma-sejtvonalat (HT186-M1 és HT199) a bal szívkamrába

oltottunk hím és nőstény SCID egerekben, majd összehasonlítottuk a metasztázismintázatot a két nemből, illetve megelőzően kasztrált és álműtött kontroll egerekben. A melanómasejtek kolóniákat formáltak a mellékvesékben, vesékben, csontokban, az agyban és a szívben az állatok 90-100%-ában. Nem találtunk szignifikáns különbséget e szervekben a kolóniák előfordulásában sem a nemek között, sem a kasztrált és intakt állatokban. Szignifikánsan több májkolónia képződött ezzel szemben az álműtött hím egerekben a kasztrált hímekhez, vagy a nőstényekhez (intakt vagy ovariektomizált) képest. Más részről magasabb májajttétszámot figyeltünk meg az ovariektomizált nőstényekben az álműtöttekhez képest a HT199 sejtekkel oltott egerekben, és hasonló, de statisztikailag nem szignifikáns különbséget észleltünk a HT168-M1 vonal esetében (117).

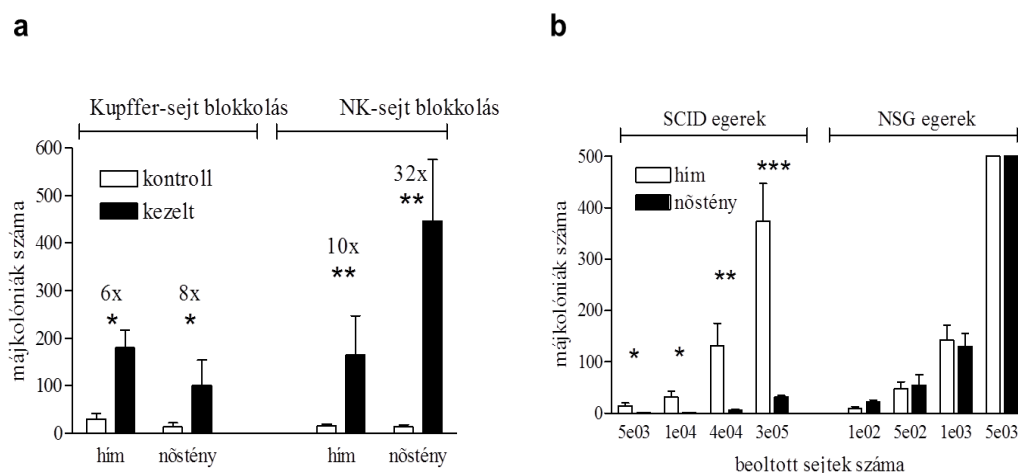
### **5.3.3. A Kupffer- és NK-sejtek szerepe a májkolonizációban**

Munkacsoportunk vizsgálatai szerint a szteroidhormon-receptorok expressziója a melanóma-sejtvonalainkban nagyon alacsony szinten mutatható ki, és ezek a hormonok sem az *in vitro* proliferációt, sem a mátrixadhéziót nem befolyásolták jelentős mértékben (117, 134). Feltételeztük ezért, hogy a nemi hormonok melanómasejtekre gyakorolt direkt hatás helyett közvetett úton, a gazdaszervezeti tényezőkön keresztül fejtik ki hatásukat.

Az észlelt nemi különbség a lép-máj modellben az első napon alakul ki, amikor a proliferáló melanómasejtek száma a nőstényekben nyolcadára, hímekben csak a harmadára csökkent. Feltételeztük, hogy a gazdaszervezet immunmechanizmusai játszhatnak szerepet a szóródó tumorsejtek eliminációjában. A természetes immunrendszer elemei jelen vannak a SCID egerekben is, mind makrofágok (Kupffer-sejtek), mind NK-sejtek nagy számban megtalálhatóak a májban. Ezért olyan kísérletet terveztünk, amely segítségével a Kupffer- és NK-sejtek lehetséges szerepét tudtuk vizsgálni a melanómasejtek májkolonizációs potenciáljában megfigyelt nemi eltérés kialakulásában. A májkolonizációt vizsgáló kísérletekben a Kupffer-sejteket szelektíven gátló gadolínium-kloridot és az NK-sejtek gátlására anti-asialo GM1 antitestet használtunk. Mivel a két nem között óriási különbség volt a májkolónia-képző potenciált tekintve, a nőstény egerekbe 10-szeres mennyiségű sejtet oltottunk, hogy

összehasonlítható májkolóniaszámot kapjunk. A gadolínium-kloriddal előkezelt egerekben a két nemből hasonló mértékben fokozódott a HT168-M1 sejtek kolóniaképzése (**17.a ábra**). Sokkal kifejezettebb növekedés volt azonban megfigyelhető nőstények esetében a hímekkel szemben (32-szeres vs. 10-szeres) anti-asialo GM1 antitesttel való NK-blokkolást alkalmazva, jelezve ezzel az NK-sejtek fontosságát a lépbe oltott melanómasejtek sorsának alakulásában.

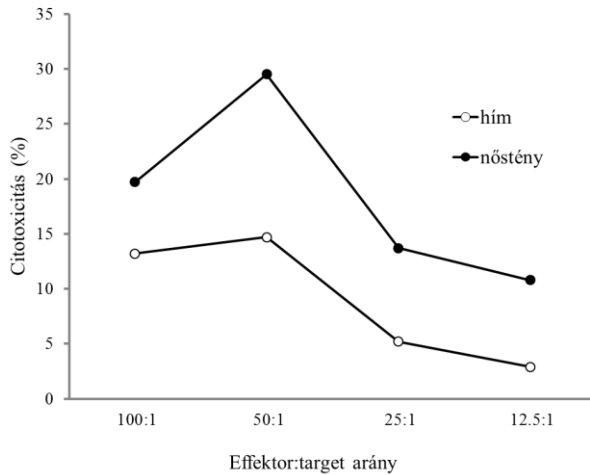
További kísérletekkel alátámasztva az NK-sejtek jelentőségét a melanómasejtek májkolonizációjában megfigyelhető nemi különbség kialakulásában vizsgáltuk a HT168-M1 sejtek kolóniaképzését lépbe oltott hím és nőstény NSG egerekben, amelyek nem rendelkeznek NK-sejt-aktivitással (135), és az eredményeket összehasonlítottuk a SCID egeres kísérletekével. Különböző számú tumorsejt lépbe oltása után a hím SCID egerekben a májkolóniák száma következetesen magasabb volt a nőstényekhez képest, akikben alacsonyabb számú tumorsejt beoltását követően a metasztázisok száma igen alacsony, vagy kimutathatatlan volt. Az NSG egerekben ugyanakkor a kolóniaképzés nem mutatott nemi különbséget a beoltott melanómasejtek mennyiségétől függetlenül (**17.b ábra**) (117).



**17. ábra.** a) Kupffer-, illetve NK-sejtek blokkolásának hatása a HT168-M1 melanómasejtek májkolonizációjára hím és nőstény SCID egerekben. b) HT168-M1 sejtek májkolónia-képzése SCID vs. NSG hím és nőstény egerekben (átlag±SEM; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,001$ )



Végül, *in vitro* citotoxicitási vizsgálatban, effektorként poli(I:C)-vel előkezelt egerek lépsejtjeit használva, bizonyítottuk a nőstény egerekből származó lépsejtek magasabb aktivitását a hím állatok lépsejtjeihez viszonyítva a HT168-M1 melanómasejtekkel szembeni citotoxicitásban (**18. ábra**) (117).



**18. ábra.** Hím és nőstény SCID egerek poli(I:C)-aktivált lépsejtjeinek HT168-M1 melanómasejtek elleni *in vitro* citotoxicitása (2 kísérlet átlaga, ahol 6-6 párhuzamos mintát vizsgáltunk)

## 6. MEGBESZÉLÉS

### 6.1. A primer tumort infiltráló dendritikus sejtek jelentősége

A CD1a<sup>+</sup> dendritikus sejtek és a DC-LAMP markert hordozó érett DC-k denzitását elemeztük malignus melanómákban a klinikopatológiai paraméterekkel összefüggésben. Hasonló számban találtunk CD1a<sup>+</sup> sejteket a melanómasejt-fészkekben és a stromális területen, míg a DC-LAMP<sup>+</sup> sejtek eloszlása jórészt a peritumorális területre korlátozódott. A CD1a<sup>+</sup> DC-k peritumorális és intratumorális, és a DC-LAMP<sup>+</sup> érett dendritikus sejtek peritumorális infiltrációja erős fordított összefüggést mutatott a tumorvastagsággal.

Az érett DC-k stromális elhelyezkedése megfelelt annak, amit más tumoroknál is leírtak (136, 137). Az érési markereket expresszáló DC-k főként a limfocita-aggregátumok mellett a daganat strómájában helyezkedtek el, esetenként klasztert képezve a T-limfocitákkal, amit felfoghatunk a zajló immunválasz jeleként, az antigénbemutatás és a T-sejtek aktiválódása végbemehet a tumor mikro környezetében. A melanómákban az érett DC-k kedvelt lokalizációja a limfocitában gazdag peritumorális terület, mely hasonlóságot mutathat a másodlagos limfoid szövetekkel, ahol az érett DC-k normális esetben előfordulnak. A tumort drenáló nyirokcsomókban a DC-k a primer tumornál jóval nagyobb számban mutathatók ki.

