

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Sejtszintű adaptáció vizsgálata klasszikus Hodgkin
lymphomában**

Dr. Matolay Orsolya

Témavezető:

Prof. Dr. Méhes Gábor



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2022

Sejtszintű adaptáció vizsgálata klasszikus Hodgkin lymphomában

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban*

Írta: Dr. Matolay Orsolya, okleveles orvosdoktor

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskolája
(Konzervatív orvostudományok és klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Méhes Gábor, az MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora

Dr. Szepesi Ágota, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szűcs Gabriella, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora

Dr. Szepesi Ágota PhD

Dr. Erdélyi Katalin PhD

Dr. Mádi András PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK

2022. június 16. 13:00 (online)

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze az orsolya.matolay@med.unideb.hu email címre küldött üzenettel, a vitát megelőző nap (2022. június 15.) 14 óráig.

1 Bevezetés

A lymphomák olyan rosszindulatú daganatok csoportja, amelyek az immunrendszer összetevőiből származnak, és általában a T- és B-sejteket érintik.

A Hodgkin-lymphoma (Hodgkin's lymphoma, HL) az összes lymphoma mintegy 10%-át teszi ki, így a ritka monoklonális B-sejt eredetű vérképzőszervi rosszindulatú daganatok közé tartozik. A HL kialakulásának okát és rosszindulatú transzformációjának mechanizmusa a széleskörű kutatások ellenére sem feltárt minden részletében.

A WHO 2008-as klasszifikációja és 2016-os revíziója szerint a HL két csoportra osztható: noduláris lymphocytá-domináns Hodgkin-lymphomára (Nodular lymphocyte predominant Hodgkin's lymphoma, NLPHL) és klasszikus Hodgkin-lymphomára (classic Hodgkin's lymphoma, cHL). A HL mintegy 85%-át a cHL teszi ki. A cHL további négy szövettani szubtípusra osztható: nodularis sclerosis (NS), kevert sejtes (MC), lymphocytá gazdag (LR) és lymphocytá szegény (LD) altípusra. A cHL jellegzetes neoplasztikus sejtje az ún. Hodgkin-Sternberg-Reed sejt (HRS). A nagy, mononukleáris Hodgkin-sejteket és a nagy, többmagvú Reed-Sternberg (RS) sejteket egy nem-neoplasztikus sejtpopuláció veszi körül.

A hypoxiát a fiziológiásnál alacsonyabb szöveti oxigénparciális nyomásként (pO_2) határozzák meg. Ez bekövetkezhet hipoperfúzió vagy a sejtek megnövekedett oxigén igénye miatt. Az érellátás kapacitását meghaladó állapot bioenergetikai válsághoz vezet. A hypoxia már a tumorprogresszió korai szakaszában kialakulhat, és alapvető hatást gyakorol a tumorok működésére. A hypoxia olyan jelátviteli útvonalakat aktiválhat a daganatos sejtekben, amelyek lehetővé teszik az alacsony oxigénszint melletti túlélést. A hypoxia számos adaptív mechanizmust indukálhat, amelyek központi vezérlő molekulája a hypoxia indukálta transzkripciós faktor (Hypoxia inducible transcriptional factor, HIF). A HIF1 α a sejtek homeosztázisának számos aspektusát befolyásolja, és aktiválódása metabolikus változásokhoz vezet. Csökkent oxigénszinttel járó körülmények között vagy oxigén hiányában a sejtek energiaellátásuk fenntartásának érdekében átállnak a glikolízisre. A daganatos sejtek normoxiás körülmények között is folytathatják a glikolízist, ezt a jelenséget Warburg-effektusnak nevezik.

A glükózkatabolizmus azonban számos metabolikus végtermék, többek között CO_2 , protonok és tejsav felhalmozódását is eredményezi. Ezen anyagok tartós felhalmozódása intracelluláris acidózishoz vezethet, amely zavarhatja a bioszintetikus reakciókat és a jelátvitelt, mivel a sejt

működésében szerepet játszó legtöbb molekula, regulátorok és egyéb komponensek pH-érzékenyek. A citoszolikus elsavasodás elkerülése érdekében a sejtek megváltoztatják az ionáramlást, és növelik a pH-szabályozó aktivitás mértékét. A transzmembrán enzimek vagy csatornák aktív upregulációja miatt az intracelluláris pH (pHi) visszatér a sejtek túlélését és proliferációját biztosító, közel lúgos pH értékekhez. A védekező mechanizmusok általában a CO₂ diffúzióján, a laktát és a H⁺ exportálásán, valamint a CO₂ hidratálásán alapulnak, és azt célozzák, hogy bikarbonát ionok keletkezzenek.

A szénsavanhidráz IX (carbonic anhydrase IX, CAIX), egy erősen HIF1 α -függő enzim- fontos szerepet játszik a sav-bázis egyensúlyban, mivel aktívan katalizálja a H⁺ eltávolítását a fiziológiás intracelluláris pH visszaállítása érdekében, miközben az extracelluláris pH elsavasodik. Így támogatva a daganatos sejtek túlélését az ellenséges mikro környezet ellenére, és így elősegíheti a tumorsejtek invázióját. A CAIX-hez kapcsolódó adaptív válasz agresszív tumorfenotípussal és kemoterápiával szembeni rezisztenciával jár együtt.

