

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Hisztopatológiai és molekuláris patológiai prognosztikai faktorok vizsgálata petefészekrákban

Szerző: Dr. Nagy Bence

Témavezető: Prof. Dr. Hernádi Zoltán



**DEBRECENI EGYETEM
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK
DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2019

Tartalomjegyzék	3
Rövidítések jegyzéke	4
Bevezetés	7
Irodalmi áttekintés	9
Epidemiológiai adatok	10
Optimális tumor redukció	12
Molekuláris biológia	13
Molekuláris háttér	18
A malignus ascites és peritonealis metasztázálás	21
Szöveti multiblokk (TMA)	25
Sejtmultiblokk (CMA)	27
Célkitűzés	28
Anyagok és módszerek	29
Eredmények	38
Megbeszélés	54
Új megállapítások	63
Rövid összefoglalás	64
Summary	65
Irodalomjegyzék	66
Kenézy Gyula Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött jegyzék	74
Tárgyszavak	76
Köszönetnyilvánítás	77
Függelék (előadások és poszterek, publikációk, kéziratok)	78

Rövidítések jegyzéke

$\alpha/\beta/\gamma$ -catenin: CTNNB1 gén által kódolt protein

AEOC: advanced epithelial ovarian cancer

APC: adenomatous polyposis coli

ARID1A: AT-rich interactive domain-containing protein 1A

ATM: ataxia teleangiectasia mutated

ATR: ATM and RAD3-related

AXIN: AXIN-1 gén által kódolt fehérje

BRAF: v-raf (rapid accelerated fibrosarcoma) humán homológja

BRCA 1/2: breast cancer type 1/2 gene

CA-125: cancer antigen 125

CCNE1: cyclin-E 1 gén

CDH1: Cadherin-1 (CAM 120/80 v. E-cadherin

CDK: ciklin dependens kináz

CDKN1A: ciklin dependens kináz 1A

CDKN2A: ciklin dependens kináz 2A

CDX-2: caudal type homeobox transcription factor 2

CIMP: CpG island methylator phenotype

CK: cytokeratin

CMA: cytologiai microarray

COX: ciklooxigenáz

CTNNB1: β -catenin gén

DO-7: p53 klón

E2F: E2 factor family of transcription factors

ECM: Extracellularis matrix

EGF: epidermal growth factor

EGFR: epidermal growth factor receptor

EMA: epithelial membrane antigen

EMT: epithelialis-mesenchymalis transitio

EOC: epithelial ovarian cancer

EP: early progression (korai progresszió)

ERB-B2: v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2

FAP: familial adenomatous polyposis coli

FIGO stage: International Federation of Gynecology and Obstetrics stádium

GSK3/CKI: Glycogen synthase kinase 3/ cycline kináz inhibitor (szerin/threonine protein kináz)

HER: humán epidermális növekedési faktor család

HGSC: high-grade serosus carcinoma

HRR: homologous recombinational repair

IHC: immunhisztokémia

INK: inhibit CDK

Ki-67: proliferációs marker

KRAS: onkogén család (Kirsten RAt Sarcoma virus után elnevezve)

KSH: Központi Statisztikai Hivatal

LCA: leukocya common antigen

LEF: lymphocyte enhancer binding factor 1

LTS: long term survival

MEK: Ras-Raf-MEK-ERK jelátviteli útvonal molekula

MET: HGF tirozin-kináz receptor (EMT-MET kontextusában: mesenchymális-epitheliális transitio)

MIB-I: Ki-67 ellenes monoklonális antitest klón jelzése

MMP-9: Matrix metallopeptidase-9 / Matrix Metalloproteinase-9

MMT: mesenchymal-mesenchymal transition

niLGSC: non-invasive low-grade serosus carcinoma

OS: overall survival

PFS: progressio free survival

PI3K/ PIK3C: foszfamidil inozitol-3 kináz

PMS: peritonealis mesothelsejt

PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10; tumor szuppresszor gén

PTH: papilláris tubális hyperplasia

RAS: onkogén család (rat sarcoma után elnevezve)

RB: retinoblastoma

RNF43: Ring Finger Protein 43; Wnt jelátvitel reguláló fehérje

Sip1: Smad interacting protein 1; TGF- β intracellularis mediator fehérje

TCF/LEF: T-cell factor/lymphoid enhancer factor

TCF4: Transcription factor 4

TGF: transforming growth factor

TGF- β 1: Transforming growth factor beta 1; cytokine család terméke

TIL: tumort infiltráló lymphocyták

TMA: tissue microarray

TP53: Tumor protein 53

VEGF: Vascular endothelial growth factor

WHO: World Health Organisation

Wnt: wingless and a related gene termed int 1

ZNF217: Zinc Finger Protein 217

Bevezetés

Az ovárium carcinoma egyike a nők leggyakoribb daganatos megbetegedéseinek. Évente, világszerte mintegy 239000 új esetet regisztrálnak és mintegy 152000 halálesetet okoz (1). 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 halál oka volt (2, 3), 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 (4).

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 (5-7). Az első vonalban platina bázisú kemoterápia választandó, ami a leggyakrabban alkalmazott kombinációban taxán származékkal együtt nyújtja a maximális elérhető hatást (8, 9).

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 (10). 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 fal- 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.

Irodalmi áttekintés

Epidemiológiai adatok

A rosszindulatú daganatos megbetegedések között a petefészek daganat mind Magyarországon, mind a nyugati országokban az 5. helyen áll mint daganatos halálok (a bőrdaganatokat nem számítva) (11). Figyelembe véve, hogy morbiditása alapján csupán a 10. helyen áll, az adat lesújtó. Valamennyi nőgyógyászati daganatos megbetegedés (vulva, vagina, cervix és corpus uteri, petevezetők, petefészek) közül a petefészek karcinómák prognózisa a legrosszabb. A WHO adatai alapján 2017-es adatok szerint az USA-ban a nők élettartam rizikója kb. 1,4%-ánál. 2017-ben megközelítőleg 22 440 nőnél diagnosztizáltak petefészek daganatot, és 14080 halálesetet okozott (12). A betegség incidenciája széles variabilitást mutat különböző etnikai csoportok között, pl. míg a japán nők esetében a rizikó csupán 0.45%, a svéd nők esetében 1.7%. A betegség incidenciája egyes országokban (pl. Gambia, Brazília, Thaiföld, Algéria) csupán 5/100 000 fő, addig Nagy-Britannia, Németország esetében 13/100000 fő. Legmagasabb a skandináv államokban 16/100000 fő (11, 13-14).

A KSH legutóbbi elérhető adatai szerint hazánkban 2016-ban 13374 nő halt meg daganatos betegségben. A petefészek daganat miatti megbetegedések száma 1100 fő körül alakult. A petefészek daganatos betegségei miatti halálozások hátterében 90%-ban epithelialis daganatok állnak. A daganatok mortalitása és morbiditása jellegzetes eltérést nem mutat Magyarország különböző területeit összevetve, illetve nem fedezhető fel a pl. vastagbél rosszindulatú daganatainál megfigyelt javuló tendenciát mutató teljes túlélési mutató az 5 éves túlélést figyelembe véve (15).

Érdekes irodalmi adat a petefészek daganatos megbetegedéseinek enyhe csökkenése mellett mutatkozó peritonealis és petevezető eredetű daganatos betegségek enyhe növekedése (16).

