

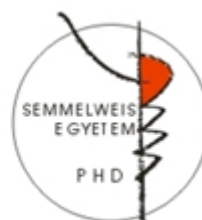
Az immunterápia prediktív markereinek vizsgálata agyi áttétet adó tüdő adenocarcinomákban

Doktori tézisek

Dr. Téglási Vanda Mónika

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Reiniger Lilla, Ph.D, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Bittner Nóra, Ph.D, klinikaigazgató

Dr. Borka Katalin, Ph.D, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Demeter Judit, D.Sc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Madaras Lilla, Ph.D, egyetemi adjunktus

Dr. Sipos László, Ph.D, főorvos, címzetes egyetemi
docens

Budapest

2019

I. BEVEZETÉS

Ismert tény, hogy a szív- és érrendszeri betegségek után, a daganatos betegségek okozzák a legtöbb halálozást. Magyarországon, csakúgy, mint a világon általában, a daganatos betegségek között a tüődaganatok a leggyakoribbak, mind az új esetek megjelenését, mind a halálozást tekintve. A rosszindulatú tüdőtumorkok több, mint harmada döntően a tüdő perifériás területein kialakuló adenocarcinoma (ADC), melynek incidenciája az elmúlt évtizedekben jelentős növekedést mutat. A tüődaganatos betegek 30-60%-ában alakul ki agyi áttét, ami a leggyakoribb koponyaűri daganat típus. Az agyi áttétek gyakorisága folyamatosan növekszik, köszönhetően a primer daganatok hatékonyabb terápiás lehetőségeinek, ezáltal a betegek hosszabb túlélésének, valamint az egyre részletgazdagabb képalkotó technikáknak. A tüődaganatos betegek 5 éves túlélése 2010 körül 15,6%-ra volt tehető. Ez a szám az egyre fejlettebb diagnosztikai lehetőségek és az elmúlt években elért jelentős terápiás fejlesztések ellenére is 20% alatt marad. A primer tumor diagnózisától az agyi áttét kialakulásáig átlagosan eltelt idő 11 hónapra tehető. Agyi áttét megjelenése esetén a betegek túlélése kedvezőtlen, körülbelül egy hónap, ami műtéti vagy sugárterápiás kezeléssel is csak 3-4 hónapra növelhető.

A tüődaganatok kezelésében sokáig a platina-bázisú kemoterápia dominált a műtéti beavatkozások mellett. Ezt követte a célzott terápiák, a tirozin-kináz és az anaplasztikus lymphoma kináz gátlók időszaka. Azonban ezen szerek alkalmazása sem nyújt kielégítő terápiás eredményt. Napjainkban egyre nagyobb teret hódít az immunterápia, melynek kezdeti sikerei bizakodásra adnak okot.

A tumor kötőszövetes állományában, azaz a stromájában elhelyezkedő sejtek, mint például az immunsejtek, fibroblasztok és endothel sejtek, mind a tumor mikrokörnyezetének részei, melyeknek szerepe lehet a tumorelles immunításban. Kezdetben azt gondoltuk, hogy az immunsejtek mind a tumorsejtek eliminálása céljából vannak jelen, azonban ma már tudjuk, hogy a CD8+ T-sejtek, a CD4+ 1-es típusú helper T-sejtek, az NK sejtek és az antigénprezentáló dendritikus sejtek a tumor ellenes immunvédekezés részei, míg a regulátor T-sejtek, az M2 típusú macrophagok, a myeloid eredetű szuppresszor sejtek és a CD4+ 2-es típusú helper T-sejtek a tumor növekedését segítik elő. Az aktivált T-sejtek az immun effektor funkciók elsődleges mediátorai. Ezek a sejtek számos gátló receptort expresszálnak, mint például a citotoxicus T-lymphocita-asszociált antigén-4 (CTLA-4), a programozott sejthalál receptor-1 (PD-1) és a lymphocita aktiváló gén-3 (LAG3). Ezeket immunellenőrzőpont molekuláknak nevezzük, mivel a saját fehérjékre, a krónikus fertőzésekre és a

tumorantigénekre adott T-sejt válasz szabályozásában vesznek részt. Krónikus gyulladás és tumoros folyamat során a T-sejtek kimerülnek és ezeket a gátló receptorokat expresszálják. A különböző immunterápiák, mint például az adaptív T-sejt terápia, a CAR T-sejt terápia, a tumorelles vakcináció vagy az immunellenőrzőpont-gátlás közül az utóbbit alkalmazzák a legtöbb daganat típus esetén, melyek az egyén saját immunrendszerének támogatása révén hatnak. Az immunellenőrzőpont-gátlók közül a PD-L1/PD-1 gátló szerek kerültek bevezetésre a tüődaganatok kezelésében. A tudomány fejlődése során egyre jobban körvonalazódott, hogy a kezelés előtt a tumormintákban a tumorsejteken megfigyelhető PD-L1 expressziós szint alapján következtetni lehet a PD-L1/PD-1 gátló szerekre adott terápiás válaszra. Emellett a PD-L1 expresszió prognosztikus biomarkernek is bizonyult. A tumorsejtek PD-L1 expressziójának meghatározásához jelenleg a „tumor proportion score”-t (TPS) alkalmazzák, ami az élő tumorsejtek számához viszonyítja a PD-L1 pozitív tumorsejtek arányát. Míg a tumorsejtek PD-L1 expressziójának biomarkerként való alkalmazhatósága immunellenőrzőpont-gátló kezelések tekintetében megerősítést nyert a számos klinikai vizsgálatnak köszönhetően, az immunsejtek jelenlétének, valamint PD-L1 és PD-1 expressziójának szerepe a tumorokban kérdéses maradt. Emellett egyre több bizonyítékkal rendelkezünk arról, hogy a T-sejt receptor (TCR) státusz potenciális biomarkerként szolgálhat mind a tumorelles adaptív immunitás vizsgálatához, mind az immunellenőrzőpont-gátló kezelésre adott válasz előrejelzéséhez az egyes szolid daganatokban, azonban az eddigi vizsgálatok eredményei ellentmondásosak. A terápiás kritériumok egyre jobban körvonalazódnak, azonban még mindig nem határoztak meg a stádiumoknak megfelelő szelekciós kritériumrendszert (pl. PD-L1 expressziós határérték), így az agyi áttétes betegeknél sem.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Primer tüdő ADC és tüdő ADC eredetű agyi áttét mintákban célunk volt:

- Feltérképezni a tumorsejtek PD-L1 expresszióját és annak összefüggéseit az egyes korábban alkalmazott terápiákkal, így a kemo-, sugár- és szteroid terápiával, valamint a betegek túlélésével.
- Meghatározni a tumor-asszociált gyulladásos sejtek eloszlását, mennyiségét, PD-L1 és PD-1 expresszióját, összevetve a tumorsejtek PD-L1 expressziójával, a korábban alkalmazott terápiákkal és a betegek túlélésével.
- Megvizsgálni a primer tüdő – agyi áttét párokban a TCR klonalitást.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III.1. Minták

Kutatásunk során összesen 227 agyi áttétet adó tüdő ADC-ben szenvedő beteget vontunk be retrospektív vizsgálatunkba. Az agyi áttétek műtéti eltávolítása 211 esetben az Országos Klinikai Idegtudományi Intézetben (OKITI) történt, mely minták formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) blokkjai a Semmelweis Egyetem, I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet archívumából álltak rendelkezésünkre. Közülük 61 esetben, a még műthető stádiumban felismert primer tüdőtumor esetén, az Országos Korányi Tbc és Pulmonológia Intézetben (OKTPI), míg 3 esetben a budapesti Bajcsy-Zsilinszky Kórházban történt sebészi kezelés. A primer tüdő ADC-k FFPE mintái az OKTPI Patológia Osztályának, valamint a Bajcsy-Zsilinszky Kórház Patológiai Osztályának archívumából álltak rendelkezésünkre, mely összesen 64 mintát jelentett. 16 esetben a Szegedi Tudományegyetem biztosította mind a primer tüdő ADC-k, mind az agyi áttétek FFPE mintáit. A primer tüdőtumrok besorolása a legújabb WHO-klasszifikáció szerint történt. A betegek klinikai adatait az OKTPI, az OKITI és a Bajcsy-Zsilinszky Kórház betegnyilvántartó rendszeréből gyűjtöttük ki.

