

Gyulladás és immunválasz nem-kissejtes tüdőrákban

Doktori értekezés

Szentkereszty Márton

Semmelweis Egyetem

Rácz Károly Konzervatív Orvostudományi Tagozat



Témavezető: Dr. Losonczy György DSc, professor emeritus

Hivatalos bírálók: Dr. Horváth Péter PhD, egyetemi adjunktus

Dr. Rojkó Livia PhD, ov. helyettes főorvos

Komplex vizsga bizottság:

Elnök: Dr. Müller Veronika DSc, tanszékv. egyetemi tanár

Tagok: Dr. Horváth Gábor PhD, habil. egyetemi docens

Dr. Moldvay Judit DSc, tanszékv. egyetemi tanár

Budapest

2025

1. Bevezetés

A tüdőrák még mindig vezető daganatos halálok Magyarországon mind a férfiak, mind a nők esetében. A leggyakoribb szövettani típus a nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC), ezen belül pedig az adenokarcinóma, kutatásainkban is ezekkel foglalkoztunk. Az NSCLC gyakran krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) talaján alakul ki. NSCLC-ben a szív- és érrendszeri megbetegedések mellett a második leggyakoribb társbetegség a COPD. Szisztémás gyulladás és limfocita diszfunkció jellemzi mind a COPD-t, mind pedig az NSCLC-t.

Világszerte tumorimmunológiai kutatások folynak annak megértésére, hogy az immunrendszer hogyan képes megakadályozni a daganat kialakulását, máskor pedig miért alakul ki mégis daganat, és ezekben az esetekben milyen kölcsönhatás alakul ki a daganatsejtek, a daganatos kötőszövetes alapállomány (stróma), és az immunsejtek között. Irodalmi adatok alapján nincs egyértelmű konszenzus, hogy a természetes ölósejteknek (NK-sejtek) és a regulatórikus T-sejteknek (Treg-sejtek) tumorelles, vagy épp ellenkezőleg, tumor növekedést elősegítő szerepük van, van-e bármilyen összefüggés a daganatban megtalálható genetikai eltérések (pl. mutációk) és az immunsejtek sűrűsége között, és ezek hogyan befolyásolják a progressziómentes- (PFS) és teljes túlélést (OS).

2. Célkitűzés

Retrospektív vizsgálatunkban 115 korai stádiumú (I-IIIa) operált tüdő adenokarcinómás beteget vontunk be, és kíváncsiak voltunk arra, hogy a betegek tumoros szövettani mintáiból meghatározott NK-sejt és Treg-sejt sűrűség összefügg-e a progressziómentes- (PFS) és teljes túléléssel (OS). Ezen kívül megvizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a betegek KRAS mutációs státusza, a fenti immunsejtek sűrűsége és a betegek különböző klinikopatológiai paraméterei között.

Prospektív vizsgálatunkban előrehaladott stádiumú (IIIB-IV) nem-kissejtes tüdőrákban szenvedő beteget vontunk be, és vizsgáltuk, hogy az NSCLC-hez társuló COPD milyen hatással van a tumoros gyulladásra és az immunválaszra, és milyen potenciális mechanizmusok lehetnek a háttérben. Emellett kíváncsiak voltunk arra, hogy az NSCLC-hez társuló COPD hogyan befolyásolja a PFS-t és OS-t elsővonalbeli kemoterápiát követően.

3. Módszerek

Retrospektív vizsgálatunkban 2004 és 2008 között diagnosztizált korai stádiumú operált adenokarcinómás beteget vontunk be, az utánkövetési idő 60 hónap volt. A formalin-fixált paraffinba ágyazott tumoros blokkokon immunhisztokémiai festéseket végeztünk. Monoklonális NKp46 ellenes antitesttel (R&D Systems, Abingdon, United Kingdom) azonosítottuk az NK-sejteket, míg FoxP3 ellenes antitesttel (236A/E7; eBioscience, San

Diego, California, USA) azonosítottuk a Treg-sejteket. Az immunsejtek sűrűségét két vizsgáló egymástól függetlenül számolta le a klinikai adatok ismerete nélkül és az 5 legsűrűbb területet (ún. hotspot) átlagoltuk. A formalin-fixált, paraffinba ágyazott tumoros blokkokból DNS-t izoláltunk, majd RFMD (Restriction Fragment Microfluidic based Detection) módszerrel KRAS mutációanalízist végeztünk.

