

Egyetemi doktori értekezés tézisei

**TRANSZFORMÁLT DERMATOFIBROSARCOMA PROTUBERANS:  
KLINIKOPATHOLOGIAI ÉS MOLEKULÁRIS PATHOLOGIAI ELEMZÉS**

dr. Szöllősi Zoltán

Témavezető: Prof. Dr. Nemes Zoltán

Debreceni Egyetem

Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Pathologiai Intézet

2006.

## TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés	4
2. Célkitűzések	7
3. Irodalmi áttekintés	8
3.1. A transzformált DFSP klinikopathologiai jellemzésével foglalkozó irodalmi adatok	8
3.2. A konvencionális, valamint transzformált DFSP molekuláris pathologiai jellemzőit elemző irodalmi adatok	12
4. Anyagok és módszerek	16
4.1. Esetek	16
4.2. Kontroll csoport a klinikopathologiai elemzés számára	18
4.3. Microdissectio	18
4.4. RNS extractio	19
4.5. Probe és primer tervezés	17
4.6. Egylépéses real time PCR	21
5. Eredmények	23
5.1. A transzformált DFSP klinikai jellemzői	23
5.2. A kontroll csoport jellemzése	26
5.3. Kórszöveti jellemzők	28
5.4. Immunhisztokémiai jellemzők	31
5.5. Molekuláris biológiai jellemzők	32

6. Megbeszélés	34
7. Összefoglalás	41
Irodalomjegyzék	43
A munka alapjául szolgáló közlemények	49
Egyéb, jelen munkában nem használt közlemények jegyzéke	49
Köszöntenyilvánítás	52
Mellékletek	53

## 1. BEVEZETÉS

A dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP) a fibrohistiocytás lágyrésztumороk közé sorolt intermediér malignitású, dermalis kiindulású elváltozás. Általában felnőttekben jelentkezik, leginkább a 20-50 évesek között figyelhető meg; ismeretes azonban gyermekkori variánsa is, mégpedig az óriássejtes fibroblastoma. Megjelenését tekintve leginkább a törzsön, illetve a proximális végtagokon alakul ki.

A klasszikus szövettani jellemzők magukban foglalják a tipikusan monoton, storiform növekedési formát, melyet a jellegzetes elnyújtott orsó alakú sejtek építenek fel. Ugyancsak jellemző vonás a subcutis zsírszövetének lépesmészszerű infiltratioja. Immunhisztokémiailag leginkább a CD34 reaktivitást tartják jellemző markernek.

A DFSP lokálisan aggresszív tumor, melyet gyakori recidivák jellemeznek, azonban metastasisok (1-4%), valamint a tumor által okozott halálozás alacsony. [1] A daganat kiújulása, az elsődleges sebészi kezelést követően 20-50% közé tehető. [2][3] A daganat mérete, valamint a recidiva között összefüggést nem találtak, ugyanakkor a sebészi eltávolítás radikalitása meghatározó. [1] Általánosságban 2 cm tumormentes szegéllyel rendelkező, úgynevezett széles kimetszés a relapsusok számát szignifikánsan csökkenti. [2]

A DFSP morfológiailag nem egységes, számos ritka variáns került leírásra. Ezeket fontos ismerni, mert egyéb, magasabb malignitású tumorokat képesek utánozni. A legtöbb ilyen szövettani variáns a klasszikus DFSP-hez hasonlóan viselkedik, kezelésében hasonló elvek érvényesek. [3][4]

Létezik azonban néhány olyan eset, ahol a DFSP mellett fibrosarcoma (FS), még ritkábban malignus fibrosus histiocytoma (MFH) ismerhető fel. Az elmúlt két évtizedben többen vizsgálták az úgynevezett transzformált DFSP prognosztikai, illetve klinikopathológiai jellemzőit, a sarcomatosus transzformáció prognosztikai jelentősége azonban mindmáig vitatott téma. [5-14]

Másrészről, újabb cytogenetikai vizsgálatok leírták, a DFSP-re jellemző a t(17;22)(q22;q13) transzlokáció, mely számfeletti r(17;22) ring kromoszóma kialakulásával jár. A kromoszomális átrendeződés a kollagen Ia1 (COLIA1), valamint a thrombocytá növekedési faktor B-lánc (PDGFB) génjének fúziójához vezet. [15][16][17] A génátrendeződés kapcsán a PDGFB gén a regulátor, exon 2 előtti szekvenciáit elvesztve a COLIA1 gén szabályozása alá kerül, mely a PDGFB növekedési faktor kontrollálatlan termelődéséhez vezet, mely a jelen kutatások szerint a DFSP kialakulásának döntő lépése. [18-23]

Bonyolult diagnosztikai esetekben a COLIA1-PDGFB fúziós génnek megfelelő mRNS kimutatása döntő lehet. Erre az irodalomban

találunk adatokat, sőt a fenti transzlokációt óriássejtes fibroblastomában, fibrosarcomatosusan átalakult DFSP-ben, valamint superficialis felnőttkori fibrosarcomában is kimutatták. Semmit sem tudunk azonban a fenti transzlokáció állapotáról a malignus fibrosus histiocytoma irányában átalakult DFSP-k esetében.

A korábban leírt vizsgálatok során reverz transzkripción alapuló hagyományos polimeráz láncreakciót (PCR) alkalmaztak, kiegészítve szekvenálási eljárással, mely a gyakorlati felhasználást korlátozza.

[28][29][30]

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen dolgozatomban először a sarcomatosus transzformáció klinikopathologiai elemzését kívánom megtenni nyolc eset jellemzőinek leírásával:

- dokumentálni a daganatok eloszlását, megjelenését,
- jellemezni a sarcomatosus átalakulás jellegét,
- meghatározni a sarcomatosus transzformáció kiterjedését,
- elemezni a sebészi kezelés hatását a daganat prognózisára.

Vizsgálataink második részének célkitűzései az alábbiak:

- paraffinos anyagon használató real time PCR alapú vizsgálati eljárás kifejlesztése a DFSP COLIA1-PDGFB génstátuszának vizsgálatára,
- malignus fibrosus histiocytoma irányú transzformált esetek genetikai elemzése a fenti transzlokációt illetően, következtetések levonása a oncogenesisre vonatkozóan.

### **3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS**

#### *3.1 A transzformált DFSP klinikopathologiai jellemzésével foglalkozó irodalmi adatok*

Penner 1951-ben közölte az első áttéteket képző DFSP esetet, melyben klasszikus, fibrosarcoma jellegű területek is felismerhetők voltak. A klinikai leírás részletes, azonban a daganat pontos paraméterei, így a fibrosarcomatosus terület aránya nem dokumentált.

[5]

Hat esetet feldolgozó átfogó tanulmány 1988-ban jelent meg Wrotnowski és munkatársai közlésében, ahol elsősorban klasszikus szövettani jellemzőket elemeznek. A klinikai jellemzők, az életkor-, nembeli eloszlás a klasszikus DFSP-hez hasonló leírásukban. A DFSP-FS diagnosztikus kritériumait nem elemzik, ugyanakkor megállapítják a sarcomatosus komponens gradusát, mitoticus indexét. A sebészi ellátás tekintetében releváns információk nem találhatóak a tanulmányban, de megemlítik, hogy egy esetben recidiva jelentkezett.

[6]

1989-ben Ding és munkatársai elemeznek kilenc fibrosarcomatosusan átalakult DFSP-t, a talált klinikopathologiai jellemzőket klasszikus DFSP-vel, superficialis fibrosarcomával, storiform malignus fibrosus histiocytomával hasonlítják össze. Nyolc

esetben írnak le recidivát, mely a klasszikus DFSP-ben észleltekkkel szemben, a műtét időpontjához viszonyítva korábban jelentkezett. Egy esetben metastasis is kialakult. A fibrosarcomatosus komponens arányát általában 25-50%-nak találták. Pontos adatokat a kezelésről közleményükben nem találunk. Felvetik azonban, hogy fennállhat valamilyen kapcsolat a fibrosarcomatosusan transzformált DFSP-k valamint a hozzájuk hasonló klinikopathologiai jellemzőket mutató tumorok (így például a superficialis fibrosarcoma) között. [7]

1992-ben Connelly és munkatársai közöltek 75 DFSP-t feldolgozó tanulmányt, amelyben hat fibrosarcomatosusan átalakult esetet is találtak. Nem találnak lényeges klinikopathologiai eltérést a klasszikus és transzformált DFSP esetek között, ugyanakkor felhívják a figyelmet a sebészi eltávolítás, illetve a pozitív sebészi szélek fontosságára. A fibrosarcomatosus komponens arányát nem elemzik részletesen, inkább a klasszikus DFSP, valamint a fibrosarcomatosususan transzformált területek mitoticus aktivitásában látják a fő különbséget. Két esetben generalizált metastaticus betegség kialakulását észlelték, mely a betegek halálához vezetett. [8]

1993-ban Eisen és munkatársa közöl egy esetet, ahol a DFSP-FS széles lokális eltávolítása ellenére metastasisok jelentkeznek a primer tumor eltávolítása után öt évvel. [9]

1996-ban O'Connell és munkatársai írtak le két transzformált esetet. Tanulmányuk elsősorban immunhisztokémiai analízis; a klinikopathologiai elemzés nem túl részletes. A fibrosarcomatosus terület aránya 25, illetve 80%. [10]

1998-ban jelenik meg az eddigi legátfogóbb tanulmány Mentzel és munkatársai közlésében, ahol 516 áttekintett DFSP esetből 41 tumorban észlelnek fibrosarcomatosus átalakulást. Diagnosztikus kritériumként a klasszikus DFSP jelenléte mellett a sarcomatosus terület kiterjedését legalább 5%-ban definiálják. A transzformáció immunhisztokémiai jellemzésén kívül leírják a fontosabb differenciál-diagnosztikai kérdéseket is.

