

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Hisztopatológiai és molekuláris patológiai
prognosztikai faktorok vizsgálata
petefészekrákban**

Dr. Nagy Bence

Témavezető: Prof. Dr. Hernádi Zoltán



DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2019

<< Hisztopatológiai és molekuláris patológiai prognosztikai faktorok vizsgálata petefészekrákban >>

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében

az Egészségtudományok tudományágban

Írta: Dr. Nagy Bence okleveles patológus és citopatológus

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája

(Klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Hernádi Zoltán

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Mikó Irén, PhD

tagok: Dr. Kovács Judit, PhD

Dr. Bacskó György, kandidátus

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK Szülészeti és
Nőgyógyászati Klinika könyvtára 2019. április 3.
11:00.

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora

Prof. Dr. Kahán Zsuzsanna, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Mikó Irén, PhD

tagok: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora

Prof. Dr. Kahán Zsuzsanna, az MTA doktora

Dr. Kovács Judit, PhD

Dr. Bacskó György, kandidátus

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati
Intézet „A” épület tanterme 2019. április 3. 13:00.

A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

Az ovárium carcinoma egyike a nők leggyakoribb daganatos megbetegedéseinek. Évente, világszerte mintegy 239000 új esetet regisztrálnak és mintegy 152000 halálesetet okoz. Előfordulási gyakoriságában jelentős földrajzi különbségek vannak. Leggyakoribb a skandináv államokban, legritkább egyes afrikai és dél-amerikai országokban. Az Amerikai Egyesült Államokban 2014-ben a nők 5. leggyakoribb daganatos haláloka volt, 2017-ben 22440 ovárium karcinómás beteget regisztráltak és 14080 halálesetet okozott. Az ovárium rosszindulatú daganatainak kb. 90%-a epithelialis eredetű. E daganatok alapvetően rossz prognózissal rendelkeznek, az 5 éves túlélés aránya átlagosan 40-50%-os. Ugyanakkor az előrehaladott, petefészen túli terjedést mutató daganatok esetében csak kb. 27%-os 5 éves túléléssel számolhatunk.

Az előrehaladott petefészek daganatok terápiás arzenálja az utóbbi években lényegesen bővült, de jelenleg is a sebészi tumor redukció és a kemoterápia képezik az alapját a terápiás lehetőségeknek. Az első vonalban platina bázisú kemoterápia választandó, ami a leggyakrabban alkalmazott kombinációban taxán származékkal együtt nyújtja a maximális elérhető hatást.

A klasszikus prognosztikai jelentőséggel bíró markerek mint az életkor, „performance score”, szöveti típus, FIGO stádium többnyire jól jellemzik a petefészek carcinoma kórlefolyását, mindemellett kevésbé rendelkeznek prediktív értékkel. Emiatt vitathatatlan igény van olyan új szenzitív molekuláris markerekre, amelyek a klasszikus faktorokkal korrelációban prediktív és/vagy prognosztikus értékkel rendelkeznek. Ezen tumor jellemzők jól hasznosíthatók a beteg követésben és kórjóslat felállításában egyaránt.

A petefészek tumorok jellegzetes terjedési útja peritonealis szóródás, a hasüregi folyadék közvetítésével. Ezzel összhangban az epithelialis petefészek daganatok FIGO szerinti stádium meghatározásának része az ascites citológiai vizsgálata, illetve ascites hiányában a sebészi beavatkozás közben történő, a tumor eltávolítást megelőzően vett hasüregi mosófolyadék vizsgálata daganatsejtek kimutatására.

A primer tumorról levált daganatsejtek túlélőképessége nagy, a hasüregi folyadéktérben passzívan sodródva kitapadnak a peritonealis felszínhez és áttéteket tudnak képezni. A folyamat biológiai alapja a daganatsejtek mikrokörnyezeti változása. A különböző szövetekben az extracelluláris mátrix nemcsak kötő- és támasztó funkcióval rendelkezik,

hanem inter-celluláris jelátviteli folyamatokban szabályozó szerepet is betölt. E folyamatok eredményeképpen a daganatsejtek folyadékter közvetített módon távoli, hasüregi szervek felszínét elérik. A hasüregi szabad terjedés által megvalósul a peritonealis disszemináció, a fali és zsigeri felületeket érintő karcinózis, amely a petefészek daganatos betegek korai elhalálzásának jelentős oki tényezője.

A fentiek fényében kliniko-onko-patológiai szempontból releváns elvárás a prognosztikai faktorok keresése, melyekkel lehetőség nyílik a daganatos folyamat kimenetelének megítélésére korai stádiumú betegek esetében, illetve előrehaladott stádiumú betegek hosszú távú túlélése megjósolható. A különböző onkoterápiás protokollok hatékonyságát eredményesen mutató prediktív faktorok is vizsgálatok fókuszában vannak, melyekkel a kellően individualizált és megfelelő ár/érték/hatás aránnyal rendelkező terápiás beavatkozások biztosíthatók.