A hypoxia már a tumorprogresszió korai szakaszában kialakulhat, és kulcsfontosságú hatást gyakorol a tumorbiológia számos aspektusára. A hypoxiás környezetben a daganatos sejteknek metabolikus adaptáción kell átesniük a túlélés érdekében. Korábbi tanulmányok arra a következtetésre jutottak, hogy az érett B-sejtek hypoxiás körülmények között kulcsfontosságú HRS-sejtjellemzőkkel rendelkező sejtekké alakulhatnak, és a hypoxia a gyógyszerrezisztenciát is befolyásolja. A napi szövettani rutin gyakran tükröz olyan szöveti elváltozásokat, amelyek egyéb agresszív jellemzőkkel társulva hypoxiás károsodásra utalnak. Korábbi tanulmányok arra a következtetésre jutottak, hogy a hypoxia az érett B-sejtekben a HRS-sejtekhez hasonló atípiát és gyógyszerrezisztenciát vált ki.

Azonban a cHL-ben a hypoxia által kiváltott metabolikus adaptációról és pH-szabályozásról általában hiányoznak az adatok.

2 Célkitűzés

2.1 A CAIX enzim expressziójának kvantitatív elemzése cHL-es betegmintákban

Ebben a tanulmányban cHL betegek biopsziás mintáit kívántuk megvizsgálni, annak érdekében, hogy betekintést nyerjünk a hypoxiával kapcsolatos változások komplexitásába, a CAIX expressziójába és annak a lymphomák progressziójában betöltött szerepébe.

Fel kívántuk mérni, hogy a CAIX expressziója hogyan korrelál a betegek túlélésével és más klinikai paraméterekkel (pl. életkor, nem, relapszus, terápiára adott válasz).

A fénymikroszkópos vizsgálataink mellett digitális képelemzéssel is elemeztük mintáinkat a 3DHistech (Budapest, Magyarország). által kifejlesztett és validált algoritmussal QuantCenter, DensitoQuant modul segítségével.

2.2 A CAIX előfordulása és dinamikája kísérleti cHL modellekben

Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a hypoxiával összefüggésbe hozható adaptációs mechanizmusokat, a sejtkinetikai faktorok és markerek expresszióját, továbbá a terápiára adott válasz megváltozását cHL sejt kultúrákban.

E célból:

- jellemeztük és validáltuk az L1236 és L428 humán Hodgkin-lymphomasejtvonalakat.
- meghatároztuk a hypoxia hatását több HIF1 α downstream effektor mRNS- és fehérjeexpressziós szintű expresszióján keresztül.
- *in vitro* kísérleteket végeztünk egy gyakran alkalmazott terápiás gyógyszerkombinációra, az ABVD-re adott válasz - hatékonyság és hatásosság - normoxiában és hypoxiában történő vizsgálatára.

3 Anyag és módszertan

3.1 A minták kiválasztása és immunhisztokémiai elemzése

A cHL-es minták a 1999 és 2019 közötti időszakból a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Patológiai Osztályán és a Nyíregyházi Jósa András Oktatókórház, Patológiai Osztályán archívumából származtak. A cHL szövettani diagnózisát a WHO legújabb klasszifikációja alapján állapítottuk meg. A nagymennyiségű patognómikus HRS-sejtekkel rendelkező eseteket választottuk ki további vizsgálataink tárgyául. Rutin patológiai festésen (hematoxin-eozin - HE) állapítottuk meg a szövetminta szöveti jellemzőit (stróma, nekrosis stb.), továbbá IHC-panelt is készítettünk, megvizsgáltuk a PAX5, CD20 és CD30, LMP-1 és LCA expresszióját. Az IHC-t sorozatmetszeteken végeztük el, CD30-hoz a Ber-H2 antitest klón (Dako-Agilent, Glopsrup, Danemark), CAIX-hez a nyúl poliklonális antitest-klónokat használtunk. EnVision Flex torna-peroxidáz/diaminobenzidin (HRP/DAB)⁺ kromogén-detektáló rendszert (Dako-Agilent) használtunk a specifikus antitest kötődés kimutatására, az antigén 9,0 pH-n történő feltárását követően. CAIX negatív kontrollként NPLHL mintákat, CAIX pozitív kontrollként vesesejtes rákot használtunk.

Kettős immunhisztokémiai festést is végeztünk a MIB1 aktivitás és a CAIX expressziójának vizsgálatának céljából. Először is, a nukleáris MIB1-et specifikusan megjelöltük és detektáltuk az EnVision Flex HRP/DAB⁺ segítségével, majd a CAIX antitesttel következett a második inkubáció. A CAIX-et Flex HRP rendszerrel vizualizáltuk lila VIP kromogén felhasználásával (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). A jelöletlen sejtmagok festésére metil-zöld oldatot (Vector Laboratories) használtunk.

A CAIX immunhisztokémiai festést poli- és monoklonális antitestekkel egyaránt végeztük. Az immunhisztokémiai festést a gyártó protokollja szerint végeztük, a detektáláshoz diaminobenzidin (DAB) kromogént használtunk.