A mintákból 3 kohortot hoztunk létre. Az elsőben 208 agyi áttétet vizsgáltunk, elsősorban a mintákban található összefüggésekre koncentráltunk a klinikai és a túlélési adatokkal összevetve. A másodikban 61 primer tüdő ADC – agyi áttét párt elemeztünk és a párok között megfigyelhető összefüggésekre helyeztük a hangsúlyt, az egyes terápiák hatását is figyelembe véve. A harmadikban 19 primer tüdő ADC – agyi áttét párban határoztuk meg a TCR profilt.

III.2. Szöveti multiblokk

Mind a primer, mind az áttéti tumormintákból szöveti multiblokkot (TMA) készítettünk számítógép vezérelt automatizált TMA Master berendezéssel (3D HISTECH Kft, Budapest, Magyarország). A mintákból 3, egyenként 2 milliméter átmérőjű reprezentatív szövethengert helyeztünk át a befogadó blokkba. Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz kontroll szövetként normál máj, tonsilla, placenta és vese mintákból helyeztünk el 1-1 szövethengert minden TMA blokkban. Az elkészült TMA blokkokból 3 µm vastagságú metszetek készültek.

III.3. Hisztológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok

III.3.1. Peritumoralis mononukleáris sejtes infiltráció

A primer tüdő és agyi áttét minták hematoxin-eosin (HE) festett metszetein meghatároztuk, hogy a tumorszövet körül a parenchymában jelen van-e mononukleáris sejtekből álló infiltrátum, azaz mononukleáris gyűrű. Két kategóriát hoztunk létre:

- a) jelen van mononukleáris gyűrű, azokban az esetekben, ha a daganatszövet körül kevés vagy masszív mononukleáris sejtes infiltráció megfigyelhető,
- b) nincs jelen mononukleáris gyűrű, azokban az esetekben, amikor a daganatszövet – parenchyma határon egyáltalán nem, vagy csak elszórva látható néhány immunsejt.

III.3.2. Intratumoralis mononukleáris sejtes infiltráció

A tumorminták kötőszövetes állományában, azaz a stromájában megfigyelhető mononukleáris sejtek mennyiségét is meghatároztuk, az egyes minták HE festett metszetein. Ennek során a lymphocyták, macrophagok és plazmasejtek jelenlétét egyaránt figyelembe vettük. Két csoportot hoztunk létre az alapján, hogy a tumor stromának több vagy kevesebb, mint 20%-ában figyelhetők meg gyulladásosejtek.

III.3.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az immunreakciókat a TMA blokkok 3 µm vastagságú metszetein végeztük el az előírásoknak megfelelő lépéseket követve Leica Bond-Max automatával (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország). A PD-L1 festéshez SP142-es klónt (hígítás 1:100; Spring Bioscience, Ventana; Oro Valley, Arizona, Egyesült Államok), kontroll szövetként placentát használtunk. A PD-1 festéshez ab52587 antitestet (hígítás 1:100; Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság), kontroll szövetként tonsillát alkalmaztunk.

Az elkészült metszeteken a tumorsejtek PD-L1 pozitivitását, valamint az immunsejtek PD-L1 és PD-1 pozitivitását vizsgáltuk. Az immunsejtek vizsgálatakor a lymphocyták, plazma sejtek és macrophagok expresszióját is figyelembe vettük. A pozitív sejtek százalékos mennyiségét szemi-kvantitatív módon határoztuk meg. A tumorsejtek esetén 1%, 5% és 50%-os határértékeket, míg az immunsejteknél 1%, 5% és 10%-os határértékeket határoztunk meg. A határértékeket a klinikai és kísérletes tanulmányokban alkalmazott határértékek alapján határoztuk meg. Az így kapott adatokból létrehoztunk egy kombinált értéket a POPLAR-tanulmányt követve. Ennek megfelelően a tumor- és immunsejtek PD-L1 expressziója alapján 4 csoportba soroltuk az eseteket: „nem expresszáló”, „alacsonyan expresszáló”, „közepesen expresszáló” és „magasan expresszáló”.

III.4. T-sejt receptor meghatározás

A lemetezett FFPE mintákból DNS izolálást végeztünk Qiagen QIAamp FFPE szöveti kit-tel (Qiagen, Hilden, Németország), majd a TCR klonalitásának vizsgálatához a nemzetközileg elfogadott primerpárok alkalmazásával (Integrated DNA Technologies Coralville, Iowa, Egyesült Államok), a BioMed2 nemzetközi ajánlása szerint végeztünk fragmenthossz-analízist a TRG lokuszra fókuszálva. Ennek első lépéseként a primerek 10x-es hígítása után multiplex-PCR történt a vizsgálni kívánt DNS szakasz enzimatikus amplifikációja érdekében (ProFlex PCR System, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, Egyesült Államok). A képződött termékeket ABI3500 Genetic Analyzer segítségével detektáltuk (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, Egyesült Államok). Az analízist GeneMapper Software 5-tel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) végeztük. Az elektroferogramok elemzése során monoklonálisnak tekintettük azt a mintát, melyben a legnagyobb csúcs amplitúdója legalább az azt követő csúcs amplitúdójának duplája volt. Poliklonális a minta több detektálható csúcs esetén, melyek közül nincs kiemelkedő, hanem Gauss görbe szerinti eloszlást mutatnak. Minden esetben egy pozitív (monoklonális) és egy negatív (poliklonális) kontrollt is vizsgáltunk az eredmények megerősítésére.

III.5. Statisztikai analízis

III.5.1. 208 agyi áttét esetet tartalmazó kohort

A kategórikus változók Pearson khi-négyzet próbával kerültek összehasonlításra, mely során a Pearson R érték mutatta meg a paraméterek közötti összefüggés mértékét. A túlélési analízist a teljes túlélés (OS), az agyi áttét műtététől számított túlélés, a progresszió mentes túlélés (PFS), valamint az agyi áttét kialakulásáig eltelt idő (TTBM) esetén is elvégeztük. Annak érdekében, hogy klinikailag még egységesebb betegcsoportokat vizsgáljunk, 4 alcsoportot hoztunk létre a primer tumor kezelése és az agyi áttét szoliter vagy multiplex megjelenése alapján: (1) a primer tumor műtėti kezelése és szoliter agyi áttét (51 fő), (2) a primer tumor műtėti kezelése és multiplex agyi áttét (25 fő), (3) nem operált primer tumor és szoliter agyi áttét (90 fő), (4) nem operált primer tumor és multiplex agyi áttét (42 fő). A modell szelekció a „survival” R csomag segítségével történt. A többváltozós modellbe foglalt változók kiválasztásához elsőként az adott változó értéke szerint definiált betegcsoportokra Kaplan-Meier-módszerrel meghatároztuk az SKM(t) túlélési görbéket, majd ezeket log-rank teszttel vetettük össze.