Etiológia és rizikófaktorok

A petefészek daganatos megbetegedéseinek előfordulási gyakorisága az életkor előrehaladtával nő. Az USA adatai alapján az incidencia 30 éves kor alatt 3/100 000 fő és 54/100 000 fő a 75-79 éves korosztályban (17). Az ovárium carcinoma átlagosan 63 éves korban kerül diagnosztizálásra, míg az emiatti halálozás átlagosan 71 éves korban következik be. Az amerikai nők esetében (USA) 40-59 éves és 60-79 éves

korosztályokban a petefészek daganat a 4. és 5. leggyakoribb daganatos halálozások (18, 19). Ezek alapján a növekvő életkor független rossz prognosztikai faktor, melyet több tanulmány is igazolt, mégsem egyértelmű ennek megítélése a betegség hátterében álló összetett és változatos molekuláris eltérés miatt (20).

A halálozási rizikó egyéb komorbitiással szövődve – korábbi szívizom infarktus, pangásos szívelégtelenség, perifériás érbetegség, cerebrovascularis betegségek, idült obstruktív tüdőbetegség - jelentősen emelkedett, akár a 30-40%-kal magasabb lehet (21, 22). Az 50 év feletti nőknél a postoperatív halálozás kétszeres a fiatalabb populációval összehasonlítva (2.6% vs. 1.2%). Fiatalabb korban a stádium megoszlás átlagosan alacsonyabb, kedvezőbb kimenetel várható (23).

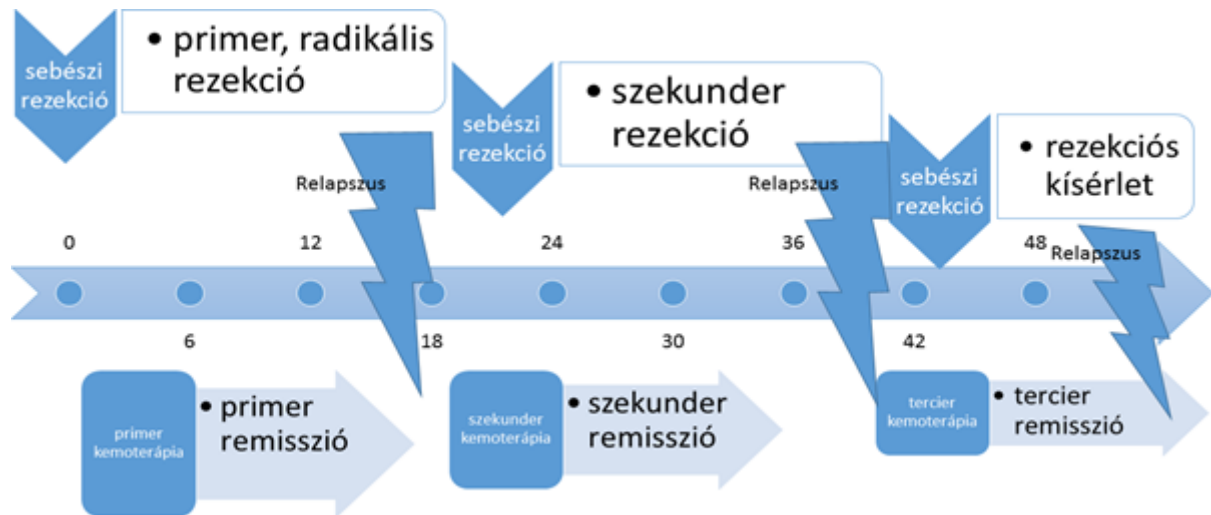
A reprodukív faktorok a petefészek daganatok között kulcsfontosságúak, a terhesség az orális fogamzásgátlók mellett az egyik legfontosabb protektív hatást kifejtő állapot – különös tekintettel az endometrioid és világossejtes daganatok esetében - míg a korai menarche és a késő menopauza jelentős rizikóval bír (24, 25). A sebészi protektív, preventív beavatkozások közé sorolható a salpingectomia, bilaterális salpingo-oophorectomia (BSO). A petevezető ligatúra és „hysterectomia” preventív szerepe nem kellően ismert, mindemellett a petevezető és petefészek endometriózis megelőzésében lehet szerepe, mely az endometrioid és „clear cell” típusú petefészek daganatok egyfajta prekursora (26).

Korábbi elképzelés alapján az egyik leginkább fenyegető prognosztikus faktornak tartott mechanizmus a fokozott ovulációs habitus volt. A petefészek felszínének ovulációs sérülései által egy sajátos mikro milió alakul ki, mely a szimultán proliferációs aktivitása következtében malignusan transzformálódik; ezt a hipotézist epidemiológiai adatok is alátámasztották, miszerint a szülés nélküli reprodukív időszak hossza, valamint az orális fogamzásgátló szerek használata preventív hatású a petefészek daganatokkal szemben. E mellett az emelkedett szérum gonadotropin hormonok (FSH, LH) szintje az ösztrogén szintjének szabályozásával/változtatásával a petefészek daganatok kialakulásának kedvez. Ennek némileg ellentmondanak egyes szerzők adatai, ahol refrakter petefészek daganatok esetében GnRH analóg adásával érték el terápiás hatást (27).

Az ovulációhoz köthető petefészek felszínét érintő gyulladós reakció, a retrográd, menstruációs eredetű „salpingitis”, illetve hüvelyi idegen – fizikai/kémiai/biológiai –

anyag jelenléte is, mint potenciális rizikófaktor ismert az irodalomban (28). Ugyanakkor az endometriózis asszociált petefészekben kialakuló pro-inflammatórikus hatás jelentősége vitathatatlan.

Napjainkban az ovárium carcinoma hosszú távú kemoterápiás kezelésének alapját a platina-rezisztenciára vonatkozó ismereteink képezik (I. ábra).



I. ábra: A petefészek karcinómák terápiájának hosszú távú stratégiája

Platina alapú kemoterápiás kezeléssel az esetek jó részében az első vonalban remisszió érhető el, majd később ismételt remisszió - platina reindukcióval – ami a recidiváló epithelialis petefészek daganatokban ismételt platinakezelés alkalmazását jelenti. A tartós remisszió esélye, a reindukció eredményessége az első vonalbeli remisszió mértékétől és tartamától függ. Ha az első vonalbeli platina származékkal teljes, vagy részleges tumor remisszió érhető el legalább 6 hónapot meghaladó időtartamban, akkor platina szenzitivitásról beszélünk és relapszus esetén a betegek mintegy 30-50%-ában várható a platina reindukció sikeressége. Minél hosszabb az első kezelés befejezésétől a progresszió észleléséig eltelt időszak, annál magasabb arányban várható remisszió. Ha a remisszió ideje kevesebb, mint 6 hónap, platina-rezisztenciáról beszélünk. Ha már a platina alapú kemoterápiás kezelés alatt is kialakult daganat progressziója, akkor a daganatot platina-refrakter kategóriába soroljuk. Ezen esetekben, a platina alapú, de nagy valószínűséggel egyéb kemoterápiás szer terápiás hatása is várhatóan elmarad (29, 30). A sikeres platina reindukció a legjelentősebb prediktív faktora az első és második platinabázisú kemoterápiás kezelés között eltelt időszak hossza. A második vonalbeli kezelés

elsődleges feladata a platinamentes intervallum prolongálása, fenntartható életminőség és alacsony toxicitás mellett (31-33).