3.1.1 Immuncitokémia

A sejt kultúrából származó citospin preparátumokat 10%-os formaldehidben fixáltuk, miután egyszer PBS-ben mostuk őket. 24 óra fixálási idő után a sejtek egy-egy cseppjét üveglemezekre

helyeztük, majd hagytuk megszáradni (1 óra). Az immunhisztokémiához a BenchMark ULTRA protokollját használtuk. A festést BenchMark Ultra immunfestő gépen végeztük (Roche Diagnostics, Németország). Az antigén feltárása után a detektálásra OptiView DAB IHC és UltraView Universal DAB Detection kitek voltak alkalmazva.

A CAIX, CAXII, HIF1 α , GLUT1, MIB1 expressziójának intenzitását és eloszlását fénymikroszkóppal (DM2500 mikroszkóp, Leica, Wetzlar, Németország) értékeltük, majd a metszeteket Panoramic MIDI Slide Scannerrel (3D Histech, Budapest, Magyarország) digitalizáltuk. A szabadkézi annotációk elhelyezése után, a szemikvantitatív elemzéshez a QuantCenter Software 2, DensitoQuant modulját használtuk (3D Histech, Budapest, Magyarország). A MIB1-CAIX kettős festést is elvégeztük.

3.2 Digitális képelemzés

A digitális elemzésre csak a reprezentatív CD30 és CAIX festéssel rendelkező nyirokcsomó mintákat használtuk fel. A CD30 és a CAIX membrán asszociálta fehérjék, így elemzésünk ugyanazzal a szoftverrel elvégezhető. A tárgylemezeket a Panoramic Slide Scanner MIDI metszet szkennelő (3DHistech, Budapest, Magyarország) segítségével digitalizáltuk. A metszetek kézi annotálását Caseviewer 2.2 program (3DHistech, Budapest, Magyarország) segítségével végeztük el. Szabadkézi annotációkat alkalmaztunk a hamis pozitivitás elkerülése érdekében, így kizártuk a sérült területeket (pl. artefaktumok, ragasztómaradványok, légbuborékok, erős háttérreakció, szöveti redők). A CD30 és CAIX expressziót QuantCenter szoftverrel (3DHistech, Budapest, Magyarország) kvantitatívan elemeztük. A teljes tárgylemez digitális képelemzését pedig a DensitoQuant modullal végeztük el. A DensitoQuant modullal festékintenzitás alapú elemzést lehet végezni.

A modul gyors, objektív és szemikvantitatív elemzést biztosított úgy, hogy azonosította az egyes pozitív pixeleken keresztül a pozitív festési reakciót. A modulban a kék és barna tolerancia, a színintenzitás, a score-szintek, a kontraszt és a gamma módosítható. Ezzel a módszerrel a szoftver képes volt kiszámolni a hisztoscoret (H-score) a digitalizált metszeten belül azonosított pozitív és negatív képpontok aránya alapján. Az elemzések után a negatív pixeleket kék színnel, míg a pozitivitást egy színspektrummal ábrázolta: a kevésbé pozitívak sárga, míg az erősen pozitívak piros színnel jelentek meg.

3.3 Sejtenyésztés

Az L1236 és L428 sejtvonalakat a DSMZ-től (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH/German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Németország) szereztük be.

A sejteket 5 percig 1200 rpm-en centrifugáltuk, majd 2-3 naponta megfelelő mennyiségű friss tápfolyadékban szuszpendáltuk. A sejteket RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, R5886) táptalajban tartottuk, amely 10% FBS-t, 1% penicillint/streptomycint, 2 mM L-glutamint és 1% piruvátot tartalmazott. A sejteket 37°C-on, párasított, 5% CO₂ inkubátorban tartottuk. Az elemzések előtt a sejtszámot tripánkéék segítségével határoztuk meg. A kísérleteket normoxiás és hypoxiás körülmények között végeztük. A hypoxiás gázkeverék 1% O₂-t, 94% N₂-t és 5% CO₂-t tartalmazott. A gáztartályt a Linde cégtől vásároltuk.

3.4 Az *in vitro* kísérletekhez használt kemoterápiás szerek

A gyógyszereket a következő koncentrációkban használtuk:

- Doxorubicin: 0,01 µM
- Vinblastin: 1 µg/ml
- Bleomicin: 10 µg/ml
- Dakarbazin: 250 µg/ml
- Acetazolamid: 50 µM.

3.5 A sejthalál kimutatása - Propidium-jodid (PI) felvétele

A sejteket 24 lyukú sejtenyésztő lemezbe tettük ki (60 000 sejt/lyuk), és különböző koncentrációjú gyógyszerekkel kezeltük őket normoxiás és hypoxiás körülmények között. A fent említett kezelést követően a sejteket 100 µl/ml propidium-jodiddal (PI) festettük meg és 30 percen keresztül 37°C-on inkubáltuk. A sejteket FACS-csővekbe gyűjtöttük, a sejteket PBS-

sel mostuk, majd ugyanilyen FACS-csővekbe gyűjtöttük (PBS 1:1). Ezután az elhalt sejtek számát áramlási citometriával (FACS Calibur, BD Biosciences) mértük és a kapott adatokat FlowingSoftware 2.5.1 szoftverrel elemeztük ki.