Csökkenő CD1a<sup>+</sup> DC-számot találtunk a legtöbb melanóma felett az epidermisben, ezt más munkacsoportok hasonlóan észlelték (34, 35). Eredményeink szerint ez a jelenség kifejezettebb volt a noduláris melanómák és a vertikális fázis mutató SSM-k felett. Ennek a csökkenésnek az oka még nem ismert; részben magyarázható lehet azzal a ténnyel, hogy még a nem kifehélyesedő epidermis is gyakran atrófiás, vagy hiperkeratotikus a melanómák felett.

A legjobb tudásunk szerint munkacsoportunk elemezte először nagyobb beteganyagban az érett dendritikus sejtek denzitását a tumorparaméterekkel összefüggésben. Később Jensen munkacsoportja 186 beteg primer melanóma anyagán végzett vizsgálata megerősítette a DC-LAMP<sup>+</sup> DC-k mennyisége és a túlélés kapcsolatát (37). Az általunk elemzett primer melanómák DC-denzitálásában nem találtunk eltérést, mikor a tumorokat

szöveti típusuk, lokalizációjuk, avagy a betegek életkora, neme szerint különböztettük meg. A kifekélyesedő tumorok alacsonyabb számú infiltráló DC-t tartalmaztak, valószínűleg a vastagabb tumorokban észlelhető nagyobb kifekélyesedési tendenciának köszönhetően. A követési idő alatt vizcerális metasztázist adó daganatokat alacsonyabb peritumorális DC-denzitás jellemezte. A kifejezett peritumorális DC-infiltráció, főként a DC-LAMP-ot expresszáló érett dendritikus sejteké, hosszabb beteg túléléssel függött össze. A CD1a<sup>+</sup> sejtek esetében ez az összefüggés elveszett, mikor az  $\leq 1$  mm eseteket kizártuk, ami azt sugallja, hogy ezeknek a sejteknek a denzitása a tumor vastagságától függ, direkt összefüggés nélkül a tumorok áttétképzésével vagy a betegek túlélésével. Ezzel ellentétben a kifejezett DC-LAMP<sup>+</sup> érett dendritikus sejtes infiltrátumnak egy- és többváltozós (DC-denzitási értékek és egyéb hagyományos prognosztikus jegyek) elemzéssel prognosztikus szignifikanciája bizonyosodott be.

Munkacsoportunk egy korábbi munkája elemezte melanómákban az aktivált T-sejtek prognosztikus értékét, az OX40<sup>+</sup> limfociták mennyisége a betegség kedvező kimenetele független prediktorának bizonyult. A DC-LAMP<sup>+</sup> érett dendritikus sejtek és az OX40-expresszáló aktivált T-sejtek magas denzitása a betegek egy olyan csoportját különítette el, akik szignifikáns túlélési előnnyel rendelkeztek a többi csoporthoz képest. Többváltozós elemzéssel, ami tartalmazta a DC- és T-sejtaktivációs markereket, ezek kombinációját, ezeken kívül több hagyományos prognosztikai faktort, szintén független túlélési prediktornak bizonyult.

## **6.2. A primer tumort infiltráló B-limfociták jelentősége**

A tumort infiltráló limfociták tipizálására, illetve funkcionális aktivitására irányuló vizsgálatok túlnyomó többsége a T-limfocitákra összpontosított, a tumort infiltráló B-sejtekről viszont jóval kevesebbet tudunk. Bár a T-limfociták kétségtelenül túlsúlyban vannak a melanómák infiltrátumában, 106 fős mintánk nagy részében jelentős számú B-limfocitát találtunk főként a peritumorális infiltrátumban, míg a tumorsejtfészkekben jelenlétük igen csekély volt. A B-sejtek gyakoriságát az összes infiltráló sejt viszonylatában nem értékeltük közvetlenül, de korábbi munkánk alapján (56) a B- és T-

sejtek denzitási értékeinek összehasonlításával 16%-os eredményt kapunk a B-limfociták prevalenciájára, mely hasonló más vizsgálatok eredményéhez (55, 69).

Bár néhány korábbi tanulmány értékelte a B-limfocita-infiltráció mértékét egyes válogatott melanómajellemzők alapján (55, 69), a legjobb tudásunk szerint a mi munkánk volt az első, amely nagyszámú mintán átfogó elemzést végzett a B-sejtek és számos klinikopatológiai faktor közötti összefüggés vizsgálatára. A CD20<sup>+</sup> limfociták száma nem mutatott összefüggést a tumorparaméterekkel, egyetlen kivételtől eltekintve: a törzsi és feji lokalizációjú melanómák szignifikánsan több peritumorális B-sejtes infiltrátumot tartalmaztak, mint a végtagiak.

Vizsgálatunk során jelentős mennyiségű B-limfocita-infiltrátumot, sőt néhány esetben kifejezetten denz területeket találtunk primer kután melanómákban. Hasonlóan jelentős mértékű B-sejtes infiltrációt írtak le több tumor esetében is (66, 138-140). Nem tisztázott, hogy a B-limfociták emelkedett száma az antigénspecifikus humorális immunválasz következménye, vagy a tumoros mikrokörnyezet gyulladásozó kemoattraktánsai hatására jelenik meg. Számos daganattípusban antigénszelektált B-sejtes immunválasz jeleit detektálták a tumorszövet immunglobulingén-elemzésen alapuló vizsgálatával (139, 141-145). Tumorreaktív B-sejteket klónoztak számos emberi tumorból, köztük melanómákból (146-148).

Több nemrégiben publikált közleményben is hangsúlyozták a daganatok mikrokörnyezetében is megtalálható, B-sejt-follikulusokhoz asszociált T-sejtcsoportokból összetevődő ún. harmadlagos limfoid struktúrák potenciális jelentőségét (149-152). Ezekhez kapcsolódva érett dendritikus sejteket is kimutattak, melyek magas denzitása kedvező beteg túléléssel függött össze. Hasonló struktúrákat, B-sejt-follikulusokat figyeltek meg több ráktípusban, többek között kolorektális, hepatocelluláris, emlő- és ováriumkarcinómában (139, 145, 153-155), de ezt a jelenséget még nem írták le primer bőrmelanómákban, csak áttétekben (156, 157).

A B-sejt-aggregátumoknak a melanómaminták kb. egynegyedében megfigyelt jelenlétét nagyobb esetszámra kiterjesztett újabb vizsgálatunkban megerősítettük (132); a minták 27%-ában (39/147 esetben) figyeltük meg a B-limfociták follikulusszerű struktúrákba

rendeződését. Az egyéb tumortípusokon, illetve melanómaáttéteken tett megfigyelésekkel (139, 145, 149, 153, 154, 156) összhangban a B-sejtek klaszterei primer melanómákban is T-sejtekkel asszociáltan helyezkedtek el, és CD21<sup>+</sup> folliculáris DC-hálózat a vizsgált minták kb. harmadában volt kimutatható. Néhány esetben DC-LAMP<sup>+</sup> érett dendritikus sejteket is észleltünk a T-sejtcsoportokon belül, jelenlétük azonban nem korlátozódott az ektópiás limfoid struktúrák területére, ellentétben a tüdőrákban megfigyeltekkel (149). Tüdőrákban a magas endotéllel rendelkező venulák (HEV) is kizárólag az ektópiás nyirokszövetekhez kapcsolódva voltak megtalálhatóak (158), míg az általunk vizsgált primer melanómákban a MECA-79-jelölt HEV-szerű venulák jelenléte a B-sejtfolikulust nem tartalmazó tumorok limfocitagazdag területein is kimutatható, más, primer melanómán tett megfigyelésekhez hasonlóan (132, 156, 159).

A B-sejtes infiltráció, illetve az ektópiás limfoid struktúrák jelenlétének klinikai jelentősége még nem tisztázott, és szintén vita tárgyát képezi, hogy a szisztémás B-sejt-válasz, vagy az *in situ* B-sejt-akkumuláció befolyásolja-e a daganatok biológiai viselkedését. Egyes állatkísérletes modellekben a B-limfociták fokozták a daganatnövekedést vagy -progressziót (63, 64), más vizsgálatok azonban ezzel ellenkező eredményre vezettek (65). Az ellentmondó eredmények háttérében a B-limfociták funkcionális diverzitása állhat (66): képesek fokozni a tumornövekedést antitestek, immunkomplexek, vagy egyéb immuninhibitor anyagok termelésén keresztül, ugyanakkor potens antigénprezentáló sejt-ként is funkcionálhatnak, elősegítve a tumorelleses T-sejt-választ. A CD4<sup>+</sup> T-sejt-aktiváció egyik javasolt mechanizmusa az aktivált B-limfociták által expresszált OX40-ligandumon keresztüli kostimuláció (160). Kifejezett összefüggést találtunk a B-sejtek és az aktivált – különösen az OX40 markert expresszáló – T-sejtek denzitása között, valamint ezek kolokalizációja felveti annak lehetőségét, hogy a B-sejtek szerepet játszanak az antigénprezentációban és a T-limfociták kostimulációjában primer melanómákban.

Vizsgálataink szerint a B-sejt-aggregátumok megjelenése nem mutatott összefüggést a metasztatizáló képességgel, illetve a betegek túlélésével, bár valamivel gyakoribbak voltak a vastagabb melanómákban. A B-limfociták denzitása ezzel szemben (mind

intra-, mind peritumorális lokalizációban) korrelált a betegek túlélésével. A dendritikus sejteken végzett vizsgálatainkhoz hasonlóan értékeltük a B-sejtek és aktivált T-limfociták denzitásértékei kombinációjának a prognosztikus hatását is, ami jelentősen különböző túlélésű betegcsoportokat eredményezett; az alacsony B- és egyidejűleg alacsony aktivált T-sejt-denzitás kirívóan rossz prognózist vetített elő.