CÉLKITŰZÉSEK (megválaszolandó kérdések formájában)

- Van-e olyan molekuláris (*immunhisztokémiailag detektálható*) faktor, ami korrelál a korai progresszióval vs. hosszú távú túléléssel?
- Kimutatható-e immunhisztokémiai expressziós profil változás, amellyel a korai daganatos kiújulás, illetve a hosszú távú túlélés prognosztizálható?
- Kimutatható-e az intercelluláris adhéziós molekulák (E-cadherin és β -catenin), a p53 fehérje expresszió, illetve a sejtproliferáció mértékének változása az ovárium carcinoma peritonealis disszimilációjában?
- Kimutatható-e immunhisztokémiai vizsgálattal a high-grade és low-grade tumorok között különbség szövetekben és folyadék mintákban?
- Alkalmazható-e a citológiai microarray (CMA) technika a tumor progresszió és a metasztázis képződés vizsgálatában?

Anyagok és módszerek

Figyelembe véve a petefészek eredetű daganatok döntően rossz túlélési adatait munkánk célja hosszú távú túlélők és korai progressziót mutató daganatos betegek, továbbá a szolid (szöveti) – primer és metasztatikus – tumorok és a malignus ascites molekuláris-immunhisztokémiai vizsgálata volt.

Betegadatok, beválogatás:

A mintagyűjtés során két klinikai centrum és két városi kórház 16 évnyi anyagának feldolgozása történt (DEKK Pathológiai Intézet, SZTE SZAKK Pathológiai Intézet, Semmelweis Kórház Kiskunhalas, valamint Csongrád megyei Egészségügyi Központ; 1999–2015). Alapvető kritérium szöveteileg verifikált epithelialis petefészek daganat volt, mely klinikailag, illetve patológiai értelemben előrehaladott fázisúnak bizonyult: FIGO Ic, FIGO IIc, FIGO IIIa, FIGO IIIb, FIGO IIIc, FIGO IV. A beválogatás további kritériuma a 12 hónapnál rövidebb progressziómentes (platinamentes) túlélés vagy a több mint 100 hónapos teljes túlélés volt. 437 beteg kórtörténetét áttekintve 44 eset felelt meg a beválogatási kritériumoknak. A nagy esetszám csökkenés hátterében a minták részleges vagy teljes hiánya, hiányos klinikai információ és betegkövetés állt. A betegek átlagéletkora 63 év volt, valamennyi esetben előrehaladott petefészek daganat került diagnosztizálásra, illetve más daganatos betegség lehetősége kizárásra került.

A platina rezisztencia/szenzitivitás/refrakteritás klinikai kritériumai alapján két betegcsoport elkülönítése történt: korai progressziót mutató csoport (EP) és hosszú távú túlélők csoportja (LTS). Valamennyi beteg platina bázisú kemoterápiában részesült túlnyomóan Taxol-Carboplatin kombinációban 2-6 ciklusban, illetve valamelyik további platina származék került alkalmazásra, kombinációs terápia formájában: „Cyclophosphamide + cisplatin (CP), Cyclophosphamide + Doxorubicin + Cisplatin (CAP), Cyclophosphamide + 4-epidoxorubicin + Cisplatin (CEP)”. Azok a betegek, aki első vonalban nem platina alapú kemoterápiás szert kaptak, kizárásra kerültek a vizsgálatból.

Vizsgálatunk másik részében további 27 beteg mintái kerültek kiválasztásra DEKK Pathológiai Intézetének anyagából a 2009-2014 közötti időszakból, akiknél rendelkezésre állt a primer tumor szövetmintája, vagy az ovárium tumor peritonealis áttétének (cseplesz, kismedencei peritoneum, hasi zsigerek) szövetmintája, és az ugyanazon betegből származó, sejtblokk preparátumként feldolgozott daganatos ascites minta egyaránt.

A szöveti tumor és ascites minták: A vizsgált 27 esetből 21 esetben a primer daganat, míg 6 esetben valamely hasüregi áttét (cseplesz, kismedencei peritóneum, hasi zsigerek) műtéti rezekciós szövetszövetmintája állt rendelkezésre. A 27 tumorból 18 high-grade, míg 9 low-grade volt. 6 eset tartozott a műtét idején FIGO IA, IB IC stádiumok valamelyikébe, míg 21 esetben FIGO II-IV stádiumú volt a daganat. Ezeket egy csoportba vontuk, mint peritonealis disszeminációt mutató daganatokat. 22 ascites mintából készült CMA, míg 5 ascites mintából egész metszeteken végeztük az IHC reakciókat.