Fontos következtetéseket vonnak le a tumorok biológiai viselkedését illetően is. Pontosan dokumentálják a daganatok sebészi és esetleges műtét utáni kezelését. Ennek megfelelően nem találnak lényeges különbséget a klasszikus DFSP és a fibrosarcomatosus DFSP localis kiújulása között, ugyanakkor a metastasisok kialakulását, valamint a daganattal összefüggő halálozást egyértelműen magasabbnak találták. Ennek megfelelően a transzformált DFSP-t nem intermedier malignitású entitásnak, hanem egyértelműen malignus folyamatnak tartják.

Rámutatnak, hogy a fibrosarcomatosus átalakulást mutató DFSP-k prognózisa független a fibrosarcomatosus átalakulás

nagyságától, viszonylag kis terjedésű, 30% körüli fibrosarcomatosus komponens súlyos kimenetelű folyamat lehet. Hasonlóan, a daganat aggresszivitásával magyarázzák a különböző recidivák között eltelt rövidebb időt a konvencionális esetekkel összehasonlítva.

Külön említést tesznek pleiomorph sarcoma irányú átalakulásról (MFH), melyet két esetben írnak le. Mivel ezen esetek száma alacsony, pontosabb klinikopathologiai elemzést nem tesznek. [11]

Hasonló, ugyanakkor kevésbé részletes elemzést Pizarro és munkatársai és készítettek 1997-ben, melyben a fentiekhez hasonló konklúziókra jutottak. [12]

A fentiekkel ellentmondó adatokat közölnek Goldblum és munkatársai 2000-ben. 18 transzformált eset feldolgozását végzik el, melyek közül egy esetben malignus fibrosus histiocytoma volt észlelhető. Részletesen dokumentálják a kezelés módozatait, elsősorban a sebészi szélek épségére koncentrálnak. Megállapítják, hogy a recidiva hajlam nem különbözik lényegesen a konvencionális esetek és a sarcomatosus átalakulást mutató tumorok között. Egyetlen esetben sem észlelték a betegség generalizálódását, sőt a korábbi közlemények leírásában hiányolták a sebészi kezelés részletezését; inadekvát sebészi eltávolítást feltételezve magyarázzák az aggresszívabb klinikai kórlefolást. [13]

Összefoglalva, a transzformált DFSP első leírásától kezdve nincs egységes álláspont a tumorok biológiai viselkedését illetően. Egyes tanulmányok a konvencionális DFSP-vel egyező viselkedést írnak le, míg mások hangsúlyozzák, hogy a sarcomatosus átalakulás egyértelműen a malignizálódás jele, mintegy dedifferenciációs tendenciaként értelmezhető.

### *3.2 A konvencionális, valamint transzformált DFSP molekuláris pathológiai jellemzőit elemző irodalmi adatok*

A DFSP molekuláris genetikájának megértése cytogenetikai analízis által leírt eltérések felismerésével indult. Két eltérés volt jellegzetes az elváltozásban:

- egy reciprok transzlokáció; t(17;22)(q22;q13),
- egy számfeletti gyűrű-kromoszóma, mely a transzlokációból származtatható; r(17;22).

A töréspontok feltérképezése leírta, hogy a 17. kromoszómán elhelyezkedő kollagen Ia1 gén (COLIA1), valamint a 22. kromoszómán elhelyezkedő thrombocyta növekedési faktor B gén (PDGFB) fúzionálnak. Ennek következtében chimericus COLIA1-PDGFB in-frame gén keletkezik, mely fontos szerepet játszik a tumorgenesisben. [15]  
[16][17]

Az I. típusú kollagén a legáltalánosabban előforduló fehérje a kollagén család proteinek között. Heterotrimer, mely két  $\alpha 1(I)$  valamint egy  $\alpha 2(I)$  láncból épül fel, melyeket különböző gének, COLIA1 és COLIA2, kódolnak.

A PDGF egy potenciális mitogén számos sejt tekintetében; sok biológiai folyamatban, mint például a sebgyógyulásban, fontos szerepet játszik. Két, A és B jelű, diszulfid-hidakkal összekapcsolt polypeptidből épül fel. A homodimerek és a heterodimerek különböző affinitással kötődnek a PDGF- $\alpha$ , illetve - $\beta$  receptorhoz. A PDGF B-láncot kódoló génszakasz a v-sis onkogén cellularis homológja. A PDGFB gén regulátor szekvenciáinak elvesztéséből adódó fokozott transzkripciója autocrin stimuláció révén számos tumor pathogenesisében leírásra került.

DFSP-ben a tumorsejtek koexpresszálják a PDGFB-t, valamint a PDGF- $\beta$  receptort mind in vivo, mind in vitro. A fent említett transzlokáció a PDGFB gén területén az exon 2 előtti regulátor régiókat mozdítja el, mely miatt a gén fokozott transzkripciója jelentkezik. [18-23]

Wang és munkatársai 1999-ben közöltek paraffinos anyagon is használható reverz transzkripción alapuló PCR reakciót. [24] Mivel a töréspont a PDGFB exon 2 kezdetén lokalizálódik, ezért egyetlen reverz primert, valamint 16 forward primert alkalmaztak. Az eljárás

egyetlen hátránya, hogy a PCR terméket a reakció specificitásának eldöntése érdekében szekvenálni is kell, mely a vizsgálat, akár rutin diagnosztikai elterjedését akadályozza. A későbbiekben más szerzők multiplex PCR-t alkalmaztak, melyben a forward primerek kombinációját használták, de a szekvenálási lépés minden leírt esetben szükséges volt.

Ugyancsak Wang és munkatársai vizsgáltak hat transzformált DFSP esetet, melyek kivétel nélkül fibrosarcomatosus átalakulást mutattak. Microdissectio után a fibrosarcomatosus terület elemzését végezték el, mely igazolta a DFSP-re jellegzetes fúziós gén jelenlétét. Ezzel bizonyították, hogy a DFSP és a fibrosarcomatosus transzformáció egymással ténylegesen kapcsolt folyamat, a közös mutáció azonos klónból származó sejtpopulációkat jelez. [28]

A későbbiekben superficialis fibrosarcomában is sikerült kimutatni a fúziós gént, mely hasonló histogenesisre utal.

Összefoglalva megállapítható, hogy a jelenleg használt, a DFSP genetikai vizsgálatában alkalmazott módszer a klinikai diagnosztikus munkában széles körben nem terjedt el, mert szekvenálási lépéssel kell kiegészíteni.

Másrészről a real time PCR egyre fontosabb szerepet játszik a különböző klinikai vizsgálatokban, mert gyors, költséghatékony, valamint kicsiny mennyiségű anyag is elegendő sikeres reakció

futtatásához. Az egyik legfontosabb előnye, hogy szükségtelenné teszi a hagyományos PCR reakciót követő, a reakció specifikusságát ellenőrző vizsgálatokat. A real time PCR kifejezetten szenzitív vizsgálómódszer, melynek előnyei különösen a paraffinos anyagból izolált RNS, valamint abból szintetizált cDNS vizsgálatánál értékelhetők. Utóbbi tényező különösen fontos, hiszen a paraffinos anyagból izolált RNS sokszor rossz minőségű, mivel a nem megfelelő formalin fixálást RNS degradáció kísérheti. Másrészt, a formalin fixálás különböző fehérjék és a nukleinsavak között kötéseket hoz létre, mely az extrakciót önmagában is megnehezíti. Mindemellett a real time PCR alkalmazható a génexpresszió kvantifikálására is, ez elsősorban friss anyagból kivont RNS esetén egyszerűbb, de megfelelő paraméterek között paraffinba ágyazott anyagok vizsgálatára is alkalmas lehet. [32]

A fellelhető irodalomban nincs adat a malignus fibrosus histiocytoma irányú átalakulást mutató DFSP-k génstátuszáról. Ennek megfelelően nem tisztázott, hogy a tumor különböző komponensei egyazon mutáció következményeként értékelhetők, vagy esetlegesen egymástól függetlenül fellépő, eltérő pathogenesisű folyamatok.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1 Esetek

87 DFSP eset került áttekintésre a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Pathologiai Intézet archivumából. Minden esetben paraffinba ágyazott, formalin fixált anyag áll rendelkezésre. Első lépésben a hagyományos szövettani feldolgozással elkészített hematoxylin-eosin festett metszeteket vizsgáltuk a sarcomatosus transzformáció jelenléte céljából. A következő diagnosztikai kritériumokat használtuk:

- a klasszikus DFSP jelenléte és
- a sarcomatosus átalakulás jelenléte az elváltozás területének minimum 5%-ban.

Fibrosarcomatosus átalakulás jelenlétét akkor fogadtuk el, amikor egy mitotikusan aktív, cellularis területet találtunk, ahol a tumorsejtek karakterisztikus fascicularis elrendeződést mutattak.

Malignus fibrosus histiocytoma irányú átalakulás jelenlétét akkor tekintettük diagnosztikusnak, amikor mitotikusan aktív, sejtdús területet találtunk, ami differenciálatlan, pleiomorph sejtekből épült fel. A 87 vizsgált esetből nyolc felelt meg a fenti kritériumoknak.

Utóbbi esetekben a következő jellemzőket dokumentáltuk: a tumor mérete; a sarcomatosus transzformáció területe; a sarcomatosus terület, valamint a klasszikus DFSP százalékos aránya; a mélységi infiltráció; a mitoticus alakok száma (MF) 10 nagy nagyítású látótérben. Mindemellett valamennyi sarcomatosus terület gradus megállapítását is elvégeztük a Trojani rendszer alapján. [33]

Az esetek immunhisztokémiai feldolgozását is elvégeztük. A deparaffinált metszeteket az alábbi antitestekkel inkubáltuk szobahőn 30 percig:

- anti-vimentin (clone V6, Dako, Glostrup, Denmark, 1/40 hígítás),
- anti- $\alpha$ -simaizom-aktin (clone asm1, Novocastra, Newcastle upon Tyne, 1/50 hígítás),
- anti-desmin (clone D33, Dako, Glostrup, Denmark, 1/40 hígítás),
- anti-CD34 (clone QBEnd/10, Novocastra, Newcastle upon Tyne, 1/25 hígítás)
- anti-factor XIIIa (FXIIIa, polyclonal, Calbiochem, San Diego, CA, USA, 1/200 hígítás).