A statisztikai tesztek elvégzése SPSS 20.0-s verzióval történt (IBM, Armonk, New York, Egyesült Államok).

III.5.2. 61 primer tüdő ADC és agyi áttét párt tartalmazó kohort

A változók között Spearman korreláció analízist végeztünk python 3.5.3 verzió és a scipy.stats statisztikai csomag használatával. A mennyiségi változók közötti valódi összefüggések akkor vizsgálhatók a legjobban, ha nem határozzuk meg határértékeket, így a statisztikai elemzést a fent leírt szövettani paraméterek szemi-kvantitatív adataival, a közleményekben, valamint a klinikai gyakorlatban használt határértékekkel egyaránt elvégeztük. Minden paraméternél a legszignifikánsabb adatot kiválasztva végeztük el a Bonferroni korrekciót. A primer tüdő ADC és a hozzá tartozó agyi áttét között vizsgálva az egyes paraméterek változását, a változás pozitív (+1), negatív (-1) vagy neutrális (0) értéket kapott, annak megfelelően, hogy az adott paraméter növekedett, csökkent vagy nem változott az agyi áttétben a primer mintához hasonlítva. Az eltérő terápiás csoportokban az egyes paraméterek változási irányának átlagát t-tesztel hasonlítottuk össze a scipy.stats python csomag használatával. Azoknál a paramétereknél, ahol különböző határértékeket határoztunk meg, a legalacsonyabb p érték esetén végeztük el a korrekciós számításokat Holm–Šidák féle többszörös összehasonlítással.

III.5.3. 19 primer tüdő ADC és agyi áttét párt tartalmazó kohort

A kategórikus változók Pearson khi-négyzet próbával kerültek összehasonlításra, mely során a Pearson R érték mutatta meg a paraméterek közötti összefüggés mértékét.

A statisztikai számítások eredményét $p < 0,05$ értéknél tekintettük szignifikánsnak.

III.6. Etikai vonatkozások

Kutatásaink során mindenben a hatályos jogszabályok szerint jártunk el a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (TUKEB) engedélyének birtokában (#155/2012, #510/2013, #86/2015), valamint a Helsinki Deklarációban foglaltaknak megfelelően.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. 208 agyi áttét esetet tartalmazó kohort

IV.1.1. Túlélési adatok

A betegek átlagos teljes túlélése 29,7 ($\pm 24,2$), míg az agyi áttét műtététől számított túlélés 14,9 ($\pm 13,5$) hónap volt. A PFS 15,1 ($\pm 16,4$) hónap volt, az agyi áttét kialakulásáig pedig átlagosan 22,0 ($\pm 21,5$) hónap telt el. A 208 betegből azonban 78 esetben az agyi áttét került először diagnózisra és csak azt követte a primer tüdő ADC felfedezése.

IV.1.2. Peri- és intratumoralis mononukleáris sejtes infiltráció

Az esetek 56%-ában figyeltünk meg peritumoralis mononukleáris sejtes infiltrációt, míg 44%-ukban ez nem volt jelen. Az esetek 69%-ában $<20\%$ és 31%-ában $\geq 20\%$ intratumoralis mononukleáris sejtes infiltráció volt azonosítható. Az agyi áttéteket vizsgálva pozitív korrelációt igazoltunk a mononukleáris gyűrű jelenléte és az intratumoralisan megfigyelhető mononukleáris sejtek mennyisége között.

IV.1.3. PD-L1 és PD-1 expresszió

A primer tüdő ADC-k agyi áttéteiben a különböző határértékeket alkalmazva az esetek 41,2%-a $\geq 1\%$ -os, 31,5%-a $\geq 5\%$ -os, 21,8%-a $\geq 50\%$ -os tumorsejt PD-L1 expressziót mutatott. Az immunsejtek tekintetében a minták 63,8%-ában $\geq 1\%$ -os, 48,1%-ában $\geq 5\%$ -os, 25,1%-ában $\geq 10\%$ -os PD-L1, valamint 75,2%-ában $\geq 1\%$ -os, 26,1%-ában $\geq 5\%$ -os, 11,5%-ában $\geq 10\%$ -os PD-1 expressziót azonosítottunk. A POPLAR-tanulmány szerinti PD-L1 expressziós csoportosítást alkalmazva az esetek 26,4%-a a PD-L1-et „nem expresszáló”, 73,6%-a pedig a PD-L1-et expresszáló csoportba került. Az expresszió mértéke alapján az esetek 38,0%-a alacsonyan, 20,3%-a közepesen, 41,7%-a pedig magasan expresszálta a PD-L1-et. Pozitív összefüggést figyeltünk meg a PD-L1 pozitív tumor- és immunsejtek és a PD-1 pozitív immunsejtek mennyisége között csaknem az összes határérték esetén. A POPLAR-tanulmány szerinti PD-L1-et „magasan expresszáló” esetekben magasabb volt az immunsejtek PD-1 expressziója mindegyik határértéknél.

IV.1.4. Az alkalmazott terápiák hatása a mononukleáris sejtek eloszlására, mennyiségére és a PD-L1 és PD-1 expresszió mértékére

A masszív peri- vagy intratumoralis mononukleáris sejtes infiltrációt mutató esetek aránya megegyezett az agyi áttét műtete előtt kemo- vagy szteroid terápiát kapott vagy nem kapott betegcsoportok között. A közvetlenül az agyi áttét műtete előtt alkalmazott szteroid terápia szignifikáns összefüggést mutatott az immunsejtek alacsonyabb PD-L1 expressziójával 10%-os határértéknél a szteroid terápiában nem részesült betegcsoporthoz képest. Nem volt kimutatható összefüggés a tumorsejtek PD-L1 és az immunsejtek PD-1 expressziójában a szteroid terápiában részesült vagy nem részesült betegcsoportokat vizsgálva. Az agyi áttét műtete előtt alkalmazott kemoterápia nem befolyásolta a tumorsejtek PD-L1 és az immunsejtek PD-L1 és PD-1 expresszióját.

IV.1.5. Az agyi áttétekben megfigyelhető mononukleáris sejtek eloszlásának és mennyiségének összefüggése a PD-L1 és PD-1 expresszióval

Az alacsony, azaz 20% alatti intratumoralis mononukleáris sejtmennyiség a tumorsejtek alacsony PD-L1 expressziójával korrelált mindegyik határértéknél. Az immunsejtek PD-L1 expresszióját vizsgálva, az intratumoralis mononukleáris sejtek 20%-ot meghaladó jelenléte magasabb PD-L1 pozitivitással társult mindegyik határértéknél. A mononukleáris gyűrű jelenléte szintén az immunsejtek magasabb PD-L1 pozitívításával korrelált mindegyik határértéknél. Az immunsejtek 1% fölötti PD-1 pozitívítása szignifikáns összefüggést mutatott a 20%-ot meghaladó intratumoralis mononukleáris sejtmennyiséggel és a mononukleáris gyűrű jelenlétével. A POPLAR-tanulmányban használt kategóriák alapján létrehozott csoportokat vizsgálva a PD-L1-et „magasan expresszáló” esetekben figyeltünk meg összefüggést az expressziós szint, valamint a mononukleáris gyűrű jelenléte és a 20%-ot meghaladó intratumoralis mononukleáris sejtmennyiség között, az „alacsonyan expresszáló” vagy „nem expresszáló” csoportokhoz képest.