Szöveti feldolgozás, metodika

Formalin fixált, paraffin beágyazott minták ismételt szöveti verifikációja történt (TL és NB). A releváns és reprezentatív minták paraffinos blokkjaiból „hematoxyllin-eosin” festés alapján kijelölt területekből 1 mm vastag mintahenger, úgynevezett „core” -mint kiemelése történt, (TMA master, 3DHistech Budapest, Hungary) majd recipiens blokkba ágyazás. Az elkészült TMA blokkból 4 mikron vastag metszeteket készítettünk, hematoxyllin-eosin festéshez és az IHC reakciókhoz. Valamennyi tumorszövetből 3-3 mintahenger került beillesztésre, mely alapján 7 recipiens paraffinos blokkba 318 mintahenger beágyazása történt.

A paraffinos multiblokkok kompaktálásához lassú termosztátos melegítésre van szükség, 56 °C-ra emelt anyaghőmérséklettel, majd folyékony paraffin segítségével 70-72° C-on a blokk összeolvasztása megtörténik. A jobb fizikális kontakt elérése érdekében enyhe erővel (kézujjakkal való nyomás) a paraffinos blokk lágy tartalma tovább tömöríthető. A művelet hőmérsékleti szabályozása mellett időbeni szabályozása is szükséges – elhúzódó melegítés és paraffinos összeolvasztás a blokk elfolyósodását okozza, mely a mintahengerek elmozdulásához, töréséhez vezet. Nem kellő ideig tartó hő-, és mechanikai hatás mintahengerek rossz rögzülését eredményezi, mely a metszés során a mintakorongok kihullásához vezet. A megfelelően kivitelezett paraffinos multiblokk a rutin 3-5 mikron vastag rotációs mikrotómos metszési eljárással egyszerűen feldolgozható.

Sejt multiblokk (CMA) összeállítás

Az ascites mintákból sejtblokk preparátum készült. Valamennyi esetben 50 ml „ascitest” fixáltunk további 50 ml 10%-os pufferezett neutrális formalinban 12-24 órán át, 4°C-on. A mintákat óvatosan 10 percig centrifugáltuk 1500/perc fordulaton, majd a felülúszó leöntése után az üledéket 56°C-ra melegített 3%-os agar géllal kevertük, és szobahőmérsékleten hagytuk megdermedni. Az ascites sejtes elemeit tartalmazó agar gélt, szöveti blokk kazettába

téve tovább fixáltuk, 10%-os pufferezett neutrális formalinban, majd standard szövettani víztelenítési és beágyazási procedúra került sorra.

Az ascites mintákból készült sejtblokk preparátumokat tumor sejt tartalmuk alapján két csoportba osztottuk. Amennyiben a citológiai mintában a tumorsejtszám kevesebb volt, mint 6 db/10 nagylátótér (400x nagyítás, 0,5 mm-es látótér átmérő), úgy a mintát „alacsony tumorsejt denzitású” csoportba kategorizáltuk. Ha a minta elérte a küszöbérték nagy látóterenkénti 6 tumor sejtet, abban az esetben „magas tumorsejt denzitású” csoportba kategorizáltuk. Ezen mintákban mintahengerenként 100-nál több tumorsejt volt. A nagy tumorsejt denzitású mintákból (n=22) a reprezentatív területekből kiemelt 3-3 db 2 mm vastag mintahengerekből CMA blokkot építettünk, a 3DHistech TMA Master készüléke segítségével. A kis tumorsejt denzitású mintákat (n=5) nem tartottuk alkalmasnak CMA építésre. Ezen mintákból az immunhisztokémiai vizsgálatokat egész metszeteken végeztük.

Immunhisztokémia (mindkét kísérletben) és immuncitokémiai vizsgálatok

A metszeteket deparaffináltuk, xilol és 96 %-60%-os leszálló alkohol sor (etil-alkohol) segítségével rehidráltuk (csak szövetminták esetében). Endogén peroxidáz blokkolást végeztünk 0,5%-os metanolos hidrogén- peroxid oldattal, 30 percen keresztül, majd desztillált vizes öblítés után a p53, a Ki-67 és az E-cadherin reakciókat Bond™ Max immunhisztokémiai automatában végeztük. Az antigén feltárás a Ki-67, E-cadherin esetében, „Novocastra Bond Epitope Retrieval Solution 2” (Leica, Code: AR9640) feltárával történt, a p53-nál „Novocastra Bond Epitope Retrieval Solution” 1 (Leica, Code: AR9961) feltárával. A detektálásra a készülékek a DS9800 Leica detektáló rendszert használtuk. β -catenin reakció során xilolos deparaffinálást követően rehidráció történt 96 %-os etil-alkohol segítségével (csak szövetminták esetében). Endogén peroxidáz blokkolást végeztünk 0,5%-os metanolos hidrogén- peroxid oldattal 30 percen keresztül, majd desztillált vizes öblítés után antigén feltárás történt. „Novocastra Epitope Retrieval Solutions” pH9 10x (Leica, Code: RE7119) 12 perc, 120-125°C-on. Inkubálás a primer antitesttel, 60 percen történt szobahőmérsékleten, nedves kamrában. Szekunder antitest EnVision™ FLEX K8000 detektáló rendszer reagense (EnVision™/HRP) 30 perc, szobahőmérsékleten, nedves kamrában. Előhívás EnVision™ FLEX DAB+ kromogén reagenssel került elvégzésre (1-5 %-os „3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride”) összekeverve 1 ml EnVision™ FLEX szubsztrát-pufferrel. Magfestés történt „haematoxylinnal”, majd dehidráció és fedés.