### **6.3. A primer tumort infiltráló FOXP3<sup>+</sup> regulátor T-sejtek jelentősége**

A FOXP3<sup>+</sup> sejtek előfordulása a melanómamintákban sokkal gyakoribb volt a stróma limfocitagazdag területein, mint a tumorsejtfészkekben, hasonlóan a más tumortípusoknál észleltekhöz (161, 162). A FOXP3-festődés túlnyomó többsége kis limfocitákban volt kimutatható; nem végeztünk kettős jelölést annak érdekében, hogy pontosabban karakterizáljuk a jelölt sejteket. A FOXP3 nem abszolút specifikus Treg-marker, minthogy aktiváció hatására átmenetileg expresszálódik mind CD4<sup>+</sup>, mind CD8<sup>+</sup> T-sejteken, jelenleg mégis ezt a Treg-sejtek fejlődése és funkciója szempontjából kritikus transzkripciós faktort tartják e sejtek legmegbízhatóbb immunhisztokémiai markerének. Leírták, hogy a humán FOXP3 megjelenése az aktivációs állapot következménye, felelős az anergiás fenotípusért, de nem szükséges a regulátor funkcióhoz (58, 163-167). Az eddigi irodalmi adatokból mindazonáltal úgy tűnik, hogy a humán tumorokban található FOXP3<sup>+</sup> limfociták túlnyomó többsége CD4<sup>+</sup> T-sejt és szuppresszor aktivitással rendelkezik (167-172).

A primer melanómákat infiltráló FOXP3<sup>+</sup> limfociták, úgy tűnik, nem gyakorolnak a betegség későbbi kimenetelét befolyásoló szuppresszor aktivitást. A túlélésre gyakorolt hatás hiányát illetően eredményeink megfelelnek egy korábbi, kisebb esetszámra támaszkodó beszámolóknak (55), mely nem elemezte azonban a Treg-infiltráció klinikopatológiai paraméterekkel való összefüggését. Vizsgálatunk szerint a FOXP3<sup>+</sup> sejtek mennyisége nem mutatott összefüggést egyetlen tanulmányozott klinikopatológiai paraméterrel (a beteg életkora, neme, tumorvastagság, lokalizáció, szövettani típus, kifekélyesedés), és a betegség kimenetelével sem.

#### **6.4. A különböző immunsejttípusok jelentősége a szentinel nyirokcsomókban**

Retrospektív tanulmányunkban több immunsejttípus denzitását vizsgáltuk malignus melanómában szenvedő betegek őrszem nyirokcsomóiban: OX40<sup>+</sup> aktivált T limfocitákat, FOXP3<sup>+</sup> regulátor T-sejteket, DC-LAMP<sup>+</sup> érett dendritikus sejteket és CD123<sup>+</sup> plazmacitoid dendritikus sejteket. Az eredményeket a beteg- és tumorparaméterekkel, valamint a betegség kimenetelével összefüggésben értékeltük.

Beteganyagunkban a DC-LAMP<sup>+</sup> érett dendritikus sejtek, a CD123<sup>+</sup> pDC-k és az OX40<sup>+</sup> aktivált T-sejtek denzitása nem mutatott szignifikáns összefüggést a betegség progressziójával vagy a túléléssel. A plazmacitoid DC-k, illetve az aktivált T-sejtek őrszem nyirokcsomókban meghatározott mennyiségének potenciális prognosztikai jelentőségéről nem közöltek tanulmányt egyetlen tumortípusban sem. Egy tanulmányban melanómák pozitív szentinel nyirokcsomóiban a DC-LAMP<sup>+</sup> dendritikus sejtek akkumulációja gyenge, bár statisztikailag szignifikáns hatást mutatott a túlélésre, de nem bizonyult független prognosztikai faktornak (92).

Mint az előbbieken ismertettük, a primer melanómákat infiltráló FOXP3<sup>+</sup> T-limfociták mennyisége nem mutatott összefüggést a betegség kimenetelével, e sejtek számának meghatározása a szentinel nyirokcsomókban ezzel szemben adhat információt a prognózisról. Magas átlagos denzitásuk szignifikánsan rövidebb progressziómentes és teljes túléléssel mutatott összefüggést. Tanulmányunk új és érdekes megfigyelése, hogy a FOXP3<sup>+</sup> sejtek magas SLN-átlagdenzitása csak a pozitív szentinelstátuszú betegekben volt összefüggésben a betegség progressziójával és rövidebb túléléssel. Továbbá, egy- és többváltozós Cox-regressziós analízissel értékelve az átlagos sejtdenzitás-értékeket, mint folytonos változót, összefüggés csak a pozitív szentinelstátuszú betegekben mutatkozott, a szentinelnegatív esetekben, illetve a teljes beteganyagot figyelembe véve nem. Speeckaert és csoportjának egy újabb keletű tanulmánya szerint sem sikerült bizonyítani a FOXP3<sup>+</sup> sejtek független prognosztikai szerepét melanómás betegek szentinel nyirokcsomóiban (90). Bár a szentinelnegatív és mégis progrediáló eseteink száma igen alacsony volt (7 beteg), ami elméletben befolyásolhatta az összehasonlítás eredményét, a különbség a progressziómentes és a teljes túlélés tekintetében sokkal

nagyobb volt az SLN-pozitív esetekben az egész vizsgált csoporthoz képest. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a Treg-ek szuppresszor funkciója hatásosabb a metasztatikus nyirokcsomókban, legalábbis amennyire ez a betegség kimenetelének befolyásolásában megnyilvánul. A különbség oka lehet a viszonylag nagyszámú Treg jelenléte a pozitív nyirokcsomókban, ahogy ezt néhány tanulmány említi (89, 90, 173, 174), vagy a tumorspecifikus immunreakció fokozott aktivitása a tumorantigének jelenlétében.

Az általános nézet szerint a tumorelles T-sejt-válasz beindítása elsősorban a drenáló nyirokcsomókban történik a primer tumorban antigéneket befogó dendritikus sejtek nyirokcsomókba vándorlása után, az ún. keresztprezentáció révén. Kísérleti modellben leírták azonban a T-limfociták tumorsejtek általi direkt aktivációját is nyirokcsomókban (175, 176). Melanómás betegekben a melanocitadifferenciációs antigén epitópokat felismerő perifériás vér CD8<sup>+</sup> T-sejtek előfordulási gyakoriságát magasabbnak találták III-as és IV-es stádiumban az I-es és II-es stádiumokhoz viszonyítva, ami a nyirokcsomó-metasztázis kialakulásának fontosságát jelzi a T-sejtek által közvetített tumorelles immunválasz indukálásában (177). A dendritikus sejtek általi T-sejt-aktiváció ugyanakkor extranodálisan, a tumorban is kialakulhat (178). Ezzel a felfedezéssel egyetértésben, egy T-sejt-klonotípusokat elemző tanulmány szerint a T-sejtek többsége a tumormentes nyirokcsomókban nem mutatott klonális expanziót, ellentétben a primer melanómákkal és áttétekkel (179, 180).

Ezek tükrében eredményeink a melanómás betegeknél a primer tumorban és az áttétes nyirokcsomókban meghatározott immunmarkerek fontosságát jelezhetik. Az eredményeinket jelentős számú melanómás beteg nyirokcsomó-mintáinak retrospektív elemzésére alapoztuk. Ahhoz, hogy teljesebb képet kapjunk a nyirokcsomók immunológiai sajátosságairól és az immunmarkerek prognosztikai értékéről, nagyobb beteganyagon végzett prospektív tanulmányok szükségesek.

#### **6.5. Kísérleti modell: a nemi különbség az áttétképzésben**

Munkacsoportunk korábbi, a HT168 és HT199 melanóma-sejtvonalakkal végzett kísérleteinek eredményeit (124) megerősítette a kifejezett metasztatikus képességgel



bíró HT168-M1 sejtek lépbe oltásának eredménye, amennyiben meglepő különbséget észleltünk hím és nőstény SCID egerek között a kialakult májkolóniák számában.

Vizsgálatainkban az emberi melanómasejtek esetében a nemi különbség az első napon megjelent a lép-máj metasztatízis modellben. Proliferáló melanómasejteket vizsgálva azt találtuk, hogy az oltást követő első napon a májban e sejtek száma a hímekben harmadára, míg a nőstényekben nyolcadára csökkent. A 7. napon talált mikroszkopikus kolóniák száma megközelítően megegyezett az első napon Ki-67-pozitivitást mutató sejtek számával, azt sugallva, hogy a legtöbb proliferáló melanómasejt képes volt kolóniaképzésre.