Prospektív vizsgálatunkba 2015 és 2017 között előrehaladott NSCLC-ben szenvedő betegeket vontunk be, összesen 175 főt. Ebből 95 fő csak NSCLC-ben szenvedett, 80 fő NSCLC-ben és COPD-ben, mint társbetegségben egyaránt. Kontrollcsoportként 60 fő dohányos kontrollt és 54 fő COPD-s kontrollt vontunk be vizsgálatunkba. Perifériás vérből rutin labor paraméterek meghatározása történt. Emellett a szérumból IL-10, TNF α és IFN γ koncentrációt határoztunk meg multiplex cytometric bead-based immunoassay-jel (Bio-Plex system from Bio-Rad in Hercules, CA, USA). VEGF koncentrációt ELISA kit segítségével (R&D Systems, Minnesota, USA) mértük meg. Tumoros betegeinkből az első kemoterápia megkezdése előtt vettünk le perifériás vért, majd Ficoll sűrűséggrádiens centrifugálással PBMC-t (Peripheral Blood Mononuclear Cells) izoláltunk. Intracelluláris mérésekhez a sejteket RPMI 1640 médiumban tenyésztettük és stimuláltuk a protokollnak megfelelően, majd a jelölés előtt permeabilizáltuk őket. Az áramlási citometriás méréseket FACS Aria (Beckton

Dickinson) és Navios (Beckman Coulter in Brea, USA) készülékeken végeztük, a kapott adatokat Kaluza szoftverrel elemeztük. A myeloid-eredetű szuppresszor sejteket (MDSC) az alábbi antigénekkal azonosítottuk: granulocytoid-(G-)MDSC:

$\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^- \text{CD11b}^{\text{high}} \text{CD15}^{\text{high}} \text{CD33}^{\text{low}} \text{CD66b}^+$,

monocytoid-(M-)MDSC:

$\text{CD3}^- \text{CD19}^- \text{CD56}^- \text{CD14}^+ \text{HLA-DR}^- \text{CD11b}^+ \text{CD33}^{\text{high}}$.

Lineage markerek (Lin) a CD3, CD14, CD19 és a CD56 voltak. A G-MDSC-ket a fehérvérsejtek arányában néztük, míg az M-MDSC-ket a PBMC arányában.

Eredményeinket statisztikai analízis alá vetettük.

4. Eredmények

Korai stádiumú tüdő adenokarcinómás betegekben a tumort infiltráló immunsejtek döntően a tumoros strómában jelentek meg. A megnövekedett NK-sejt sűrűség hosszabb PFS-sel és OS-el társult. Férfiakban, dohányosokban és KRAS mutáns betegekben csökkent az NK-sejt denzitás, összehasonlítva nőkkel, nemdohányosokkal és KRAS vad betegekkel. A Treg-sejt sűrűség nem mutatott összefüggést semmilyen klinikopatológiai paraméterrel, azonban érdekes módon a magas Treg-sejt sűrűség szintén hosszabb PFS-sel és OS-sel túléléssel társult. Amennyiben az NK-sejtek vagy Treg-sejtek denzitása a medián érték feletti volt, úgy a PFS és OS megnyúlása még kifejezettebbnek bizonyult. Ez arra utalhat, hogy a Treg-sejtek egyaránt fontos résztvevői

az NK-sejt mediált tumorellenes immunválasznak. Multivariáns Cox-regresszió alapján a fiatal életkor és a korai patológiai stádium mellett a mediánnál magasabb NK-sejt denzitás, vagy kombinált $NK^{\text{magas}}/Treg^{\text{magas}}$ denzitás egyaránt a hosszabb PFS független prognosztikus tényezőinek bizonyultak. Hasonlóképpen multivariáns Cox-regresszió alapján a fiatal életkor, a korai patológiai stádium mellett a mediánnál magasabb NK-sejt és Treg-sejt denzitás, valamint a kombinált $NK^{\text{magas}}/Treg^{\text{magas}}$ denzitás egyaránt a hosszabb OS független prognosztikus tényezőinek bizonyult.