Citrát pufferben (pH 6.0) magas nyomású antigén feltárást alkalmaztunk, melyet standard peroxidase-streptavidin-biotin módszerrel VIP chromogen (SK4600, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) segítségével vizualizáltunk. A CD34 és a FXIIIa

immunreaktivitás az érintett sejteknek a tumoron belüli aránya szerint, szemikvantitatív módon került értékelésre (-, +, ++, +++).

A klinikai adatok a klinikai információs rendszerből, valamint az intézeti regiszterből kerültek feldolgozásra.

#### *4.2. Kontroll csoport a klinikopathológiai elemzés számára*

A sarcomatosus transzformációt nem mutató 79 tumorból 20 esetet választottunk ki a sebészi eltávolítás radikalitása alapján. Minden esetben ún. széles lokális kimetszést végeztek. Rögzítettük a vonatkozó klinikai információkat, valamint a tumorok maximális átmérőjét.

#### *4.3. Microdissectio*

Wang és munkatársai eredeti leírásában szereplő módszert alkalmaztuk. [28] Röviden, a sarcomatosusan átalakult DFSP esetek paraffinos blokkjai RNS mentes környezetben kerültek feldolgozásra, ahol cserélhető pengéjű microtommal 10µm vastag metszeteket készítettünk. A microdissectio céljából a metszeteket tárgylemezre helyeztük, majd xylo segítségével deparaffináltuk, ezt követően leszálló alkoholsorban rehidráltuk, majd haematoxylin-eosin háttérfestést alkalmaztunk. Steril pengével a határzónának megfelelő

keskeny sáv kihagyásával a két komponenst egymástól elválasztottuk, azokat külön kezeltük. [28]

Öt konvencionális DFSP-t pozitív kontrollként használtunk.

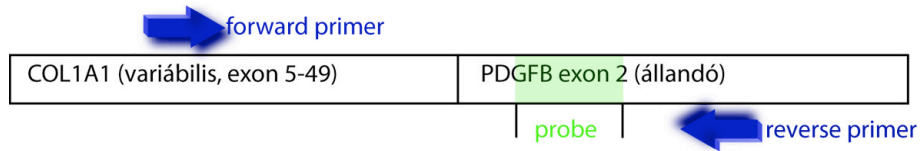
#### *4.4. RNS extractio*

A deparaffinált metszetek steril Eppendorf-csőbe kerültek, majd ezután proteinase K-t tartalmazó pufferben 56°C-on 16 órán át emésztettük az anyagot. Abszolút alkoholos kicsapást követően a mintákban fellelhető teljes RNS mennyiség kivonásra került az EZ1 Biorobot EZ1 RNA Tissue Mini Kit protokollnak megfelelően (Qiagen, Hilden, Germany).

#### *4.5. Probe és primer tervezés*

Az adott génszakvenciákat a gén azonosítója segítségével internetes adatbázisból szereztük be ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). A primer és probe szekvenciák (1. táblázat) a Primer Express szoftver segítségével kerültek megtervezésre (Applied Biosystems, Foster City, USA), a COL1A1 gén (azonosító: *NM\_000088*) exon 5, valamint exon 49 közötti szekvenciáknak megfelelően. Azért, hogy elkerülhessük többféle probe szekvencia használatát, egy probe-ot terveztünk a PDGFB gén (azonosító: *NM\_033016*) exon 2 5' végének megfelelően. A reverz

primer a probe-ot követő PDGF exon 2-n belüli szekvenciának megfelelő volt. (1. ábra)



1. ábra A COL1A1-PDGFB fúziós gén sematikus képe, a vizsgált génterületekkel

1. táblázat Probe és primer szekvenciák

Primer	Nucleotid szekvencia
COL1A1 (forward)	
exon5	5'AGATGGCATCCCTGGACAGC
exon7	5'TTCGACGTTGGCCCTGTC
exon8	5'TGGCGAGCCTGGAGCTTC
exon9	5'CCCTGGAAAGAATGGAGATGAT
exon10	5'AAGCTGGAAAACCTGGTCGTC
exon11	5'CCTGGAATGAAGGGACACAGA
exon12	5'ATGGTGCCAAGGGAGATGCT
exon13	5'TGGCAGCCCTGGTGAAAA
exon14	5'CTGCCTGGTGAGAGAGGTCG
exon15	5'GAAATGATGGTGCTACTGGTGCT
exon16	5'CCTGGTGCTGTTGGTGCTAA
exon19	5'TGGCCTGCCTGGTGAGAG
exon 20	5`GGAGACACTGGTGCTAAGGGAGAG
exon 21	5`CTGGAGAGGAAGGAAAGCGA
exon 22	5`GACCTGGTAGCCGTGGTTTC
exon 23	5`TGAAGCTGGTCTGCCTGGT
exon 24	5`TCCTGATGGCAAACCTGGC
exon 26	5`AAGGCTGGAGAGCGAGGTGTT
exon 27	5`AAGGCTGGAGAGCGAGGTGTT
exon 28	5`TGGCGAGAGAGGTGAACAAG
exon 29	5`GGTCCTCCAGGTGAAGCAGG
exon 30	5`TGGTGAGAGAGGTCGCCCT
exon 31	5`GGTTTCCCTGGCGAGCGT
exon 32	5`GGGAATGCCTGGTGAACGT
exon 33	5`AAGATGGCGTCCGTGGTCT
exon 34	5`GCCCTGCTGGTCCCACTG

exon 35	5`GGAGACCGTGGTGAGCCTG
exon 37	5`GGTAATGTTGGTGCTCCTGGAG
exon 38	5`TTTCCCTGGTGCTGCTGG
exon 39	5`CCTGGTGCTGATGGTCCTG
exon 40	5`GGCTTCCCTGGTCTTCCTG
exon 41	5`CCCTGGTGAATCTGGACGTGA
exon 42	5`CCCCTGGACGAGACGGTT
exon 44	5`TCCTGTCGGCCCTGTTGG
exon 45	5`AGGGTCACCGTGGCTTCTC
exon 46	5`CTGGTGAACAAGGCCCTCTG
exon 47	5`ACTGGTGATGCTGGTCCTGTT
exon 48	5`CTCAAGATGTGCCACTCTGACTG
exon 49	5`CTCAAGATGTGCCACTCTGACT
PDGFB (reverse)	5`GCGTTGGAGATCATCAAAGGA
Probe	5`-FAM-CCGAGGAGCTTTATGAGATGCTGAGTGACC-TAMRA-3`

#### 4.6. Egylépéses real time PCR

A PCR reakció ABI 7300 real time PCR készülékben (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 96-well plate-en került kivitelezésre. Minden reakciót duplán végeztünk el. A végső reakcióelegy 10 $\mu$ l extrahált RNS-t, 25 $\mu$ l Quantitect Probe RT-PCR mixet, 0.5 $\mu$ l Quantitect RT mixet, 0.7 $\mu$ l-0.7 $\mu$ l (1 $\mu$ M-1 $\mu$ M) forward, valamint reverse primert és 0.3 $\mu$ l (0.2 $\mu$ M) probe-ot tartalmazott 17.8 $\mu$ l RNS mentes víz kíséretében. (Quantitect Probe PCR kit, Qiagen, Hilden, Germany)

Az RNS integritás ellenőrzése az általánosan expresszált 36B4 gén amplifikálásával történt, hasonló reakció körülmények között, mint fent. A primer és probe szekvenciák a következők voltak:

- 36B4-forward 5'-AGATGCAGCAGATCCGCAT-3'
- 36B4-reverse 5'-ATATGAGGCAGCAGTTTCTCCAG-3'
- 36B4-probe 5'-FAM-AGGCTGTGGTGCTGATGGGCAAGAA-TAMRA-3'.

Első lépésben reverz transzkripció történt 50°C-on 30 percig, majd ezt követően denaturáltuk a DNS-t 95°C-on 15 percig. A kezdő lépés után 40 ciklust futtattunk 76°C-95°C-56°C váltakozásával, ahol a fluoreszcens detektálás az utolsó lépésben történt. A kapott adatok elemzését a Sequence Detection Software-rel végeztük (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

## **5. EREDMÉNYEK**

### *5.1. A transzformált DFSP klinikai jellemzői*

A 2. táblázatban található a betegek jellemzői. Öt beteg esetében fibrosarcomatosus transzformáció, három betegnél pedig malignus fibrosus histiocytoma irányú átalakulást észleltünk. A betegek között hat nő és két férfi volt, életkoruk szerint 26-62 év közöttiek (átlagosan 41 év).

Valamennyi tumor lassan növő, fájdalomtalan, felszínes elváltozásként jelentkezett; egyéb szokatlan klinikai jellemző nem került leírásra. Hat esetben a törzsön helyezkedett el az elváltozás, két esetben pedig az alsó végtagon proximálisan. A daganatok mérete 3.5 cm és 8 cm között volt (átlagosan 4 cm). Hat esetben történt széles lokális kimetszés, két esetben inkomplett eltávolítás történt radioterápiával. A sebészi resectiós vonalak természetesen pozitívak voltak az utóbbi két esetben.

A követés időtartama négy és 36 év között mozgott, egy eset kivételével mindig meghaladta az öt évet.