3.6 Apoptózis kimutatása Annexin-V-FITC festéssel

Az L1236 és L428 sejteket 24 lyukú sejttenyésztőlemezbe tettük ki (60.000 sejt/lyuk), és különböző koncentrációjú gyógyszerekkel kezeltük őket normoxiás és hypoxiás körülmények között. A fent említett kezelést követően a sejteket 100 µl/ml propidium-jodiddal (PI), 5 µl FITC Annexin V-vel (A komponens) festettük és 1 órán keresztül jégen, sötétben inkubáltuk. A sejteket FACS-csővekbe gyűjtöttük, a sejteket PBS-sel mostuk és ugyanabba a FACS-csőbe gyűjtöttük (PBS 1:1). Ezután a sejtek számát áramlási citometriával (FACS Calibur, BD Biosciences) mértük és az adatokat Flowing Software 2.5.1 szoftverrel elemeztük ki.

3.7 A hypoxia indukálta elváltozások vizsgálata

3.7.1 mRNS izolálás és RT-qPCR

A sejtek teljes RNS izolálását TRIzol reagenssel (Invitrogen, TR118) készítettük el, 2 µg RNS-t használtunk fel reverz transzkripcióra High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, 4368813) segítségével, a gyártó protokollját követve. qPCR BIO SyGreen Lo-ROX Supermix (PCR Biosystems Ltd., London, UK, PB20.11-05) reagenst használtuk a RT-qPCR-reakciókhoz, a gének expressziós szintjét a Light-Cycler 480-al (Roche Applied Science) detektáltuk. A normalizáláshoz a 36B4 és a GAPDH, valamint a ciklofilin A gének mRNS expresszjának geometriai átlagát használtuk.

3.7.2 Áramlási citometria

A CAIX expresszióját APC Conjugation Lightning-Link® (ab201807) kit és Mab75 antitest (hígítás: 1:1000) segítségével határoztuk meg. Az L1236 és L428 sejteket T25 flaskákba helyeztük (10^6 sejt) és 48 órán át normoxiás és hypoxiás körülmények között inkubáltuk. Majd PBS-sel mostuk és 1000 RPM-en 5 percig, szobahőmérsékleten centrifugáltuk. A PBS eltávolítása után a sejteket 1%-os formalinban rögzítettük. HEPES-sel kimostuk a formalint a

mintákból, majd az APC konjugációs Lightning-Link kitet használva jelöltük a mintákat, a gyártó leírását követve. A CAIX expresszióját áramlási citometriával (Novocyte Flow Cytometer, ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA) elemeztük. Az adatelemzést a NovoExpress® szoftverrel végeztük el (1.3.0, ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA, 2018).

3.7.3 Statisztikai elemzés

A histoscore-t a következő képlettel számoltuk ki:

H-score = $((1 \times \% \text{gyengén festődő sejtek}) + (2 \times \% \text{közepesen festődő sejtek}) + (3 \times \% \text{erősen festődő sejtek}))$. A histoscore tartománya 0-300 között van.

Statisztikai elemzésünkben a két csoport összehasonlítására nem-parametrikus Wilcoxon signed-rank tesztet alkalmaztunk, az ettől eltérő statisztikai próbát jeleztük. A Mann-Whitney U-tesztet a csoport alapú összehasonlításokhoz alkalmaztuk. Nem-parametrikus Spearman-féle korrelációt és nem-parametrikus Kruskal-Wallis-számításokat végeztünk a CD30 és a CAIX párosított esetek értékkülönbségének elemzésére. Az adatokat átlag \pm SD-ben adtuk meg, az eltéréseket jeleztük. A statisztikai elemzést GraphPad Prism 6 szoftverrel (La Jolla, CA, USA) végeztük. A statisztikai szignifikációt $p < 0.05$ értékkel definiáltuk.

4 Eredmények

4.1 CAIX és CAXII expressziójának vizsgálata cHL-ben

A CD30+, CAIX+ és CAXII+ tumorméret számszerűsítésére a sorozatmetszeteket CD30, CAIX és CAXII immunhisztokémiai festéseket végeztünk el. A CD30 és CAIX expresszió specifikusnak bizonyult a patognomonikus HRS sejtekre, azonban a CAXII expresszió nem volt specifikus inkább stromális reakciót mutatott. A HRS-en kívül egyetlen más sejttípus sem bizonyult CAIX pozitívnak, ami erős membrán és/vagy gyenge citoplazma-pozitivitás formájában jelentkezett. 56/101 (55,4%) eset volt CAIX-pozitív, vizsgálati csoportunk többi részét negatív esetként definiáltuk. Nekrózist csak 27/101 (26,7%) esetben észleltük, ebből NS 20/27 (74,07%), 4/27 (14,81%) MC és 3/27 (11,11%) LD, de az értékelt minták 85% (23/27) bizonyult CAIX pozitívnak. A nekrotikus gócot jellemzően CAIX pozitív sejtek vették körül. A megfigyelt jelenség összhangban volt a CAIX expresszió jelenlegi irodalmával, amely a nekrotikus magot körülvevő

adaptációs zónát képviseli. A vizsgálati kohorszban a leggyakoribb szövettani altípus az NS (70/101, 69,3%) volt, ezt követte az MC (20/101, 19,8%) és az LR (7/101, 6,9%), majd az LD (4/101, 0,39%). A CAIX expresszió 56/101 (55,44%) esetben volt pozitív, ezek többsége (46/70, 65,7%) az NS altípusban, míg az MC esetében csak 20% volt pozitív (4/20) az összes MC esetből. Az LR-ben is alacsony volt a pozitivitás (2/7, 28%), ezzel szemben a legagresszívabb klinikai variánsban, az LD rendelkezett a legmagasabb pozitívítási aránnyal (100%, 4/4).