A TMA illetve CMA blokkokon készült IHC illetve ICC metszeteket digitalizáltuk, Panoramic Midi tárgylemez „scanner” segítségével. A reakciók értékelését digitális metszeteken végeztük. A kis tumorsejt denzitású immuncitokémiai reakcióit nem digitalizáltuk, közvetlen mikroszkópos értékelés történt.

Immunreakciók értékelése:

Túlélést vizsgáló eseteinkben a β -catenin reakciót külön értékeltük sejtmembrán és nukleáris reakció tekintetében. *(Megjegyezzük, hogy a β -catenin citoplasma fehérje, mely a sejtmembrán intracelluláris oldalán, az extracelluláris E-cadherinnel mutat összefüggést. A sejtmembrán jelölődés valójában egy membrán asszociált citoplasmikus pozitivitás. A rutin patológiai diagnosztikában a jelölődés lokalizációja és jellege miatt sejtmembrán megnevezést használunk.)* E-cadherin esetében a sejtmembránon észlelt 10%-feletti pozitivitás minősült pozitív reakciónak. 10% feletti nukleáris pozitivitást minősítettünk pozitívnak p53 és Ki-67 immunhisztokémiai reakciók esetében.

A szöveti tumorok és ascites tumorsejtek vizsgálata során, az egyes esetekben, a specifikusan festődő tumorsejtek százalékos arányát határoztuk meg, „cut-off” értéket nem határoztunk meg.

Statisztikai analízis:

A betegek LTS és EP csoportokba rendezett szöveti mintáin végzett immunhisztokémiai reakciók eredményeit hasonlítottuk össze, Kaplan–Meier teszt, illetve logisztikus regressziós analízis segítségével. A szöveti tumor mintákon, illetve az ascites mintákon kapott eredményeket összevetve, Wilcoxon és MannWhitney tesztet, valamint Spearman korrelációt végeztünk. Valamennyi statisztikai vizsgálat IBM SPSS 24 statisztikai szoftver segítségével történt.

Eredmények

Hosszútávú túlélők és korai progressziót mutató betegek eredményei

P53 expresszió: „Low-grade” tumorok esetében p53 sejtmag pozitivitást észleltünk az esetek 47,8%-ban, míg „high-grade” tumoroknál ez 66,7%-nak adódott. Optimális tumorredukció esetén 45,4%-ban észleltük pozitív p53 reakciót, míg a szuboptimális esetek 68,1%-ban. A szerózus karcinómák 58%-a mutatott pozitivitást, míg a nem szerózusok 53%-a. A 65 év feletti populáció 65%-ában láttuk a p53 reakciót, míg 65 év alattiaknál a nukleáris expresszió a minták mintegy felében volt megfigyelhető.

Ki-67 expresszió: „Low-grade” tumorok esetében a Ki-67 proliferációs frakció 43%-os volt, míg „high-grade” tumorok tekintetében 66,7%-os. Optimális tumorredukció esetén a minták 40,9%-a mutatott Ki-67 sejtmagi expressziót, míg a szuboptimális tumor redukciós beavatkozások 68,1%-a. A serosus daganatok 54,8%-a, a nem serosus daganatok 53,8%-a volt pozitív. A 65 év feletti csoportjában 43,3%-os volt a Ki-67 sejtmagi expresszió, míg a 65 évnél fiatalabbaknál 45,8%-os.

E-cadherin expresszió: „Low-grade” tumorokban az esetek 73,9%-ban észleltünk membrán pozitivitást, ami a „high-grade” tumorok esetében 80,9% volt. 72,7% mutatott pozitivitást azon tumorok közül, melyek esetében optimális tumorredukció volt és 81,8% ahol inkomplett tumor eltávolítás történt. A serosus tumorok esetében 80,6%-os, a nem serosus tumorok esetében 69,2%-os E-cadherin membránfestődést észleltünk. A 65 év feletti populációban 85,0%-os volt az E-cadherin membrán expresszió, míg a 65 év alattiaknál 70,8%.