Platina szenzitivitás alapján jó és rossz terápiás választ adó betegcsoportok különíthetők el. Platina szenzitivitás hiányában a betegség korai progressziója várható, míg platina szenzitivitás mellett a progresszió mentes túlélés jellemzően hosszabb, illetve hosszabb távú teljes túlélés lehetséges.

Optimális tumor redukció

Az előrehaladott petefészek daganatos betegekben kiterjedt hasüregi tumoros disszemináció alakul ki, mely a reproduktív szerveket valamint a vastagbél adott szakaszát is érintheti. E mellett a cseplesz, mint kb. 20x15x2 cm-es zsírpárna az esetek döntő többségében ugyancsak infiltrált, mely fájdalmas, obstrukciós tüneteket okoz. Napjaink petefészek daganat kezelési stratégiája agresszív sebészi beavatkozás által elért citoredukcióból és a fent említett kemoterápiából áll. Az ún. „tumor debulking”, vagyis tumorszövet eltávolítás/redukció az intraperitonealis daganatszövetet hivatott minél nagyobb mértékben eltávolítani, mely sokszor vezet a reproduktív szervek és a sigmoid colon együttes eltávolításához – posterior exenteratio. Az optimális tumor redukció definíciója nem egységes, de talán a legszélesebb körben elfogadott, hogy nem marad vissza 1cm-nél nagyobb átmérőjű malignitást mutató szövet sem intra- sem pedig extra-peritoneálisan. A sebészi kezelés célja, hogy a lehető legnagyobb mennyiségű tumorszövetet távolítsa el. Ennek igazolt, meggyőző bizonyítéka a progresszió mentes túlélés átlag 5 hónapos, a teljes túlélés átlag 15 hónapos növekedése sikeres tumor redukció (debulking) esetén (6, 34).

Optimális tumor redukció alkalmával intraperitoneálisan 1cm-nél nem marad vissza nagyobb tumorszövet. A citoredukció ilyen drámai jellegű hatása alapvető biológiai viselkedési különbség összehasonlítva más, hasüregi terjedés mutató rosszindulatú megbetegedésekkel. Más, gyakori peritonealis áttétképző daganatos betegségekben (gyomor, vastagbél, hasnyálmirigy) az áttétek sebészi eltávolításának nincs érdemi túlélésre gyakorolt hatása.

Molekuláris biológia

A petefészek daganatok heterogén csoportot képeznek. A rosszindulatú petefészek daganatok legnagyobb csoportját az epithelialis daganatok alkotják (90%), melyek alapvetően különböznek mind biológiai viselkedésükben, szöveti megjelenésükben, terápiájukban a petefészek stromális/sex-cord és csírasejtes daganataitól. Az epithelialis daganatok szöveteileg több fenotípusra oszthatók: serosus, endometrioid, mucinosus, „clear cell”, „transitionalis”/Brenner, differenciálatlan és kevert variánsok.

A számos egyéb daganatos betegségben megfigyelt karcinogenezis szekvencia jelenséggel ellentétben, a petefészek epithelialis daganatanál nem jellemző a klasszikus malignizálódási tendencia - a benignus-„borderline”-malignus szekvencia ugyanakkor ismert jelenség, ám szöveti szubtípus jellemzőit és molekuláris sajátosságait figyelmen kívül hagyja (35). Klasszikus nézet alapján a petefészek epithelialis daganatai a felszíni ún. germinális epitélből származtathatók, melyek stromális invaginációja – inklúziós ciszták formájában – képezi a daganatos elváltozások alapját (klasszikus koncepció). Ennek ellentmond az az általános karcinogenezis elmélet, hogy az adott monoklonális proliferáció legyen az kontrollált, illetve részben kontrollált növekedésű, valamilyen mértékű hasonlóságot mutat azzal a szövetel, melyből ered. A petefészek epithelialis daganatai még csak közvetetten sem mutatnak semmilyen morfológiai hasonlóságot a petefészek sejtjeivel. Ez alapján kijelenthető, hogy a klasszikus elmélet idejétmúlt – új megközelítési irányt kell alkalmazni.

A petefészek daganatok karcinogenezise két fő szakaszra: a malignus transzformációra és a peritonealis disszeminációra bontható, melynek háttérében heterogén folyamatok zajlanak. Kliniko-patológiai és molekuláris jellemzők alapján az epithelialis petefészek daganatok „low-grade” és „high-grade” csoportba sorolhatók (36). A két csoport közötti morfológiai és biológiai- klinikai eltérések háttérében sajátos mutációs eltérések állnak, melyek a két csoportot még jobban elválasztja egymástól.

„Low-grade” tumorok

Az I-es típusba sorolhatók az ún. „low-grade” epithelialis daganatok, melyek fenotípusosan endometrioid, szeromucinózus, „low-grade” szerózus, „clear-cell” daganatok. Az elváltozások háttérében az esetek egy részében szöveteileg is felismerhető „precancerosus” folyamat, mely lehet endometriózis illetve a „papillaris

tubaris hyperplasia” (PTH). Az elváltozások háttérében a petevezető hámból, illetve a fimbriákról leváló epithelialis sejtek malignus transzformációja áll. A „low-grade” tumorok gyakran kétoldali, nagy, több cm átmérőjű, cisztikus daganatok, melyek lassan nőnek, gyakran a hasüreget is kitöltő, kompressziós tüneteket okoznak, minimális hasüregi folyadékképződéssel járhatnak. Biológiai viselkedésükre az alacsony malignus potenciál, a jó prognózis és a lassú progresszió jellemző. Mégis, az esetek mintegy 10 %-ban a betegek halálát okozza.

Szerózus daganatok

A „low-grade” szerózus karcinómák (LGSC) lehetnek non-invazívak, illetve invazívak. A 2014-es WHO klasszifikáció a serosus „borderline” tumort és az atípusos proliferatív szerózus tumort szinonimaként kezelte. Azóta több munkacsoport foglalkozott a „low-grade” tumorok háttérében álló biológiai folyamatok feltérképezésével. Mára elfogadott az atípusos proliferatív szerózus tumor (APST), a szerózus „borderline” tumor elnevezés. Ezek mellett a non-invazív „low-grade” szerózus karcinóma (niLGSC) említendő meg, mint korai, nem invazív daganat típus eltérő morfológiai sajátosságokkal. A niLGSC gyakran kétoldali és petefészken túli terjedést mutat az esetek mintegy 30%-ában (37). A jelzett morfológiai különbség ellenére a háttérében álló folyamatok - invazív és nem invazív hashártya implantáció - alapjául ugyanazon mutációk szolgálnak (BRAF és KRAS) (38). Ezek alapján az „invazív implant” egyfajta LGSC áttétként értelmezhető, melyet magyaráz, hogy APST és niLGSC sebészi eltávolítását követően, az esetek mintegy 10%-ában a daganatos kiújulás eredményeként LGSC ismerhető fel (39, 40). Molekuláris vizsgálattal igazolt, hogy a LGSC sejtek széles világos eozinofíl citoplazma morfológiájának háttérében BRAF mutáció áll. Ilyen morfológiájú sejtek pedig kimutathatók a mikroinvazív daganatos gócban, illetve peritonealis implantátumokban, valamint nyirokcsomó áttétekben. További molekuláris jellemző a csökkent ösztrogén, progeszteron és WT-1 expresszió, illetve az emelkedett p16 jelölődés. Ezen széles eozinofíl sejtek egyfajta sajátos fenotípussal rendelkező sejtek, melyek a petevezető „papillaris tubaris hyperplasiájában” is ismertek (41, 42).