IV.1.6. Az alkalmazott terápiák összefüggése a túléléssel

A primer tüdő ADC korai, I-es és II-es stádiumban történő diagnózisa, a tüdőtumor műtéti rezekciója és a kemoterápia alkalmazása szignifikánsan jobb OS-t eredményezett egyváltozós log-rank teszttel. A többváltozós Cox regressziós analízis során a tüdőtumor műtéti rezekciója pozitív, a kemoterápia hiánya negatív független prognosztikus tényezőnek bizonyult. Azonban ezek a paraméterek log-rank teszttel nem mutattak összefüggést az agyi áttét műtététől számított túléléssel.

IV.1.7. A mononukleáris sejtek eloszlásának és mennyiségének összefüggése a túléléssel

A peritumoralis mononukleáris gyűrű hiánya rosszabb túléléssel társult az agyi áttét műtététől számítva. A fenti összefüggés a többváltozós Cox analízist követően csak erős tendenciának bizonyult. A 20%-ot meghaladó intratumoralis mononukleáris infiltrátummal bíró agyi áttétes betegek primer tumor diagnózisától számított túlélése kedvezőbb.

IV.1.8. A PD-L1 és PD-1 expresszió összefüggése a túléléssel

A tumor- és immunsejtek fehérje expressziós adatait log-rank teszttel vizsgálva, nem találtunk összefüggést sem a PD-L1, sem a PD-1 expressziós értékek és az OS vagy az agyi áttét műtététől számított túlélés között egyik általunk használt határérték esetén sem. Az eredmények többváltozós Cox regressziós analízis során sem érték el a szignifikáns értéket. A POPLAR-tanulmány alapján létrehozott betegcsoportok vizsgálatakor az egyváltozós log-rank

tesztet alkalmazva a PD-L1-et „nem expresszáló” betegcsoport jobb túlélést mutatott az agyi áttét műtététől számítva a PD-L1-et expresszáló betegcsoportéhoz képest. Kaplan–Meier analízissel a PD-L1-et „alacsonyan expresszáló” betegek teljes túlélése bizonyult kedvezőbbnek a PD-L1-et „magasan expresszáló” betegekhez képest.

IV.2. 61 primer tüdő adenocarcinoma és agyi áttét párt tartalmazó kohort

IV.2.1. Túlélési adatok

A betegek átlagos teljes túlélése 41,2 ($\pm 26,0$), míg az agyi áttét műtététől számított túlélés 16,4 ($\pm 12,9$) hónap volt. A PFS 21,1 ($\pm 18,1$) hónap volt, az agyi áttét kialakulásáig pedig átlagosan 26,3 ($\pm 23,5$) hónap telt el. A 61 betegből 5 esetben az agyi áttét került először diagnózisra.

IV.2.2. Peri- és intratumoralis mononukleáris sejtes infiltráció

A primer tumorokat vizsgálva az esetek 78%-ában volt megfigyelhető peritumoralis mononukleáris sejtes infiltráció, míg 22%-ukban nem volt jelen. Az esetek 84%-ában $<20\%$ és 16%-ában $\geq 20\%$ intratumoralis mononukleáris sejtes infiltráció volt azonosítható. Az agyi áttéteket vizsgálva peritumoralis mononukleáris sejtes infiltráció az esetek 63%-ában volt látható, míg 37%-ában nem volt jelen. Az intratumoralis mononukleáris sejtek tekintetében 69%-ban azonosítottunk $<20\%$ és 31%-ban $\geq 20\%$ infiltrációt.

IV.2.3. PD-L1 és PD-1 expresszió

A primer tüdő ADC-k 36,1%-a $\geq 1\%$ -os, 24,6%-a $\geq 5\%$ -os, 6,6%-a $\geq 50\%$ -os tumorsejt PD-L1 expressziót mutatott. Az immunsejtek tekintetében a minták 44,3%-ában $\geq 1\%$ -os, 9,8%-ában $\geq 5\%$ -os, 3,3%-ában $\geq 10\%$ -os PD-L1, valamint 83,6%-ában $\geq 1\%$ -os, 45,9%-ában $\geq 5\%$ -os, 21,3%-ában $\geq 10\%$ -os PD-1 expressziót azonosítottunk. Az agyi áttétek 34,4%-a $\geq 1\%$ -os, 27,9%-a $\geq 5\%$ -os, 18%-a $\geq 50\%$ -os tumorsejt PD-L1 expressziót mutatott. Az immunsejtek tekintetében a minták 35,6%-ában $\geq 1\%$ -os, 6,8%-ában $\geq 5\%$ -os, 6,8%-ában $\geq 10\%$ -os PD-L1, valamint 63,9%-ában $\geq 1\%$ -os, 24,6%-ában $\geq 5\%$ -os, 11,5%-ában $\geq 10\%$ -os PD-1 expressziót figyeltünk meg.

IV.2.4. A primer tüdő adenocarcinómában és a hozzá tartozó agyi áttétben jelenlévő mononukleáris sejtek elhelyezkedésének és mennyiségének összefüggései

Nem találtunk összefüggést a primer tüdő ADC-ben és a hozzá tartozó agyi áttétben lévő intratumoralis vagy peritumoralis mononukleáris sejtes infiltráció között. Szintén nem

találtunk összefüggést egy adott primer tüdő vagy agyi áttét mintán belül a peritumoralis és intratumoralis mononukleáris sejtes infiltrációt összehasonlítva.

IV.2.5. A primer tüdő adenocarcinomában és a hozzá tartozó agyi áttétben megfigyelhető PD-L1 és PD-1 expressziók közötti összefüggések

A primer tüdő ADC-ben és a hozzá tartozó agyi áttétben megfigyelhető PD-L1 és PD-1 expressziós adatok összehasonlításakor szignifikáns pozitív korrelációt mutattunk ki a tumorsejtek PD-L1 expressziójában a párok között, az általunk alkalmazott mindhárom határértéknél. A legerősebb korrelációt a határérték nélküli összehasonlításakor láttuk. Ez az eredmény Bonferroni-korrekcióval is szignifikáns maradt. Az immunsejtek PD-L1 expresszióját összehasonlítva hasonló, bár gyengébb összefüggést figyeltünk meg az összetartozó primer tüdő ADC és agyi áttét párok között 10%-os határértéknél. Azonban ez az összefüggés Bonferroni-korrekcióval nem érte el a szignifikáns értéket. Az immunsejtek PD-1 expresszióját tekintve nem volt kimutatható összefüggés az összetartozó primer tüdő ADC és agyi áttét párok között. Bár a szignifikáns értéket nem érte el a változás mértéke, az agyi áttétekben a PD-1 expresszió csökkenését figyeltük meg.

IV.2.6. A mononukleáris sejtek eloszlásának és mennyiségének összefüggései a PD-L1/PD-1 expresszióval a primer tüdő ADC mintákban

A primer tüdő ADC mintákban a 20%-nál kevesebb intratumoralis mononukleáris sejtes infiltrátum az immunsejtek alacsonyabb PD-L1 expressziójával társult. A PD-1 expresszióval való összevetésnél egy tendenciát figyeltünk meg a kevés stromalis immunsejtes infiltrátum és az alacsony PD-1 expresszió között. Az intratumoralis immunsejtek mennyisége nem mutatott összefüggést a tumorsejtek PD-L1 expressziójával. A peritumoralis mononukleáris sejtek jelenléte pozitív korrelációt mutatott az immunsejtek PD-1 expressziójával, azonban nem korrelált a tumorsejtek és immunsejtek PD-L1 expressziójával.

IV.2.7. Az immunsejtek mennyiségének és eloszlásának, valamint a PD-L1/PD-1 expresszió mértékének összefüggése a túléléssel

A túlélési adatokat vizsgálva nem találtunk összefüggést az immunsejtek mennyisége, eloszlása, valamint a PD-L1 és PD-1 fehérje expressziós adatok tekintetében sem.