Nem találtunk nemi különbséget a primer tumor tömegében lépbeoltást követően, sem a tüdőkolóniák számában HT168-M1 melanómasejtek intravénás oltását követően. Az intrakardiális oltás számos szervben kolóniaképzést eredményezett, azonban csak a májban észleltünk különbséget a két nem között: több kolóniát találtunk a hímekben a nőstényekhez képest, és az orchidektómia csökkentette, az ovariektómia pedig növelte ezek számát. Az ovariektómia hatása kevésbé tűnik szignifikánsnak, mint az orchidektómiáé, különösen a HT168-M1 sejtvonal esetében. Ennek egy lehetséges magyarázata a gonadális ösztrogénszintézis kiesését kompenzáló extragonadális aromatazaktivitás. A jelenség hátterét vizsgálva azonban humán melanómasejtekben sem fehérje-, sem RNS-szinten nem tudtunk számottevő nemihormon-receptor expressziót kimutatni (117, 118). *In vitro* kísérletekben a nemi hormonok nem befolyásolták sem a proliferációt, sem a mátrixadhéziót. Más tanulmányok szerint sem hatott az ösztrogénkezelés a humán melanómasejtek proliferációjára (115, 116, 181). Egy lehetséges magyarázat a melanómasejtek különböző kolóniaképző képességére a 2-metoxiösztradiol (2ME<sub>2</sub>) növekedést gátló hatása, ami egy endogén ösztrogénmetabolit, mely főként a májban termelődik és ösztrogénreceptortól független aktivitású. Munkacsoportunk egy korábbi tanulmányában bemutatta, hogy a 2ME<sub>2</sub> *in vitro* és *in vivo* gátolja a melanómasejtek növekedését apoptózist indukálva és megállítva a sejtosztódási ciklust (125). Bár a 2ME<sub>2</sub>-koncentráció különbsége magyarázhatja a hím és nőstény egerek közötti májkolonizációs különbségre vonatkozó eredményeinket és az

ovariectómia utáni kolóniaszám-emelkedést, nem valószínű, hogy felelős lehet a hím egerekben orchidektómiát követően megfigyelt drámai kolóniaszám-csökkenésért.

Az a tény, hogy a nemi hormonok direkt módon nem befolyásolták a melanómasejteket, azt sugallja, hogy ezek indirekt hatást gyakorolnak a gazdaszervezet befolyásolásán keresztül. Bizonyították a nemi hormonok hatását a legtöbb immunsejt differenciációjára és működésére. Ennek a jelentősége az emberi melanómákban azonban nem ismert. A melanómák szövettani regressziója gyakoribb férfiakban, mint nőkben (104, 182). Munkacsoportunk korábbi vizsgálata szerint az intratumorális makrofáginfiltráció jelentősebb volt a férfiakban, mint a női betegekben (56), viszont a dendritikus sejtek, a T- és B-limfociták denzitásában nem mutatkozott szignifikáns különbség (56, 57, 129, 130). Mindent összevetve, igen kevés bizonyítékát találtuk annak, hogy a specifikus immunrendszer működésére tett endokrin hatásoknak szerepe lenne a melanómák kimenetelének nemtől függő különbségeiben. A melanómasejtek immundeficiens SCID egerekben észlelt nemtől függően eltérő májkolóniaképző képessége sem tudható be a specifikus immunrendszer különbözőségének.

A proliferáló melanómasejtek mennyiségének a vizsgálatunkban az oltást követő első napon megfigyelt csökkenése mindenesetre a gazdaszervezet védekező mechanizmusainak szerepét jelzi. Mivel a természetes immunrendszer elemei megtalálhatóak a SCID egerekben, azt feltételeztük, hogy a Kupffer-, vagy NK-sejtek tehetők felelőssé a tumorsejtek gyors eliminációjáért. Mindkét sejttypusról leírták, hogy gátolja a májmetasztázisok kialakulását és növekedését (183-185).

A Kupffer-sejtek, a májban található makrofágok, akutfázis-reakcióval válaszolnak különböző stresszhatásokra (gyulladás, sérülés, karcinogének általi tumorindukció). Az aktivált Kupffer-sejtek által termelt IL-6 mennyisége hím egerekben magasabbnak mutatkozott a nőstényekéhez képest, amit felelőssé tettek egy kémiai hepatokarcinogenezis modellben észlelt nemi különbségekért (186). Kísérleteinkben az állatok előkezelése a Kupffer-sejteket gátló gadolínium-kloriddal a HT168-M1 sejteknek a két nemből egyforma mértékben fokozódó májkolóniaképzésével járt, ami valószínűtlenné teszi, hogy a magasabb kolóniaképző potenciált hímekben a Kupffer-

sejtek működésbeli különbsége magyarázná. Végeztünk kísérletet összehasonlítandó a B16 melanómasejtek kolóniaképzését hímeekben és nőstényekben IL-6-knockout egerekben (B6.129S2-Il6tm1Kopf/J). Az eredmény hasonló volt, mint C57BL/6 egerekben (Ladányi, nem közölt adat), ami azt jelzi, hogy ebben a modellben az IL-6 valószínűleg nem vesz részt a melanómasejtek májkolonizációjabeli nemi különbség kialakulásában.

NK-sejtek nagy számban találhatóak a májban, a hepatikus limfociták jelentős populációját képezik. Ezek a veleszületett immunrendszer első védelmi vonalát jelentik a patogéninfekciók és a tumorok ellen, és szabályozói az adaptív immunrendszer működésének. Sem emberben, sem egerekben nem tisztázott az összefüggés az NK-sejtek száma vagy aktivitása és a hormonszint, vagy a nemi jelleg között (187).

Eredményeink az NK-sejtek kifejezettebb hatását mutatják a melanómasejtek májkolónia-képzésére nőstény egerekben, mint hímeekben. Ez azt sugallja, hogy az NK-sejtek szerepet játszhatnak a májbéli kolóniaképző tulajdonság határfokában észlelt, nemek közötti különbségben, legvalószínűbben azzal, hogy hozzájárulnak a disszeminált tumorsejtek eliminációjához. Az NK-sejtek szerepét támogatta a nemek közötti különbség hiánya NSG egerekben, amelyek NK-aktivitásra nézve deficiensek (135). Korábbi tanulmányok eredményeivel egyezően (188, 189), ezek az állatok kifejezetten fogékonyak a melanómasejtek kolonizációjára. Az NK-sejtek lehetséges *in vitro* hatását vizsgálva citotoxicitási tesztet végeztünk poli(I:C)-aktivált lépsejtekkel a HT168-M1 melanómasejtekkel szemben, ami a nőstények lépsejtjeinek magasabb effektor citotoxikus aktivitását mutatta.

A természetes effektorsejtek jelenlétét leírták más nem limfoid szervekben, többek között a tüdőben is, ahol a májhoz hasonlóan szerepet játszanak a metasztatizálás kontrollálásában (183). Így tehát az NK-sejtek aktivitásában lévő potenciális különbség valószínűleg nem tehető önmagában felelőssé a májkolonizációban igen, de a tüdőkolonizációban nem észlelt nemi különbség kialakulásáért. A májban megfigyelt kolóniakialakulás nemi különbségének jelentőségét kiemeli az a tény, hogy a máj a leggyakrabban érintett szerv számos emberi tumor, többek között a melanóma

disszeminációjában. Eredményeink azonban nem extrapolálhatók automatikusan az emberi melanómák viselkedésére, minthogy nem publikáltak még nemtől függő szervpreferenciát a melanómás betegek áttétképzésében. A fajok közötti potenciális eltérés oka nem ismert, és némiképp korlátozza eredményeink interpretálását e tekintetben. Mindazonáltal úgy gondoljuk, hogy a megfigyeléseink új elemeket tesznek hozzá a daganatok áttétképzésének bonyolult kirakósjátékához.

## 7. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A primer melanómák területén az infiltráló immunsejtek esetében a DC-LAMP<sup>+</sup> érett dendritikus sejtek nagy mennyisége szignifikánsan jobb prognózissal függött össze. A dendritikus sejtek és az aktivált T-limfociták együttes magas denzitása a jó prognózis szignifikáns független prediktorának bizonyult.

A B-sejtes infiltrátum mennyisége és a prognózis között szintén pozitív kapcsolatot találtunk. A B-sejtek alacsony peritumorális denzitása kombinálva alacsony aktivált T-sejtszámmal a rossz prognózis szignifikáns független előjelzője volt.

2. A FOXP3<sup>+</sup> regulátor T-sejteknek melanómás betegek őrszem nyirokcsomóiban meghatározott magas átlagos denzitása a szentinel-pozitív esetek alcsoportjában a betegség progressziójával és rövidebb túlélési idővel mutatott összefüggést, azonban e sejtek szentinel-negatív betegek őrszem nyirokcsomóiban, illetve a primer melanómákban mért denzitása esetében nem találtunk kapcsolatot a túléléssel.

A többi vizsgált immunsejttípus: az OX40<sup>+</sup> aktivált limfociták, a DC-LAMP<sup>+</sup> érett dendritikus sejtek és a CD123<sup>+</sup> plazmacitoid dendritikus sejtek mennyisége a szentinel nyirokcsomókban nem mutatott prognosztikus szignifikanciát.

3. Preklinikai modellben a humán melanómasejtek magasabb arányú kolóniaképzését figyeltük meg hím SCID egerekben a nőstényekhez képest a májban, de a többi szervben nem. A nemi különbség már a kolóniaképzés korai szakaszában megjelent. Az NK-sejtek lehetséges szerepére utal, hogy gátlásuk hatása erősebb volt a nőstény egerekben, valamint az NK-aktivitásra nézve deficiens NSG egereken végzett kísérletekben nem észleltünk különbséget a hímek és nőstények között a melanómasejtek májkolonizációs képességében.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A melanómák szerves részét képező gazdaszervezeti sejtek, ezen belül a veleszületett és adaptív immunválasz létrehozásában közreműködő sejtek pozitív és negatív hatást is gyakorolhatnak a betegség kimenetelére. A hatékony immunválasz kialakulása csökkenti a daganatok progressziójának, metasztázisaik kialakulásának valószínűségét, így a betegség kimenetelét kedvezően befolyásolja. Az immunsejtes infiltrátum prognosztikai szerepét tanulmányoztuk melanómákban. Eredményeink a primer tumorban és a pozitív szentinelstátuszú betegek nyirokcsomóiban meghatározott immunmarkerek fontosságát jelzik. Megfigyeléseink alapján a leghatékonyabb antigénprezentáló sejtnak tartott dendritikus sejtek és a B-sejtek magas denzitása, illetve az aktivált T-limfocitákkal együttes kifejezett infiltrációja, mint a működő immunválasz jelei a legjobb prognózist jelentették az 5 éves utánkövetési periódusban. Eredményeinkből következtethetünk arra, hogy az antigénbemutatás és a T-sejtek aktiválódása végbemehet a tumor mikro környezetében is. Vizsgálataink azt jelezték, az általunk vizsgált immunaktivációs markerek szerepe a betegek prognózisát tekintve nagyobb a primer tumorban, mint a szentinel nyirokcsomókban. Kivételt képeznek a FOXP3<sup>+</sup> T-limfociták, magas átlagos denzitásuk a pozitív szentinel státuszú betegekben szignifikánsan rövidebb progressziómentes és teljes túléléssel mutatott összefüggést.