Három esetben figyeltünk meg recidivát: két olyan betegben, ahol a kiírtás radikalitása nem volt kellő, valamint egy olyan betegben, ahol széles lokális eltávolítást alkalmaztak. Ennek megfelelően a

sarcomatosus DFSP teljes kiújulási aránya 37.5%, viszont csak 17% azokban az esetekben, ahol a kezelés széles lokális kimetszés.

A recidivát megelőző időintervallum kilenc hónaptól négy évig terjedt. Egy betegben három recidiva (6. eset), egy másik betegben két recidiva (3. eset), valamint egy esetben egy recidiva (4. eset) alakult ki.

A DFSP-MFH esetek közül két esetben észleltünk recidivát, ennek megfelelően a kiújulási arány 66% volt. Mindkét esetben a resectiós vonalak tumorszövetet tartalmaztak.

Egy esetben észleltük a DFSP-FS kiújulását (kiújulási arány 17%), mely esetben a kezelés széles lokális kimetszés volt.

2. táblázat A transzformált DFSP klinikai jellemzői

Eset	Kor/nem	Elhelyezkedés	Tumor méret (cm)	Sarcoma típus	A sarcoma megjelenése	Sebészi szélek	Kezelés	Recidivák	Metastasisok	Utánkövetés
1.	26/N	Hát	4x3x2.5	FS	De novo	Negatív	WLE	-	-	NED; 36 év
2.	36/N	Mellkasfal	4.5x3x3	FS	De novo	Negatív	WLE	-	-	NED; 20 év
3.	56/F	Alsó végtag	6x4x4	MFH	De novo	Pozitív	ILE, irradi.	2	-	DUC; 17 év
4.	41/N	Törzs	4x3x3	FS	De novo	Negatív	WLE	1	-	NED; 6 év
5.	39/N	Hasfal	4x2.5x2	FS	De novo	Negatív	WLE	-	-	NED; 5 év
6.	62/F	Törzs	8x3x6	MFH	De novo	Pozitív	ILE, irradi.	3	+	DUC; 13 év
7.	28/N	Törzs	5x3.5x3	FS	De novo	Negatív	WLE	-	-	NED; 4 év
8.	37/N	Alsó végtag	3.5x3x3	MFH	De novo	Negatív	WLE	-	-	NED; 5 év

NED (no evidence of disease) a betegségnek nincs jele; DUC (death of unrelated cause) egyéb okból elhalálozott; WLE (wide local excision) széles lokális kimetszés; ILE (incomplete local excision) inkomplett lokális kimetszés

A 3. eset egy 56 éves férfi volt, aki a lábszárán vett észre egy 6x4 cm-es daganatot. Az elváltozást eltávolították, a szövettani

diagnózis sarcomatosus neurilemmoma volt. A sebészi szél pozitívnak mutatkozott, ennek megfelelően a beteget irradiálták, sebészi reexcisio nem történt. Négy évvel később 2.5x1.5 cm-es nodulus jelent meg a korábbi műtéti területnek megfelelően, melyet eltávolítottak. Áttekintésre került a beteg korábbi anyaga, és a végleges kórszövettani vélemény DFSP-MFH lett. Az eltávolítás ebben az esetben sem volt teljes, de ennek ellenére sem újabb kimetszés, sem postoperatív irradiáció nem történt. Kilenc hónappal később újabb 2x1.5 cm-es tumor jelent meg, melyet széles kimetszéssel eltávolítottak. Ennek megfelelően a sebészi szélek negatívak voltak. Ezt követően a beteg tumormentes maradt 17 évvel később bekövetkezett cardialis eredetű haláláig. Boncolás nem történt.

A 4. eset egy 41 éves nő volt, aki egy lassan növekedő, a törzsén elhelyezkedő elváltozással fordult orvoshoz, mely eltávolításra került. A kórszövettani vélemény DFSP-FS volt. A széles kimetszés, és negatív resectios vonalak ellenére 16 hónappal később recidiva jelent meg. A szövettan ugyanazt az elváltozást írta le. A második műtétet követően további kiújulást nem észleltünk.

A 6. eset egy 62 éves férfi volt, aki a törzsén növekvő elváltozást észlelt. Az inkomplett kimetszést követően a szövettani diagnózis DFSP-MFH volt. Háromszor jelentkezett recidiva (kilenc hónappal, a későbbiekben négy évvel, valamint hét évvel az első műtét után). A

sebészi szélek valamennyi esetben daganatszövetet tartalmaztak, az utolsó kimetszés kivételével. A beteg háromszor kapott műtét utáni irradiációt, valamint egy alkalommal kemoterápiában is részesült. Négy és fél évvel az első kimetszést követően a bal inguinalis területen megnagyobbodott nyirokcsomó jelentkezett, melynek szövettani feldolgoása metastaticus MFH-t véleményezett. A beteg 13 évvel az első műtétet követően hunyt el magasvérnyomás betegséghez társuló agyvérzés miatt. A klinikai és képalkotó vizsgálatok kizárták az esetleges áttétes, bevérzett agytumor lehetőségét. Boncolás nem történt.

## *5.2. A kontroll csoport jellemzése*

A 3. táblázat összegzi a kontroll csoport klinikai jellemzőit. 20 konvencionális DFSP-t írtunk le. A betegek között 13 nő, valamint hét férfi szerepelt. Életkor tekintetében 23 és 48 év közöttiek voltak (átlagosan 35 év).

10 esetben az elváltozás a törzsön, három esetben az alsó végtagon, két esetben a válltájékon, egy-egy esetben inguinalisan, illetve a felső végtagon helyezkedett el. A daganatok mérete 2 és 5 cm között volt (átlagosan 3.585 cm). Minden esetben széles lokális kimetszést alkalmaztak, a sebészi szélek negatívak voltak.

Három betegnél jelentkezett recidiva (a kiújulási arány 15%), mely az első műtétet követő 14 és 18 hónap között jelentkezett (átlagosan 19 hónap).

Az utánkövetés ideje három és 14 év között váltakozott, átlagosan 8.6 év volt.

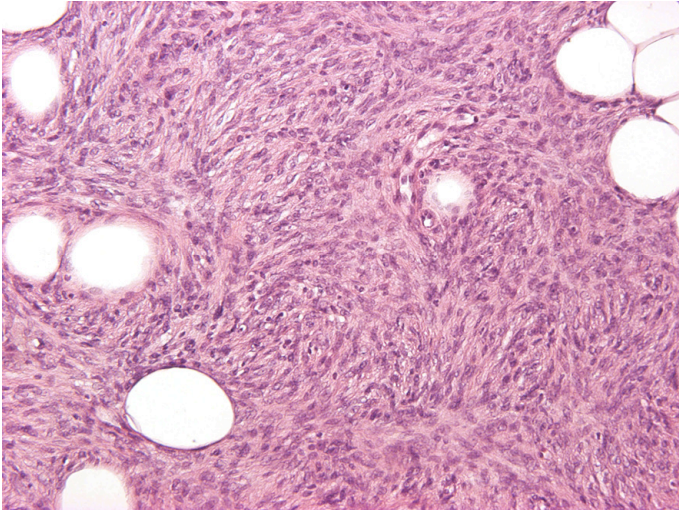
3. táblázat 20 konvencionális DFSP-vel, széles lokális kimetszéssel kezelt beteg klinikai adatai (kontroll csoport)

Eset	Kor/nem	Elhelyezkedés	Méret (cm)	Recidiva	A recidiváig eltelt idő (a recidivák száma)	Metastasis	Utánkövetés
1.	28/N	Hát	3	-	-	-	NED; 4 év
2.	34/N	Nyak	2.5	-	-	-	NED; 10 év
3.	45/F	Mellkasfal	4	-	-	-	NED; 8 év
4.	41/N	Törzs	5	+	14 hónap (1)	-	NED; 12 év
5.	33/F	Alsó vgt.	3	-	-	-	NED; 11 év
6.	45/F	Törzs	3.5	-	-	-	NED; 3 év
7.	37/N	Hát	2.4	-	-	-	NED; 6 év
8.	24/N	Törzs	4	-	-	-	NED; 5 év
9.	48/F	Alsó vgt.	3.3	-	-	-	NED; 8 év
10.	35/N	Felső vgt.	4	-	-	-	NED; 7 év
11.	28/N	Váll	5	-	-	-	NED; 10 év
12.	24/N	Skalp	2.8	+	24 hónap (1)	-	NED; 9 év
13.	36/N	Inguinalis	2	-	-	-	NED; 6 év
14.	42/F	Törzs	4	+	18 hónap (1)	-	NED; 7 év
15.	23/N	Hát	3.7	-	-	-	NED; 14 év
16.	37/N	Nyak	3.4	-	-	-	NED; 8 év
17.	32/F	Hát	2.8	-	-	-	NED; 10 év
18.	30/F	Alsó vgt.	4.6	-	-	-	NED; 3 év
19.	39/N	Hasfal	3.8	-	-	-	NED; 7 év
20.	40/N	Váll	4.9	-	-	-	NED; 6 év

NED (no evidence of disease) a betegségnek nincs jele

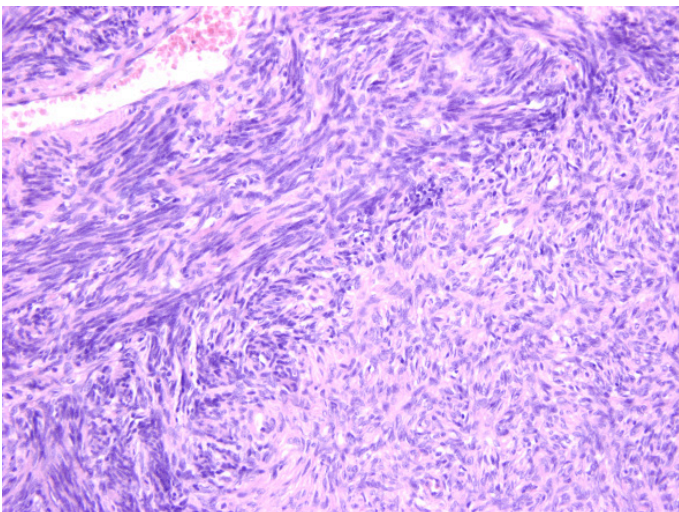
### 5.3. Kórszöveti jellemzők

A daganatok szövettani elemzését Weiss és Goldblum leírásai alapján végeztük. [4]