Endometrioid és világos sejtés daganatok

Az endometrioid daganatok döntően jól differenciáltak, esetenként közepesen és rosszul differenciált formák is megfigyelhetők, sok esetben valamennyi forma együtt, mely a daganatképződés dedifferenciációs mechanizmusára utal. A világos-sejtes daganatoknak hisztopathologiai gradálásuk nincs – háttér molekuláris folyamataik és prognózisuk ellenére „high-grade” daganatok, gyakran észlelhetők együtt endometrioid daganatokkal. Mindkét típusára jellemző az ARID1A és PTEN gének mutációja, illetve a catenin b1 gén - β -catenin – (CTNNB1), illetve PIK3CA gének aktiváló mutációja (43-45). Az esetek kevesebb, mint 10%-ában TP53, KRAS és BRAF mutáció is kimutatható (43, 46). A hasonló molekuláris háttér hasonló prekursor léziót feltételez. Ezzel ellentétben betegség lefolyása többször különböző. Míg az endometrioid karcinómákban Wnt- β -catenin útvonal defektusa, alternatív aktiválódása ismert, addig az a világos-sejtes daganatok esetében nem jellemző (47).

„Szeromucinózus” karcinómák

A szeromucinózus karcinómák döntően nem invazív daganatok, makroszkóposan papillarizáltak, leginkább niLGSC szerű morfológiával rendelkeznek; a sejtes morfológia egy kevert típust mutat, melyre az endometrioid, laphám, „endocervicalis” típusú glanduláris sejtek jellemzők. Immunfenotípusok jellegzetes „Müllerian” típusú: ösztrogén és progeszteron receptor, és CA-125 pozitív, CK20, CDX2 negatív. Jellegzetes az ARID1A gén mutációja, mely az endometriotikus eredettel konzisztens (48).

„Mucinózus” karcinómák

A mucinózus daganatok döntő többsége jól differenciált, a rosszul differenciált forma ritkaság. Morfológiailag heterogén tumorról van szó, melyben mind az invazív, az atípusos proliferatív mucinózus komponens kimutatható. Immunhisztokémiai vizsgálattal az ösztrogén és progeszteron receptor expresszió nem mutatható ki – a fenotípus a „nem-Müllercső” eredetet támogatja. Háttér molekuláris eltérésként leggyakrabban KRAS aktiváló mutáció detektálható, az esetek kis százalékában társuló génhiba nélkül. Számos esetben RNF43 gén inaktiváló mutációja, KRAS, BRAF mutáció és/vagy ERBB2 amplifikáció áll fenn, mely a RAS/MEK útvonal aktivációját támogatja (49). A mucinózus carcinoma gyakran észlelhető együtt Brenner-tumorról, mely a közös eredetet támogatja - prekursor lézió a Brenner-

tumorhoz hasonlóan a tubo-peritóneális junkció hámjából kialakult „transitionalis” sejtfészek (50, 51).

Brenner tumor

A Brenner-tumorok speciális fibromatózus stromával övezett, fészkes jellegű transitionalis-típusú hámtumorok, melyek döntően benignusak. Az atípusos proliferatív forma és a malignizálódás is ritka (transitionalis carcinoma). A Brenner-tumorok molekuláris háttere nem kellően tisztázott. Ismeretes a CDKN2A gén deléciója, illetve egyes esetekben a KRAS és PIK3CA mutáció is kimutatható (52).

„High-grade” tumorok

A 2-es típusba a high-grade tumorok sorolhatók, melyek leggyakoribb és legmeghatározóbb típusa a „high-grade” szerózus carcinoma. Ide tartozik a „transitionalis” karcinóma, karcinoszarkóma, illetve differenciálatlan karcinóma is. Prekurzor lézió a petevezető STIC („serosus tubaris intraepithelialis carcinoma”). A II-es csoport daganatai közül a high-grade serosus carcinoma a leggyakoribb variáns, gyors progresszióval, hasüregi folyadékkepződéssel, korai hasüregi disszeminációval, általában aszimmetrikus, változatos hasüregi megjelenéssel (42, 53).

High-grade szerózus carcinoma

A high-grade szerózus carcinoma egy viszonylag homogén csoport melynek molekuláris mechanizmusa korrelál a BRCA gén mutációjával. Az ún. „usual-type” HGSC szolid sejtfészeket alkotó, réseket képző, néhol papilláris, glanduláris struktúrákat alkotó tumorszövet, melyre jellemző a nekrozis. Immunhisztokémiailag diffúz p53, PTEN és WT-1 pozitivitás észlelhető. A SET típus sejtes összetételében hasonló, ám szöveti kontextusában eltér, szolid területeket alkotó tumorszövet azonosítható, mely több más fenotípus kevert morfológiai jegyeit jeleníti meg - endometrioid, transitionalis. E típusra jellemző a nagyszámú mitózis, kifejezett TIL és nekrozis (54). A p53 immunhisztokémiai reakció ez esetekben is diffúzan pozitív. A SET típus gyakran társul a BRCA1 mutációjával, ám STIC ritkábban fordul elő. Ez a szubtypus gyakran kialakul fiatal korban, és rosszabb prognózissal jár. Az úgynevezett „usual-type” HGSC ezzel szemben idősebbekben alakul ki, illetve általánosan rossz prognózisa mellett mégis egy fokkal enyhébb lefolyással jár. A betegség lefolyásában

észlelt különbség háttérben e daganatok kemoszenzitivitása állhat, mely mechanizmus a HRR defektusára vezethető vissza (55). A high-grade tumorokban észlelt TP53 gén mutáció mellett kialakuló egyéb mutációk kevesebb, mint 5%-ban vannak jelen. E kis százalékos arányú, ám változatos molekuláris eltérések leginkább a TP53 gén mutáció késői következményeként foghatók fel (55). A TP53 gén mutációja „ubiquiter”, jelentős genetikai instabilitást hordozva okozhat CCNE1 gén amplifikációt, a BRCA 1/2 gének csírasejtes és szomatikus mutációját, a HRR jelátviteli útvonal károsodását (55).

Differenciálatlan karcinóma és karcinoszarkóma

Sem a differenciálatlan karcinóma sem karcinoszarkóma nem mutat morfológiai hasonlóságot a HGSC-val, sem a HG endometrioid carcinomával. A háttérben álló genetikai jelenségek inkább jellegzetesek „mesenchymalis” daganatokra, mintsem epithelialis eredetűekre. A TP53 génmutáció mindkét formában kimutatható. Jellemző mindkét formára a „bizarr” hisztomorfológiai megjelenés és a rapidan progresszív betegség lefolyás. A karcinoszarkóma malignus „mesenchymalis” komponenst tartalmaz – a molekuláris jellemzők egyelőre kevésbé ismertek. A p53 fehérje mellett fokozott CDKN2A expresszió esetenként kimutatható. A bifázisos jelleg az epithelialis komponens malignus „mesenchymalis” transzformációja általi, mely folyamat molekuláris háttere egyelőre nem tisztázott (56, 57).

