

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

IMMUNOLÓGIAI , CITO-ÉS MOLEKULÁRIS GENETIKAI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI
ÉS AZOK JELENTŐSÉGE AZ EPITELIÁLIS PAJZSMIRIGYDAGANATOK
PATOGENÉZISÉBEN ÉS KÓRLEFOLYÁSÁBAN

DR JUHÁSZ FERENC

TÉMAVEZETŐ:

PROF. DR. LUKÁCS GÉZA

EGYETEMI TANÁR

DEBRECENI EGYETEM ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM

ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

I SZ. SEBÉSZETI KLINIKA

DEBRECEN, 2006

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A pajzsmirigy daganatok etiopatogenetikai kutatása, annak különleges biológiai tulajdonságai miatt rendkívül szerteágazó. A sokszínű, az egész világon folyó újabb tudományos vizsgálatokkal párhuzamosan, több mint húsz éve indítottuk el azokat a kutatásokat, amelyek eredményeit a mellékelt publikációkban összefoglaltuk.

A legutóbbi időszakban közölt eredmények azt mutatják, hogy az a korábban általánosan elfogadott nézet, mely szerint az epiteliális pajzsmirigydaganatok prognózisa nagyon kedvező, már nem tartható fenn. Az ismert prediszponáló faktorok: női nem, korábbi nyaki irradiáció, pajzsmirigy hiperplázia mellett a metasztatizáló pajzsmirigyrák korai felismerését segítő új prognosztikai faktorok felfedezése ezért különösen kívánatos.

A pajzsmirigy karcinóma molekuláris alapjaival foglalkozó ismeretek gyorsan és folyamatosan növekednek. Az immunszisztéma válaszkészségének megértése azonban még várat magára. Az immunválasz és a pajzsmirigy karcinóma összefüggésének szempontjából értékes, de egyben egymásnak ellentmondó eredmények születtek számos szerző tollából. Tekintve, hogy a pajzsmirigy karcinóma jelenleg nőkben a leggyorsabban növekvő rosszindulatú daganatféle - ritka előfordulása ellenére - fokozott figyelemben részesül.

A karcinogenezis egy komplex genetikai folyamat, amely nemcsak a malignus sejtek karakterisztikus változásait foglalja magába, hanem az extracelluláris környezeti hatásokat is. A szervezet válasza viszont befolyásolja a túlélést, a malignus sejtek növekedését és szétterjedését. Az immunválasz résztvesz ebben a folyamatban, melyet állandóan érzékel. Az immunszisztéma válaszkészségének jobb megértése ma úgy tűnik, megalapozhatja a pajzsmirigyrák vaccinációval történő kezelését, elsősorban az alacsonyan differenciált és anaplasztikus szövettani változatokban.

Az eredmények és vélemények igen különbözőek az irodalomban. E sok kérdőjelet tartalmazó probléma határozta meg célkitűzéseinket.

Vizsgálni kívántuk:

- 1.) a pajzsmirigy karcinómában szenvedő betegek HLA antigénjeit azzal a céllal, hogy találunk-e olyan allélt, amely a betegekben szignifikánsan gyakran fordul elő, jelezve valamilyen összefüggést a betegség manifesztációjával, a rosszindulatúság fokával, a metasztázis kiterjedésével, lokalizációjával, vagy az immunszisztéma válaszkészségével.
- 2.) Ugyanilyen szempontokból tanulmányoztuk az IgG nehéz lánc allotípusait (Gm).
- 3.) Megfelelő matematikai analízisek segítségével kívántuk eredményeinket elemezni.
- 4.) HLA tipizálást, bazális/stimulált kalcitonin meghatározásokat, valamint családvizsgálatot végeztünk medulláris karcinómás betegekben és családtagjaikban azzal a céllal, hogy összefüggést keressünk az immungenetikai determináció és a betegség kialakulása és lefolyása között.
- 5.) Kimutatható-e citogenetikai módszerekkel olyan kromoszóma-eltérés, ami általában jellemző a benignus és malignus pajzsmirigy daganatokra?
- 6.) Különböznek-e szövettanilag eltérő pajzsmirigydaganat típusok citogenetikailag?
- 7.) Van-e összefüggés a kromoszóma-eltérések és a betegség progressziója között?
- 8.) Jó-és rosszindulatú humán daganatokban egyaránt megtalálható Ha, N, K *ras* oncogen mutáció a jól differenciált malignus (PTC, FTC, FPTC) és a benignus folliculáris pajzsmirigy tumorokban milyen gyakorisággal fordul elő?
- 9.) Milyen szerepe lehet a *ras* onkogéneknek a pajzsmirigy neopláziák kialakulásában, fenntartásában és progressziójában?
- 10.) Van-e különbség a földrajzilag távoleső /*Kelet-Magyarország, Newfoundland/Kanada*/ területeken élők benignus és malignus pajzsmirigy daganataiban észlelt *ras* onkogén mutáció gyakoriságában, illetve, hogy milyen környezeti hatások befolyásolhatják a pajzsmirigy neopláziák létrejöttét.

A DE OEC I sz. Sebészeti Klinika endokrin sebészeti munkacsoportja évtizedek óta nagy számban végez pajzsmirigyműtéteket és e tevékenysége generációk óta elismert mind a sebészek mind a belgyógyászok körében. Ezt az ismertséget nagytekintélyű vezető sebészek Szeleczy, Balázs, Lukács professzorok és munkatársaik hosszú évek fáradságos munkájával érték el. A pajzsmirigy műtétek száma Magyarországon 1990 és 2001 között 4000-6000 volt, amelyeknek 4, 2 %-a mutatott malignitást. Ugyanezen időszakban az I sz. Sebészeti Klinikán 238-510/év műtéti számban a malignus tumorok előfordulása átlagosan 8, 2 % volt. A rosszindulatú pajzsmirigy tumorok csaknem kétszer gyakoribb előfordulása vélhetően a más intézetekből további kezelésre ide irányított betegek nagy számával magyarázható. Ez a helyzet a tradicionális háttérrel együtt, kivételesen nagyszámú, rosszindulatú pajzsmirigy betegségben végzett kutatás alapjául szolgált, valamint lehetőséget kínált a betegség patogenetikájának és kórlefolyásának tanulmányozására.