A melanómák progressziójában a nemi különbségek szerepét vizsgálva magasabb májkolonizációs arányt találtunk hím egerekben nőstényekhez viszonyítva. Korábbi munkáink az immunrendszer szerepét valószínűsítették. Jelen vizsgálataink az NK-sejtek részvételét jelzik a kolonizáció hatásfokának meghatározásában és felvetik a természetes védekező mechanizmusok szerepét a melanómás, illetve más tumoros betegek túlélésében megfigyelhető nemi különbség kialakulásában.

A daganatok várható progressziójának megítélésében, a kezelések stratégiájának kidolgozásában egyelőre az immunológia által nyújtott lehetőségek nem foglalnak el kitüntetett szerepet, pedig valószínű, hogy a szervezet védekezőképessége és reakciókészsége sokkal jelentősebb, mint ahogy ezt jelenleg figyelembe vesszük.

## 9. SUMMARY

Host cells representing an integral component of melanomas, among them cells contributing to the development of native and adaptive immune responses, can exert both positive and negative effects on the outcome of the disease. Evolving efficient immune response can reduce the chance of tumor progression and metastasis formation hence the outcome of the disease is more favorable. We investigated the prognostic importance of immune cell infiltrate in melanoma patients. Our results suggest the importance of the studied immune markers in the primary tumors and in the tumor positive sentinel lymph nodes. Our results indicate that a prominent infiltration of dendritic cells, B cells and activated T lymphocytes in malignant melanoma, as signs of a functional immune response, can be considered as a favorable prognostic factor. According to our results we could conclude that antigen presentation and T cell activation may occur in the tumor microenvironment. Furthermore, our findings on the prognostic value of immune activation-associated markers suggest that these markers, except FOXP3<sup>+</sup> T lymphocytes, in the primary tumor may have a higher impact on the prognosis of the patients than the studied markers in sentinel lymph nodes. High mean density of FOXP3<sup>+</sup> T lymphocytes, only in cases with positive SLN status, was associated with significantly shorter progression-free and overall survival.

Investigating the role of gender difference in melanoma progression, we observed a higher rate of colony formation in male compared to female mice. Our previous results indicate a contribution of host immune defense mechanisms. Our results support a role of NK cell involvement in determining the efficiency of colonization, and provide a mechanism that may be involved in the development of gender differences in survival of patients with melanoma and possibly those with other tumor types as well.

In predicting tumor progression and designing more effective therapeutic strategies of malignant melanoma the possibilities provided by immunology are mostly ignored, even though the host immune defense system and antitumor immune response are more important than we consider at the moment.

**10. IRODALOMJEGYZÉK**

1. Arnold M, Holterhues C, Hollestein LM, Coebergh JW, Nijsten T, Pukkala E, Hollecsek B, Tryggvadóttir L, Comber H, Bento MJ, Diba ChS, Micallef R, Primic-Žakelj M, Izarzugaza MI, Perucha J, Marcos-Gragera R, Galceran J, Ardanaz E, Schaffar R, Pring A, de Vries E. (2014) Trends in incidence and predictions of cutaneous melanoma across Europe up to 2015. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 28: 1170-1178.
2. Marzuka-Alcalá A, Gabree MJ, Tsao H. (2014) Melanoma susceptibility genes and risk assessment. *Methods Mol Biol*, 1102: 381-393.
3. Dahlke E, Murray CA, Kitchen J, Chan AW. (2014) Systematic review of melanoma incidence and prognosis in solid organ transplant recipients. *Transplant Res*, 3: 10.
4. Rastrelli M, Alaibac M, Stramare R, Chiarion Sileni V, Montesco MC, Vecchiato A, Campana LG, Rossi CR. (2013) Melanoma m (zero): diagnosis and therapy. *ISRN Dermatol*, 2013: 616170.
5. Gilde K, Plótár V, Remenár É, Vízkeleti J, Hunyadi J, Liskay G. Melanoma malignum. In: Kásler M (szerk.), *Az onkológia alapjai*. Medicina, Budapest, 2011, pp. 943-962.
6. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. (2009) Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 27:6199–6206.
7. Smoller BR. (2006) Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma. *Mod Pathol*, 19: S34-S40.
8. Somlai B. Melanoma malignum. In: Kárpáti S, Kemény L, Remenyik É (szerk.), *Bőrgyógyászat és venerológia*. Medicina, Budapest, 2013, pp. 753-765.
9. Perrott RE, Glass LF, Reintgen DS, Fenske NA. (2003) Reassessing the role of lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy in the management of cutaneous malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*, 49: 567-588.



10. Bremnes RM, Al-Shibli K, Donnem T, Sirera R, Al-Saad S, Andersen S, Stenvold H, Camps C, Busund LT. (2011) The role of tumor-infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 6: 824-833.
11. Udagawa T, Wood M. (2010) Tumor-stromal cell interactions and opportunities for therapeutic intervention. *Curr Opin Pharmacol*, 10: 369-374.
12. Döme B, Hendrix MJ, Paku S, Tóvári J, Tímár J. (2007) Alternative vascularization mechanisms in cancer: pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol*, 170: 1-15.
13. Quatresooz P, Reginster MA, Piérard GE. (2011) 'Malignant melanoma microecosystem': Immunohistopathological insights into the stromal cell phenotype. *Exp Ther Med*, 2: 379-384.
14. Wilson WR, Hay MP. (2011) Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 11: 393-410.
15. Prechl J. Tumorimmunológia. In: Erdei A, Sármay G, Prechl J (szerk.), *Immunológia, Medicina*, Budapest, 2012, pp. 531-543.
16. Paschen A, Eichmüller S, Schadendorf D. (2004) Identification of tumor antigens and T-cell epitopes, and its clinical application. *Cancer Immunol Immunother*, 53: 196-203.
17. Johansson M, DeNardo DG, Coussens LM. (2008) Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunol Rev*, 222: 145-154.
18. Ji Y, Zhang W. (2010) Th17 cells: positive or negative role in tumor? *Cancer Immunol Immunother*, 59: 979-987.
19. 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.
20. 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.
21. Gajewski TF. (2007) Failure at the effector phase: immune barriers at the level of the melanoma tumor microenvironment. *Clin Cancer Res*, 13: 5256-5561.

22. Domagala-Kulawik J, Osinska I, Hoser G. (2014) Mechanisms of immune response regulation in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*, 3:15-22.
23. Balkwill F, Mantovani A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357: 539-545.
24. Coussens LM, Werb Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature*, 420: 860-867.
25. Solinas G, Marchesi F, Garlanda C, Mantovani A, Allavena P. (2010) Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 29: 243-248.
26. Senovilla L, Vacchelli E, Galon J, Adjemian S, Eggermont A, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Ma Y, Tartour E, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. (2012) Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *OncoImmunology*, 1: 1323-1343.
27. Shortman K, Liu Y-J. (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*, 21: 151-161.
28. Udey MC. (2004) Skin dendritic cells in immunity and autoimmunity. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 9: 15-17.
29. Sathe P, Vremec D, Wu L, Corcoran L, Shortman K. (2013) Convergent differentiation: myeloid and lymphoid pathways to murine plasmacytoid dendritic cells. *Blood*, 121: 11-19.
30. Facchetti F, Vermi W, Mason D, Colonna M. (2003) The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells. *Virchows Arch*, 443: 703-717.
31. Salio M, Cella M, Vermi W, Facchetti F, Palmowski MJ, Smith CL, Shepherd D, Colonna M, Cerundolo V. (2003) Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-g-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *Eur J Immunol*, 33: 1052-1062.
32. 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.
33. Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J. (1997) Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer*, 73: 309-316.

34. Stene MA, Babajanians M, Bhuta S, Cochran AJ. (1988) Quantitative alterations in cutaneous Langerhans cells during the evolution of malignant melanoma of the skin. *J Invest Dermatol*, 91: 125-128.
35. Toriyama K, Wen D-R, Paul E, Cochran AJ. (1993) Variations in the distribution, frequency, and phenotype of Langerhans cells during the evolution of malignant melanoma of the skin. *J Invest Dermatol*, 100: 269S-273S.
36. 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.
37. 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.
38. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc P-H, Trajanoski Z, Fridman W-H, Pagès F. (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, 313: 1960-1964.
39. Galon J, Pagès F, Marincola FM, Thurin M, Trinchieri G, Fox BA, Gajewski TF, Ascierto PA. (2012) The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med*, 10: 1.
40. Galon J, Pagès F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, Zlobec I, Berger A, Bifulco C, Botti G, Tatangelo F, Britten CM, Kreiter S, Chouchane L, Delrio P, Arndt H, Asslaber M, Maio M, Masucci GV, Mihm M, Vidal-Vanaclocha F, Allison JP, Gnjatic S, Hakansson L, Huber C, Singh-Jasuja H, Ottensmeier C, Zwierzina H, Laghi L, Grizzi F, Ohashi PS, Shaw PA, Clarke BA, Wouters BG, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Wang E, O'Donnell-Tormey J, Lagorce C, Pawelec G, Nishimura MI, Hawkins R, Lapointe R, Lundqvist A, Khleif SN, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Palmqvist R, Nagtegaal ID, Wang Y, D'Arrigo C, Kopetz S, Sinicrope FA, Trinchieri G, Gajewski TF,

- Ascierto PA, Fox BA. (2012) Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med*, 10: 205.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida 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.
47. 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*, 86: 523-530.
48. 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.