IV.2.8. A terápiák hatása a mononukleáris sejtes infiltrátum változásának irányára a primer tüdő tumorhoz képest a hozzá tartozó agyi áttétben

A peritumoralis és intratumoralis mononukleáris sejtek mennyiségében bekövetkezett változás irányát (növekedés/csökkenés/nincs változás) a primer tüdő ADC és a hozzá tartozó agyi áttéti minták között vizsgáltuk az egyes terápiák függvényében. Mindkét paraméter esetén a változás iránya azonos volt az agyi áttétekben a primer tumorhoz képest attól függetlenül, hogy az adott páciens részesült-e kemo-, sugár- vagy szteroid terápiában a primer tüdő vagy az agyi áttét műtete előtt.

IV.2.9. A terápiák hatása a PD-L1/PD-1 expresszió változásának irányára a primer tüdő tumorhoz képest a hozzá tartozó agyi áttétben

A tumorsejtek PD-L1 és az immunsejtek PD-L1 és PD-1 expressziójában bekövetkezett változás irányát (növekedés/csökkenés/nincs változás) a primer tüdő ADC és a hozzá tartozó agyi áttéti minták között az egyes terápiák függvényében vizsgálva lényegében nem volt megfigyelhető szignifikáns különbség Bonferroni korrekció elvégzésével. Egy esetben, a primer tüdő tumor műteti rezekciója előtt kapott sugárkezelés esetén mutatkozott szignifikáns különbség. A primer tumormintához képest az agyi áttétben az immunsejtek magasabb PD-1 expresszióját igazoltuk, azonban ezt az összefüggést csak az 1%-os határértéknél láttuk, és csak 2 beteg részesült ilyen terápiában a 61 főből. Az agyi áttét műtete előtt kemoterápiában részesült betegek agyi áttétében a tumorsejtek PD-L1 expressziója szignifikánsan magasabbnak mutatkozott a primer tumor tumorsejtjeihez képest. Azonban ez az összefüggés nem volt szignifikáns Bonferroni korrekció elvégzésekor.

IV.3. 19 primer tüdő ADC és agyi áttét párt tartalmazó kohort

IV.3.1. Tumor infiltráló lymphocyták mennyisége

A 38 minta HE festett metszeteit szemi-kvantitatív módon megvizsgálva, mindegyik tumor mikro környezetében $\geq 1\%$ lymphocytát azonosítottunk. Így mindegyik mintát alkalmasnak találtuk a további vizsgálatok elvégzésére.

IV.3.2. T-sejt receptor fragmenthossz-analízisének eredményei

A vizsgálatba bevont 38 mintából 2 primer tüdő ADC és 3 agyi áttét mintában nem volt elegendő DNS, így az analízis sikertelen volt. A vizsgálatra alkalmas 17 primer tüdő ADC mintából egy, míg a 16 agyi áttét mintából három bizonyult monoklonálisnak. TCR státusz változást (poliklonális \rightarrow monoklonális) két agyi áttétben figyeltünk meg a hozzá tartozó primer tüdő adenocarcinomához képest.

IV.3.3. A fragmenthossz-analízis eredményeinek összefüggése a klinikai adatokkal

A terápiás adatokat elemezve a primer tüdő ADC műtete előtt kapott kemoterápia nem befolyásolta a tüdő ADC minta TCR státuszát. Az agyi áttét műtete előtt kapott kemo- vagy szteroid terápia önmagában nem volt hatással az agyi áttét TCR státuszára, valamint az összetartozó primer tüdő ADC és agyi áttét minták TCR státusza között megfigyelhető változásra sem. Azonban a kemo- és szteroid terápiában egyaránt részesült betegeknél a kettős terápia szignifikánsan befolyásolta az összetartozó tumor minták között megfigyelhető TCR státusz változást: a mindkét terápiában részesült betegek 40%-ánál a primer tüdő ADC poliklonális státusza monoklonálissá változott az agyi áttétben.

V. MEGBESZÉLÉS

Munkánk során 61 primer tüdő ADC és 208 tüdő ADC eredetű agyi áttétben határoztuk meg az immunsejtek eloszlásának és mennyiségének, a tumorsejtek PD-L1 expressziójának és az immunsejtek PD-L1 és PD-1 expressziójának összefüggéseit. További 19 primer tüdő ADC – agyi áttét párban a minták TCR klonalitását határoztuk meg. Fontosnak tartottuk csak ADC és ADC eredetű áttétek vizsgálatát, hiszen a korábbi eredmények alapján a PD-L1 expresszió túlélésre gyakorolt hatása a csak tüdő ADC mintákat vizsgáló tanulmányokban is ellentmondásos. A primer tüdőcarcinoma kezelése során gyakran alkalmaznak szisztémás kemoterápiát vagy sugárterápiát, agyi áttét esetén pedig szteroid terápiát. Ezen terápiák hatásának vizsgálata kulcsfontosságú, mivel nem pontosan ismert, hogy miként befolyásolják a jelenleg elfogadott biomarker, a tumorsejtek PD-L1 expressziójának mértékét az agyi áttétekben, ezáltal az immunellenőrzőpont-gátló terápia indikációs körét. A további paramétereket újabb potenciális biomarkerek azonosítása érdekében vizsgáltuk. A primer tüdő ADC – agyi áttét párokat vizsgálva arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a tumorpárok fent említett paramétereik között megfigyelhető összefüggések alapján következtethetünk-e a primer tumor jellemzőiből az agyi áttét sajátosságaira, terápiás érzékenységére, illetve, hogy ezen összefüggéseket miként befolyásolják az egyes onkoterápiák.

V.1. A tumorsejtek PD-L1 expressziója

Adataink alapján látható, hogy a hazai, agyi áttétet adó tüdő ADC-ben szenvedő betegek legalább 34-41%-a részesülhet nivolumab vagy pembrolizumab monoterápiában másodvonalban, mivel ezek alkalmazásához elegendő a tumorsejtek 1%-ot meghaladó PD-L1 expressziója. 2017-től pedig már elsővonalban is alkalmazható a pembrolizumab terápia

pemetrexed vagy carboplatin kemoterápiával kombinálva PD-L1 expressziós szinttől függetlenül. Ugyanakkor atezolizumab monoterápiában másodvonásban csak az áttétes betegek 22%-a részesíthető a tumorsejtek PD-L1 expresszióját figyelembe véve. Más tanulmányokban primer tüdő ADC mintákat vizsgálva eltérő expressziós szintekről számoltak be. Pawelczyk és *mtsai* 364 tüdő ADC mintát vizsgálva 29,1%-ban kevesebb, mint 1%-os és 4,4%-ban 50%-ot meghaladó PD-L1 expressziót írtak le. Kim és *mtsai* 71,9%-ban kevesebb, mint 1%-os és 13%-ban 50%-ot meghaladó PD-L1 expressziót figyeltek meg 146 tüdő ADC-s beteget vizsgálva. A kohortok között megfigyelhető eltérő PD-L1 expressziós szintek a különböző antitestek alkalmazásából is adódhat.