BETEGEK ÉS MÓDSZER

HLA antigén tipizálás szerológiai módszerrel.

52 pajzsmirigy karcinómában szenvedő beteget 58 HLA A,B,C és DR antigénre tipizáltuk. A betegek fenotípus megoszlását 380 egészséges kontrollal hasonlítottuk össze, akik HLA A,B,C antigénekre, illetve közülük 160-an DR allélekre is tipizálva voltak. A HLA antigének kimutatására a nemzetközi standard limfocita citotoxicitási mikromódszert alkalmaztuk (Terasaki, McLelland 1964).

IgG nehéz-lánc (Gm) tipizálás hemagglutinációs inhibíciós módszerrel

Az előző a betegcsoportból 50 egyént IgG nehéz-lánc Gm allotípusokra is tipizáltunk. A szérumok Gm azonosítására a hemagglutinációs inhibíciós tesztet

használtuk (van Loghem 1973). Alkalmazott reagenseinkkel 13 fenotípust tudtunk kimutatni. Eredményeinket 228 egészséges egyén adataival hasonlítottuk össze.

HLA DR antigén tipizálás DNS szinten.

Munkánkat folytatva 2002-től lehetőségünk nyílt a HLA DR allélek DNS alapú tipizálására (OLERUP-SSP). Ez egyben a korábbi szerológiai specifikációk részletesebb felbontását is megengedte. Ebbe a vizsgálati sorozatba 75 eddig HLA-ra nem tipizált 1990 után operált pajzsmirigy karcinómás beteg tartozott, 65 férfi és 10 nő. Az átlagéletkor a diagnózis felállításának időpontjában 40-53 év volt. A követési idő 1-30 az átlag 8,6 év volt. Húszt beteg tumor mérete nem haladta meg az egy cm-t. A limfocitás infiltráció mértékét figyelembe véve enyhe, átlagos, súlyos csoportba soroltuk a betegeket. A DR antigének előfordulási gyakoriságát 170 egészséges véradó adataival hasonlítottuk össze. A tipizálások a BIOTEST HLA SSP Kit használatával történtek. DNS szeparáláshoz és tisztításhoz „Generation Capture Column kit”-et használtunk (Gentra System Inc).

A HLA tipizálás eredményeinek értékelésekor használt matematikai módszerek

Szignifikancia teszt.

Egy bizonyos HLA antigén gyakoribb előfordulása a vizsgált betegek között nem feltétlenül jelent általános és lényeges összefüggést a betegséggel. Ezt a kérdést csak a chi-négyzet próba Woolf (1955) módszerének segítségével lehet eldönteni, melynek első lépése a 2X2 kontingencia táblázat használata. Az illető antigénnel rendelkezők a-val, a nem rendelkezőt b-vel, az antigénnel rendelkező kontrollokat c-vel, a nem rendelkezőket d-vel jelöljük.

$$\chi^2 = \frac{(ad - bc)^2 n}{(a + c)(b + d)(a + b)(c + d)}$$

Relativ rizikó (RR)

Relativ rizikó (RR) az a szám, amely megmutatja, hogy hányszor gyakrabban fordul elő a betegség az illető antigént hordozók körében, mint ezen antigénnel nem rendelkezőkben. Az előbbi képlet jelölését véve alapul

$$RR = \frac{ad}{bc}$$

Diszkriminációs funkció analízis (Mclachlan 2004, 2005) az SPSS PC szoftver segítségével végeztünk. A számítógépes analízishez az alábbi változókat adtuk meg: életkor, tumor szövettani klasszifikációja, HLA-DR típus, limfocitás infiltráció mértéke, regionális és távoli áttétek, valamint a tumor méret.

Bazális és stimulált kalcitonin (CT) meghatározás. Családvizsgálatok.

Az I sz. Sebészeti Klinikán 1950-1990 között operált 30 medulláris (MTC) pajzsmirigy rák közül 12 betegben tudtuk egyidőben elvégezni a HLA és a bazális valamint a stimulált szérum kalcitonin vizsgálatokat. Közülük 5 beteg családjában familiáris halmozódást találtunk. A bazális és stimulált szérum kalcitonin vizsgálatokat és a HLA tipizálást nemcsak a betegekben, hanem a familiáris típusú medulláris karcinómás betegek egészséges (klinikai tüneteket nem mutató) családtagjaiban is elvégeztük.

A basális és stimulált calcitonin meghatározásokat RIA módszerrel végeztük. Az értekezésben részletezett stimulált kalcitonin meghatározások pentagastrin Peptavlon ICI Pharmaceuticals, Macclesfield Cheshire felhasználásával történtek 0,5 ug/kg/5mp dózisban (Wells és mtsai 1975). A pentagastrin beadását 60-90 mp alatt végeztük i.v., esetenként infúziós pumpa segítségével.

A családvizsgálatok során megrajzoltuk a családfát, minden elérhető családtagot HLA tipizáltunk, valamint elvégeztük a bazális és indokolt esetben a stimulált kalcitonin meghatározást.

Citogenetikai vizsgálatok papilláris karcinómában és follikuláris adenómában.

Hat beteg műtéttel eltávolított pajzsmirigy daganatának citogenetikai vizsgálata során négy esetben, három papilláris karcinómában, és egy follikuláris adenómában kaptunk értékelhető metafázisokat.

Minden esetben a primer tumort vizsgáltuk. A tenyészethez colchicint adtunk, majd a feldolgozást a hagyományos módszerrel végeztük. Két sávozási eljárást alkalmaztunk: G-sávozást és Q-sávozást. A kariotipizálás a papírképek kivágásával történt.

Molekuláris genetikai vizsgálatok benignus és malignus pajzsmirigy neopláziában.