β -catenin expresszió, sejtmembránban: „Low-grade” tumorok esetében sejtmembrán asszociált β -catenin expressziót az esetek 78,2%-ban észleltünk, míg a „high-grade” tumorok 71,4%-ában. Azon esetben, ahol optimális tumor redukció történt a β -catenin membrán reakció megfigyelhető volt a minták 77,2%-ban, míg szuboptimális redukciós minták 72,7%-a mutatott pozitivitást. A serosus daganatok membrán pozitivitása 80,6%-os volt, míg a nem szerózusoké 61,5%. A 65 év feletti csoport eseteinek 70%-a mutatott jelölődést, míg a 65 év alattiak 79,1%-a.

β -catenin expresszió, sejtmagban: A nukleáris β -catenin reakció mind a „low-grade”, mind a „high-grade” tumorok esetében jelen volt 13,0% illetve 14,2%-os aránnyal. Optimális tumor redukció mellett 18,2%-ban észleltünk pozitivitást, míg a sejtmagi β -catenin szuboptimális tumor redukció esetében a minták csupán 9,1%-ában volt detektálható. A serosus tumorok

3,2%-a, a nem serosus tumorok 38,4%-a volt pozitív. A 65 éves kor feletti populáció 20,0%-os, β -catenin nukleáris pozitivitást mutatott, míg a 65 év alattiaké 8,3%-t. Sejtmagi β -catenin expresszió valamennyi esetében a sejtmembránhoz asszociálva is észleltük a β -catenin expressziót.

A vizsgált fehérjék expressziója és klasszikus prognosztikus markerek eredményeit egy- és többváltozós analízissel hasonlítottuk a hosszú távú túlélők és a korai progressziót mutató betegek csoportjainak függvényében.

Hosszú távú túlélés: Egyváltozós analízissel a serosus fenotípus potenciális negatív hatással rendelkezik a teljes túlélésre vonatkozólag (68,03 mo. vs. 117,01 mo.; $p = 0,025$), mely mellett az optimális tumor redukciós eljárás potenciális pozitív hatással rendelkezik a szuboptimális sebészi terápiával szemben, mind egy- (57,48 mo. vs. 105,36 mo.; $p = 0,003$), mind többváltozós (0,325; $p = 0,005$) analízissel vizsgálva. Vizsgálati anyagunkban OS tekintetében a kor, tumor grádus illetve stádium nem mutatott szignifikáns eltérést. Nukleáris β -catenin expressziót csupán a hosszú távú túlélők mintáiban láttunk (146,67 mo. vs. 71,84 mo.; $p=0,041$), míg a korai progressziót mutatók mintáiban ez a jelölődés hiányzott (0/27). A két csoport között túlélési idő medián értéke 146,67 (LTS) hónap, illetve 71,84 (EP) hónap volt. Pozitív p53 immunhisztokémiai reakciót mutató esetek szignifikancia szint közeli értéket mutattak teljes túlélést figyelembe véve a p53 negatív esetekhez képest (70,40 mo. vs. 99,80 mo., $p = 0,057$). A teljes túlélést nézve a többi paraméter nem mutatott szignifikáns eltérést (β -catenin membrán expresszió, E-cadherin, Ki-67).

Progresszió mentes túlélés: Az optimális tumor eltávolítás pozitív prediktív értékkel rendelkezik, összehasonlítva a szuboptimális tumor eltávolítással, statisztikai analízissel mind az egyváltozós (14,00 mo vs. 42,93 mo.; $p = 0,001$), mind a többváltozós (0,329; $p = 0,002$) analízissel kimutathatóan. Vizsgáltunk alapján a progressziómentes túlélés függvényében a kor, szöveti típus, a tumor differenciáltsági foka stádiuma statisztikailag nem mutatkozott szignifikánsnak. Emelkedett proliferációs frakció negatív hatással bírt a progressziómentes túlélésre, mely statisztikailag is igazolódott (26 mo. vs. 61,95 mo.; $p = 0,039$).

Eredményösszegzés: Amennyiben a teljes túlélés függvényében vizsgáljuk eredményeinket, a klasszikus prognosztikai markerek közül a serosus fenotípus rendelkezik szignifikáns negatív prediktív értékkel, míg az optimális tumorredukció szignifikáns pozitív prediktív értékű. Az fehérje markerek közül a β -catenin sejtmagi lokalizációja szignifikáns pozitív prediktív értékkel rendelkezik, a hosszú távú túlélést mutató betegcsoportunkban mutatott

pozitivitást. Korai progressziót leginkább Ki-67 proliferációs frakció szignifikáns emelkedése mutatja.

Megjegyezzük, hogy a p53 sejtmagi expresszió, erős negatív tendenciát a hosszú távú túlélési vizsgálatban. Változása statisztikai szignifikancia szintet nem ért el.