2. ábra Konvencionális DFSP. Jellegzetes storiform myofibroblastos proliferáció, zsírszöveti infiltratioval. fibroblast karaktert mutató (HE, 20x)

sejtek storiform proliferációja, intercellularisan némi kollagén depozícióval, valamint igen finom kapillaris hálózattal (2. ábra). A

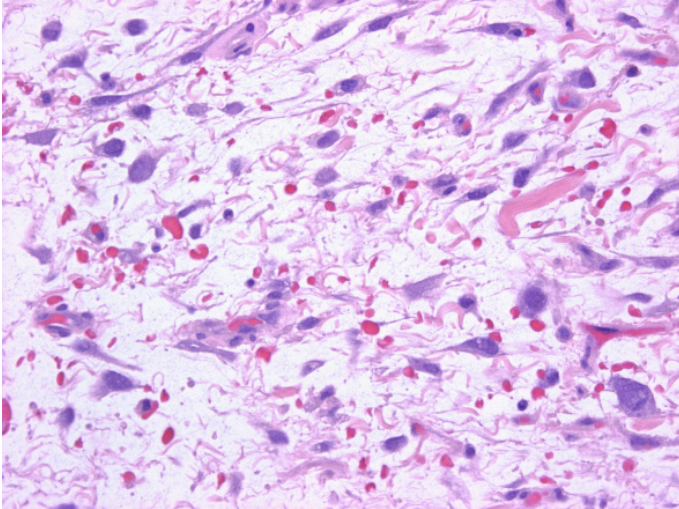


3. ábra DFSP-FS. A storiform szerkezetet mutató területtől élesen elkülönülő fascicularis rajzolatot mutató sarcomatosus proliferáció. (HE, 20x)

A 4. táblázat összegzi valemennyi transzformált DFSP pathologiai jellemzőit.

Minden tumorban megfigyelhető volt a DFSP-re jellegzetes orsósejtes,

subcutan zsírszövet jellemző, ún. lépesmézyszerű infiltratioja ugyancsak karakterisztikus vonás volt. Minimális nuclearis polimorfizmus mellett a mitózisok száma alacsony volt. Myxoid átalakulás egy esetben volt



4. ábra Pleiomorph daganatsejtek DFSP-MFH-ban (HE, 40x)

l á t h a t ó . A D F S P komponens aránya 45% és 75% között mozgott (átlagosan 54%).

A s a r c o m a t o s u s átalakulás minden esetben de novo jelentkezett.

A f i b r o s a r c o m a t o s u s jelleget (3. ábra) kifejezett sejtdússág, valamint fascicularis növekedés jellemezte az igen jellemző heringraj mintázattal. A tumorsejtek magja nagyobb, duzzadtabb volt, mint a DFSP-ben megfigyeltek, a kromatin durvábbnak mutatkozott. Bizarr sejtformák a fibrosarcomatosus területet nem jellemezték. A fibrosarcomatosus átalakulás a tumorerő subcutan területein jelentkezett, a dermis nem volt érintett egyetlen esetben sem. A klasszikus DFSP és a FS határa három esetben éles volt, míg két esetben elmosott. Focalis myxoid átalakulás két esetben jelent meg.

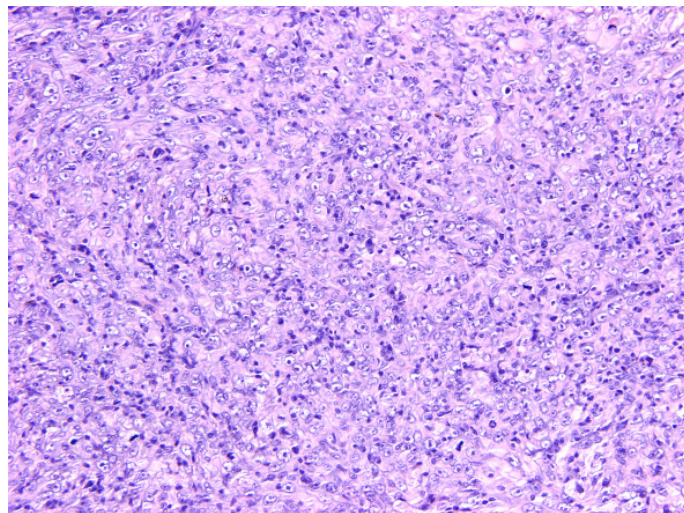
A malignus fibrosus histiocytoma irányban átalakult területeken a tumorsejtek viszonylag nagyok és pleiomorphak voltak (4. ábra). A mitotikus aktivitás fokozódása mellett multinuclearis óriássejtek is megfigyelhetők voltak. Az MFH szintén a daganat subcutan területében jelent meg, ugyanakkor dermalis érintettség is megfigyelhető volt két

esetben. Az MFH és a DFSP közötti határ két esetben elmosott, egy esetben éles volt. Focalis myxoid átalakulás két esetet jellemzett.

3. táblázat A sarcomatosus DFSP esetek histopathologiai jellemzői

Eset	A tumor megjelenése	A sarcomatosus komponens mérete (cm)	Mélységi invasio (cm)	A sarcomatosus komponens gradusa (Trojani)	Sarcomatosus komponens (%)	DFSP komponens (%)	MF/ 10 HPF (DFSP)	MF/ 10 HPF (sarcoma)
1.	eredeti	2x2.5	2.1	1	40	60	1	9
2.	eredeti	2.4x2.9	2.2	2	45	65	2	11
3.	eredeti	2x3	4	2	25	75	1	10
	1. recidiva	2x1	3	2	45	55	2	11
4.	eredeti	3x2	3	2	50	50	3	14
	1. recidiva	3x3	3.5	2	30	70	2	11
5.	eredeti	2x2.1	2	2	45	55	2	11
6.	eredeti	3x4	3.5	2	35	65	2	13
	1. recidiva	3x3	3.2	2	45	55	3	12
	2. recidiva	3x2	3	2	55	45	2	14
	3. recidiva	2.8x2	2.2	2	50	50	2	16
7.	eredeti	3x3	3	2	70	30	2	9
8.	eredeti	1.5x2	2.4	2	45	65	2	11

Általánosságban szólva a mitotikus aktivitás a sarcomatosus területeken magasabbnak bizonyult. A klasszikus DFSP területein a mitotikus aktivitás 1 és 3



között ingadozott 10 nagy 5. ábra Metastaticus DFSP-MFH, tisztán MFH jelleggel (HE, 20x)

nagyítású látótérben (átlagosan 1.875), ugyanakkor a sarcomatosus területeken ugyanez 9 és 16 közötti értéket mutatott (átlagosan 12).

Kiterjedt tumor necrosis vagy vérzés egyik esetben sem volt látható.

A 6. esetben megfigyelt metastaticus tumorban kizárólag malignus fibrosus histiocytomára jellegzetes szerkezet mutatkozott (5. ábra).

A sarcomatosus terület gradusa egy esetben grade 1, hét esetben grade 2 volt.

#### *5.4. Immunhisztokémiai jellemzők*

A 4. táblázat összefoglalja a jellemző immunhisztokémiai vonásokat.

Vimentin immunreaktivitás mind a DFSP, mind a sarcomatosus komponensben jelen volt. A konvencionális DFSP területeken erős CD34 reaktivitás mutatkozott, ugyanakkor a fibrosarcomatosus területek csak három esetben mutattak gyenge pozitívítást.

Az MFH területek CD34 negatívnak bizonyultak. FXIIIa reaktivitás csak néhány sejtben volt jelen a DFSP komponensben, ugyanakkor az MFH-n belül diffúz erős pozitívítást mutatkozott. Ez utóbbi sejtekről más tanulmányunkban kimutattuk, hogy nem neoplasticus jellegűek, hanem a daganat stromájához tartoznak. [Szollosi Z, Nemeth T, Egervari K, Nemes Z. Histiocyte-like cells expressing factor XIIIa do not belong to the neoplastic cell population in malignant fibrous histiocytoma. *Pathol Res Pract.* 2005;201:369-77.]

Az FS területek FXIIIa negatívak voltak. A dezmin és simaizom-aktin reakciók minden esetben negatívak voltak.