Véletlenszerűen választottunk ki pajzsmirigy karcinómában és follikuláris adenómában szenvedő betegek paraffinba ágyazott szövettani blokkjait a kanadai St-John's (New Foundland) Egészségtudományi Központjának és a DE OEC, akkor Debreceni Orvostudományi Egyetem Patológiai Intézetének archívumából. Kanadának ezen a vidékén a napi jód (J) felvétel több mint elégséges 190-550 µg/nap, míg Magyarország Dunától keletre fekvő területein a jód felvétel 46-70 µg/nap. A Debrecenből származó metszeteket a St-John's-ban dolgozó patológusok revideálták, hogy ki lehessen zárni az eltérő diagnosztikai kritériumokból adódó tévedést. A paraffinba ágyazott blokkokból 5 mm vastagságú metszetek készültek, amelyeket PCR céljaira Shibata és mtsai. (1991) leírása szerint preparáltunk. Szintetikus oligonukleotidok felhasználásával hibridizációt végeztünk és PCR technikát, valamint Southern Blot módszert alkalmaztunk.

EREDMÉNYEK

A különböző szöveti típusú pajzsmirigy tumorokban számos szerző vizsgálta a HLA antigének megoszlását. Az eredmények megegyeznek abban, hogy az I.osztály (HLA A,B,C lokusz) antigénjeinek előfordulása nem különbözik a normál kontrolltól. Különböző paramétereket figyelembe véve eltérést tapasztaltak ugyanakkor az egyes DR antigének szerepét illetően.

HLA DR antigén megoszlása pajzsmirigy karcinómában szenvedő betegekben

Első saját vizsgálatunkban szerológiai módszert használva 52 hámeredetű pajzsmirigy rákban szenvedő beteget tipizálva megállapítottuk, hogy a HLA DR1 antigén szignifikánsan gyakran (53,8 % vs. 19,4 %) fordult elő $\chi^2 = 21.26$, RR = 4.85 . 12 metasztázissal rendelkező betegből tíz DR1 pozitív volt.

HLA-DR antigének és a Gm fenotípus megoszlása epiteliális pajzsmirigy tumorokban

HLA antigének mellett a betegek Gm allotípusainak vizsgálatától azt reméltük, hogy a pajzsmirigy karcinómára való hajlam kockázatának megbecsüléséhez közelebb jutunk. A vizsgálatokba 50 differenciált pajzsmirigy tumoros beteget és 168 egészséges véradóból álló kontrollt vontunk be. A Gm allotípusok előfordulása ugyanezekben a HLA tipizált betegekben nem mutatott eltérést a kontrolltól. A betegek és a kontrollok mindegyike tipizált volt az MHC I. és II. osztályának antigénjeire. Egyedül az fb fenotípus mutatott emelkedett értéket ($\chi^2 = 4,50$, $p < 0,05$) a kontrollhoz képest. A follikuláris (11/16), papilláris (8/16), follikulo-papilláris (10/18) tumorban szenvedők a megjelölt arányban fb homozigóták voltak.

Nem találtunk azonban összefüggést a különböző Gm genotípusok és a pajzsmirigy karcinóma szövettani típusai között. A továbbiakban a Gm és HLA fenotípusok lehetséges interakcióját vizsgáltuk. Csoportosítottuk a betegeket és a kontrollokat DR1 pozitivitás és Gm fb homozigótaság szerint. Ebben a csoportosításban jól megfigyelhető, hogy HLA DR1+ fb+ betegek relatív kockázata a kontrollhoz és az összes többi csoporthoz képest extrém mértékben megemelkedett. A HLA DR1+ fb+ relatív kockázata például a DR1- fb- -al szemben 37,48.

HLA DR allélek DNS alapú tipizálása

Munkánkat folytatva később lehetőségünk nyílt a HLA DR allélek DNS alapú tipizálására (OLERUP-SSP). Ez egyben a korábbi szerológiai specifitások részletesebb felbontását is megengedte. 75 eddig nem vizsgált, de a korábbival megegyező hisztológiai típusú daganatos beteget tipizálva a HLA DR11 (RR=2.14, $\chi^2=13.12$, $p<0.000$) antigén szignifikánsan gyakori előfordulását mutattuk ki a 170 egészséges kontrollhoz képest. Ez jellemző volt mind a follikuláris, mind a papilláris karcinómára. Ugyanakkor a betegség prognosztikai faktoraival - mint a tumor mérete, a limfocitás infiltráció mértéke, a regionális nyirokcsomó és a távoli metasztázis előfordulása - nem találtunk DR11 asszociációt.

A betegség manifesztációja és a DR1 előfordulása között korábban talált asszociáció miatt azonos módon hasonlítottuk össze az ezen csoportban bemutatott betegek adatait és úgy találtuk, hogy ebben a szériában nincs összefüggés a betegség lefolyása és a DR11 antigén előfordulása között. Hét papilláris karcinómás betegnek jelentős cervikális limfadenopatiája volt, azonban ezek a nyirokcsomók nem bizonyultak patológiásnak, ultrahang vizsgálattal, illetve pozitron emissziós tomográfiával, még - ami a legfontosabb - szövettanilag sem. Mind a hét beteg DR1 pozitív volt.

Hagyományosan az egy cm-es tumor átmérőt használják a mikrotumorok és a klinikailag releváns karcinómák elválasztására. A mikrotumorok ugyanis biológiailag különböznek a nagyobb daganatoktól, amit több szerző is bizonyított. Így megvizsgáltuk a különböző paraméterek hatását a mikrotumor, klinikailag releváns karcinóma átmenetre. A diszkriminációs faktor analízis során csak két tényező függött szignifikánsan össze a tumor méretének alakulásával: a távoli metasztázis jelenléte pozitív módon (minimum $F=6.647$, funkciós $\text{coefficiens}=0.841$, $P=0.0119$) és a limfocitás infiltráció mértéke fordított arányban ($F=-0.565$, $P=0.0109$). Az utóbbi eredmény azt sugallja, hogy a klinikailag észlelhető tumor kialakulása kapcsolatban van az immunrendszer károsodásával, ami a limfocitás infiltráción keresztül jut érvényre. A többi változó, mint például a DR fenotípus, a nem, az életkor, a szövettani típus nem bizonyult meghatározónak.

Irodalmi adatok szerint ismert, hogy összefüggés mutatható ki a pajzsmirigy karcinóma előfordulása és bizonyos onkogén mutációk (RET, MET) között, mely

utóbbiak fokozzák a HLA II.osztály antigénjeinek expresszióját és így áttételesen a tumor limfocitás infiltrációját is.