A MIB1 expresszióját is megvizsgáltuk cHL esetekben. Kettős immunhisztokémiai festést 26 esetben végeztünk. Eredményeink szerint a MIB1 értékek szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak a CAIX pozitív populációban, mint a CAIX negatív populációban ($p < 0,001$), ami arra utalhat, hogy a CAIX pozitív esetek adaptációval összefüggő sejtciklus-leállításban (cell cycle arrest) vannak.

4.2 Digitális elemzés - A CD30 és CAIX expressziójának kvantitatív meghatározása a cHL-ben

101 mintát vizsgáltunk meg a digitális analízissel. Kézi annotációt alkalmaztunk, majd a mintákat a QuantCenter szoftver (3Dhistech, Budapest, Magyarország) DensitoQuant moduljával elemeztük, amely automatikusan képes H-scoret számolni. A cut-off szintet 1-es H-score értékben határoztuk meg. A vizsgálatot validáló negatív esetekben a cut-off szintet soha nem haladták meg.

A CD30 értékek igen változónak bizonyultak, ellentétben a CAIX értékekkel, amelyek általában alacsonyak voltak. De a CAIX pozitív mintákban szignifikánsan magasabbnak bizonyult a CD30 értéke a negatív esetekhez képest. A sejtklaszterek azonosításához a CD30+ tumortömeget összehasonlítottuk a CAIX- és CAIX+ összmennyiséggel. A CAIX- esetekben - érdekes módon - szignifikánsan alacsonyabb volt a CD30 expressziója, a CAIX+ esetekben azonban a CD30 összmennyisége nőtt.

4.2.1 A CD30 és a CAIX közötti kapcsolat vizsgálata

A legtöbb esetben a CD30 pozitív tumortömeg a CAIX+ esetekben nagyobb volt, mint a CAIX- eseteknél, azonban e tényezők között nem találtunk pozitív korrelációt. A CAIX-expresszió igen változónak bizonyult, és általában alacsonyabb volt a CD30-expresszióhoz képest. Ez arra

utalhat, hogy az enzim részleges upregulációja a HRS-sejt-szubpopuláció funkcionális diverzitására. A CAIX-overexpressziója a malignus sejtkompartment jellemzője, míg a sejtes háttér negatív maradt.

A CD30 esetében a minimális érték 3,46, a maximális pedig 151,33 volt (átlag $52,37 \pm 30,74$), míg a CAIX esetében a minimális érték 2,16, a maximális pedig 90,4 (átlag $18,7 \pm 18,8$). A statisztikai elemzés alapján a CD30+ sejttömeg szignifikánsan nagyobbak bizonyult, ami magasabb CAIX+ frakcióval társult ($p = 0,008$). A pixel alapú elemzésünk szerint a CD30-expresszió az LD változatban volt a legmagasabb ($n = 4$, tartomány: 24,29-109,95, átlag: $63,1 \pm 32,9$), amit az NS követett ($n = 70$, tartomány: 2,16-128,3, átlag: $46,85 \pm 27,5$), az MC ($n = 20$, tartomány: 3,38-151,3, átlag: $45,65 \pm 35,2$) és az LR altípus, ahogyan az várható volt ($n = 7$, tartomány: 2,518-28,5, átlag: $17,5 \pm 8,8$). A CAIX negatív esetekben a H-score tartománya 0,01-0,99 (átlag: $0,37 \pm 0,29$), a CD30 H-score a CAIX negatív esetekben 3,38 és 118,2 között volt (átlag: $37,38 \pm 25,34$). A CAIX pozitív esetekben a H-score 2,16-90,36 között volt, míg a pozitív esetek CD30 H-score-ja 3,46-151,33 (átlag $52,37 \pm 30,74$). A pixelalapú elemzés azt mutatta, hogy a CAIX-átlagos expressziója az LD-változatban volt a legmagasabb, ezt követte az NS, MC és LR altípus. A statisztikai elemzés szerint a CD30+ sejttömeg szignifikánsan nagyobbak bizonyult, ami magasabb CAIX+ frakcióval társult ($p < 0,0001$). Negatív kontrollként CD30 és CAIX kettős negatív NPLHL eseteket ($n = 8$) használtunk. A CAIX+ és CAIX- esetek CD30+ tumorméret közötti szignifikáns különbség azt jelzi, hogy a CAIX-upreguláció a cHL progresszív formáiban fordul elő. Ez arra enged következtetni, hogy a HRS-sejtek túlélési előnyt élveznek a többi sejthez képest. A CD30+ sejtek mennyisége a CAIX+ esetekben megnövekedett, azonban a korrelációs elemzés szerint e markerek között nem volt pozitív korreláció (p -érték = 0,475, Spearman r_s : -0,008).