4. táblázat Immunhisztokémiai vonások

Eset	A tumor megjelenése	Vimentin (DFSP és sarcoma)	CD34 (sarcoma)	CD34 (DFSP)	FXIIIa (sarcoma)	FXIIIa (DFSP)	Desmin	$\alpha$ -SMA
1.	eredeti	+	-	++	-	+	-	-
2.	eredeti	+	+	+++	-	+	-	-
3.	eredeti	+	-	++	++	+	-	-
	1. recidiva	+	-	++	++	+	-	-
	2. recidiva	+	-	+++	+++	++	-	-
4.	eredeti	+	+	+++	-	+	-	-
	1. recidiva	+	-	+++	-	+	-	-
5.	eredeti	+	-	+++	-	+	-	-
6.	eredeti	+	-	++	+++	+	-	-
	1. recidiva	+	-	++	+++	+	-	-
	2. recidiva	+	-	++	+++	++	-	-
	3. recidiva	+	-	++	++	+	-	-
7.	eredeti	+	+	+++	-	+	-	-
8.	eredeti	+	-	+++	-	+	-	-

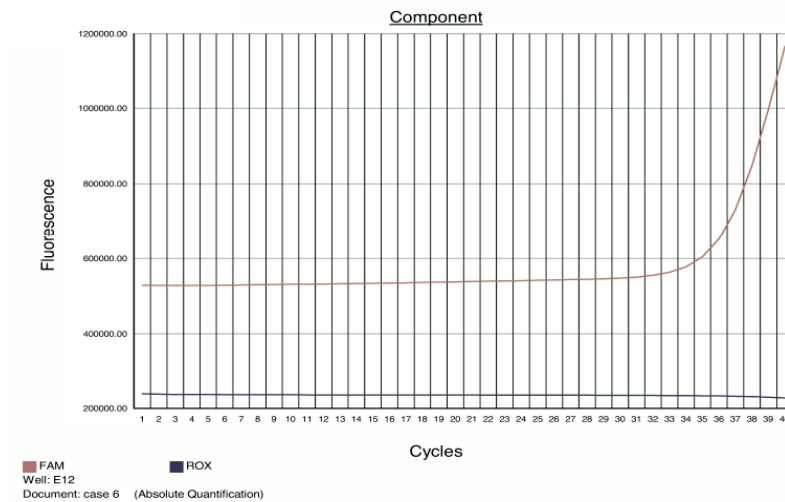
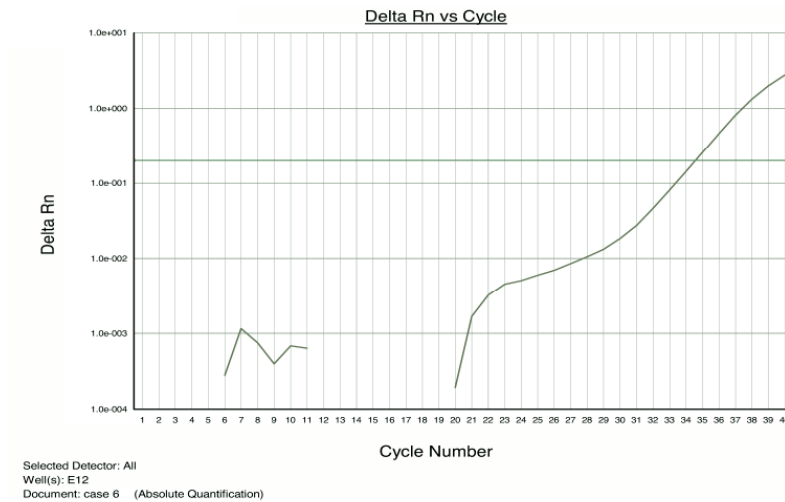
### 5.5. Molekuláris biológiai jellemzők

Az 1. esetet kivéve, minden tumorból sikerült amplifikálható RNS-t nyerni, melyet a 36B4 génnel végzett referencia vizsgálat igazolt.

Az 5. táblázat mutatja a real time PCR eredményeket. A vizsgálat tanulsága szerint a DFSP-FS esetek az alábbi transzlokációkkal voltak jellemezhetőek: a COL1A1 gén 27, 32, 40, 47 exonjai fuzionáltak a PDGFB 2 exonnal. A DFSP-MFH csoportban kimutatott transzlokációkat a következő COL1A1 exonok jellemezték: exon 32, 34, 40. A kontroll csoport tagjaiban a COL1A1 29, 32, 34, 38, 42 exonjai és a PDGFB 2 exon közötti transzlokáció volt megfigyelhető.

5. táblázat A transzformált DFSP-k fúziós génjei

esetszám	transzlokáció
1.	nincs átírható RNS
2.	exon 32 COL1A1- exon 2 PDGFB
3.	exon 34 COL1A1-exon 2 PDGFB
4.	exon 40 COLA1-exon 2 PDGFB
5.	exon 27 COL1A1-exon 2 PDGFB
6.	exon 32 COL1A1-exon 2 PDGFB
7.	exon 47 COL1A1-exon 2 PDGFB
8.	exon 40 COL1A1-exon 2 PDGFB



7. ábra A 6. esetben észlehető amplifikáció, mely COLIA1 exon32, PDGFB exon2 specifikus transzlokációt jelez

## 6. MEGBESZÉLÉS

Vizsgálatunkban 87 dermatofibrosarcoma protuberans közül 8 esetben észleltünk sarcomatosus átalakulást. A sarcomatosus átalakulás gyakorisága vizsgálataink szerint 9,1%, mely összhangban áll egy hasonló, azonban nagyobb anyagot átfogó elemzéssel.[11]

A sarcomatosus átalakulást mutató eseteket tovább vizsgáltuk. A nyolc tumor közül öt esetben fibrosarcomatosus átalakulást, három esetben pedig malignus fibrosus histiocytoma jellegű átalakulást észleltünk. Ez az arány meglehetősen szokatlan, ugyanis a malignus fibrosus histiocytoma irányú átalakulás az irodalomban is csak ritkaságként szerepel. Szigorú diagnosztikus kritériumaink alapján azonban az MFH irányú átalakulás nem kétséges.

Klinikopathologiai kontroll csoportként 20 konvencionális, széles lokális kimetszéssel eltávolított DFSP-t tekintettünk.

Az életkori, valamint anatómiai sajátosságok között nem találtunk eltérést a kontroll csoport, valamint a sarcomatosus DFSP-k között. A sarcomatosus átalakulás valamennyi esetünkben de novo keletkezett, nem pedig a recidivák során. A sarcomatosus terület valamennyi esetben a tumorok szignifikáns területét alkotta 25% és 75% között. Arra vonatkozóan, hogy mennyi a minimális sarcomatosus terület nagysága, amely már a biológiai viselkedést befolyásolja

tanulmányunk nem adott választ; továbbra is az 5%, vagy afölötti sarcomatosus átalakulásnál vonhatjuk meg a határt Mentzel és munkatársai közleménye alapján. [11]

A klinikopathológiai elemzés szempontjából fontos utánkövetési idő a tanulmányunkban meghaladta a kritikus eltávolítás utáni három évet, amikor a recidivák többsége jelentkezik.

A széles lokális kimetszéssel kezelt konvencionális DFSP-k recidiva aránya 15%-nak bizonyult esetünkben.

A sarcomatosus átalakulást mutató esetekben hat beteg esetében alkalmaztak széles helyi kimetszést, míg két betegnél inkomplett lokális eltávolítás történt radioterápiával és kemoterápiával, vagy anélkül.

A transzformált DFSP-k között három esetben észleltünk recidivát, ennek megfelelően a DFSP-FS-t, illetve a DFSP-MFH-t jellemző recidiva arány 37.5%. Ezt összehasonlítva a konvencionális DFSP-t jellemző értékkel szignifikáns különbség észlelhető a transzformált esetek javára.

Abban az esetben, ha a kezdeti kimetszés nem volt teljes, a recidiva arány 100% volt. Sajnálatos módon csak egyetlen recidiváló transzformált DFSP esetén alkalmaztak széles helyi kimetszést.

A széles lokális kimetszéssel kezelt DFSP-k recidiva aránya 17% volt, mely lényegében összhangban áll a konvencionális DFSP-t jellemző, általunk is észlelt, illetve irodalmilag is dokumentált értékkel.

Egy DFSP-MFH-ban szenvedő betegnél alakultak ki metastasisok (ennek alapján a áttétképzési arány 12.5%-nak felel meg).

A fenti megfigyelések alapján elmondható, hogy a transzformált DFSP-k esetében megfelelő kezeléssel a recidiva arány lecsökkenthető a konvencionális DFSP-t jellemző értékre, ugyanakkor a fenti betegben kialakult metastasisok egyértelműen agresszívabb klinikai lefolyást sejtetnek, összehasonlítva a konvencionális DFSP-t jellemző 3%-os áttétképzési aránnyal.

A sarcomatosus terület kiterjedése, gradusa, valamint a mélységi infiltráció a vizsgálataink szerint a prognózist nem befolyásolja.

A fenti megállapítás hasonló a lokális kezelés fontosságát hangsúlyozó, az alacsony és a magas gradusú végtagi sarcomákat elemző tanulmányban leírtakkal. [34] Utóbbi tanulmányban leírtakat is figyelembe véve felvethető, hogy az MFH irányú átalakulás a transzformáció agresszívebb formáját képviseli, melynek megfelelően a tumor lokális kezelése összetettebb, a széles lokális eltávolítás nehezebben kivitelezhető. Erre utal, hogy vizsgálatainkban a három

MFH irányú transzformációt mutató tumorból két esetben nem kellő radikalitással történt meg az excisio.

Újabban alkalmazzák az ún. micrographicus sebészeti eljárásokat, azonban ezek értéke a fibrohistiocytás tumoroknál, pontosan a tumorokat felépítő fibroblastos populatio miatt, meglehetősen limitált. [35]

Az immunhisztokémiai jellemzők közül a CD34 reaktivitás a legjelentősebb. Valamennyi konvencionális DFSP-ben, valamint a sarcomatosus átalakulást mutató tumorok DFSP területein erős CD34 pozitivitás volt észlelhető. A sarcomatosus területeken azonban gyenge immunreaktivitást vagy negativitást láttunk, mely a sarcomatosus átalakulás felismerésében nyújthat segítséget.

Az intermedier malignitású, valamint malignus cutan fibrohistiocytás tumorok elkülönítése időnként gondot okoz. A CD34 expresszió kívül a differenciáldiagnosztikát egyértelműen segítő más immunhisztokémiai reakció nem ismert. Különösen bonyolítja a helyzetet a malignus fibrosus histiocytoma irányú átalakulást mutató DFSP esetek elemzése, ugyanis ezek gyakorta emlékeztethetnek atypusos fibroxanthomára, vagy a tiszta cutan malignus fibrosus histiocytomára. Az atypusos fibroxanthoma és tiszta cutan MFH között a határvonal a subcutis érintettsége, ugyanis annak infiltrációja

malignus fibrosus histiocytomát jelez, míg a dermisre lokalizált folyamat atypusos fibroxanthomaként diagnosztizálendő.