A két vizsgálati széria közötti DR antigén eltérés, valamint az irodalomban is tapasztalt ilyen irányú ellentmondások valószínűleg a betegség kialakulására hajlamosító változó környezeti, kockázati tényezők különbözőségében rejlik. Gondolhatunk itt arra a tényre is, hogy a csernobili katasztrófa az első tanulmányunk megjelenése után történt, amelynek hatását a pajzsmirigyrák kialakulására nem lehet vitatni.

Családvizsgálatok medulláris pajzsmirigyrákban

Az irodalmi áttekintés fejezetben részletesen foglalkoztunk a medulláris pajzsmirigykarcinóma különleges helyzetével a pajzsmirigyrák között. Itt a családvizsgálatok számára elérhető betegek és hozzátartozóinak HLA típusát és a bazális valamint a provokált szérum calcitonin értékek összefüggéseit értékeltük. 1950 és 1990 között operált 30 medulláris pajzsmirigyrák közül 12 betegben genetikai vizsgálatokat (HLA) és szérum calcitonin meghatározást volt alkalmunk elvégezni.

12 beteg statisztikai analízise igen nehéz, mert a kis számok miatt fennáll a tévedés lehetősége. Ennek ellenére nem tartjuk véletlennek azt, hogy 12 betegből 9 DR7 pozitív volt. A DR7 antigén előfordulása Magyarországon 23 %. A kilenc DR7 pozitív betegből öt esetben bizonyított, vagy feltételezhető volt a családi előfordulás.

Nem volt módunk több MTC-s beteget tipizálni a korai halálozások miatt, de a DR7 antigen jelenlétének meghatározó fontosságát és a betegségre utaló markerként való alkalmazását családvizsgálatokkal igyekeztünk megerősíteni.

14 családtag pentagasztrin terheléses calcitonin (s-CT) meghatározását végeztük el. Ezek közül 7 olyan családtag pentagasztrin terheléses szérum CT szint (s-CT) meghatározását végeztük el, akiknek bazális CT értéke kórosan emelkedett volt. A stimulált CT (s-CT) szint a bazális értékhez képest mind a 7 családtagban megemelkedett, noha igen magas 1300 pq/ml CT értéket csak két családtag esetében mutattunk ki, akiknél a medulláris pajzsmirigy karcinóma diagnózisát felállítottuk. Mindkét beteg CT szérum szintje totál tiroidektómia után normalizálódott. A részletes szövettani vizsgálat C sejtes hiperpláziát bizonyított mely

olyan preblasztomatózisnak tekintendő, amelyet klinikailag karcinómaként szükséges megítélni és kezelni.

Citogenetikai vizsgálatok

Follikuláris adenomában kariotípus eltérést nem észleltünk. A három sikeresen vizsgált papilláris karcinóma közül kettőben klonális számbeli és szerkezeti eltéréseket igazoltunk. A modális kromoszómaszám mindhárom papilláris karcinómában a diploid tartományba esett, de hipodiploiditást eredményező kromoszómavesztéseket és - néhány sejtben - számfeletti kromoszómákat is megfigyeltünk. Míg a tri-, és tetraszomiák nem bizonyultak következetesnek, két betegben nonrandom kromoszómavesztéseket igazoltunk.

Az egyik beteg 31 analizált sejtje közül 22-ban 10-es monoszomiát, vagy mindkét homológ elvesztését, 15-ben az X, 10-ben az Y hiányát észleltük. A hipodiploid sejtek mellett néhány hiperdiploid és hipotetraploid sejt is megjelent. A másik betegben a 22-es monoszomiát találtuk klonális jellegűnek. Ugyanezen két betegben hasonló szerkezeti eltérés, a 11q deléciója volt kimutatható, q21, ill. q23 töréspontokkal. Az előbb említett két tumoros beteg egyikéből a 11q delécióhoz további - deléciókból és pontosan nem identifikálható transzlokációkból származó - marker kromoszómák társultak. Közöttük az 1-es kromoszóma q23-qter régiójának duplikálódását azonosítottuk. A marker kromoszómák mellett a sejtek egy részében génamplifikációra utaló „double minute-ok” is megjelentek.

A betegek konstitucionális kariotípusa - PHA-val stimulált perifériás limfocita kultúrában vizsgálva - normálisnak bizonyult. Ugyanazon betegek különböző ideig tenyésztett in vitro kultúrájában a marker kromoszómák ugyanazok maradtak, azaz az átrendeződött kromoszómák nagy valószínűséggel a primer tumorban megjelenő, neoplasztikus transzformációval összefüggő aberrációkat képviselik.

Vizsgálataink igazolják, hogy a pajzsmirigydaganatok citogenetikai vizsgálatai diagnosztikus és prognosztikai értékű kromoszóma-eltérések kimutatását teszik lehetővé. Az észlelt számbeli és szerkezeti eltérések specifikus szerepét molekuláris vizsgálatokkal kell bizonyítani. Várható, hogy az egyes tumorokra jellemző átrendeződések és az érintett gének további megismerése a jövőben új terápiás és megelőzési stratégiát tesz lehetővé.

ras onkogénmutáció vizsgálata benignus és malignus neopláziában

25 follikuláris pajzsmirigy adenóma 16 follikuláris karcinóma és 20 papilláris karcinóma onkogén mutációs frekvenciáját elemeztük. Mutációt szenvedett ras onkogéneket azonosítottunk 13 pajzsmirigy adenómás debreceni beteg közül 11 betegben illetve 6 pajzsmirigy karcinóma közül 3 esetben. Az adenómák 80%-a makrofollikuláris szerkezetű volt, míg a maradék kevert, mikro és makrofollikuláris struktúrát mutatott. ras onkogén mutációt 12 papilláris karcinómában meglepetésre egy esetben sem találtunk. A leggyakoribb mutáció a 61-es codonon mutatkozott Gln→Arg szubsztitúcióval. A mutációk 93%-a ehhez a helyhez kötődött, míg a 12,13-as codonon nem tudtunk mutációt kimutatni. Egy magyarországi anyagban két ras mutációt is találtunk, amely szövettanilag tipikusan mikrofollikuláris szerkezetű volt./Codon 61 (Gln→Lys N-ras, ill. Gln Arg→ Ha-ras)/. Szerzők többsége a mikrofollikuláris adenómát preblasztomatózisnak tartja így a kettős mutációt is szenvedett adenóma magasabb malignitási potenciálját, igazolhatja a beteg fokozott megfigyelése során esetleg bekövetkező malignus transzformáció.