A tumoron belüli variabilitás leírására relatív pozitivitási arányt számoltunk az összes cHL-variáns esetében. A CAIX/CD30 átlagos aránya $0,23 \pm 0,57$ volt az összes esetre és $0,35 \pm 0,61$ az összes CAIX+ esetre. A CAIX/CD30 arány az LD altípusban volt a legmagasabb (0,87), ezt követte az NS (0,35), az MC (0,13) és az LR változat (0,83). Az LR altípusban a CAIX/CD30 arány továbbra is magas maradt, de az esetek alacsony száma ($n = 2$) és a mintákon belüli pozitív események gyakorisága nem tette lehetővé a további statisztikai elemzést.

Összefoglalva digitális képelemzés eredményeit: A CAIX+ sejtek a CD30 pozitív sejtek egy alfrakcióját alkotják, és jelentős funkcionális heterogenitást jeleznek a malignus klónon belül, ami hozzájárulhat az agresszív és rezisztens tumorsejt fenotípushoz.

4.3 A CAIX klinikai jelentősége

A betegek 47,5%-a nő volt (48/101), és 30/48 (62,5%) bizonyult CAIX-pozitívnak. A férfi betegek (53/101, 52,47%) esetében 49% volt CAIX-pozitív (26/53). Betegeink 86,13%-a (87/101) 60 év feletti volt. 48/101 (47,52%) beteg panaszkodott B-tünetekre, amelyek közül 60,4% (29/48) bizonyult CAIX pozitív esetnek.

A CAIX-expresszió szoros kapcsolatot mutatott a nekrotikus területekkel. Míg a nekrózis nem befolyásolta az általános túlélést, a CAIX expresszió esetében minimális különbség volt a CAIX pozitív és a CAIX negatív esetek között, mivel a progressziómentes túlélés statisztikailag eltérőnek bizonyult. A túlélési elemzést 72 hónapra számoltuk (n=81). A teljes túlélés (Overall survival, OS) 0,823, a progressziómentes túlélés (Progression free survival, PFS) pedig 0,504 volt az elemzett vizsgálati populációban. A Kaplan-Meier-görbék és a Mantel-Cox statisztikai elemzés azt mutatta, hogy a nekrózis - hiánya vagy jelenléte - nem befolyásolta az általános túlélést (0,812 versus 0,833, p=0,469), azonban a két csoport között enyhe különbség volt a PFS-ben (0,19 versus 0,579, p=0,146). Szignifikáns különbséget találtunk azonban a CAIX-expresszióban. Az OS minimálisan különbözött a CAIX negatív és pozitív esetek között (0,934 versus 0,699, p=0,097, nem szignifikáns), de a PFS-ben feltűnő különbség volt a csoportok között. Elemzésünk szerint a CAIX negatív csoportban statisztikailag szignifikánsan hosszabb volt a kumulatív PFS a CAIX pozitív esetekhez képest (0,771 vs. 0,19, p<0,001). A CAIX-pozitivitás esetén a kezelés kezdeti sikertelenségének pozitív prediktív értéke (Positive predictive value, PPV) 0,76-nak bizonyult. A CAIX-negativitás negatív prediktív értéke (Negative predictive value, NPV) 0,66-nak bizonyult (p<0,003). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a CAIX expressziója növelheti a kezdeti kemoterápia utáni sikertelenség/progresszió valószínűségét (76,2%, illetve 65,9%).

4.4 A hypoxia indukálta változások *in vitro* elemzése

4.4.1.1 Sejtvonalak validálása

PAX5 és CD30 immunhisztokémiai festéssel állapítottuk meg a sejtvonalak – L1236, L428 – Hodgkin limfóma eredetét. Mindkét sejtvonal expresszálta a daganatra jellegzetes markereket.

4.4.2 A hypoxia indukált CAIX expresszió

4.4.2.1 A CAIX expressziójának kvantitatív meghatározása

A CAIX mRNS-szintű expressziója hypoxia alatt indukálódott a normoxiához képest, azonban az indukció mértéke eltérő volt a két sejtvonalban. Az L1236 sejtekben közel 10-szeres növekedés volt tapasztalható hypoxia hatására. Az L428 sejtekben hasonló tendencia mutatkozott, de ez nem érte el a statisztikai szignifikancia szintet.

4.4.2.2 A hypoxia indukálja a CAIX expresszióját

A formalinban fixált minták szövettani vizsgálata azt mutatta, hogy a CAIX enzim expressziós mintázata eltérő a két sejtvonalban, ami összhangban volt a qPCR eredményekkel. Az L428 csak minimálisan mutatta az enzim upregulációját, míg az L1236 sejtvonalban a CAIX expressziója erősen indukálhatónak bizonyult hypoxia hatására. A minták szemikvantitatív elemzéséhez digitális képelemzést alkalmaztunk. A tárgylemezeket Panoramic MIDI Scannerrel szkenneltük, és a DensitoQuant algoritmussal elemeztük. Normoxiában a pixelek kis hányada volt pozitív CAIX-re. Ezzel szemben hypoxia esetén a sejtek közel 80%-a festődött pozitívan CAIX-re.