A tüdő ADC eredetű agyi áttétekben a tumorsejtek PD-L1 expresszióját sem a betegség lefolyása során alkalmazott kemoterápia, sem az agyi áttét műtete előtt közvetlenül alkalmazott szteroid terápia nem befolyásolta. Melanoma eredetű agyi áttétekben már beszámoltak arról, hogy a szteroid terápia nincs hatással a tumorsejtek PD-L1 expressziójára. Azonban primer nem kissejtes tüdő carcinoma (NSCLC) mintákat vizsgálva ellentmondásosak az eredmények. Shin és *mtsai* szignifikáns PD-L1 expresszió növekedést, azonban kutatócsoportunk másokhoz hasonlóan a PD-L1 expresszió csökkenését írta le platina bázisú kemoterápiát követően. Míg a primer daganatra adott kemoterápia az elsődleges lokalizációban befolyásolhatja a tumorsejtek PD-L1 expresszióját, addig az agyi áttétek esetén, feltehetően a vér-agy gát védő szerepe miatt, a terápiás hatás elmaradása mellett, a PD-L1 expressziót befolyásoló hatás sem alakul ki.

A primer tüdő ADC – agyi áttét párokat vizsgálva pozitív korrelációt figyeltünk meg a párok között a tumorsejtek PD-L1 expresszióját tekintve. Eredményeink megegyeznek más, primer NSCLC és összetartozó agyi áttét párokat vizsgáló tanulmányok eredményeivel. Mansfield és *mtsai*, valamint Takamori és *mtsai* 5%-os határértéket használva írtak le hasonló összefüggést. Kim és *mtsai* 1%-os és 50%-os határérték esetén számoltak be a párok PD-L1 expressziója között megfigyelhető korrelációról. Mivel az agyi áttétek valószínűleg csak néhány tumorsejtből származnak, két főbb hipotézis is magyarázhatja a fenti összefüggést: 1) Az agyi áttétek olyan primer tumorsejtekből fejlődnek ki, amelyek véletlenszerű szelekciója a PD-L1 pozitív tumorsejtek arányát tükrözi. 2) A metasztatizáló tumorsejtek PD-L1 expressziójától függetlenül az agyi áttétekben a primer tumorra jellemző PD-L1 expressziós mintázat alakul ki. Ezt a hipotézist Gupta és *mtsai* sejtes kísérletei is alátámasztják, miszerint az egyensúlyban lévő sejtpopulációkból izolált szubpopulációk ugyanazt az egyensúlyt érik el. A tumor párok tumorsejtjeinek PD-L1 expressziója között megfigyelt összefüggést a preoperatíván alkalmazott kemo-, sugár- és szteroid terápia nem befolyásolta. Takamori és *mtsai* bár kis

esetszámot vizsgáltak, szintén nem mutattak ki kemoterápia által kiváltott hatást NSCLC eredetű agyi áttétek PD-L1 expressziójára.

Habár mi nem találtuk a primer tüdő ADC-k tumorsejtjeinek PD-L1 expresszióját prognosztikusnak, Pawelczyk és *mtsai* 364 tüdő ADC mintát vizsgálva 50%-nál kevesebb PD-L1 expresszió esetén kedvezőbb túlélésről számoltak be. Az agyi áttétek tumorsejtjeinek PD-L1 expressziója a teljes kohortban nem bizonyult prognosztikusnak, azonban a klinikai alcsoportokat külön vizsgálva, a primer tumor műtéten átesett és többszörös agyi áttétel rendelkező betegcsoportban az 1% alatti PD-L1 expresszió szignifikánsan jobb túléléssel társult az agyi áttét műtététől számítva. Feltételezhető, hogy ezekben az esetekben a PD-L1/PD-1 gátló szerek önmagukban is jelentős hatást érhetnek el az immunválasz reaktiválásával.

V.2. Tumor-asszociált immunsejtek

V.2.1. A tumor-asszociált immunsejtek mennyiségének és eloszlásának összefüggései

A primer tüdő ADC minták 84%-ában, míg az agyi áttétek 69%-ában kevesebb, mint 20% intratumoralis gyulladásosejt beszűrődés volt látható. A mononukleáris gyűrű a primer minták 22%-ában, míg az agyi áttétek 44%-ában hiányzott. Az alacsony immunsejtes infiltrátummal rendelkező daganatok esetén feltételezhető, hogy a betegek nem rendelkeznek a daganatot eliminálni képes lokális immunválasszal. Valószínűleg ezen betegek esetén nem várható kedvező hatás immunellenőrzőpont-gátló monoterápia alkalmazásakor. Olyan szerekkel kombinálva, melyek növelik az immunsejtek tumorszövet környezetébe történő vándorlását, mint például a CTLA-4 gátló ipilimumab, kedvezőbb hatás érhető el.

A primer tüdő ADC - agyi áttét párokat összevetve nem találtunk összefüggést a tumor mikrokörnyezetében megfigyelhető immunsejtek elhelyezkedésében és mennyiségében. Mansfield és *mtsai* 73 primer tüdőcarcinoma – agyi áttét pár esetén szignifikánsan több tumor infiltráló lymphocytáról számoltak be a primer tumorban az agyi áttétéhez képest. Kim és *mtsai* 12 primer tüdőcarcinoma – agyi áttét párt vizsgálva írták le, hogy nincs különbség az eltérő lokalizációban lévő, összetartozó tumorpárok mikrokörnyezetében található immunsejtek mennyiségében.

A preoperatív alkalmazott terápiák, így a kemo-, sugár- és szteroid terápia hatását vizsgálva azt találtuk, hogy egyik eljárás sem befolyásolja az agyi áttétekben jelenlévő immunsejtek elhelyezkedését és mennyiségét, a primer tumorhoz viszonyítva sem. Berghoff és *mtsai* vegyes eredetű agyi áttét kohortokon szintén kimutatták, hogy sugár- és szteroid terápiától

független az immunsejtek eloszlása a tumor mikrokörnyezetében. Mindezek alapján egyik terápia sincs hatással az immunsejtek tumoros mikrokörnyezetbe való vándorlására.

Az agyi áttétek esetén pozitív korrelációt mutattunk ki a stromális immunsejtek mennyisége és a mononukleáris gyűrű jelenléte között. Az irodalmi adatok nem homogén betegcsoportokat vizsgálva ellentmondásosak. Leírtak már az agyi áttétek körül több gyulladásosejtet, mint intratumoralisan, ahogy beszámoltak már a tumor stromában megfigyelhető magasabb arányú immunsejtes beszűrődésről is. A primer tüdő ADC-k esetén az agyi áttétekben megfigyelthez hasonló tendenciát láttunk.

A primer tüdő ADC mintákban nem figyeltünk meg összefüggést az immunsejtek mennyisége és eloszlása, valamint a tumorsejtek PD-L1 expressziója között. Azonban az agyi áttétekben a stromális immunsejtek mennyisége és a tumorsejtek PD-L1 expressziója pozitív korrelációt mutatott. Más tanulmányokban melanoma és NSCLC eredetű agyi áttéteket vizsgálva, szintén szignifikáns pozitív korrelációt írtak le a tumor infiltráló lymphocyták mennyisége és a minták tumorsejtjeinek PD-L1 expressziója között. Ez az eredmény megegyezik azzal a megfigyeléssel, hogy a tumorsejtek PD-L1 expressziója immunológiailag aktív mikrokörnyezetet tükröz.

A primer tüdő ADC mintákban az immunsejtek mennyisége és eloszlása nem bizonyult prognosztikusnak. Korábbi tanulmányokban azonban kimutatták, hogy NSCLC esetén a tumor infiltráló vagy tumor stromában megfigyelhető lymphocyták független prognosztikus markerek. A magas arányú immunsejtes beszűrődés kedvezőbb prognózissal társul. Ez az összefüggés a mi kohortunkban feltételezhetően a primer tüdő ADC minták alacsony száma miatt nem volt kimutatható. Eredményeink alapján a tüdő ADC eredetű agyi áttétekben megfigyelhető mononukleáris sejtes infiltráció, főleg peritumoralis lokalizációban, társult kedvezőbb túléléssel, mind a primer tumor diagnózisától, mind az agyi áttét műtététől számítva. Ezekben az esetekben az immunellenőrzőpont-gátló szerek általi immunrendszer reaktiválás további kedvező klinikai hatással járhat.