49. 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.
50. 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.
51. Mandalà M, Imberti GL, Piazzalunga D, Belfiglio M, Labianca R, Barberis M, Marchesi L, Poletti P, Bonomi L, Novellino L, Di Biagio K, Milesi A, Guerra U, Tondini C. (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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. Hillen F, Beaten CIM, van de Winkel A, Creytens D, van der Schaft DWJ, Winnepenninckx V, Griffioen AW. (2008) Leukocyte infiltration and tumor cell plasticity are parameters of aggressiveness in primary cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother*, 57: 97-106.
56. 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.

57. Ladányi A, Somlai B, Gilde K, Fejös 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.
58. Knutson KL, Disis ML, Salazar LG. (2007) CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis. *Cancer Immunol Immunother*, 56: 271-285.
59. deLeeuw RJ1, 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.
60. Mourmouras V, Fimiani M, Rubegni P, Epistolato MC, Malagnino V, Cardone C, Cosci E, Nisi MC, Miracco C. (2007) Evaluation of tumour-infiltrating CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human cutaneous benign and atypical naevi, melanomas and melanoma metastases. *Br J Dermatopathol*, 157: 531-539.
61. De Panfilis G, Campanini N, Santini M, Mori G, Tognetti E, Maestri R, Lombardi M, Froio E, Ferrari D, Ricci R. (2008) Phase- and stage-related proportions of T cells bearing the transcription factor FOXP3 infiltrate primary melanoma. *J Invest Dermatol*, 128: 676-684.
62. 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.
63. Qin Z, Richter G, Schüler T, Ibe S, Cao X, Blankenstein T. (1998) B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med*, 4: 627-630.
64. de Visser KE, Korets LV, Coussens LM. (2005) De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell*, 7: 411-423.
65. DiLillo DJ, Yanaba K, Tedder TF. (2010) B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. *J Immunol*, 184: 4006-4016.
66. Nelson BH. (2010) CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol*, 185: 4977-4982.

67. Hersey P, Murray E, Grace J, McCarthy WH. (1985) Current research on immunopathology of melanoma: analysis of lymphocyte populations in relation to antigen expression and histological features of melanoma. *Pathology*, 17: 385-391.
68. Ralfkaier E, Hou-Jensen K, Gatter KC, Drzewiecki KT, Mason DY. (1987) Immunohistological analysis of the lymphoid infiltrate in cutaneous malignant melanomas. *Virchow Arch A*, 410: 355-361.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. Carrega P, Morandi B, Costa R, Frumento G, Forte G, Altavilla G, Ratto GB, Mingari MC, Moretta L, Ferlazzo G. (2008) Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> cells and display an impaired capacity to kill tumor cells. *Cancer*, 112: 863-875.
73. Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, André P, Dieu-Nosjean MC, Alifano M, Régnard JF, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Cremer I. (2011) Profound alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res*, 71: 5412-5422.
74. Fregni G, Perier A, Avril MF, Caignard A. (2012) NK cells sense tumors, course of disease and treatments. Consequences for NK-based therapies. *OncoImmunology*, 1: 38-47.
75. Balsamo M, Scordamaglia F, Pietra G, Manzini C, Cantoni C, Boitano M, Queirolo P, Vermi W, Facchetti F, Moretta A, Moretta L, Mingari MC, Vitale M. (2009) Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 20847-20852.
76. Pietra G, Manzini C, Rivara S, Vitale M, Cantoni C, Petretto A, Balsamo M, Conte R, Benelli R, Minghelli S, Solari N, Gualco M, Queirolo P, Moretta L, Mingari MC.

- (2012) Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the expression of activating receptors and cytolytic activity. *Cancer Res*, 72: 1407-1415.
77. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*, 42: 717-727.
78. 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.
79. Coffelt SB, Hughes R, Lewis CE. (2009) Tumor-associated macrophages: Effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta*, 1796: 11-18.
80. Ribatti D, Crivellato E. (2009) Immune cells and angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 13: 2822-2833.
81. Dirkx AEM, oude Egbrink MGA, Wagstaff J, Griffioen AW. (2006) Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *J Leukoc Biol*, 80: 1183-1196.
82. 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.
83. Storr SJ, Safuan S, Mitra A, Elliott F, Walker C, Vasko MJ, Ho B, Cook M, Mohammed RA, Patel PM, Ellis IO, Newton-Bishop JA, Martin SG. (2012) Objective assessment of blood and lymphatic vessel invasion and association with macrophage infiltration in cutaneous melanoma. *Mod Pathol*, 25: 493-504.
84. Houghton AM. (2010) The paradox of tumor-associated neutrophils. Fueling tumor growth with cytotoxic substances. *Cell Cycle*, 9: 1732-1737.
85. Piccard H, Muschel RJ, Opdenakker G. (2012) On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit Rev Oncol Hematol*, 82: 296-309.
86. Khazaie K, Blatner NR, Khan MW, Gounari F, Gounaris E, Dennis K, Bonertz A, Tsai FN, Strouch MJ, Cheon E, Phillips JD, Beckhove P, Bentrem DJ. (2011) The significant role of mast cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 30: 45-60.



87. Ribatti D, Crivellato E. (2012) Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochim Biophys Acta*, 1822: 2-8.
88. Kohrt HE, Nouri N, Nowels K, Johnson D, Holmes S, Lee PP. (2005) Profile of immune cells in axillary nodes predicts disease-free survival in breast cancer. *PLoS Med*, 2: e284.
89. 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.
90. Speeckaert R, Vermaelen K, van Geel N, Autier P, Lambert J, Haspleslagh M, van Gele M, Thielemans K, Neyns B, Roche N, Verbeke N, Deron P, Speeckaert M, Brochez L. (2011) Indoleamine 2,3-dioxygenase, a new prognostic marker in sentinel lymph nodes of melanoma patients. *Eur J Cancer*, 48: 2004-2011.
91. 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.
92. Elliott B, Scolyer RA, Suci S, Lebecque S, Rimoldi D, Gugerli O, Musat E, Sharma RN, Lienard D, Keilholz U, Testori A, Eggermont A, MacKie R, Robert C, Cook M, Thompson JF, Angevin E, Spatz A; European Organization for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group. (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.
93. 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.
94. Movassagh M, Spatz A, Davoust J, Lebecque S, Romero P, Pittet M, Rimoldi D, Liénard D, Gugerli O, Ferradini L, Robert C, Avril MF, Zitvogel L, Angevin E. (2004.) Selective accumulation of mature DC-Lamp+ dendritic cells in tumor sites is associated with efficient T-cell-mediated antitumor response and control of metastatic dissemination in melanoma. *Cancer Res*, 64(6):2192-8.

95. Bembenek A, Li J, Loddenkemper C, Kemmner W, Stein H, Wernecke KD, Schlag PM. (2008) Presence of mature DC-Lamp<sup>+</sup> dendritic cells in sentinel and non-sentinel lymph nodes of breast cancer patients. *Eur J Surg Oncol*, 34: 514-518.
96. 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.
97. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55: 74-108.
98. Micheli A, Ciampichini R, Oberaigner W, Ciccolallo L, de Vries E, Izarzugaza I, Zambon P, Gatta G, De Angelis R, The EUROCORE working group. (2009) The advantage of women in cancer survival: an analysis of EUROCORE-4 data. *Eur J Cancer*, 45: 1017-1027.
99. Molife R, Lorigan P, MacNeil S. (2001) Gender and survival in malignant tumours. *Cancer Treat Rev*, 27: 201-209.
100. McArdle CS, McMillan DC, Hole DJ. (2003) Male gender adversely affects survival following surgery for colorectal cancer. *Br J Surg*, 90: 711-715.
101. Visbal AL, Williams BA, Nichols FC 3rd, Marks RS, Jett JR, Aubry MC, Edell ES, Wampfler JA, Molina JR, Yang P. (2004) Gender differences in non-small-cell lung cancer survival: an analysis of 4,618 patients diagnosed between 1997 and 2002. *Ann Thorac Surg*, 78: 209-215.
102. Miller JG, Mac Neil S. (1997) Gender and cutaneous melanoma. *Br J Dermatol*, 136: 657-665.
103. Kemeny MM, Busch E, Stewart AK, Menck HR. (1998) Superior survival of young women with malignant melanoma. *Am J Surg*, 175: 437-445.
104. Scoggins CR, Ross MI, Reintgen DS, Noyes RD, Goydos JS, Beitsch PD, Urist MM, Ariyan S, Sussman JJ, Edwards MJ, Chagpar AB, Martin RCG, Stromberg AJ, Hagendoorn L, McMasters KM. (2006) The Sunbelt melanoma trial. Gender related differences in outcome for melanoma patients. *Ann Surg*, 243: 693-700.
105. de Vries E, Nijsten TEC, Visser O, Bastiaannet E, van Hattem S, Janssen-Heijnen ML, Coebergh JWW. (2008) Superior survival of females among 10,538 Dutch