4.4.2.3 A MIB1 aktivitás és a CAIX expresszió vizsgálata

Az L1236 sejtvonal esetében megvizsgáltuk a MIB1 expresszióját is annak érdekében, hogy a proliferációs index és a CAIX expressziója közötti esetleges összefüggést vizsgáljuk, a retrospektív vizsgálatunkhoz hasonlóan. Kettős immunhisztokémiai festést végeztünk a könnyebb értékelés érdekében. Érdekes módon azt találtuk, hogy a MIB1 és a CAIX pozitivitás között fordított kapcsolat állhat fenn, mivel a MIB1 pozitív sejtekből hiányzott, vagy csak minimális CAIX-expressziót mutattak. A proliferációs potenciál elvesztése arra utalhat, hogy a

hypoxiás sejtek nyugalmi állapotban vannak, a sejtciklusuk leállt. Megállapítottuk, hogy a CAIX expressziója időfüggő módon növekedett az L1236-ban, és a CAIX expressziója túlnyomórészt az óriás HRS-sejtekhez kapcsolódott.

4.4.2.4 A CAIX dinamikus expressziójának vizsgálata

Áramlási citometria segítségével állapítottuk meg a CAIX+ és a CAIX- sejtpopulációk eloszlását. Az L1236 sejtvonalban hypoxia hatására megemelkedett a CAIX+ sejtek száma. Eredményeink alapján, normoxiában detektálható volt egy nagy mennyiségű CAIX- sejtpopuláció és egy kisebb sejtcsoportból álló CAIX+. Hypoxiában azonban jelentős mértékben megváltozott a sejtek megoszlása. A sejtek a CAIX+ tartományba mozdultak el, ami arra utal, hogy a sejtek egy fenotípus-váltáson mentek keresztül, annak érdekében, hogy túléljenek a hypoxiás niche-ben.

Az L428 sejtvonalban csak minimális mértékben következett be a CAIX+ tartományba történő elmozdulás.

4.4.2.5 A citotoxikus kezelés hatása az L1236 sejtvonalban

Az acetazolamid (AA) a CAIX inhibitora. Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy az AA-kezelés módosíthatja-e a cHL-sejtek ABVD-kezelésre adott válaszát. Hypoxiás környezetben a propidium-jodid pozitív sejtek aránya nagyon magas volt, lehetetlenné téve a spontán sejthalálon felüli sejthalál kimutatását, ezért normoxiás körülmények között végeztük el a kísérleteket. L1238 sejteket ABVD-vel, acetazolamiddal vagy a kettő kombinációjával kezeltük 24 órán át. Normoxiában az AA nem indukált sejthalált, míg az AVBD-vel kombinálva a propidium-jodid pozitív sejtek arányának növekedését figyeltük meg. A két szer kombinációja növelte az elhalt sejtek számát.

Összességében azt javasoljuk, hogy a CAIX gátlása az enzim aktiválásának megszüntetése érdekében új terápiás megközelítés lehet a kemoterápiás gyógyszerek hatékonyságának és hatásosságának növelésére.

5 Főbb eredmények és következtetések

Röviden összefoglalva, jelen Ph.D munka főbb megállapításai a következők:

- A cHL patognomikus sejtjei -a HRS-sejtek - CAIX-et expresszálnak. A CAIX expressziója szelektív a HRS-sejtekre.
- Az enzim expressziója jellemző volt a perinekrotikus területeken.
- A CAIX expresszió kimutatása és nyomon követése prediktív értékkel bír a cHL progressziójára, és előre jelezheti a kezelésre adott választ, valamint a betegség kimenetelét. Ezek ismeretében érdemes megfontolni a CAIX biomarkerként való használatát ebben a daganattípusban.
- A digitális képelemzésen alapuló vizsgálat képes volt kimutatni a CD30 és CAIX pozitív sejteket. Ezzel a módszerrel számszerűsíteni lehetett a markerek expresszióját. A CAIX-pozitív sejtek a CD30-pozitív sejtek szubfrakcióját alkották.
- Az L1236 sejtvonalban, hypoxia hatására a CAIX expressziójában szignifikáns növekedés volt kimutatható.
- Eredményeink alapján a megnövekedett CAIX expresszió fordított korrelációban áll a MIB1 aktivitással.
- Úgy tűnik, hogy a CAIX expresszió hozzájárulhat a sejtciklus leállításához, ami védő mechanizmust biztosíthat a hypoxia ellen.