Molekuláris háttér

A β -catenin és az E-cadherin intercelluláris adhéziós szerepe ismert, fiziológias jelenség. Az immunglobulin családhoz tartozó CAM-molekulák, szelektinek és integrinek mellett homotípiás kötással rögzülő transzmembrán peptidek, ektodomének, melyek stabilitása kalcium-függő (58). A cadherin „szupercsalád” mintegy 180 hasonló molekulát tartalmaz különböző fejlettségű biológiai szinteknek humán szövetekben (59). A klasszikus cadherineket közé az alábbiak tartoznak: E-cadherin (epithelialis sejtek, hám- és embrionális morula sejtek), P-cadherin (placenta sejtjei, szívmusclesejtek, tüdő és tápcsatorna sejtjei), N-cadherineket („synaptogenesisben” és központi idegrendszeri intercelluláris kapcsolatok), M-cadherin (izomsejtek), R-cadherin (retinális és agy szegmentáció), VE-cadherin (endotél sejtek), K-cadherin (vese sejtjei) (60, 61). A cadherineket (E-cadherin) β -catenin keresztül kapcsolatban állnak az α -catenin monomerrel és α -catenin dimerrel, melyek a citoplazma aktin asszociált mikrotubuláris rendszeréhez. Ezt a kapcsolati erősséget a β -catenin és a β -catenint szabályozó kinázok (pl.: GSK3 β) kontrollálják (62).

A metasztázis egyik első fontos lépése a sejt elszakadása a környező sejtektől és az extracelluláris mátrix-szal való intenzív interakció. Az interakcióban szereplő sejtek intercelluláris kapcsoló struktúráiban a résztvevő molekulák átrendeződése zajlik, mely folyamat tengelye a β -catenin és az E-cadherin interakciójában bekövetkező változás. A szomatikus sejtek szintetizálják a β -catenint, melynek folyamatos lebontási mechanizmusa is aktív, amennyiben a Wnt jelátviteli út inaktív. Reguláris Wnt jelátvitel esetében, receptor-ligand kötődés hiányában az APC/GSK3 β axin destruktív komplex megköti a β -catenint, mely foszforillálódik és így lehetővé válik a degradációja (63-66). A β -catenin degradáció APC függő „ubiquitin-proteasoma” révén történik. A receptor- ligand kapcsolódás esetén a GSK3 gátlása után a β -catenin kiszabadul a destruktív komplexből és a szabad β -catenin bejut a magba. A β -catenin regulátor fehérje a Wnt jelátviteli rendszer kulcsmolekulája, mely folyamat során a sejtmembrán citoplazmikus oldalához asszociált molekula a sejtmembrántól elválik, majd a sejtmagba kerül, ahol aktivátor fehérjeként működik. Ez által létrejön a TCF/LEF aktivációja, ami további változásokat kelt az intercelluláris adhéziókban, valamint potenciózza a sejt/szöveti morfogenezist és tumorfejlődés programját (67, 68). APC receptor-ligand kötődés hiányában történő aktiváció is kialakulhat bazális

„mesenchymalis” őssejtek nem APC ligand protein kapcsolódása által, ekkor a β -catenin inadekvát intercelluláris felhalmozódása jön létre, mely jelenség mellett proto-onkogének transzkripció ko-regulátor fehérjék (c-myc, cyclin D1) gének konstitutív expressziója jön létre. A differenciálódó sejtben bekapcsolódik az apoptózis és a Wnt út gátlódik, amíg az APC vesztés vagy a β -catenin túltermelés inaktív állapotban tartja a differenciálódás és apoptózis programját (69).

A p53 fehérje, a TP53 gén terméke, transzkripció aktivátor doménnel rendelkező, 53 kDa fehérje, mely transzkripció aktivátor domént, tetramerizációs domént és két DNS kötő domént tartalmaz. A TP53 gént, mint első, felismert tumor szuppresszor gént ismerjük. A genomikus stabilitás kulcsgénje. A humán daganatok jelentős részében a genom károsodásának hátterében aberráns TP53 génkópia és következményes aberráns p53 fehérje kimutatható (70-72). A TP53 és p53 fehérje tumor szuppresszor hatása révén a „genom őreként” is ismeretes. „Rákellenes” hatása számos funkciója által valósul meg: apoptózis indukál, a genomot ért többnyire oxidatív stressz ellenes védőmechanizmusokat serkenti, gátolja az érújdonképződést, aktiválja a DNS javító enzimeket, szerepet játszik az öregedésben. Nem daganatos szomatikus sejtekben mdm2 kötődés általi regulációja révén inaktív. A DNS-t ért károsodás, illetve stressz hatás következtében az mdm2 komplex felbomlik és a TP53 gén aktiválódik. Ennek hatása, hogy a sejtek a sejtciklusból kilépve, G1 fázis stop által (CDKN1A transzkripciója megindul), nyugvó fázisban várják a DNS javító enzimeket, illetve nem javítható DNS hiba következtében a sejt programozott sejthalál útvonala aktiválódik. Ezen hatás pontos mechanizmusa nem kielégítően felderített (73). A DNS-hez kötődött p53 további gének és fehérjék aktivációját váltja ki (miRNS miR-34a, WAF1/CIP1, p21), melyek a sejtciklus szabályozásában, a tumor szuppresszióban DNS javításban játszanak szerepet. A CDKN1A gén terméke, a p21, egy „cyclin dependens kináz inhibitor”, mely a RB gén produktum RB fehérje foszforillációját gátolja (74). Az RB protein a sejtciklus szabályozásában kulcsszerepet tölt be. Mitogén jel következtében „cyclin dependens kinázok” aktivációja indul, a RB fehérje hiperfoszforilláció hatására inaktiválódik és az E2F transzkripció faktor felszabadulása mellett a sejt végigmegy a sejtcikluson, a DNS replikálódik. A sejtciklus M fázisban az RB protein defoszforillációja által a sejtciklus terminálódása megy végbe. DNS károsodás esetében ATM és ATR protein kinázok foszforillálják a p53 fehérjét, és DNS hibajavító fehérjéket, ezzel aktiválva őket. Mutáns biállélikus TP53

gén, illetve aberráns p53 fehérje esetében a fenti sejtciklust megállító, DNS replikációt szabályozó hatás kiesik; ennek eredménye kontrollálatlan sejtproliferáció (75).

A 17-es kromoszóma p13.1 „locusán” elhelyezkedő TP53 gén mutációja a leggyakoribb szoliter génmódosulás az petefészek karcinómák között, melynek hatása a transzkripció aktivátor domén, tetramerizációs domén és DNS kötő domének hibás funkciója (76, 77). UV sugárzás indukálta DNS károsodás, nem megfelelő proto-onogene aktiváció, mitogén jelátviteli útvonal aktiválódása, hypoxia hatására a TP53 aktiválódik, transzkripció faktor hatása által regulációs „TP53-célgén” kapcsolat alakul ki (78). Habár a TP53 gén mutáció valamennyi petefészek karcinóma morfológiai szubtípusban kimutatott, legszorosabb a serosus karcinómákkal való összefüggése, olyannyira, hogy a „high-grade serosus carcinoma,, mára, definíciónak megfelelően TP53 mutáns (79).