- melanoma patients is independent of Breslow thickness, histologic type and tumor site. *Ann Oncol*, 19: 583-589.
106. Lasithiotakis K, Leiter U, Meier F, Eigentler T, Metzler G, Moehrle M, Breuninger H, Garbe C. (2008) Age and gender are significant independent predictors of survival in primary cutaneous melanoma. *Cancer*, 112: 1795-1804.
  107. Joosse A, de Vries E, Eckel R, Nijsten T, Eggermont AMM, Hölzel D, Coebergh JWW, Engel J. (2011) Gender differences in melanoma survival: female patients have a decreased risk of metastasis. *J Invest Dermatol*, 131: 719-726.
  108. Joosse A, Collette S, Suci S, Nijsten T, Lejeune F, Kleeberg UR, Coebergh JWW, Eggermont AMM, de Vries E. (2012) Superior outcome of women with stage I/II cutaneous melanoma: pooled analysis of four European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trials. *J Clin Oncol*, 30: 2240-2247.
  109. Rampen FHJ. (1984) Sex differences in survival from cutaneous melanoma. *Int J Dermatol*, 23: 444-452.
  110. Stidham KR, Johnson JL, Seigler HF. (1994) Survival superiority of females with melanoma. A multivariate analysis of 6383 patients exploring the significance of gender in prognostic outcome. *Ann Surg*, 129: 316-324.
  111. Neifeld JP, Lippman ME. (1980) Steroid hormone receptors and melanoma. *J Invest Dermatol*, 74: 379-381.
  112. Kokoschka EM, Spona J, Knobler R. (1982) Sex steroid hormone receptor analysis in malignant melanoma. *Br J Dermatol*, 107(Suppl 23): 54-59.
  113. Duncan LM, Travers RL, Koerner FC, Mihm MC Jr, Sober AJ. (1994) Estrogen and progesterone receptor analysis in pregnancy associated melanoma: absence of immunohistochemically detectable hormone receptors. *Hum Pathol*, 25: 36-41.
  114. Morvillo V, Luthy IA, Bravo AI, Capurro MI, Portela P, Calandra RS, Mordoh J. (2002) Androgen receptors in human melanoma cell lines IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN and in human melanoma metastases. *Melanoma Res*, 12: 529-538.
  115. Feucht KA, Walker MJ, Das Gupta TK, Beattie CW. (1988) Effect of 17 $\beta$ -estradiol on the growth of estrogen receptor-positive human melanoma in vitro and in athymic mice. *Cancer Res*, 48: 7093-7101.

116. Richardson B, Price A, Wagner M, Williams V, Lorigan P, Browne S, Miller JG, Mac Neil S. (1999) Investigation of female survival benefit in metastatic melanoma. *Br J Cancer*, 80: 2025-2033.
117. 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.
118. 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.
119. Proctor JW, Auclair BG, Stokowski L. (1976) Endocrine factors and the growth and spread of B16 melanoma. *J Natl Cancer Inst*, 57: 1197-1198.
120. Lopez RE, Bhakoo H, Paolini NS, Rosen F, Holyoke ED, Goldrosen MH. (1978) Effect of estrogen on the growth of B-16 melanoma. *Surg Forum*, 29: 153-154.
121. Simon SR, Ershler WB. (1985) Hormonal influences on growth of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst*, 74: 1085-1088.
122. Hirayama R, Hirokawa K, Makinodan T. (1985) Change in the metastatic mode of B16 malignant melanoma in C57BL/6 mice with ageing and sex. *IARC Sci Publ*, 58: 85-96.
123. Walker MJ, Chaudhuri PK, Das Gupta TK, Beattie CW. (1980) Influence of host sex on the growth of human melanoma. *Proc Soc Exp Biol Med*, 165: 96-99.
124. 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.
125. 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.
126. 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.
127. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, Double JA, Everitt J, Farningham DAH, Glennie MJ, Kelland LR, Robinson V, Stratford IJ,

- Tozer GM, Watson S, Wedge SR, Eccles SA. (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer*, 102: 1555-1577.
128. 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 Exp Metastasis*, 7: 599-607.
129. Ladányi A, Kiss J, Somlai B, Gilde K, Fejős Z, Mohos A, Gaudi I, Tímár J. (2007) Density of DC-LAMP<sup>+</sup> 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.
130. 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.
131. Ladányi A, Mohos A, Somlai B, Liskay G, Gilde K, Fejős Z, Gaudi I, Tímár J. (2010) FOXP3<sup>+</sup> cell density in primary tumor has no prognostic impact in patients with cutaneous malignant melanoma. *Pathol Oncol Res*, 16: 303-309.
132. 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.
133. 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<sup>+</sup> cell density in cases with positive sentinel node status is associated with unfavorable clinical outcome. *J Transl Med*, 11: 43.
134. Dobos J. (2009) A melanóma progresszióját befolyásoló endokrin tényezők. *Magy Onkol*, 53: 47-50.
135. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T. (2002) NOD/SCID $\gamma$ <sup>null</sup> mouse: and excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*, 100: 3175-3182.
136. Bell D, Chomarat P, Broyles D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, Valladeau J, Davoust J, Palucka KA, Banchereau J. (1999) In breast carcinoma tissue, immature

- dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med*, 190: 1417-1425.
137. Troy AJ, Summers KL, Davidson PJT, Atkinson CH, Hart DNJ. (1998) Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 4: 585-593.
  138. Whelchel JC, Farah SE, McLean IW, Burnier MN. (1993) Immunohistochemistry of infiltrating lymphocytes in uveal malignant melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34: 2603-2606.
  139. Coronella-Wood JA, Hersh EM. (2003) Naturally occurring B-cell responses to breast cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 52: 715-738
  140. Lee HE, Chae SW, Lee YJ, Kim MA, Lee HS, Lee BL, Kim WH. (2008) Prognostic implications of type and density of tumour infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Br J Cancer*, 99: 1704-1711.
  141. Hansen MH, Nielsen H, Ditzel HJ. (2001) The tumor-infiltrating B cell response in medullary breast cancer is oligoclonal and directed against the autoantigen actin exposed on the surface of apoptotic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 12659-12664.
  142. O'Brien PM, Tsirimonaki E, Coomber DW, Millan DW, Davis JA, Campo MS. (2001) Immunoglobulin genes expressed by B-lymphocytes infiltrating cervical carcinoma show evidence of antigen-driven selection. *Cancer Immunol Immunother*, 50: 523-532.
  143. Coronella JA, Tellemann P, Kingsbury GA, Truong TD, Hays S, Junghans RP. (2001) Evidence for an antigen-driven humoral immune response in medullary ductal breast cancer. *Cancer Res*, 61: 7889-7899.
  144. Coronella JA, Spier C, Welch M, Trevor KT, Stopeck AT, Villar H, Hersh EM. (2002) Antigen-driven oligoclonal expansion of tumor-infiltrating B cells in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *J Immunol*, 169: 1829-1836.
  145. Nzula S, Going JJ, Stott DI. (2003) Antigen-driven clonal proliferation, somatic hypermutation, and selection of B lymphocytes infiltrating human ductal breast carcinomas. *Cancer Res*, 63: 3275-3280.

146. Yeilding NM, Gerstner C, Kirkwood JM. (1992) Analysis of two human monoclonal antibodies against melanoma. *Int J Cancer*, 52: 967-973.
147. Punt CJA, Barbuto JAM, Zhang H, Grimes WJ, Hatch KD, Hersh EM. (1994) Anti-tumor antibody produced by human tumor infiltrating and peripheral blood B lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother*, 38: 225-232.
148. Kotlan B, Simsa P, Teillaud J-L, Fridman WH, Toth J, McKnight M, Glassy MC. (2005) Novel ganglioside antigen identified by B cells in human medullary breast carcinomas: the proof of principle concerning the tumor-infiltrating B lymphocytes. *J Immunol*, 175: 2278-2285.
149. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, de Chaisemartin L, Lebecque S, Fridman WH, Cadranel J. (2008) Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol*, 26: 4410-4417.
150. Goc J, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Dieu-Nosjean MC. (2013) Characteristics of tertiary lymphoid structures in primary cancers. *OncoImmunology*, 2: e26836.
151. Di Caro G, Bergomas F, Grizzi F, Doni A, Bianchi P, Malesci A, Laghi L, Allavena P, Mantovani A, Marchesi F. (2014) Occurrence of tertiary lymphoid tissue is associated with T-cell infiltration and predicts better prognosis in early-stage colorectal cancers. *Clin Cancer Res*, 20: 2147-2158.
152. Siliņa K, Rulle U, Kalniņa Z, Linē A. (2014) Manipulation of tumour-infiltrating B cells and tertiary lymphoid structures: a novel anti-cancer treatment avenue? *Cancer Immunol Immunother*, 63: 643-662.
153. Suzuki A, Masuda A, Nagata H, Kameoka S, Kikawada Y, Yamakawa M, Kasajima T. (2002) Mature dendritic cells make clusters with T cells in the invasive margin of colorectal carcinoma. *J Pathol*, 196: 37-43.
154. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K. (2005) Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 18538-18543.