Sejt-multiblokk és szöveti multiblokk minták eredményei

P53 expresszió: A szöveti tumorok (primer és áttéti tumorok) esetében a p53 fehérje expressziója átlagosan 45,56%-os volt, az ascites minták esetében a p53 átlagos expresszió 32,76% volt. A „low-grade” tumoroknál a primer tumorok átlagos p53 festődése 24,89% lett, míg a „high-grade” tumorok primer tumorsejtjei átlagosan 58,06%-os pozitivitást mutattak. Az ascitesben mind a „low-grade”, mind a „high-grade” tumorokban változatlan arány volt észlelhető – alacsonyabb p53 expresszió mutatkozott (2,43% vs. 44,56%). Primer és áttéti daganatok jelölődési mintázatát vizsgálva áttéti tumorokban magasabb p53 expressziót észleltünk 66,33% vs. 41,47%. Az ascites tumorsejtjei esetében itt is kimutatható, hogy a p53 expresszió csökkent; primer tumorok 41,47% vs. ascites 28,95%, áttétek: 66,33% vs. 48,00%.

Ki-67 expresszió: A szöveti tumorok (primer és áttéti tumorok) esetében Ki-67 expresszió vizsgálata során átlagosan 19,08%-os festődést kaptunk, míg az ascites esetében a Ki-67 index 25,72%-ban expresszáldott, átlagosan. A „low-grade” tumoroknál a primer tumorok átlagos Ki-67 reakciója 6,22%-os lett, a „high-grade” tumorok primer tumorsejtjei átlagosan 25,11%-os Ki-67 pozitivitást mutattak. Az ascitesben mind a „low-grade”, mind a „high-grade” tumorokban változatlan arány volt észlelhető – magasabb Ki-67 expresszió mutatkozott (6.86% vs. 33.06%). A tumorszövetek között a primer daganatok proliferációs aktivitása kissé magasabb volt az áttétkehez képest, (16,00% vs. 19,61%). Az ascites tumorsejtjeinek Ki-67 expressziója mind primer, mind metasztatikus tumor mellett magasabbnak mutatkozott (25,65% és 26,00%).

E-cadherin expresszió: A szolid tumorok (primer és áttéti tumorok) E-cadherin expressziója átlagosan 31,40% lett, az ascitesben 39,52%-ot mértünk. A „low-grade tumoroknál a primer tumorok átlagos E-cadherin jelölődése 33,75%-os lett, a high-grade tumoros esetekben ez az érték 30,44% volt. Az ascitesben mind a „low-grade”, mind a „high-grade” tumorokban változatlan arányt észleltünk (40,22% és 37,59%) a „low-grade” tumorok javára. Primer és áttéti daganatok jelölődési mintázatát vizsgálva E-cadherin expresszió némileg alacsonyabb volt áttétekben, (32,14% vs. 28,60%), mindemellett az ascites mintákban az E-cadherin expresszió enyhén fokozódott (42,10% vs. 26,50%).

β -catenin expresszió: A szolid tumorok (primer és áttéti tumorok) β -catenin membrán expresszió átlaga 82,19 % volt. Az ascites átlagos β -catenin membrán expressziója 58,77% lett. Magfestődést egy esetben sem láttunk. A „low-grade” szöveti tumorok 78,67%-os a „high-grade” tumorok 81,89%-os pozitivitást mutattak. Az ascitesben mind a „low-grade”,

mind a „high-grade” tumorokban változatlan arány volt észlelhető - csökkent β -catenin expresszió mutatkozott (54,38% vs. 60,72%). Primer és áttéti daganatok jelölődési mintázatát vizsgálva β -catenin expresszió mérsékelten csökkent 82,00% vs. 76,67%. Ez a tendencia ascites esetében nem volt megfigyelhető. Az ascites mintákban a β -catenin csökkent reakciót mutatott, 55,09% és 73,80%.

Az ascites és szöveti tumorok közötti p53 jelölődési különbség szignifikánsnak bizonyult (45,56% vs. 32,76%, **p=0,001**). A proliferációs aktivitás az ascites tumorsejtek esetén magasabb volt ugyan, mint a primer tumorokban, de a különbség nem bizonyult szignifikánsnak (25,72% vs. 19,08%, p=0.101). Az ascites tumorsejtek fokozott E-cadherin expressziót mutattak, de a különbség nem bizonyult szignifikánsnak (39,52% vs. 31,40%, p=0,294). A β -catenin expressziója sejtmembránon az ascites tumorsejtekben kisebb mértékű volt, mint a primer tumorokban, és ez szignifikánsnak bizonyult (82,19 v 58,77% **p=0,006**).