Prospektív vizsgálatunkban az előrehaladott nem-kissejtes tüdőrákban és COPD-ben, mint társbetegségben szenvedő betegekben megnyúlt a PFS elsővonalbeli kemoterápia után. A multivariáns Cox-regressziós modell alapján a COPD a PFS független prognosztikus tényezőjének bizonyult ebben a betegcsoportban. Az NSCLC-hez társuló COPD enyhítette a tumoros gyulladást a proinflammatorikus citokinek (CRP, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$) és a neutrofilia csökkentésével. Emellett mérsékelte az immunszuppressziót azáltal, hogy közel normalizálta a Neu/Ly hányadost, a VEGF serkentette a limfocitózist, csökkentette az IL-10 koncentrációt, és növelte az effektor $granz^+CD8^+$ T-sejtek felszaporodását. Az NSCLC-ben szenvedő betegekben (társuló COPD nélkül) a VEGF neutrofiliaival járt együtt, emellett megnövelte a M-MDSC-k arányát is. Társuló COPD esetén azonban ezzel ellentétesen a magasabb VEGF szintek nem jártak

neutrofiliaival és csökkent a pro-tumor M-MDSC-k aránya is.

5. Következtetések

Korai stádiumú tüdő adenokarcinómás betegekben a magas intratumoralis NK-sejt és Treg-sejt sűrűség megnöveli mind a PFS-t, mind pedig az OS-t. Míg az NK-sejtek szerepe a tumor eliminatív immunválaszban eléggé kézenfekvő, a Treg-sejt sűrűség jótékony hatása sokkal meglepőbb. Feltételezhető, hogy a tumor T-reg sejtjei csökkentik a tumoros gyulladást, mely kedvezhet az eliminatív hatású immunválasznak is, amely akkor működik a leghatékonyabban, amennyiben kiegyensúlyozott (mint ahogy látjuk majd az előrehaladott NSCLC-s kohorszunkban is).

Előrehaladott nem-kissejtes tüdőrákban a társuló COPD, mint társbetegség megnövelte a progressziómentes túlélést elsővonalbeli kemoterápiát kapott betegcsoportunkban. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a társuló COPD enyhítette, modulálta a tumoros gyulladást és immunszuppressziót egyaránt, amellyel így egy hatékonyabb és kiegyensúlyozottabb gyulladásos válaszhoz és immunválaszhoz járult hozzá.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

1. **Szentkereszty Márton**; Ladányi Andrea; Gálffy Gabriella; Tóvári József; Losonczy György Density of

tumor-infiltrating NK and Treg cells is associated with 5 years progression-free and overall survival in resected lung adenocarcinoma. LUNG CANCER 192 p. 107824 (2024). **IF: 4.5**

2. **Szentkereszty Márton**; Komlósi Zsolt István; Szűcs Gergő; Barna Gábor; Tamási Lilla; Losonczy György✉; Gálffy Gabriella. Effect of COPD on inflammation, lymphoid functions and progression-free survival during first-line chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 26: 2 pp. 1117-1128., 12 p. (2020). **IF: 3.201**

A disszertációtól független saját közlemények:

1. Pósfai Boglárka; **Szentkereszty Márton***; Sánta Fanni; Bajory Zoltán; Simon Andrea; Kozéki Zsófia; Csányi Ildikó; Akgul Mahmut; Kuthi Levente✉ Penile melanoma: a pathological report of two cases. DIAGNOSTIC PATHOLOGY 18: 1 Paper: 117, 6 p. (2023) **IF: 2.4**