155. Coppola D, Nebozhyn M, Khalil F, Dai H, Yeatman T, Loboda A, Mulé JJ. (2011) Unique ectopic lymph node-like structures present in human primary colorectal carcinoma are identified by immune gene array profiling. *Am J Pathol*, 179: 37-45.
156. 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.
157. 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.
158. 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.
159. Martinet L, Le Guellec S, Filleron T, Lamant L, Meyer N, Rochaix P, Garrido I, Girard JP. (2012) High endothelial venules (HEVs) in human melanoma lesions. Major gateways for tumor-infiltrating lymphocytes. *OncoImmunology*, 1: 829-839.
160. Linton P-J, 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.
161. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. (2006) Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res*, 12: 5423-5434.
162. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay Nel H, Mosseri V, Laccourreye O, Bruneval P, Fridman WH, Brasnu DF, Tartour E. (2006) Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, 12: 465-472.



163. Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink BG, van der Zanden L, de Vries RR, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Toes RE. (2005) Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol*, 66: 13-20.
164. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. (2007) Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol*, 37: 129-138.
165. Allan SE, Passerini L, Bacchetta R, Crellin N, Dai M, Orban PC, Ziegler SF, Roncarolo MG, Levings MK. (2005) The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J Clin Invest*, 115: 3276-3284.
166. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK. (2007) Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol*, 19: 345-354.
167. Ziegler SF. (2006) FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol*, 24: 209-226.
168. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. (2005) Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity*, 22: 329-341.
169. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299: 1057-1061.
170. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, Maeda M, Onodera M, Uchiyama T, Fujii S, Sakaguchi S. (2004) Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol*, 16: 1643-1656.
171. Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF. (2003) Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest*, 112: 1437-1443.
172. Kryczek I, Liu R, Wang G, Wu K, Shu X, Szeliga W, Vatan L, Finlayson E, Huang E, Simeone D, Redman B, Welling TH, Chang A, Zou W. (2009) FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease. *Cancer Res*, 69: 3995-4000.

173. Mansfield AS, Heikkila PS, Vaara AT, von Smitten KAJ, Vakkila JM, Leidenius MHK. (2009) Simultaneous Foxp3 and IDO expression is associated with sentinel lymph node metastases in breast cancer. *BMC Cancer*, 9: 231.
174. Ma MW, Medicherla RC, Qian M, Vega Saenz de Miera E, Friedman EB, Berman RS, Shapiro RL, Pavlick AC, Ott PA, Bhardwaj N, Shao Y, Osman I, Darvishian F. (2012) Immune response in melanoma: an in-depth analysis of the primary tumor and corresponding sentinel lymph node. *Mod Pathol*, 25: 1000-1010.
175. 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.
176. Wolkers MC, Stoetter G, Vyth-Dreese FA, Schumacher TNM. (2001) Redundancy of direct priming and cross-priming in tumor-specific CD8+ T cell responses. *J Immunol*, 167: 3577-3584.
177. Mortarini R, Piris A, Maurichi A, Molla A, Bersani I, Bono A, Bartoli C, Santinami M, Lombardo C, Ravagnani F, Cascinelli N, Parmiani G, Anichini A. (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.
178. 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.
179. 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.
180. thor Straten PT, Becker JC, Guldborg P, Zenthen J. (1999) In situ T-cells in melanoma. *Cancer Immunol Immunother*, 34: 386-395.
181. Lopes MT, Sonohara S, Chammas R, Brentani MM. (1991) Effects of steroids on laminin-binding integrins in a human melanoma cell line. *Int J Cancer*, 48: 73-80.

182. Mäsback A, Westerdahl J, Ingvar C, Olsson H, Jonsson N. (1997) Cutaneous malignant melanoma in Southern Sweden 1965, 1975, and 1985. Prognostic factors and histologic correlations. *Cancer*, 79: 275-283.
183. Wiltout RH, Herberman RB, Zhang SR, Chirigos MA, Ortaldo JR, Green KM, Talmadge JE. (1985) Role of organ-associated NK cells in decreased formation of experimental metastases in lung and liver. *J Immunol*, 134: 4267-4275.
184. Roh MS, Kahky MP, Oyedeji C, Klostergaard J, Wang L, Curley SA, Lotzová E. (1992) Murine Kupffer cells and hepatic natural killer cells regulate tumor growth in a quantitative model of colorectal liver metastases. *Clin Exp Metastasis*, 10: 317-327.
185. Timmers M, Vekemans K, Vermijlen D, De Zanger R, Wisse E, Braet F. (2004) Confocal laser scanning microscopic study of the killing of metastatic colon carcinoma cells by Kupffer cells in the early onset of hepatic metastasis. *Comp Hepatol*, 3(Suppl 1): S50.
186. Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, Karin M. (2007) Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science*, 317: 121-124.
187. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. (2005) Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update*, 11: 411-423.
188. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. (2008) Efficient tumor formation by single human melanoma cells. *Nature*, 456: 593-598.
189. Carreno BM, Garbow JR, Kolar GR, Jackson EN, Engelbach JA, Becker-Hapak M, Carayannopoulos LN, Piwnica-Worms D, Linette GP. (2009) Immune-deficient mouse strains display marked variability in growth of human melanoma lung metastases. *Clin Cancer Res*, 15: 3277-3286.

## 11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Ladányi A, Sebestyén T, **Mohos A**, Liskay G, Somlai B, Tóth E, Tímár J: **Ectopic lymphoid structures in primary cutaneous melanoma.** Pathol Oncol Res 2014 20:981-985. IF: 1,806\*

Dobos J\*, **Mohos A\***, Tóvári J, Rásó E, Lőrincz T, Zádori G, Tímár J, Ladányi A: **Sex-dependent liver colonization of human melanoma in SCID mice – role of host defense mechanisms.** Clin Exp Metastasis 2013 30:497-506. IF: 3,725

**Mohos A\***, Sebestyén T\*, Liskay G, Plótár V, Horváth S, Gaudi I, Ladányi A: **Immune cell profile of sentinel lymph nodes in patients with malignant melanoma - FOXP3<sup>+</sup> cell density in cases with positive sentinel node status is associated with unfavorable clinical outcome.** J Transl Med 2013 11:43. IF: 3,991

Ladányi A, Kiss J, **Mohos A**, Somlai B, Liskay G, Gilde K, Fejős Z, Gaudi I, Dobos J, Tímár J: **Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma.** Cancer Immunol Immunother 2011 60:1729-1738. IF: 3,701

Ladányi A, **Mohos A**, Somlai B, Liskay G, Gilde K, Fejős Z, Gaudi I, Tímár J: **FOXP3<sup>+</sup> cell density in primary tumor has no prognostic impact in patients with cutaneous malignant melanoma.** Pathol Oncol Res 2010 16:303-309. IF: 1,483

Ladányi A, Kiss J, Somlai B, Gilde K, Fejős Z, **Mohos A**, Gaudi I, Tímár J: **Density of DC-LAMP<sup>+</sup> mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor.** Cancer Immunol Immunother 2007 56:1459-1469. IF: 3,728

\*Megosztott első szerző

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném hálás köszönetemet kifejezni Dr. Ladányi Andreának, témavezetőmnek és barátomnak kitartó támogatásáért és segítségéért, melyet tudományos munkám végzéséhez nyújtott.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Tímár József Professzor úrnak, hogy az Országos Onkológiai Intézetben a Tumor Progressziós Osztály munkacsoportjába befogadott és támogatta munkámat.

Köszönettel tartozom Dr. Szende Béla Professzor úrnak, Dr. Kopper László Professzor úrnak és Dr. Matolcsi András Professzor úrnak, a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológia és Kísérleti Rákkutató Intézet korábbi és jelenlegi intézetvezetőinek, hogy támogatták munkám, és hogy az I. sz. Patológiai Intézetet munkahelyemnek tekinthetem.

Köszönöm Prof. Dr. Kopper Lászlónak és Prof. Dr. Kovalszky Ilonának, hogy a Patológiai tudományok Doktori Iskola vezetőjeként, illetve az Onkológia program vezetőjeként lehetővé tették tudományos tevékenységemet. Laczik Cecíliának köszönöm az adminisztratív teendők körüli kedves segítségét. Dr. Sebestyén Annának dolgozatom átolvasását és ezzel kapcsolatos segítő észrevételeit.

Köszönöm az OOI korábbi Tumor Progressziós Osztálya, valamint a Sebészeti és Molekuláris Patológiai Osztály munkatársainak a segítségét és a munkavégzéshez kialakított remek hangulatot. Külön köszönöm Dobos Juditnak a közös munkát, támogató és segítő észrevételeit. Köszönöm Dr. Sebestyén Tímeának a közös munkát, Dr. Tóvári Józsefnek a jelenlétét, Gaudi Istvánnak a statisztikai elemzésekben, Kónya Miklósnak a fotódokumentációban nyújtott segítségét. Köszönöm a rengeteg segítséget Parragné Derecskei Katalinnak.

Végül, de nem utolsó sorban köszönetet szeretnék mondani családomnak: Tibor öcsémnek, aki folyamatosan erőt öntött belém, szüleimnek, akik szeretnek, felneveltek, támogattak és mindig tanulásra biztattak, férjemnek, Andrásnak és gyermekeinknek: Andrisnak, Zsuzsinak, Pistinek, Mimunak és Karcsinak, akik elviselik, hogy a

tudomány oltárán a velük eltölthető időm egy jó részét feláldozom, és szorítanak nekem, hogy ez sikeres is legyen.

A disszertáció alapjául szolgáló kutatásokat az ETT-308/2003 (LA), az OTKA K 72836 (LA), 105132.(LA), 84173 (To'J), a GVOP-3.11.-2004-05-0090.3.0 (TJ), az NKFP1a-0024-05. (TJ) és a TÁMOP4.2.1.B-09/1 KMR-2010-0001 (TJ) alapok támogatásával végeztük.