Az egyes reakcióknál a betegcsoporton belül minta-páronként is megnéztük külön, hány esetben emelkedett, illetve csökkent az expresszió az ascitesben a primer tumorhoz képest. A p53 vizsgálatokor 3 esetben emelkedett, 20 esetben csökkent, 4 alkalommal pedig nem változott. 2 mintánál nem volt lehetséges az összehasonlítás, mert kivitelezési hiba miatt az ascites minta hiányzott. A Ki-67 reakció során 16 minta expressziója emelkedett, 8 mintáé csökkent és 3 esetben nem volt változás. Szintén két esetben nem volt lehetséges a vizsgálat.

Az eseteket stádium, grade, illetve a szöveti tumor primer vagy áttéti jellege alapján csoportosítva, további összefüggések voltak megállapíthatók. Előrehaladottabb tumor stádiumban az E-cadherin expresszió alacsonyabb, mint a korai stádiumokban, de az összefüggés nem bizonyult szignifikánsnak, míg a β -catenin esetében nincs érdemi különbség. Az áttéti tumorokban közel hasonló az E-cadherin és β -catenin expresszió, mint az előrehaladott stádiumú primer tumorok esetén. Az előrehaladottabb tumorok esetében mérsékelten magasabb p53 és Ki-67 értéket tapasztaltunk, de ez részben a kis mintaszámnak és az ezen betegcsoportban domináló magasabb grádusnak is betudható.

A folyadékcitológiai minták és szöveti tumor (primer tumor, áttét) minták immunhisztokémia reakciók százalékos megoszlási eredményét az alábbi táblázatok mutatják.

Szöveti tumor és ascites minták vizsgálata: A p53 expresszió és a Ki-67 index mind a szöveti tumorok, mind az ascites esetén korrelált a tumor grádusával. A high-grade tumorok sejtei fokozott p53 expressziót és magasabb proliferációs indexet mutattak mind a primer tumoroknál, mind az ascites mintákban. High-grade tumorokban némileg alacsonyabb E-cadherin expressziót, és némileg magasabb β -catenin expressziót láttunk, azonban az eltérés nem szignifikáns. Mind low-grade, mind high-grade esetekben az ascitesekben nőtt az E-cadherin expresszió és csökkent a β -catenin membrán expresszió a primer tumorhoz képest.

Az ascites tumorsejtjeiben az E-cadherin expresszió fokozódik, ami az ovárium tumorokra jellemző. Ugyanakkor a β -catenin membrán expresszióban markáns csökkenés figyelhető meg. Az áttéti tumorok sejtei és a mellette lévő ascites által hordozott tumorsejtek ugyanakkor hasonló adhézions molekula expressziós profilt mutattak. Az ascitesben lévő tumorsejtek szignifikánsan alacsonyabb p53 expresszióval jellemezhetők, ugyanakkor emelkedett a proliferációs aktivitásuk.

Eredmény összegzés:

Vizsgálati mintáinkban a petefészek daganatok döntő többsége előrehaladott, FIGO IIIC stádiumban került felismerésre – 50,7% -, illetve jelentős a serosus típus túlsúlya (77,4%). A már hasüregi propagációt mutató daganatok között közel azonos a high-grade és a low-grade tumorok aránya, a hasüregi, ascitesben észlelt daganatos terjedés már fennáll. A klasszikus prognosztikai markerek közül a serosus fenotípus rendelkezik szignifikáns negatív prediktív értékkel, míg az optimális tumorredukció pozitív prediktív értékű. Az immunhisztokémiai markerek közül a β -catenin nukleáris expresszió szignifikáns pozitív prediktív értékkel rendelkezik, mely a hosszú távú túléléssel korrelál, az önálló β -catenin membrán jelölődés nem rendelkezik prognosztikus/prediktív értékkel az általunk vizsgált esetekben. A korai progressziót leginkább az aktív sejtproliferáció jelzi (Ki-67 pozitivitás). A p53 nukleáris expressziót közel szignifikánsnak találtuk mint negatív prediktív értékű változót.

P53 expresszió mind a szöveti tumorok, mind az ascites esetén emelkedik a tumor grádusával. Ez a jelenség a Ki-67 proliferációs index esetében is kimutatható volt. Az E-cadherin expresszió mérsékelten alacsonyabb, a β -catenin enyhén magasabb a high-grade tumorokban, összehasonlítva a low-grade tumorok mintáival. Az E-cadherin expresszió fokozott, a β -catenin membrán reakció csökkent a malignus ascitesben a primer tumorokhoz képest.