A Ki-67 sejtmag antigén, mint proliferációs marker, immunhisztokémiai vizsgálattal kimutatható a sejtciklus G1, S, G2, és M fázisaiban és nem expresszálódik G0 fázisban. 1983 óta ismert „non-histon protein”, mely expressziója során a mag belsejéből a heterokromatinba kerül, a perikromoszómális régióba. Habár széleskörűen vizsgálat molekula, melynek kimutatása egyes daganatok esetében kiemelt jelentőséggel bír, pontos celluláris funkciója a mai napig nem teljesen tisztázott. Prognosztikai jelentősége az ún. „Ki-67 overexpresszió” esetében van, amely általánosan kedvezőtlenebb kórlefolyást jelez. A Ki-67 proliferációs index mellett megemlíthető a rutin szöveti diagnosztikában használt mitózis index is, amely egy morfológiailag is felismerhető metafázis állapot. Figyelembe véve a mitózis állapota (M-fázis) és a Ki-67 expresszió kifejeződési állapotait (G1, S, G2, M), 10x-es különbséget detektálhatunk a Ki-67 javára. A Ki-67 mára gyakorlatilag önálló prognosztikus markerként használható (pl. emlő daganatai, petefészek daganatai), mégis számos daganat esetében a mitózis szám meghatározása rendelkezik diagnosztikus jelentőséggel (agy daganatai, „mesenchymalis” daganatok). A mindennapi szöveti diagnosztikában a Ki-67 antigén kimutatására sok esetben a MIB-1 monoklonális antitestet alkalmazzuk (80).

A malignus ascites és peritonealis metasztatizálás

A hasüreg hatalmas felületű belső testfelszín, mely kétrétegű hashártya felszínnel rendelkezik, az üregben fiziológias körülmények között 10-20 ml, mozgás hatására szabadon áramló folyadék van. A hashártya két fő alkotóból áll. Az egyrétegű epitél-szerű sejtek alkotta mezotél („mesothel”) és támasztószövetként jelen levő kötőszövetes stróma, mely számos összetevőt is tartalmaz: fibroblasztok, makrofágok, „glycoproteinek” és „proteoglycanok”. A peritonealis üregben fellelhető továbbá érett zsírszövet és a cseplesz speciális limforetikuláris testjei (81).

A leggyakrabban petefészek, gyomor, vastagbél, hasnyálmirigy daganatok mutatnak peritóneum felszínén terjedést. E mellett gyakran látható emlő, tüdő és melanóma infiltrációja is (82). A peritonealis üreg olyan daganatsejt predilekciós hely, amely hatalmas felületéről, illetve hasüregi folyadék által gyűjti és terjeszti a daganatsejteket. A cseplesz saját nyirokrendszerének limforetikuláris testjei maguk is karcinogenezist támogató hatással rendelkeznek (83, 84). A daganatsejtek a peritóneum üregét háromféle módon érhetik el: intraperitonealis szóródással (petefészek, hasnyálmirigy, „colorectalis” daganatok esetében); direkt, „transperitonealis” járatok mentén (hasnyálmirigy és gyomor daganatai); hematogén terjedéssel (tüdő, emlő, melanóma) (85). A petefészek daganatok legfontosabb és leggyakoribb terjedési formája a peritonealis terjedés, mely az előrehaladott petefészek daganatos betegek legalább 70%-ában jelen van. A levált, leszakadt daganatsejtek a peritóneum felszínét elérve, a peritonealis folyadék által sodortatva, passzívan mozognak, nagy mennyiségű hasüregi folyadékot létrehozva. A peritonealis metasztatizálás során a daganatsejtek adhéziója figyelhető meg, a peritóneális felszíneken (86, 87). A migrációs tumor-progresszióban mezotél-sejtek, fibroblasztok, zsírsejtek által termelt szolúbilis faktorok kemotaktikus hatása játszik fő szerepet, mely által strómális proliferáció indul meg. Ezen kölcsönhatás következtében a peritonealis felszínen, illetve peritóneumban a daganatsejtek egy új generációja, szelektált migrációs csoportja jön létre (86). A peritonealis szolid (szöveti) tumorképzés valamennyi terjedő daganat esetében megfigyelhető. A tápcsatornai daganatsejtek vagy direkt sejtleválás útján érhetik el a peritonealis teret vagy a vérér és nyirokér mikrosérülései által bekövetkező intralumináris terjedéssel.

A peritonealis „mesenchymalis” sejtek (PMS) egyediek, „mesenchymalis” és epithelialis jellemzőkkel is rendelkeznek, mind mezodermális jellegű, mind epithelialis jellegű sejtfelszíni molekulákat expresszálnak (88, 89). A nagyszámú PMS számos változatos funkcióval rendelkezik. Egyrészt felület aktív „proteoglycanokat” és foszfolipideket termelnek, melyek a peritonealis tér „síkosításában” játszanak szerepet. Másrészt felelősek a hasüregi folyadék és ion háztartásért, annak antitrombotikus, nonadhezív, állapotáért, a fibrózis és adhézió gátlásáért (90). A PMS közreműködő szerepe ismert továbbá a hasüregi és szisztémás gyulladáshoz vezető folyamatokban.

A PMS osztódó képessége alacsony, és ismert gyors „elidősülésük”, mely által inkább hasonlatosak az epithel sejtekhez, ám az „elidősült” PMS sejtek továbbra is életképesek, metabolikusan aktívak. E jelenségek leginkább az antiapoptotikus készségüknek köszönhetőek (89, 91). Az „elidősült” PMS-ek nagyobbak, ellapultak, β -galaktozidázt expresszálnak, „lipofuscint” tartalmazhatnak. A telomeráz hosszának folyamatos rövidülése ismert jelenség a sejtek „öregedése” és mitotikus aktivitásuk csökkenése hátterében. A PMS-ek genetikailag igen változatos telomeráz hosszal rendelkeznek, a DNS károsodása döntően nem a telomeráz területet érinti; e sejtek genetikailag telomeráz függetlenek (92). A PMS korai „elidősülés”, in vitro is megfigyelhető, már fiatal sejtkultúrákban is (91). A folyamat TGF- β 1 fehérje termelés növekedés által időzített stressz-hatás indukált folyamat, melynek következménye a még nem „elidősült” sejtek gyorsult érése.

Ezzel összefüggő további jellegzetesség az „elidősülés” következtében fellépő biokémiai jelek progresszív kumulációja, mely a sejteket, a sejteket ért celluláris stressz következtében eltérő válaszkészséggel ruházza fel (93).

A mezotélsejtek aktív szerepe a peritonealis disszeminációban máig vitatott. Egyrészt, az ovárium tumoros biopsziás minták nem tartalmaztak PMS-eket az osztódó tumorsejtek mellett. Másrészt, kísérletes esetekben azon daganatok mutattak kevésbé effektív hasüregi terjedést, melyekkel PMS-et adtak a peritoneumba. Nem szabad viszont azt sem elfelejteni, hogy a PMS felszíni nagyszámú ligand és receptor komplex interakcióra képes, mely jelenség a petefészek daganatok terjedésének adhéziós fázisában beindul. PMS-asszociált „fibronectin” és tumorsejt-asszociált α 5 β 1 integrin közötti és hialuronsav és CD44 receptor közötti interakció zajlik le (94, 95). A kísérletesen blokkolt „fibronectin” termelés hatására a daganatsejtek PMS-hez való

asszociációs készsége jelentős mértékben csökken, mozgási képességük mérséklődik (96).