A St.John's-ban operált betegekből származó hisztológiai mintákban sokkal kisebb számban találtunk ras mutációt, mint a kelet-magyarországi régióban, operáltakban. Itt a follikuláris adenómák 16%-ában (2/12) mutattunk ki ras mutációt, amely szignifikánsan alacsonyabb incidenciát jelez ($\chi^2 = 5,695$, $P < 0,02$). 10 pajzsmirigy karcinómából csupán 1(10%)betegben lehetett ras mutációt kimutatni New Foundlandon. Follikuláris karcinóma tekintetében azonban nem volt szignifikáns különbség a ras mutációk incidenciájában New Foundland és a Tiszántúl között ($\chi^2 = 1,423$; $P < 0,02$). A mutációk célpontja viszont itt is a 61-es codonon (Gln→Arg szubsztitúcióval) helyezkedett el. A magyarországi betegekhez hasonlóan az itt operált 10 papilláris pajzsmirigy rák egyikében sem lehetett azonban ras mutációt észlelni.

KÖVETKEZTETÉSEK, MEGBESZÉLÉS

1986-ban közölt eredményeink szerint differenciált pajzsmirigy karcinómás betegek között szerológiai tipizálással a HLA-DR1 antigén szignifikánsan gyakran fordul elő a normál kontrollhoz képest. 2003-2004-ben DNS alapú tipizálással a DR11 alléllal találtunk szignifikáns kapcsolatot azonos hisztológiai típusú betegekben egy új vizsgálati szériában. Megállapítottuk, hogy a DR11 magas frekvenciája nem torzította más HLA antigének előfordulásának mértékét, amit a DR11 pozitívak kizárása utáni relatív rizikószámítás is igazolt. A DR11 fenotípus nem volt befolyással a tumor méretére, a limfocitás infiltráció mértékére, a regionális nyirokcsomó illetve a távoli metasztázis előfordulására. Úgy találtuk, hogy diszkrimináns faktor analízis alapján a prognózist befolyásoló tényezők között összefüggés van, ugyanis a tumor méretének növekedésével a metasztázis gyakoribb előfordulása és a limfocitás infiltráció csökkent mértéke mutatott szignifikáns kapcsolatot.

HLA antigének mellett a betegek IgG nehézlánc (Gm) allotípusainak vizsgálatától azt reméltük, hogy a pajzsmirigy karcinómára való hajlam kockázatának megbecsüléséhez közelebb jutunk. Nem találtunk szignifikáns összefüggést azonban a különböző Gm genotípusok és a pajzsmirigy karcinóma szövettani típusai között. A továbbiakban a Gm és HLA fenotípusok lehetséges interakcióját vizsgálva csoportosítottuk a betegeket és a kontrollokat DR1 pozitivitás és Gm fb homozigotáság szerint. Ebben a csoportosításban jól megfigyelhető, hogy HLA DR1+ fb+ betegek relatív kockázata a kontrollhoz és az összes többi csoporthoz képest extrém mértékben megemelkedett. A HLA DR1+ fb+ relatív kockázata például a DR1- fb- -al szemben (RR=37, 48) igen magas.

Az utóbbi időben közölték, hogy a RET/PTC onkogének az MHC II osztály expresszióját fokozzák (Hwang és mtsai 2004). Valószínűnek tűnik, hogy a pajzsmirigy tumorsejtek citokineket termelnek, ami előmozdítja a limfocitás infiltrációt. Ezt korábban a MET fokozott expressziójával kapcsolatban is kimutatták, amely jelentkezik a papilláris és follikuláris karcinómában egyaránt, ami megmagyarázza, hogy az MHC II osztály expressziója és a limfocitás infiltráció miért nemcsak a papilláris típusra korlátozódik. Érdekes módon a p53 onko-szupresszor gén természetes módon előforduló típusa stabilizáló hatással van az MHC II osztály

antigénjeinek expressziójára amelyet, a mutáns p53 nem tud kifejtteni

Az MHC II osztály indukciója, melyet különböző onkogének kiválthatnak, megmagyarázza, hogy a korábbi vizsgálatokban talált MHC II expresszió miért mutat különböző szabályozást a pajzsmirigyrákban a normál pajzsmirigysejtekkel összehasonlítva. Az infiltráló mononukleáris sejtek biztosítják a ko-stimulációban szereplő molekulákat, amelyek egyébként nem expresszálódnak a pajzsmirigyrák sejtekben, ami lehetővé teszi a hatékony immunválaszt. Ezek az infiltráló mononukleáris sejtek azonban a kétélű kard szerepét is játszhatják, amennyiben a gyulladást okozó mediátorok elősegíthetik a tumor növekedését paracrine módon.

Bizonyíték van arra, hogy a pajzsmirigyrák a specifikus tumor antigének (RET/PTC) ellen humorális és celluláris immunválaszt indíthat, amely esetleg sikeresen eliminálni képes a mutáns onkogéneket hordozó sejteket az immunmoduláció révén. Az immunmoduláció átformálhatja a túlélő tumort az immunrendszer szelektív nyomása által. Ez egy gyökeresen különböző tumortípus megjelenéséhez vezethet. A tumor "darwini evolúciója" lényeges lehet a mikrokarcinóma – klinikailag releváns átmenetre. A tumor evolúció nagy kihívás a hatékony vaccinák kifejlesztésében, ami tumorspecifikus neoantigénekre alapoz.