Új megállapítások

- ✓ Nukleáris β -catenin expresszió a hosszú távú túlélés pozitív prediktív markere.
- ✓ A Ki-67 proliferációs index a korai progresszió negatív prediktív markere.
- ✓ Az E-cadherin rövid és hosszú távú túlélésre gyakorolt hatását kimutatni nem tudtuk, az ascites általi tumor terjedésben döntő szerepet játszik. Folyadéktérben expressziója fokozódik.
- ✓ A β -catenin fehérje expresszió sejtmembrán csökkenése kimutatható a malignus ascites sejteiben, főleg korai stádiumú daganatokban.
- ✓ High-grade petefészek daganatokra jellemző a p53 fehérje expressziója, mind szöveti tumorban, mind malignus ascitesben.
- ✓ Az ascites tumorsejtjei fokozottabb proliferációs aktivitást mutatnak (Ki-67 index).
- ✓ A TMA metodika mellett a CMA metodika kiválóan alkalmas malignus folyadék minták vizsgálatára.

Köszönetnyilvánítás

Köszönem témavezetőmnek, Prof. Dr. Hernádi Zoltánnak, az MTA doktorának, a PhD értekezés elkészítéséhez nyújtott segítségét, a kutatáshoz szükséges feltételek biztosítását, a szakmai irányítást, a folyamatos szakmai felügyeletet, a közlemények elkészítésében való részvételt, illetve a kezdeti bizalmat, mely a fizikális távolság ellenére is folyamatosan fennállt.

Köszönöm Prof. Dr. Méhes Gábornak az anyagi és szellemi támogatását, továbbá a kísérletes munka háttérének biztosítását.

Köszönöm Dr. Tóth László adjunktus úrnak elvitathatatlan szakmai közreműködését, támogatását, iránymutatását. Köszönöm továbbá, hogy a patológia hivatását megszerettette velem, és pályám során támogatta a tudományos útkeresésemet.

Köszönöm Dr. Molnár Péter professzor úrnak a közlemények elkészítésében nyújtott segítségét, meglátásait, erkölcsi útmutatásait.

Köszönöm Dr. Póka Róbert professzor úrnak a közlemények elkészítésében nyújtott segítségét, támogatását.

Köszönöm Dr. Thurzó László (†) professzor úrnak a Szegedi Nőgyógyászati Onkológiai Tanszék korábbi vezetőjének az anyaggyűjtésben nyújtott segítségét.

Köszönöm Prof. Dr. Iványi Bélának a SZTE ÁOK Pathológiai Intézet és Tanszék korábbi vezetőjének a tudományos munka folytatásához nyújtott segítségét, a kísérletes munka anyagi háttérében való jelentős hozzájárulását, szakmai fejlődésem biztosítását.

Köszönöm Dr. Hortobágyi Tibornak, hogy lehetővé tette munkám folytatását és befejezését.

Köszönöm. Dr. Pálka István és Dr. Zombori János főorvos úrnak, hogy a szövetszövetmintákat rendelkezésemre bocsájtották, segítették a kísérletes munka elvégzését.

Köszönöm László Eszter diplomás analitikusnak a metodikai feladatokban nyújtott kiváló szakmai segítségét.

Köszönet illeti a debreceni és szegedi intézetek asszisztenseit, akik nélkül a számtalan szövettani metszet, sejtblokk minta és reakció nem készülhetett volna el.

Köszönettel tartozom Hodosi Katalinnak, a munkában lévő statisztikai számításokért.

Köszönöm kollegáimnak, hogy a PhD kurzusokon való részvételem alatt, illetve a dolgozat elkészítése során helyettesítettek, diagnosztikus és oktatási feladataim ellátásában kisegítettek.

Köszönöm családomnak, elsősorban feleségemnek, hogy támogatott a munka elkészítése során, és türelemmel viselte távolléteimet a kísérletes munka, kongresszusok, illetve közlemények elkészítése alatt.



**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/373/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nagy Bence
Neptun kód: AJW2IH
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Tóth, L., **Nagy, B.**, Méhes, G., László, E., Molnár, P. P., Póka, R., Hernádi, Z.: Cell adhesion molecule profiles, proliferation activity and p53 expression in advanced epithelial ovarian cancer induced malignant ascites-Correlation of tissue microarray and cytology microarray. *Pathol. Res. Pract.* 214 (7), 978-985, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2018.05.014>
IF: 1.466 (2017)
2. **Nagy, B.**, Tóth, L., Molnár, P. P., Méhes, G., Thurzó, L., Póka, R., Hernádi, Z.: Nuclear-catenin positivity as a predictive marker of long-term survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Pathol. Res. Pract.* 213, 915-921, 2017.
IF: 1.466





További közlemények

3. Dajnoki, Z., Béke, G., Mócsai, G., Kapitány, A., Gáspár, K., Hajdu, K., Emri, G., **Nagy, B.**, Kovács, I., Beke, L., Dezső, B., Szegedi, A.: Immune-mediated Skin Inflammation is Similar in Severe Atopic Dermatitis Patients With or Without Filaggrin Mutation.
Acta Derm.-Venereol. 96 (5), 645-650, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2340/00015555-2272>
IF: 3.653

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 6,585

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
2,932**

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

Debrecen, 2018.12.17.