Fontos további momentum és a folyamat komplexitását igazoló mechanizmus az „epithelialis-mesenchymalis-tranzíció” (MMT), melynek részjelensége a PMS által létrejövő „mesenchymalis-mesenchymalis” átmenet. E folyamat során az intraperitoneális progressziót mutató daganatsejtek a PMS-kel interakcióba kerülve azokat aktiválják, és tumor asszociált fibroblasztos megjelenést/funkciót stimulálnak – az összefüggő PMS felszín megszakad. A folyamat eredménye a mezotél barrier apoptotikus károsodása (97, 98).

A daganatos sejtek egyetlen sejt-ként vagy klaszter-ként leválva, passzív mechanizmus által terjednek, helyváltoztatásukat maga a fiziológiai mozgás adja a peritoneális folyadékban. Klinikai megfigyelések és retrospektív klinikai vizsgálatok azt sugallják, hogy az előrehaladott ovárium daganatok hatékonyan nőnek a peritoneális üregeken belül, de ritkán adnak áttétet távoli szervekbe (kivéve nyirokcsomó áttétképzés útján). Ezt a hipotézist erősíti az a megfigyelés, hogy a „ventriculo-peritonealis shunt” beültetésén átesett betegekben nem szóródik a tumor a shunt közvetítésével. Kísérletesen, a „shunt” beültetést követő két évben sem igazolódott vénás jellegű áttétképződés, holott sem fizikai, sem biológiai barrier nem volt. Ez a szokatlan eredmény Paget klasszikus „seed and soil” elméletét támasztja alá. A petefészek tumorsejtek számára a megfelelő táptalajt a mezotélium adja, mely a hasüregi szerveket fedi. Az implantálódó daganatsejtek a mezotélt felszínesen kolonizálják, de mélyebb infiltráló kialakítására nem, vagy csak ritkán képesek. Mielőtt a petefészek daganatsejtek leválnak és elkezdődik metasztatikus utazásuk, a daganatsejtek strukturális átalakulására van szükség, melynek következtében mind helyváltoztatásra, mind helyzet változtatása képessé válnak. E folyamat az „epithelialis-mesenchymalis transitio” (EMT), mely során a hámsejtek közötti intercelluláris adhéziók fellazulnak, a citoskeleton alapvetően átalakul és a daganatsejt a bazális membrántól elválk (99). Az intercelluláris adhéziós molekulák közül az E-cadherin játszik fő szerepet, az intercelluláris integritás tengelyét adja; a csökkenő E-cadherin expressziót N-cadherin és P-cadherin expresszió emelkedés kíséri – ez a folyamat a „cadherin switch” (100).

Az E-cadherin molekula α - és β -cateninen keresztül kapcsolódik a citoplazmikus mikrofilament rendszerhez, mely az epithelialis sejteket egymás mellett tartja. Epithelialis daganatokban az EMT kiváltotta E-cadherin vesztés egyenlő a fokozott invazivitással (101). A hasüregi folyadékban lebegő petefészek daganatos sejtek E-cadherin expressziója alacsonyabb, csak úgy, mint az áttétekben (102). EMT következtében a sejtek képessé válnak a „mesenchymalis” jelátviteli útvonalak használatára, illetve strómális sejtekkel való interakcióra. A háttérben integrinek ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$) és mátrix metalloproteázok (MMP-9) aktiválódnak, ami az E-cadherin ektodomén elválását eredményezik; ez a mechanizmus az intercelluláris adhéziónak fellazulását okozza, és lehetővé teszi a sejtek számára az egyesével való, illetve csoportos leválást – a sejtek folyadéktérhez szabott, ún. „sferoid” alakot öltenek. A levált sejtek a hasüregi folyadékban haladnak tovább (103, 104). Helyváltoztatásukhoz elengedhetetlen a „sferoid” alak, melyet integrinek tartanak fenn, ugyanezen molekulák biztosítják, hogy a daganatsejtek a különösen erősen tapadnak meg a folyadéktérből kikerülve a mezoteliális felszínen (105, 106). A fentiek mellett a sejtmembrán asszociált mátrix metalloproteázok termelése is fokozódik, mely gátolja a nem kívánt, túl korai megtapadást, illetve elősegíti a kívánt tumorsejt-mezotél adhézión. Ezt egy bonyolult $\beta 1$ -integrin heterodimerizálódási folyamat, CD44 expresszió, mátrix metalloproteáz aktiválódás előzi meg. Ezt a mezotél sejtek, daganatos sejtek által a Fas ligand útvonalon (CD95) kiváltott apoptózisa előz meg, meggátolva a mezotélsejtek meglevő megtapadási és invazivitási képességét (107, 108).

Az ovárium daganat levált sejtcsoportjai, sejtjei immár bizonyos fokú „mesenchymalis” morfológiával is jellemezhetők, valamint E-cadherin szabályozó Sip1 regulátor hatás által elveszítik az E-cadherin fölötti irányítást. Ez a diszregulációs állapot a fibronectin receptor fokozott sejt felszíni megjelenését váltja ki, mely a daganatsejtet egyfajta készülségi állapotba hozza, hogy a megfelelő környezetben kitapadhasson. Ha egy metasztatikus kolónia kialakult a sejtek reverzibilis re-epitelizációja megy végbe („mesenchymalis-epithelialis transitio”, MET) és készen állnak a környezeti parakrin növekedési faktorok hatására gyors ütemben növekedni. A metasztatikus tumornövekedés jól koordinált, szabályozott mechanizmus, melynek háttérében különböző, egymás hatását potenciózó növekedési faktorok (VEGF, PGF) kiváltotta érújdonképződés áll (109, 110).

Szöveti multiblokk– „tissue microarray” (TMA) módszer

A szöveti multiblokk, vagy tissue microarray metodika magas „throughput” értékkel rendelkező, leginkább a tumorbiológiai kutatásokban használt eljárás, mely a szakirodalomban ismert és széleskörűen használt (111). Egyértelmű előnye a költséghatékonyság, mindemellett nem elhanyagolható értéke a szövetmintára kifejtett minimális károsító hatása. Előnyként említendő még a fajlagosan kedvező reagens költsége, ami a mintákon elvégzett reakciókat illeti. Elvitathatatlan érdeme az egy paraffinos blokkon elvégzett számos különböző reprezentált tumorszövet összehasonlíthatósága, melynek háttérét az egy metszeten végzett standardizált eljárás lehetősége adja (112).

Az eljárás alapja H. Battifora és munkacsoportja által kifejlesztett, 1986-ban elsőként publikált eljárás, melyet J. Kononen és munkatársai tökéletesítettek (113-115). Elsődleges cél a proteomikai kutatásokban való alkalmazhatóság volt. A vizsgálati módszer tökéletesítésével az eljárás azóta DNS szintű vizsgálatokhoz is alkalmassá vált (in situ hibridizáció) (116). Azóta számos kutatásban használták ezt az eljárást a legkülönbözőbb témakörökben, döntően immunhisztokémiai reakciók összehasonlítására (117, 118).