A pajzsmirigy follikuláris karcinóma DR kapcsolatáról megjelent közlemények említik a DR1, DR7, DR11-et, vagy nem találtak kapcsolatot egyáltalán. A mi esetünkben a DR11 szignifikáns emelkedéséről számolunk be ugyanabban a populációban (de nem ugyanazon betegeken), amelyben korábban a DR1 asszociációt közöltük. Ez nem lehet technikai probléma, amit a csontvelő donorok HLA vizsgálata is igazolt, amikor a szerológiai módszerről a DNS alapú tipizálásra váltottunk a laboratóriumban. Az MHC II osztály antigénkülönbség összefüggésben lehet a változó környezeti kockázati tényezők hatásával a különböző érzékenységu populációkban. A heterogenitás példáját adja Sridama és mtsai (1986), akik az irradiációhoz kapcsolódó pajzsmirigyrákban kimutatták, hogy a DR7 pozitív betegeken a latencia idő sokkal rövidebb, mint a DR7 negatívokban. Ebben a közlésben tanulságos, hogy hét PTC-s beteg nyilvánvalóan sikeres immunválaszoló DR1 pozitív volt, amely antigén gyakoriságát korábban kimutattuk mi is. Megjegyezzük, hogy az utóbbi vizsgálatunkban négy beteg volt 1986 előtti és 17 egyén 1996 utáni manifesztációjú. A csernobili radioaktív felhő a katasztrófa után

Magyarországot néhány nappal később érte el. A kombináció esetleg spekulatív, de mégis ez volt a legdrámaibb környezeti, kockázati tényező a két közlésünk közötti intervallumban.

A DR11-el betegeinkben talált asszociációt megerősítették Dralle és mtsai (1986) amikor follikuláris karcinómában a DR5 (a DR11 a DR5 egy része) szignifikánsan gyakori előfordulását észlelték, míg Rigopoulou és mtsai (1994) papilláris karcinómában találták ugyanezt. A korábbi közlésünk a DR1 fokozott gyakoriságáról sem egyedülálló, amivel megerősítettük Panza és mtsai (1982) megállapítását, akik ugyanezt találták egy kisebb olasz betegcsoportban.

Megjegyezni kívánjuk, hogy a családi halmazódást mutató kisszámú medulláris karcinómás anygunkban 12 betegből kilencben találtunk DR7 pozitivitást amely betegszám növelésével illetve a betegek ilyen irányú vizsgálatával hozzájárulhat a genetikai predispozíció pontosabb megítéléséhez.

Citogenetikai vizsgálatainkról összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a pajzsmirigy differenciált daganataira jellemző a diploid modális kromoszómaszám és a hipodiploiditásra való hajlam. Hiperdiploid, poliploid sejtek megjelenése anaplasztikus elfajulásra figyelmeztet. A papilláris karcinóma patogenézisében a 10-es kromoszóma illetve a 11q játszhat szerepet. A változatos markerek, főleg az 1q triszómia és a „double minute”-ok megjelenése kedvezőtlen prognózist jelez.

Igazoltuk, hogy a pajzsmirigydaganatok citogenetikai vizsgálatai diagnosztikus és prognosztikai értékű kromoszóma-eltérések kimutatását teszik lehetővé. Az észlelt számbeli és szerkezeti eltérések specifikus szerepét molekuláris vizsgálatokkal kell bizonyítani.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a ras gének jóval gyakrabban aktiválódtak Kelet Magyarországon, mint New Foundlandon. Hasonló ras gén aktiválódás figyelhető meg follikuláris adenómákban mint a tumorgenezis késői fázisának megfelelő follikuláris karcinómában, mely utóbbiban erősen szignifikáns különbséget találtunk.

Említésre érdemes, hogy 22 papilláris karcinómában, egy esetben sem tudtunk ras mutációt kimutatni. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a papilláris pajzsmirigyrák keletkezésében valószínűleg nincs szerepe a ras mutációs aktivitásnak. Ezekben a tumorokban két tirozinkináz a RET/PTC onkogén mutáció szerepe látszik fontosnak,

de a környezeti hatások nagy jelentőségére itt is szükséges felhívni a figyelmet.

Állatkísérleti adatokból ismert hogy a jódhiány pajzsmirigy hiperpláziához, göbképződéshez és végül rosszindulatú daganatok kifejlődéséhez vezethet. Néhány tanulmány golyvaendémiás vidékeken annak a follikuláris tumornak a gyakoribb előfordulását igazolta, amelynek növekedett ras mutációs frekvenciáját ebben a tanulmányban mi is megállapítottuk. Vizsgálataink alapján valószínűnek látszik, hogy a jódhiányos vidéken kimutatható ras onkogén aktiváció nagyon fontos szerepet játszik a daganat keletkezésében/fenntartásában. Természetesen nem állíthatjuk ugyanakkor, hogy egyetlen tényező (ras onkogén mutáció) elegendő a tumoros folyamat elindulásához, hiszen a multifaktoriális etiológia általánosan elfogadott a kutatók körében. Várható továbbá, hogy az egyes tumorokra jellemző génátrendeződések és az érintett gének további megismerése a jövőben új terápiás és megelőzési stratégiát tesz lehetővé.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. F. Juhász, Gy. Balázs, Valéria Stenszky, L. Kozma and N.R. Farid. The relation of susceptibility to and biologic behavior of thyroid epithelial cell cancer to HLA. Cancer. 1986, 58: 52-54. I F: 2, 33
2. F. Juhász, Gy. Balázs, L. Kozma, E. Kraszits, Valéria Stenszky and N.R. Farid. Interaction of IgG Heavy-chain allotypes /Gm/ and HLA in conferring susceptibility to thyroid carcinoma. Clinical Endocrinology. 1986, 25: 17-21. I F: 2, 388
3. F. Juhász, P. Boros, Gy. Szegedi, Gy. Balázs, P. Surányi, E. Kraszits, Valéria Stenszky and N.R. Farid. Immungenetics and immunologic studies of differentiated thyroid cancer. Cancer. 1989, 63: 1318-1326. I F: 2, 313
4. Éva Oláh, F. Juhász, F. Boján, Valéria Stenszky, N.R. Farid. Cytogenetic analyses of three papillary carcinomas and a follicular adenoma of the thyroid. Cancer Genet Cytogenet. 1990, 44: 119-129. I F: 2, 392
5. Oláh É., Balogh E., Boján F., Pásti G., Losonczi L., Juhász F., Stenszky V., Farid N.R. Kromoszóma vizsgálat pajzsmirigy papilláris karcinómában és follikuláris adenómában. Orvosi Hetilap. 1991, 132 (6): 281-336.
6. Shi Y.F., Zou M.J., Schmidt H., Juhász F., Stenszky V., Robb D., Farid N.R. High rates of ras codon 61 mutation in thyroid tumors in an iodide-deficient area. Cancer Res. 1991 May 15, 51 (10): P 2690-3. I F: 4, 383
7. Juhász F., Stenszky V., Lukács G., Győry F., Lenkey Á. Családvizsgálatok medulláris pajzsmirigyrákokban. Magyar Sebészet. 1993, 46: 361-368.
8. F. Juhász, L. Kozma, V. Stenszky, F. Győry, G. Lukács, N.R. Farid. Well differentiated thyroid carcinoma is associated with human leucocyte antigen D-related 11 in Eastern Hungarians. Cancer. 2005 Oct 15, 104 (8): 1603-8. I F: 4, 434