Vizsgálataink második részében a transzformált DFSP molekuláris jellemzését végeztük el. Ennek a kérdésnek különös jelentőséget ad, hogy míg a DFSP-FS esetén ismert, hogy a tumor további dedifferenciálódásáról van szó, addig a MFH irányú átalakulás eredete ismeretlen.

Az eddig használt vizsgálómódszerek RNS izoláláson alapultak, melyet klasszikus PCR reakció követett. Ezt követően a PCR termék szekvenálásával igazolták a transzlokáció meglétét. Mindez, elsősorban a szekvenálási lépés miatt, bonyolult és drága eljárásnak számított.

Másrészről a konvencionális PCR reakció további akadálya a megfelelő mennyiségű RNS izolálása a paraffinos blokkokból, mely gyakorta nehézségekbe ütközik.

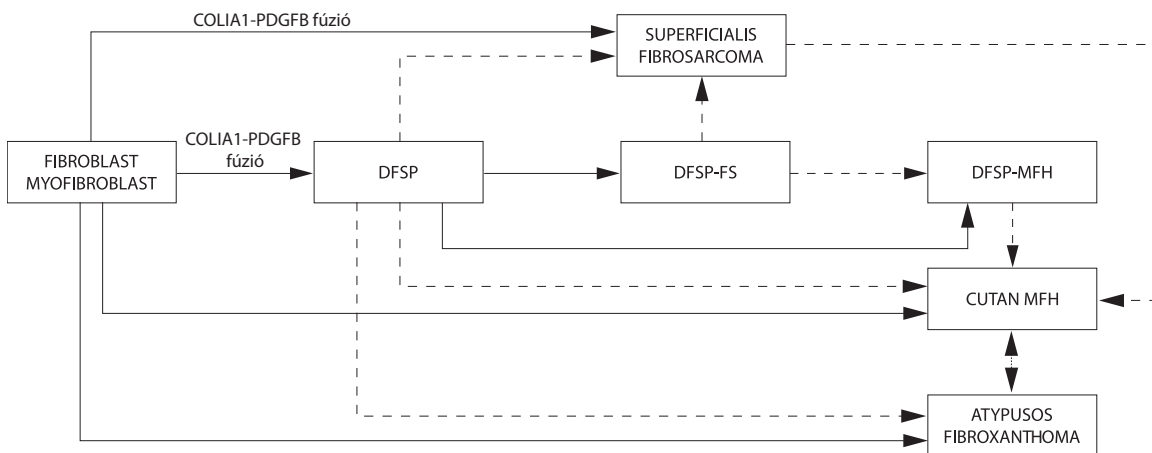
Real time PCR segítségével azonban a szekvenálási lépést megkerülhetjük, kellően gyors módszert alkalmazhatunk. További előnye a vizsgálómódszernek, hogy jóval szenzitívebb, mint a klasszikus PCR, így kisebb mennyiségű RNS is elégséges hozzá.

Vizsgálatainkkal sikeresen fejlesztettünk ki a DFSP diagnosztikájában használható real time PCR alapú, olcsó módszert. Jelenleg a szélesebb felhasználást valamelyest korlátozza, hogy 39 primerpárral kell a vizsgálatot elvégezni, azonban a klinikai

gyakorlatban nyilván elégséges egy egyszerűsített, a már ismert transzlokációkat detektáló módszer.

Megállapítottuk, hogy a fibrosarcomatosus DFSP-k mellett a malignus fibrosus histiocytoma irányú átalakulást mutató tumorokban is mind a sarcomatosus területen, mind a klasszikus komponensben fellelhető a DFSP-t jellemző COLIA1-PDGFB transzlokáció. MFH irányú specifikus transzlokációt vizsgálatunk nem tárt fel. Az adott tumorok mindkét komponensében ugyanaz a transzlokáció volt jellegzetes, mely a tumor közös eredetét tisztázza.

Mindezek alapján megállapítható, hogy a dermatofibrosarcoma protuberans, a fibrosarcomatosus DFSP, valamint a malignus fibrosus histiocytomatosus DFSP egy genetikai eltérés különböző fenotípusú megjelenési formái. Az elváltozások a genetikai eltérés különböző progressziós fokát képviselik. Megállapítható, hogy ezen elváltozások mintegy spektrumot képviselnek, melynek differenciáltabb szélén a konvencionális DFSP áll. Az általunk lehetségesnek tartott kapcsolatokat a 8. ábra mutatja.



8. ábra A DFSP és kapcsolt elváltozásainak kapcsolatai és lehetséges kapcsolatai

Az tumorigenesisre vonatkozó adatainkból a vizsgálataink további irányai is megállapíthatók. Vizsgálni kívánjuk a tiszta cutan MFH, valamint atypusos fibroxanthoma státuszát a COLIA1-PDGFB fúziós gén tekintetében. Megpróbáljuk azonosítani az egyes daganatfélések közötti kapcsolatokat, melyek a közös oncogenetikai alapot alátámaszthatják.

Mindemellett törekszünk a fenti reakción alapuló, a rutin pathológiai diagnosztika számára könnyen elérhető multiplex real time PCR reakció összeállításán, annak optimalizálásán a DFSP és társult elváltozásai diagnosztikájában.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP) egy lokálisan invazív, intermedier malignitású fibrohistiocytás lágyrésztumor. A DFSP morfológiailag heterogén, számos ritka variáns került leírásra, melyek ismerete elsősorban a DFSP-től agresszívabb lágyrésztumорок differenciáldiagnosztikájában fontos. Néhány esetben a DFSP fibrosarcomatosus (FS), vagy még ritkábban malignus fibrosus histiocytoma jellegű (MFH) területeket tartalmaz. Utóbbi variánsok prognosztikai jelentősége kérdéses.

Másrésről, a DFSP-t specifikus fúziós gén jellemzi, mely a COL1A1 és a PDGFB gén között alakul ki. A DFSP-FS-ben kimutatható a transzlokáció, ugyanakkor nem ismert a fenti genetikai eltérés állapota DFSP-MFH-ban.

Vizsgálataink a transzformált DFSP biológiai viselkedését elemzik több beteg adatainak értékelésével hosszú utánkövetéses vizsgálatban. Másrészt, real time polimeráz láncreakció (PCR) alapú vizsgálattal elemezzük a chimericus gén állapotát a sarcomatosus DFSP mindkét komponensében.

Kimutattuk, hogy a DFSP-ben észlelhető sarcomatosus átalakulás a tumorprogresszió egy formája, amely rosszabb prognózissal társul, összehasonlítva a klasszikus DFSP-vel. A transzformált DFSP

aggresszivitása feltehetően a sarcomatosus komponens gradusával mutat összefüggést. Annak ellenére, hogy a transzfomált DFSP aggresszívabb tumor, a prognózis kedvezően befolyásolható a kimetszés radikalitásával, melynek következtében a disszemináció, illetve a lokális recidiva mértéke a klasszikus DFSP-ben észlelthez közelíthető.

Demonstráltuk, hogy real time PCR alapú vizsgálat használható a sarcomatosus DFSP diagnosztikájában. Kimutattuk a COLIA1-PDGFB fúziós transzkriptumot a fibrosarcomatosus, illetve a malignus fibrosus histiocytoma jellegű területekben, mely jellegzetesség alátámasztja a különböző komponensek közös clonalis eredetét.

## **IRODALOMJEGYZÉK**

1. McPeak CJ, Cruz T, Nicastrì AD. Dermatofibrosarcoma protuberans: an analysis of 86 cases-five with metastasis. *Ann Surg* 1967;166:803-16.
2. Taylor HB, Helwig EB. Dermatofibrosarcoma protuberans: study of 115 cases. *Cancer* 1962;15:717-25.
3. Fletcher CDM, Evans BJ, Macartney JC, *et al.* Dermatofibrosarcoma protuberans: A clinicopathological and immunohistochemical study with a review of the literature. *Histopathology* 1985;9:921-38.
4. Weiss SW, Goldblum JR. Fibrohistiocytic tumors of intermediate malignancy. In Weiss SW, Goldblum JR eds. *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*. St. Louis: Mosby; 2001;491-534.
5. Penner DW. Metastasizing dermatofibrosarcoma protuberans: a case report. *Cancer* 1951;4:1083-6.
6. Wrotnowski U, Cooper PH, Shmookler BJ. Fibrosarcomatous change in dermatofibrosarcoma protuberans. *Am J Surg Pathol* 1998;12:287-93.
7. Ding J, Hashimoto H, Enjoji M. Dermatofibrosarcoma protuberans with fibrosarcomatous areas. A clinicopathologic study of nine cases and a comparison with allied tumors. *Cancer* 1989;64:721-9.

8. Conelly JH, Evans HL. Dermatofibrosarcoma protuberans. A clinicopathologic review with emphasis on fibrosarcomatous areas. *Am J Surg Pathol* 1992;16:921-5.
9. Eisen RN, Tallini G. Metastatic dermatofibrosarcoma protuberans with fibrosarcomatous change in the absence of local recurrence. A case report of simultaneous occurrence with a malignant giant cell tumor of soft parts. *Cancer* 1993;72:462-8.
10. O'Connell JX, Trotter MJ. Fibrosarcomatous dermatofibrosarcoma protuberans: a variant. *Mod Pathol* 1996;9:273-8.
11. Mentzel T, Beham A, Katenkamp D, Dei Tos AP, Fletcher CDM. Fibrosarcomatous ('high-grade') dermatofibrosarcoma protuberans. Clinicopathologic and immunohistochemical study of a series of 41 cases with emphasis on prognostic significance. *Am J Pathol* 1998;22:576-87.
12. Pizarro GB, Fanburg JC, Miettinen M. Dermatofibrosarcoma protuberans with fibrosarcomatous transformation: re-explored [Abstract]. *Mod Pathol* 1997;10:55A
13. Goldblum JR, Reith JD, Weiss SW. Sarcomas arising in dermatofibrosarcoma protuberans. A reappraisal of biologic behaviour in eighteen cases treated by wide local excision with extended clinical follow up. *Am J Pathol* 2000;24:1125-30.