V.2.2. A tumor-asszociált immunsejtek PD-L1 és PD-1 expressziójának összefüggései

A párokban az immunsejtek PD-L1 expressziója a tumorsejtek PD-L1 expressziójához hasonló összefüggést mutatott, azonban az immunsejtek PD-1 expressziója eltérő volt az agyi áttétben a primer tüdő ADC-hez képest. Kim és *mtsai*, valamint Berghoff és *mtsai* munkájához hasonlóan az agyi áttétekben az immunsejtek PD-1 pozitivitásának csökkenése volt látható. Az agyi áttétekben a PD-L1 pozitív tumor- és immunsejtek mennyisége pozitívan korrelált a PD-1 pozitív immunsejtek mennyiségével. Duchnowska és *mtsai* emlőcarcinoma

eredetű agyi áttéteket vizsgálva nem figyeltek meg összefüggést a PD-1 és PD-L1 expresszió között. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a tumorsejtek és immunsejtek között dinamikus kommunikáció zajlik, valamint hogy a kimerült, PD-1 expresszáló immunsejtek a környezetükben PD-L1 expressziót indukálnak.

Mind a primer tüdő ADC, mind az agyi áttét mintákban a 20%-ot meghaladó stromalis immunsejtes infiltrátum, valamint a mononukleáris gyűrű jelenléte az immunsejtek magasabb PD-L1 és PD-1 expressziójával társult. Mivel az agyi áttétekben az immunsejtek PD-L1 és PD-1 expressziója is pozitív korrelációt mutatott a tumorsejtek PD-L1 expressziójával, az együttesen megfigyelhető fehérje expressziók potenciálisan immunszuppresszív környezetre utalnak.

Különböző primer daganatokból származó agyi áttéteket vizsgáló tanulmányokban arról számoltak be, hogy a szteroid terápiának nincs hatása az agyi áttétben megfigyelhető PD-L1 expresszió mennyiségére. Ezzel ellentétben saját kutatásunk során az immunsejtek PD-L1 expresszióját az agyi áttétekben a közvetlenül az agyi áttét műtete előtt alkalmazott szteroid terápia szignifikánsan csökkentette. A primer tüdő ADC – agyi áttét párok között megfigyelt változás iránya a fentiekhez hasonló tendenciát mutatott szteroid terápia esetén. Ezek alapján a szteroid terápia az immunsejtek mennyiségének változtatása nélkül csökkentheti azok PD-L1 expresszióját. A preoperatív alkalmazott szisztémás kemoterápia és a sugárterápia nem befolyásolta a PD-L1 és PD-1 expresszió mértékét az agyi áttétekben. Mivel a szteroid terápia hatással lehet az agyi áttétekben az immunsejtek PD-L1 expressziójára, azonban nem befolyásolta a tumorsejtek PD-L1 és az immunsejtek PD-1 expresszióját, így a kombinált pozitív érték (CPS) bevezetése esetén szükséges lehet az agyi áttétek vizsgálata a PD-L1/PD-1 gátló kezelés előtt.

Az agyi áttétek esetén kapott eredményeinket a POPLAR-tanulmány alapján is kiértékeljük. Mivel ez a tumorsejtek és immunsejtek PD-L1 expresszióját is figyelembe veszi, így biológiailag relevánsabb információt nyújthat. A minták 26,4%-a a „nem expresszáló” csoportba került, ami azt jelenti, hogy sem a tumorsejtek, sem az immunsejtek nem expresszálták a PD-L1-et, így ezek a betegek nagy valószínűséggel nem profitálnának a PD-L1/PD-1 gátló kezeléssel. A PD-L1-et expresszáló minták közül 41,7% bizonyult „magasan expresszáló”-nak, ami a teljes populáció 30%-a. Ezeknél a betegeknél valószínűleg jelentős kedvező hatás érhető el PD-L1/PD-1 gátló kezeléssel. A PD-L1-et „magasan expresszáló” csoportban a PD-L1 expresszió és a mononukleáris gyűrű jelenléte, valamint a 20%-ot meghaladó stromalis immunsejtes infiltrátum szignifikáns összefüggést mutatott. Ugyanebben a betegcsoportban az immunsejtek magasabb PD-1 expressziója is megfigyelhető volt. A

túlélési adatokkal összevetve a POPLAR-tanulmány szerinti csoportokat a teljes kohortban, nem találtunk összefüggést. A klinikailag homogenizált betegcsoportok közül, a primer tumor műtéten átesett és többszörös agyi áttéttel rendelkező betegcsoportban a „nem expresszáló” agyi áttét műtete utáni túlélése az expresszálókhöz, valamint az „alacsonyan expresszáló” teljes túlélése a „magasan expresszálókhöz” képest bizonyult jobbnak. Bár kezdetben úgy tűnt, hogy a POPLAR-tanulmány szerinti kombinált értékelés hasznos lehet a terápiás javaslat felállításakor, mégsem terjedt el az alkalmazása. Néhány tanulmányban azonban megtalálható ennek az értékelő rendszernek az alkalmazása. Így például Gadgeel és *mtsai* agyi áttétes NSCLC-s betegeknél 42,8%-os „nem expresszáló” és 17,5%-os „magasan expresszáló” arányt írtak le 360 beteget vizsgálva.

V.3. T-sejt receptor klonalitás

A klinikai vizsgálatok alapján egyre nyilvánvalóbb, hogy a TCR státusz potenciális biomarkerként szolgálhat a tumorelles adaptív immunitás vizsgálatához és az immunellenőrzőpont-gátló kezelésre adott válasz előrejelzéséhez az egyes szolid daganatokban. A TCR státusz meghatározásához leggyakrabban a CDR3 régió szekvenálását alkalmazzák.

Reuben és *mtsai* 11 neoadjuváns kezelésben nem részesült tüdő ADC mintát vizsgálva mutatták ki, hogy a magas intratumoralis TCR heterogenitás fokozott kiújulással, progresszióval és rövidebb betegségmentes túléléssel társul. Saját mintáink közül a TCR analízisre alkalmas 17 primer tüdő ADC mintából 16 bizonyult poliklonálisnak, ami a fenti eredmény alapján nem meglepő, hiszen minden esetben kialakult agyi áttét, tehát a betegség progrediált. Melanoma és prosztata carcinoma esetén alkalmazott anti-CTLA-4 kezelés növelte a mintákban a TCR diverzitást, valamint az eredetileg magas TCR diverzitással bíró betegeknél alkalmazott CTLA-4 gátló terápia kedvezőbb teljes túléléssel járt. Melanoma mintákat vizsgálva a PD-1 gátló kezelésre reagáló betegek tumor infiltráló lymphocytáinak magas TCR diverzitása volt jellemző. A fentiek alapján valószínűsíthető, hogy a PD-1 gátló kezelés előtt alkalmazott CTLA-4 gátlás fokozhatja annak terápiás hatását a daganatok poliklonális TCR státuszának előidézése által. Saját mintáinkat nézve a primer tüdő ADC-k több, mint 90%-ában és az agyi áttétek több, mint 80%-ában lenne várható terápiás hatás PD-1 gátló kezelés esetén, ami CTLA-4 gátló előkezeléssel tovább növelhető. Azonban más tanulmányok azt feltételezik, hogy a csökkent TCR diverzitás tumor-antigén-specifikus T-sejtek akkumulációját mutathatja a tumor mikro környezetében, tehát a TCR diverzitás vizsgálatával azonosíthatóvá válnak esetleges tumor-reaktív T-sejt klónok. Echchakir és *mtsai*

9 NSCLC mintából 3 esetben írtak le oligoklonalitást, azaz domináns T-sejt klónt, ami bizonyos T-sejt alpopulációk relatív expanziójával társult. Saját tüdő ADC mintáink közül csak egy, az agyi áttétek közül pedig 3 esetben figyeltünk meg monoklonalitást. Annak tisztázására, hogy ezekben a mintákban a domináns T-sejt klón jelenléte valóban tumor-specifikus immunitást jelezhet-e, további nagyszámú betegcsoportok vizsgálata és túlélési analízise szükséges.