2. **Szentkereszty Márton**; Szente Anna; Gerlőczy Balázs; Szmola Richárd; Ivády Gabriella. A gyors helyszíni citológiai vizsgálat jelentősége a hasüregi mesenchymalis tumorok diagnosztikájában. MAGYAR ONKOLÓGIA 67: 1. szuppl. pp. 57-57., 1 p. (2023)

3. Ivády Gabriella; Szente Anna; **Szentkereszty Márton**; Tóth Erika. Az emlőrákos betegek primer szisztémás kezelését követő axilláris őrszemnyirokcsomók intraoperatív citológiai vizsgálatának minőségbiztosítása.

MAGYAR ONKOLÓGIA 67: 1. szuppl. pp. 32-34., 2 p. (2023)

4. Sente Anna Lídia; **Szentkereszty Márton**; Gerlóczy Balázs; Szmola Richárd; Ivády Gabriella. Hasnyálmirigy szolid lézióinak endoszkópos ultrahangvezérelt citodiagnosztikája, valamint a pancreatobiliaris citológia új WHO beosztásának ismertetése. MAGYAR ONKOLÓGIA 67: 1. szuppl. pp. 57-57., 1 p. (2023)

5. Butz Henriett; Lövey József*; **Szentkereszty Márton**; Bozsik Anikó; Tóth Erika; Patócs Attila ☐ Case Report: A Novel Pathomechanism in PEComa by the Loss of Heterozygosity of TP53. FRONTIERS IN ONCOLOGY 12 Paper: 849004, 9 p. (2022)

IF: 4.7

6. Papp Gergő; Regős Eszter; **Szentkereszty Márton**; Téglási Vanda; Pápay Judit ☐ A nem-kissejtes tüdődaganatok korszerű diagnosztikája és célzott kezelése a biomarkerek korszakában. ORVOSKÉPZÉS 96: 3 pp. 365-373., 9 p. (2021)

7. Székely Borbála; Papp Eszter; Somorác-Kiss Dóra; Hegyi Barbara; Udvarhelyi Nóra; **Szentkereszty Márton**; Tóth Erika; Rubovszky Gábor. Mellkasi SMARCA4-deficiens differenciálatlan tumor – esetbemutató. MAGYAR ONKOLÓGIA 65: 1 pp. 54-54., 1 p. (2021)

8. Szűcs Gergő; Imreh Éva; **Szentkereszty Márton**; Gálffy Gabriella; Losonczy György; Komlósi Zsolt István. Az inzulinrezisztencia szerepe a nem-kissejtes tüdőrákhoz társuló immunparalízis kialakításában. MEDICINA

THORACALIS (BUDAPEST) 71: 3 pp. 200-200., 1 p. (2018)

9. Komlósi Zs. I.; **Szentkereszti M.**; Szűcs G.; Imreh É.; Losonczy Gy. Role of carbohydrate metabolism abnormality in non-small cell lung cancer-related immunoparalysis. EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL 52: suppl. 62 Paper: PA2790 (2018)

10. Gálffy Gabriella; Puskás Rita; **Szentkereszty Márton**; Losonczy György. Immunterápia tüdőrákban. MEDICINA THORACALIS (BUDAPEST) 70: 2 pp. 81-93., 13 p. (2017)

11. Bikov A✉; Lazar Z; Gyulai N; **Szentkereszty M**; Losonczy G; Horvath I; Gálffy G. Exhaled Breath Condensate pH in Lung Cancer, the Impact of Clinical Factors. LUNG 193: 6 pp. 957-963., 7 p. (2015). **IF: 2,0**

12. Gálffy G; Szentkereszty M; Máté N; Bartusek D; Nagy A; Losonczy Gy; Tamási L; Egri G; Juhász M; Szlávik N. A tüdőcarcinoidok korszerű diagnosztikus és terápiás lehetőségei. MEDICINA THORACALIS (BUDAPEST) 63: 1 pp. 52-58., 7 p. (2010)