Impact faktor: 18, 24

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ, DE ABBAN NEM FELHASZNÁLT
TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. E. Bodolay, Gy. Szegedi, P. Surányi, F. Juhász, V. Stenszky, Cs. Balázs, N. R. Farid. Expression of HLA-DR antigens by thyroid cells: the effect of Graves IgG. Immunology Letters. 1987. 15. 77-81 I F: 1, 241
2. Fábián E., Balázs Gy., Lukács G., Csáky G., Juhász F. Pajzsmirigydagajatok preoperatív igazolása finomtű-aspiratioval. Magyar Sebészet. 1987, 40: 121-126
3. V. Stenszky, C. Balázs, E. Kraszits, F. Juhász, L. Kozma, Gy. Balázs and N. R. Farid. Association of goitrous autoimmune thyroiditis with HLA-DR 3 in Eastern Hungary. Journal of Immunogenetics. 1987, 14: 143-148 I F: 1, 250
4. Balázs Gy., Lukács G., Fábián E., Csáky G., Juhász F. A pajzsmirigy hideg göbök differenciáldiagnosztikája. Orvoscépzés. 1987, 62: 471-477
5. Edith Bodolay, Péter Surányi, Ferenc Juhász, Valeria Stenszky, Csaba Balázs, N. R. Farid. Methimazol blocks Graves IgG but not interferon- γ -HLA-DR expression by thyroid cells. Immunology Letters. 1988, 18: 167-172
I F: 1, 137
6. Surányi P., Szegedi Gy., Damjanovich S., Juhász F., Stenszky V., Farid N.R. B_Lymphocyte subsets in Hashimoto Thyroiditis. Immunology Letters. 1989, 22(2): 147-1450. I F: 1, 241
7. Lukács G., Balázs Gy., Juhász F. A radikalitás szempontjai a papilláris pajzsmirigyrákok regionális nyirokcsomó-metasztázisainak kezelésében. Magyar Sebészet. 1991, 44: 113-117
8. Lukács G., Balázs Gy., Mikó T., Juhász F., Pálffy A. Klinikum és morfológia a follikuláris szerkezetű pajzsmirigy-tumörök szelektív műtéti kezelésében. Magyar Sebészet. 1991, 44: 165-171
9. Lukács G., Balázs Gy., Molnár F., Juhász F., Gyóry F. Pajzsmirigykarcinóma és benignus pajzsmirigybetegség együttes előfordulása. Magyar Sebészet. 1991, 44: 281-287.
10. Lukács G., Balázs Gy., Juhász F. A radikalitás szempontjai a papilláris típusú pajzsmirigyrákok regionalis nyirokcsomó-metasztázisainak kezelésében Magyar

Sebészet. 1991, 44: 113-117

11. Lukács G., Balázs Gy., Uray É., Juhász F. Differenciált szerkezetű pajzsmirigyrákok tüdő-és csontátáttéteinek kezelése. Orvosi Hetilap. 1991, 132: 2687-2690
12. Gy. Balázs, E. Fábíán, G. Lukács, F. Juhász. Rapid cytological diagnosis during thyroid surgery. European Journal of Surgical Oncology. 1992, 18: 1-6
IF: 0, 450
13. Lukács G., Balázs Gy., Juhász F., Thomázy V., Győry F. A medulláris pajzsmirigyrák kezelése és prognózisa. Magyar Sebészet. 1992, 45: 313-320
14. Lukács G., Miltényi L., Uray É., Győry F., Juhász F., Molnár P., Balázs Gy. Interdiszciplináris együttműködés a magas malignitású pajzsmirigy tumorok kezelésében. Magyar Sebészet. 1993, 46: 1-6
15. Lukács G., Győry F., Juhász F. Differenciált szerkezetű pajzsmirigyrákok recidíváinak prognosztikai jelentősége. Magyar Sebészet. 1993, 46: 351-360.
16. Juhász F., Balázs Gy., Lukács G., Lenkey Á., Győry F. Thyreoglobulin meghatározások értéke differenciált pajzsmirigycarcinómában szenvedő betegek utókezelésében. Orvosi Hetilap. 1994, 135: 849-853
17. A.F. Ahmad, V. Stenszky, F. Juhász, Gy. Balázs, N. R. Farid. No Mutations in the Translated Region of Exon 1 in the TSH Receptor in Graves Thyroid Glands. Thyroid 1994, 4: N. 2. IF: 1, 695
18. Gy. Balázs, G. Lukács, F. Juhász, F. Győry, Éva Oláh, Erzsébet Balogh. Special features of childhood and juvenile thyroid carcinomas Surgery Today Jpn J Surg. 1996, 26: 536-540 IF: 0, 171
19. Győry F., Lukács G., Nagy V. E, Juhász F., Mezősi E., Szakáll Sz., Máth J., Balázs Gy. Differenciált pajzsmirigy carcinoma: prognosztikai faktorok vizsgálata. Orvosi Hetilap. 2001, 54: 69-74
20. Győry F., Lukács G., Juhász F., Mezősi E., Szakáll Sz., T. Végh, Máth J., Balázs Gy. Surgically treated Hashimoto Thyroiditis. Acta Chir Hungarica. 1999, 38 3-4: pp. 243-247
21. Győry F, Balázs G, Nagy EV, Juhász F, Mezősi E, Szakáll S, Máth J, Lukács G. Differentiated thyroid cancer and outcome in iodine deficiency. Eur J Surg Oncol. 2004 Apr, 30 (3): 325-31 IF: 1. 882