6 Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/481/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

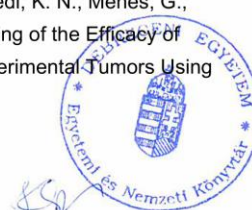
Jelölt: Matolay Orsolya
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Méhes, G., **Matolay, O.**, Beke, L., Czenke, M., Jóna, Á., Miltényi, Z., Illés, Á., Bedekovics, J.:
Hypoxia related carbonic anhydrase IX expression is associated with unfavourable response to first-line therapy in classical Hodgkin's lymphoma.
Histopathology. 74 (5), 699-708, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/his.13808>
IF: 3.626
2. **Matolay, O.**, Beke, L., Gyurkovics, A., Francz, M., Varjasi, G., Rejtő, L., Illés, Á., Bedekovics, J., Méhes, G.: Quantitative Analysis of Carbonic Anhydrase IX Uncovers Hypoxia-Related Functional Differences in Classical Hodgkin Lymphoma Subtypes.
Int. J. Mol. Sci. 20 (14), 1-12, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20143463>
IF: 4.556

További közlemények

3. **Matolay, O.**, Bádón, E. S., Balázs, L., Juhász, P., Csonka, T., Méhes, G.: A szénsavanhidráz IX szerepe a malignus daganatok progressziójában - lehetséges terápiás célpont?
Magyar Onkol. 65, 157-166, 2021.
4. Kis, A., Dénes, N., Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Beke, L., **Matolay, O.**, Enyedi, K. N., Méhes, G., Mező, G., Bai, P., Kertész, I., Trencsényi, G.: In Vivo Molecular Imaging of the Efficacy of Aminopeptidase N (APN/CD13) Receptor Inhibitor Treatment on Experimental Tumors Using ⁶⁸Ga-NODAGA-c(NGR) Peptide.
BioMed Res. Inter. 2021, 1-11, 2021.
IF: 3.411 (2020)





5. Méhes, G., **Matolay, O.**, Beke, L., Czenke, M., Pórszász, R., Mikó, E., Bai, P., Berényi, E., Trencsényi, G.: Carbonic Anhydrase Inhibitor Acetazolamide Enhances CHOP Treatment Response and Stimulates Effector T-Cell Infiltration in A20/BalbC Murine B-Cell Lymphoma. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (14), 1-14, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21145001>
IF: 5.923
6. Kis, A., Péli-Szabó, J., Dénes, N., Vágner, A., Nagy, G., Garai, I., Fekete, A., Szikra, D. P., Hajdu, I., **Matolay, O.**, Méhes, G., Mező, G., Kertész, I., Trencsényi, G.: In vivo Imaging of Hypoxia and Neoangiogenesis in Experimental Syngeneic Hepatocellular Carcinoma Tumor Model Using Positron Emission Tomography. *Biomed Res. Int.* 2020, 1-10, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/4952372>
IF: 3.411
7. Varga, G., Ghanem, S., Szabó, B., Nagy, K., Pál, N., Tánczos, B., Somogyi, V., Baráth, B., Deák, Á., **Matolay, O.**, Bidiga, L., Pető, K., Németh, N.: Which remote ischemic preconditioning protocol is favorable in renal ischemia-reperfusion injury in the rat? *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 76 (3), 439-451, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-200916>
IF: 2.375
8. **Matolay, O.**, Méhes, G.: Sustain, Adapt, and Overcome: hypoxia Associated Changes in the Progression of Lymphatic Neoplasia. *Front Oncol.* 9, 1-7, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2019.01277>
IF: 4.848

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 28,15

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,182**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.10.29.



Támogatások

A kutatás az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-3-II-DE-488 és az ÚNKP-21-4-I-DE-253 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai, valamint az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 VENTURE CATAPULT, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 támogatásával készült.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Méhes Gábornak, a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Patológiai Intézet vezetőjének a doktori tanulmányaim során nyújtott türelmes útmutatásáért, bátorításáért, folyamatos támogatásáért és motivációjáért.

Köszönöm továbbá Prof. Dr. Bay Péternek, hogy lehetővé tette számomra, hogy a kutatócsoportjában dolgozhassak. Hálás vagyok, észrevételeiért, tanácsaiért, támogatásáért. Köszönöm Kapitányné Dr. Mikó Editnek, Péliné Szabó Juditnak az értékes konzultációkat és hasznos tanácsokat. Nagyon hálás vagyok Dr. Kovács Tündének., Újlaki Gyulának, Sárközi Zsanett Mercédesznek, Jankó Laurának a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom Beke Líviának az immunhisztokémiai festésekért.

Őszinte köszönetemet fejezem ki továbbá Prof. Dr. Vereb Györgynek és Rebenku Istvánnak, akik lehetőséget biztosítottak arra, hogy csoportjuk keretén belül dolgozhassak, hozzáférést biztosítottak a laboratóriumhoz és a kutatási eszközökhöz. Támogatásuk nélkül ez a kutatás nem valósulhatott volna meg.

Szeretném megköszönni minden volt tudományos diákomnak/TDK-hallgatómnak, hogy csatlakoztak hozzám ezen a csodálatos úton, és nemcsak tanultak tőlem, hanem tanítottak is: Dr. Vajda Áron, Dr. Tárkányi Nóra, Dr. Kiss Viktória Edina, Viola Szabolcs, valamint Dobi Péter és Fülöp Ádám.

Végül, de nem utolsósorban, szeretném kifejezni hálámat szerető és támogató családomnak és minden kedves barátomnak a doktori tanulmányaim során nyújtott folyamatos bátorításukért, támogatásukért és toleranciájukért.