A párok TCR státuszát összehasonlítva két esetben figyeltünk meg változást, ami összefüggést mutatott az agyi áttét műtete előtt alkalmazott kemo- és szteroidterápiával. A két esetben a terápiás szempontból feltételezhetően kedvezőbb poliklonális státusz monoklonálissá változott az agyi áttétben a primer tüdő ADC-hez képest. Tehát ha a TCR státusz terápiás biomarkerként elfogadásra kerül, akkor feltételezhető, hogy szükségessé válik mindegyik tumorminta vizsgálata a kezelés előtt.

Kutatásaink eredménye alapján összességében elmondható, hogy a daganatos betegség kezelése során alkalmazott hagyományos onkoterápiás eljárások, így a kemo- és sugárterápia, valamint az agyi áttétek esetén csaknem rutinszerűen alkalmazott szteroid terápia nem befolyásolja az immunellenőrzőpont-gátló terápia szempontjából fontos biomarker, a tumorsejtek PD-L1 expressziós szintjét az agyi áttétekben. Az immunsejtek PD-L1 expresszióját azonban a szteroid terápia szignifikánsan csökkentette. Bár csak 16 pár esetén tudtuk vizsgálni a TCR klonalitást, elmondhatjuk, hogy az agyi áttét műtete előtt alkalmazott kemoterápia és szteroid terápia együttesen befolyásolhatja az agyi áttétek TCR klonalitását, azonban ennek pontosabb megítélése érdekében további vizsgálatok szükségesek. Összességében feltételezhető, hogy a tumorsejtek PD-L1 expressziója a daganat saját jellegzetessége, amit nem befolyásolnak a rutinszerűen alkalmazott onkoterápiák. Amennyiben továbbra is a tumorsejtek PD-L1 expressziójának mértéke marad az egyetlen PD-L1/PD-1 gátló kezelésre vonatkozó terápiás kritérium, valószínűsíthető, hogy áttétes betegeknél a terápiás indikáció felállításához elegendő lehet csak a primer tumorminta PD-L1 expressziójának meghatározása, ami nem operálható agyi áttétek jelenlétekor nagy segítség lenne. Azonban ha a CPS vagy a TCR státusz meghatározása bevezetésre kerül, elengedhetetlen lesz mindegyik tumorminta vizsgálata a kezelés megkezdéséhez.

VI. KÖVETKEZTETÉSEK

- A tumorsejtek PD-L1 expresszióját sem a betegség lefolyása során alkalmazott kemoterápia, sem az agyi áttét műtete előtt közvetlenül alkalmazott szteroid terápia nem befolyásolja tüdő ADC eredetű agyi áttétekben.
- A primer tüdő ADC – agyi áttét párok tumorsejtjeinek PD-L1 expressziója között megfigyelt pozitív korrelációt nem módosítja a preoperatívan alkalmazott kemo-, sugár- és szteroid terápia.
- A primer tumor műtéten átesett és többszörös agyi áttéttel rendelkező betegcsoportban a tumorsejtek 1% alatti PD-L1 expressziója szignifikánsan jobb túléléssel társul az agyi áttét műtététől számítva.
- Az agyi áttétekben az immunsejtek elhelyezkedésére és mennyiségére nincs hatással a preoperatívan alkalmazott kemo-, sugár- és szteroid terápia, a primer tumorhoz viszonyítva sem.
- A tüdő ADC eredetű agyi áttétekben jelenlévő mononukleáris gyűrű kedvezőbb túléléssel társul, mind a primer tumor diagnózisától, mind az agyi áttét műtététől számítva.
- Az agyi áttétekben a preoperatív szteroid terápia az immunsejtek mennyiségének változtatása nélkül csökkentheti azok PD-L1 expresszióját.
- A POPLAR-tanulmány szerinti betegcsoportok esetén a PD-L1 expresszió prognosztikus markernek bizonyult tüdő ADC eredetű agyi áttétekben.
- A kettős kemo- és szteroid terápia megváltoztathatja a TCR státuszt az agyi áttétekben a primer tüdő ADC-hez képest.

VII. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

VII. I. Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. **Téglási V**, Reiniger L, Fábíán K, Pipek O, Csala I, Bagó AG, Várallyai P, Vízkeleti L, Rojkó L, Tímár J, Döme B, Szállási Z, Swanton C, Moldvay J. Evaluating the significance of density, localization, and PD-1/PD-L1 immunopositivity of mononuclear cells in the clinical course of lung adenocarcinoma patients with brain metastasis. *Neuro Oncology* 2017 Aug 1;19(8):1058-1067.
doi: 10.1093/neuonc/now309. IF: 9,384
2. **Téglási V**, Pipek O, Lózsa R, Berta K, Szüts D, Harkó T, Vadász P, Rojkó L, Döme B, Bagó AG, Tímár J, Moldvay J, Szállási Z, Reiniger L. PD-L1 expression of lung cancer cells, unlike infiltrating immune cells, is stable and unaffected by therapy during brain metastasis. *Clinical Lung Cancer*.
doi: 10.1016/j.clcc.2019.05.008 IF: 4,204

VII. II. Egyéb témában megjelent közlemények

3. Marosvári D, **Téglási V**, Csala I, Marschalkó M, Bödör C, Tímár B, Csomor J, Hársing J, Reiniger L. Altered microRNA expression in folliculotropic and transformed mycosis fungoides. *Pathology and Oncology Research* 2015 Jul;21(3):821-5.
doi: 10.1007/s12253-015-9897-8. IF: 1,960
4. Rojkó L, Reiniger L, **Téglási V**, Fábíán K, Pipek O, Vágvölgyi A, Agócs L, Fillinger J, Kajdácsi Z, Tímár J, Döme B, Szállási Z, Moldvay J. Chemotherapy treatment is associated with altered PD-L1 expression in lung cancer patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2018 Jul;144(7):1219-1226.
doi: 10.1007/s00432-018-2642-4. IF: 3,282
5. **Téglási V**, Csúry TD, Dezső K, Bugyik E, Szabó V, Szállási Z, Paku S, Reiniger L. Origin and distribution of connective tissue and pericytes impacting vascularization in brain metastases with different growth patterns. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2019 Feb 28. pii: nlz007.
doi: 10.1093/jnen/nlz007. IF: 3,490
6. Reiniger L, **Téglási V**, Pipek O, Rojkó L, Glasz T, Vágvölgyi A, Kovalszky I, Gyulai M, Lohinai Z, Rásó E, Tímár J, Döme B, Szállási Z, Moldvay J. Tumor necrosis correlates with PD-L1 and PD-1 expression in lung adenocarcinoma. *Acta Oncologica* 2019 Apr 19:1-8. doi: 10.1080/0284186X.2019.1598575. IF: 3,473