22. Puskas LG, Juhasz F, Zarva A, Hackler L, Farid J, Farid N. Gene profiling identifies genes specific for well-differentiated epithelial thyroid tumors. *Cell Mol Biol* 2005 Sep 5, 51-2: 177-186 IF: 0. 873

Impact faktor: 9,930

KÖNYVRÉSZLETEK

1. T. Mikó, G. Lukács, Gy. Balázs, F. Juhász. Reliability of frozen section diagnosis of the thyroid. *Verh Dtsch Krebs Ges.* 1983, 4: 629. Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York
2. Balázs György, Juhász Ferenc. Pajzsmirigygyulladások. 1989, 57-59,. *Medicina Szerk. : Balázs György A pajzsmirigy és a mellékpajzsmirigy sebészete*
3. G. Lukács, G. Balázs, P. Molnár, F. Juhász, F. Győry. Gleichzeitiges Auftreten von Schilddrüsenkarzinomen und benignen Schilddrüsenerkrankung. In: W. Pimpl, *Derzeitiger Stand in Diagnose und Therapie der Struma Maligna* Springer Verlag Berlin 1993, 27-37
4. F. Juhász, Zs. Kincses, F. Győry, Zs. Kanyári, B. Megyeri and Gy. Balázs. Surgical and medical treatment of abdominal carcinoid tumors 8 th World Congress of the International Gastro-Surgical Club Strasbourg (France), 1998, April 15-18, International Proceedings Division Eds: H. Bismuth, J. P. Galmiche, M. Huguier, D. Jaeck (Monduzzi Editore)
5. L.G. Puskas, F. Juhasz, A. Zarva, L. Hackler, Jr. and N. R. Farid. Distinction Between Graves' Disease and Hashimoto's Thyroiditis by Gene Profiling *The Journal of Endocrine Genetics* 2005, Volume 4: No. 1,

ABSTRACT, SUPPLEMENTUM, COMMENT

1. Juhász F., Stenszky V., Bartha I., Balázs Gy.: A complex clinical and genetic analysis of patients with medullary thyroid cancer. Acta Endocrinologica. 1983,. 102: Suppl. 252 IF: 2, 241
2. F. Juhász, Valéria Stenszky, Gy. Balázs, L. Kozma and N. R. Farid. Epithelial thyroid cell carcinoma is associated with DR 1. International Meeting on Immunogenetics of endocrine Disorders. St.John,s , New Foundland. Canada. 1985. augusztus 24-27. Abstracts, 23.
3. V. Stenszky, F. Juhász, Gy. Balázs, B. Larsen, N. R. Farid. HLA and IgG heavy chain markers /GM/ in differentiated thyroid carcinoma. XIII. Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Abstracts. 1986.
4. F. Juhász, V. Stenszky, Gy. Balázs, B. Larsen, N. R. Farid. HLA and IgG heavy chain markers (Gm) in DTC. 14-th International Cancer Congress. Budapest, 1986. augusztus 21-27. Abstract of Lectures. Vol. 3. 4527.
5. V. Stenszky, C. Balázs, E. Kraszits, F. Juhász, L. Kozma, Gy. Balázs and N. R. Farid. Association of goitrous autoimmune thyroiditis with HLA-DR 3 in Eastern Hungary. Journal of Immunogenetics. 1987, 14: 143-148
6. Balázs Gy., Lukács G., Fábíán E., Csáky G., Juhász F. A pajzsmirigy hideg göbök differenciáldiagnosztikája. Orvoseképzés. 1987, 62. 471-477.
7. Sápy P., Péter M., Balogh E., Juhász F. Schwere chronische Entzündung im Pankreaskopf - negatives ERCP. Acta Chir Austriaca. 1988, 3: 153-154
8. Gy. Balázs, G. Lukács, G. Csáky, F. Juhász and E. Fábíán. Reeingriffe bei papillären Schilddrüsenkarzinom. Acta Chir Austriaca. 1988, Sonderheft/Jahrgang. 20.
9. F. Juhász und L. Varga. Anwendungsmöglichkeiten des Ebrimycin-gels in der septischen Abteilung der allgemeinen Chirurgie? Acta Chir Austriaca. 1988, Heft 3.

10. Gy. Balázs, G. Lukács, F. Juhász, Éva Uray. Komplexe Behandlung des papillären Schilddrüsenkarzinom ohne Radiojodtherapie. Acta Chir Austriaca. 1988, Heft 3.
11. G. Lukács, F. Juhász, Valeria Stenszky, Gy. Balázs, B. Larsen, Farid N.R. HLA and IgG heavy chain markers (Gm) in differentiated thyroid carcinoma. Medicine, Biologie, Environment. 1990, 18: 35-37.
12. F. Juhász, I. Erdei, Zs. Kanyári. Metal allergy as a possible cause for the early reoperation after laparoscopic cholecystectomy. 4-th International Congress of the European Association for Endoscopic Surgery Trondheim Norway 1996. júnus 23-26. Abstract.
13. Juhász F., Farid N. R. Immune response to papillary thyroid carcinoma. (Letter: Comment) J Clin Endocrinol Metab. 1996 Nov, 81(11): 4175-6. IF: 5. 778
14. G. L. Lukács, Gy. Balázs, F. Győry, F. Juhász, Sz. Szakáll. Chirurgische Strategie bei Strumen im Kindesalter. Acta Chir.Austriaca. Suppl. Nor. 141. 8. 1998.
15. Juhász F.,Kanyári Zs.,Győry F.,Lukács G. Laparoskopos adrenalectomia. Learning curve. Magyar Sebészet 2000 október, 46: III. évf. Supplementum.
16. G. L. Lukács, F. Győry, F. Juhász, Sz. Szakáll. Pediatric thyroid cancer European Journal of Cancer 2001 October, Vol 37: (Suppl.6) page 108. Abstracts IF: 3. 302

Impact factor: 11,321