14. Dowd JO, Laidler P. Progression of dermatofibrosarcoma protuberans to malignant fibrous histiocytoma: report of a case with implications for tumor histogenesis. *Hum Pathol* 1998;19:368-70.
15. Bridge JA, Neff JR, Sandberg AA. Cytogenetic analysis of dermatofibrosarcoma protuberans. *Cancer Genet Cytogenet* 1990;49:199-202.
16. Naeem R, Lux ML, Huang S-F, *et al.* Ring chromosomes in dermatofibrosarcoma protuberans are composed of interspersed sequences from chromosomes 17 and 22. *Am J Pathol* 1995;147:1553-8.
17. Pedeutour F, Simon MP, Minoletti F, *et al.* Translocation t(17;22) (q22;q13) in dermatofibrosarcoma protuberans. A new tumor-associated chromosome rearrangement. *Cytogenet Cell Genet* 1996;72:171-4.
18. O'Brien KP, Seroussi E, Dal Cin P, *et al.* Various regions within the alpha-helical domain of the COL1A1 gene are fused to the second exon of the PDGFB gene in dermatofibrosarcomas and giant cell fibroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;23:187-93.
19. Simon MP, Pedeutour F, Sirvent N, *et al.* Deregulation of the platelet-derived growth factor B-chain gene via fusion with collagen gene

- COL1A1 in dermatofibrosarcoma protuberans and giant cell fibroblastoma. *Nature Genet* 1997;15:95-8.
20. Shimizu A, O`Brian KP, Sjoblom T, *et al.* The dermatofibrosarcoma protuberans associated collagen type Ia1/platelet derived growth factor (PDGF) B-chain fusion gene generates a transforming protein that is processed to functional PDGF BB. *Cancer Res* 1999;59:3719-3723.
21. Sirvent N, Maire G, Pedetour F. Genetics of dermatofibrosarcoma protuberans family of tumors> from ring chromosomes to tyrosine kinase inhibitor treatment. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;37:1-19.
22. Sandberg AA, Bridge JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bones and soft tissue tumors: dermatofibrosarcoma protuberans and giant cell fibroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;140:1-12.
23. Linn SC, West RB, Pollack JR, *et al.* Gene expression patterns and gene copy number changes in dermatofibrosarcoma protuberans. *Am J Pathol* 2003;163:2383-2395.
24. Wang J, Hisaoka M, Shimajiri S, *et al.* Detection of COL1A1-PDGFB fusion transcripts in dermatofibrosarcoma protuberans by reverse transcription-polymerase chain reaction using archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol* 1999;8:113-9.

25. Maire G, Martin L, Michalak-Provost S, *et al.* Fusion of COL1A1 exon 29 with PDGFB exon 2 in a der(22)t(17;22) in a pediatric giant cell fibroblastoma with a pigmented Bednar tumor component. Evidence for age-related chromosomal pattern in dermatofibrosarcoma protuberans related tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;134:156-61.
26. Gokden N, Dehner LP, Zhu X, *et al.* Dermatofibrosarcoma protuberans of the vulva and groin: detection of COL1A1-PDGFB fusion transcripts by RT-PCR. *J Cutan Pathol* 2003;30:190-195.
27. Saeki H, Tsunemi Y, Ohtsuki M, *et al.* Gene mutation analysis in five cases of dermatofibrosarcoma protuberans using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Acta Derm Venereol* 2005;85:221-4.
28. Wang J, Morimitsu Y, Okamoto S, *et al.* COL1A1-PDGF fusion transcripts in fibrosarcomatous areas of six dermatofibrosarcoma protuberans. *J Mol Diagn* 2000;2:47-52.
29. Saeki H, Hoashi T, Tada Y, *et al.* Analysis of gene mutations in three cases of dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP): ordinary DFSP, DFSP with fibrosarcomatous lesion (DFSP-FS) and lung metastasis of DFSP-FS. *J Dermatol Science* 2003;33:161-7.
30. Gu W, Ogose A, Kawashima H, *et al.* Congenital dermatofibrosarcoma protuberans with fibrosarcomatous and myxoid change. *J Clin Pathol* 2005;58:984-6.

31. Sheng WQ, Hashimoto H, Okamoto S, *et al.* Expression of COL1A1-PDGFB fusion transcripts in superficial adult fibrosarcoma suggests a close relationship to dermatofibrosarcoma protuberans. *J Pathol* 2001;194:88-94.
32. Rupp GM, Locker J. Purification and analysis of RNA from paraffin-embedded tissues. *Biotechniques* 1998;6:56-60.
33. Coindre JM, Nguyen BB, Bonichon F, de Mascarel I, Trojani M. Histopathologic grading in spindle cell soft tissue sarcomas. *Cancer* 1988;61:2305-9.
34. Gaynor JJ, Tan CC, Casper ES, Collin CF, Friedrich C, Shiu M, Hajdu SI, Brennan MF. Refinement of clinicopathologic staging for localized soft tissue sarcoma of the extremity: a study of 423 adults. *J Clin Oncol* 1992;10:1317-29.
35. Gloster HM, Harris KR, Roenigk RK. A comparison between Mohs micrographic surgery and wide local excision for the treatment of dermatofibrosarcoma protuberans. *J Am Acad Dermatol* 1996;35:82-7.

## **A MUNKA ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE**

1. **Szollosi Z**, Nemes Z. Transformed dermatofibrosarcoma protuberans: a clinicopathological study of eight cases. *J Clin Pathol* 2005;58:751-756. IF:2.619
2. **Szollosi Z**, Scholtz B, Egervari K, Nemes Z. Transformed dermatofibrosarcoma protuberans: real time PCR detection of COLIA1-PDGFB fusion transcripts in sarcomatous areas. IF:2.619

## **EGYÉB, JELEN MUNKÁBAN NEM HASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE**

1. Szucs-Farkas Z, Toth J, **Szollosi Z**, Peter M, Bartha I.  
Pseudoaneurysm and ilio-caval fistula caused by malignant fibrous histiocytoma of the aorta-CT diagnosis and angiographic confirmation. *Eur Radiol* 2002;2:450-3. IF: 2.364
2. Antus B, Hamar P, Kokeny G, **Szollosi Z**, Mucsi I, Nemes Z, Rosivall L. Estradiol is nephroprotective in the rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:54-61. IF: 2.840
3. **Szollosi Z**, Tarr T, Kiss E. Crohn disease versus systemic lupus erythematosus: an autopsy diagnosis of predominantly extraintestinal Crohn disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:702-3. IF: 3.545

4. **Szollosi Z**, Egervari K, Nemes Z, Kaczur V. Re: Lottner et al. simultaneous detection of HER2/neu gene amplification and protein overexpression in paraffin-embedded breast cancer. *J Pathol.* 2005;207:119-20. IF: 5.333
5. **Szollosi Z**, Nemeth T, Egervari K, Nemes Z. Histiocyte-like cells expressing factor XIIIa do not belong to the neoplastic cell population in malignant fibrous histiocytoma. *Pathol Res Pract.* 2005;201:369-77. IF: 0.681
6. Egervari K, **Szollosi Z**, Nemes Z, Kaczur V. Comparison of immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization assessment of HER-2 status in routine practice. *Am J Clin Pathol.* 2006;125:155-6. IF: 2.716
7. Cserni T, Kiss A, Jozsa T, **Szollosi Z**, Nagy B. Extralobar Pulmonary Sequestration in the Right Upper Thoracic Region. *Respiration.* Accepted for publication. IF: 1.019
8. Keresztes K, Miltenyi Z, Bessenyei B, Beck Z, **Szollosi Z**, Nemes Z, Olah E, Illes A. Epstein-Barr virus in Hodgkin's lymphoma in North-eastern part of Hungary and its impact on therapeutic and survival results. *Acta Hematologica.* Accepted for publication IF: 1.373
9. Egervari K, **Szollosi Z**, Nemes Z. IHC for Her2 with CBE356 antibody is a more accurate predictor of Her2 gene amplification by FISH than HercepTest in breast carcinoma. *J Clin Pathol.* Accepted

for publication. IF: 2.619

A közlemények összesített impact faktora: 27.728

MAGYAR NYELVŰ KÖZLEMÉNYEK:

1. Keresztes K, Miltényi Zs, Bessenyei B, Beck Z, Szöllősi Z, Nemes Z, Oláh É, Illés Á. Epstein-Barr-vírus-asszociáció Hodgkin-lymphomában, hatása a kezelési és túlélési eredményekre. Hematológia. 2005;38:65-75.
2. Keresztes K, Bessenyei B, Szöllősi Z, Beck Z, Miltényi Zs, Nemes Z, Oláh É, Illés Á. Hodgkin-lymphomás betegek Epstein-Barr vírus asszociációjának vizsgálata. Orvosi Hetilap. 2005;146:1575-82.

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Köszönetet mondok témavezetőmnek, Prof. Dr. Nemes Zoltánnak akinek összegyűjtött archivumából a fenti esetek, jórészt klinikai adataikkal együtt előkerültek, és a rendelkezésemre álltak.

Köszönet illeti Scholtz Beátát, aki a real time PCR reakció megtervezésénél nyújtott segítséget.

Az RNS izolációnál Egervári Kristóf V. éves orvostanhallgató segített, ezért köszönet neki.

Az immunhisztokémiai reakciók elkészítését, az RNS izoláció előkészítését Kósáné Csonka Terézia asszisztensnő végezte, ezért őt is köszönet illeti.

## **Mellékletek**