A metodika elsődlegesen formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintákon végzendő, döntően immunhisztokémiai reakciók vizsgálatára szolgál. A szöveti multiblokk eljárás a hétköznapi kórszövettani rutin diagnosztikában használt paraffinos blokk kiöntésével kezdődik, ez az úgynevezett „donor-blokk”, melyen egy előre megtervezett mintázatot alakítunk ki, „térkép” segítségével. A rutin diagnosztikai eljárással ellentétben nem egy szövetminta paraffinos blokkba építése történik, hanem a mintázatnak megfelelően számos szövetminta beágyazására kerül sor, az úgynevezett „recipiens blokkokból”. Ehhez először előre meghatározott számú és méretű lyukat kell fúrni a recipiens blokkba, ezek a recipiens fiolák, melyekbe a különböző, más szövetekből – donor blokkokból - származó mintákat befogadják. A recipiens fiolák befogadó átmérője, száma, a szövethengerek egymáshoz való viszonya az alapja a megfelelő multiblokk kialakításnak, a költséghatékonyságnak, kellő reprezentativitásnak és standardizálásnak (119).

A megfelelő kialakítás a kellően nagy és lehető legkisebb érdekes mintaszámot jelenti. Egy hagyományos paraffinos blokkba 10-100 recipiens paraffin fiola alakítható

ki – mintahenger átmérő és mintatávolság függvényében. A nagyobb darabszám jellemzően kisebb mintaátmérőt takar, emiatt, általában több reprezentatív mintahenger beültetésére van szükség egy recipiens blokkba. A kisebb recipiens fiolaszám általában nagyobb beültetett mintaátmérővel rendelkezik, ez esetben, függően a végleges esetszámtól, több multiblokk kialakítását teszi szükségessé (120).

Költséghatékonyság tekintetében a kevesebb multiblokk kialakítása idő, anyagi és kényelmi szempontból is kedvező, ám az egy paraffinos blokkba épített mintahengerek száma nem növelhető korlátlanul. Az alsó vizsgálhatósági határ irodalmi adatok alapján 0.2 mm átmérőjű hengert jelent, melynél kisebb átmérő használata, még több ugyanazon szövetből származó mintahenger beültetése mellett sem rendelkezik kellő reprezentativitással (121). A nagyobb mintahenger átmérők (irodalmi adatok alapján 5 mm) vizsgálhatósága és összehasonlíthatósága könnyebb a vizsgáló számára, ám nagy kutatási esetszámoknál több blokk kialakítását teszi szükségessé. Ideális, a 1-3 mm-es mintahenger átmérő lehet (122).

Valamennyi vizsgálat alapja a kellő reprezentativitás. A multiblokk kialakításánál a recipiens blokkokból származó szövetminták többnyire redundánsan vannak jelen annak érdekében, hogy az elvégzett, többnyire immunhisztokémiai reakciók kiértékelhetők legyenek. A tervezés és megfelelő „donor-blokk-donor-terület” kiválasztás és mintavételezés mellett a reprezentativitás megtartott, vagyis az esetleges minta károsodás következésben is jelen van kellő mennyiségű és minőségű minta, melyen az adott reakció kiértékelhető (115).

Standardizált feltételek elengedhetetlenek minták összehasonlítása alkalmával. A multiblokk erre kiválóan alkalmas, hiszen egy műveletsoron esik át valamennyi minta ugyanazon időben. A pH, ionmilió, antigén feltárás automatizált körülményei, a reagens koncentrációja, inkubációs ideje, illetve adott esetben a kromogén szubsztrát valamennyi mintahengeren egyszerre érvényes illetve van jelen (123).

(Munkacsoportunk korábbi és jelenlegi vizsgálatait szövetblokkokból 1 mm—es, a sejtblokkokból 2 mm-es mintahengert használt. Irodalmi adatok alapján ez egy kellő és vállalható kompromisszum.)

Az eljárás hátrányaként említendő hogy egy-egy vizsgálandó szövetből igen minimális, döntően több darab, 1-5 mm-es mintahenger kerül kiválasztásra és beépítésre. Sok esetben, megfelelő redundancia mellett sem reprezentatív a donor szövetminta. Ennek

háttérben állhat a több cm átmérőjű daganatok ismert „tumor-heterogenitása”, tumorszövet mentes nekrotikus területek jelenléte. Emellett a rutin diagnosztikai, paraffinos blokk mintákat általánosan érintő metodikai hibák (víztelenítési, fixálási, beágyazási), továbbá az immunhisztokémai reakciók technikai problémái. Az elkészült paraffinos multiblokkokból készített 3-5 µm vastag metszetekről mintahengerek lesodródhatnak, mechanikusan károsodhatnak. Irodalmi adatok alapján ez 2-12% közötti veszteséget jelent. Adott esetben a kész metszeteken való tájékozódás problémát jelenthet, főleg szimmetrikus multiblokkok kialakításánál, emiatt jelzőanyag beültetése válhat szükségessé, melynek pozícióját korábban említett térkép mutatja. A metszeteket digitalizálva viszonylag gyors, jól követhető kiértékelés alkalmazható (124).

Alapvetően kijelenthető, hogy a szöveti multiblokk vizsgálat minta-, munka- és költséghatékony, azonos reakciókörülményeket teremt, jól standardizálható. Emiatt kifejezetten alkalmas kutatási célra. A kis mintaátmérők és tumor heterogenitás jelensége miatt rutin diagnosztikai alkalmazhatósága erősen korlátozott.

Sejt multiblokk – „Cytology-microarray”

A TMA metodika egy módosított változata az úgynevezett CM, vagyis citológiai microarray, melynek alapja a citodiagnosztikai mintavételből származó, részben folyadék tartalmú mintából kinyerhető tumorsejtek vizsgálata (125, 126). E megoldás különösképpen előnyös azokban az esetekben, ahol a szöveti mintavétel korlátozottan lehetséges, korlátozott értékű, illetve nem megvalósítható, és csupán folyadék áll rendelkezésre a diagnosztika számára (testüreg, emlő cisztózus elváltozásai). Bubendorf 2006-ban szerkesztőségi közleményben hívta fel a figyelmet a technika széles körű alkalmazhatóságára. Ezidáig igen csekély irodalmi adat áll rendelkezésre testüregi folyadék minták által tartalmazott sejtek vizsgálatára vonatkozóan (127).

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 szövétileg 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” – early progression) és hosszú távú túlélők csoportja („LTS” – long term survival). 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 (**I. táblázat**).

I. táblázat: Túlélési betegadatok – prognosztikai vizsgálat adatai

Betegadatok I.		
	N	N (%)
Kor (évek)		
Medián 95% CI (évek)	63 (95% CI; 52,1-57,4)	
FIGO stádium a diagnózis idején		
IC	8	18,2
IIC	2	4,5
IIIA	1	2,3
IIIB	4	9,1
IIIC	27	61,4
IV	2	4,5
Szöveti típus		
Szerózus	31	70,5
Endometrioid	3	6,8
Mucinózus	4	9,1
Differenciálatlan	6	13,6
Differenciáltsági fok (grade)		
G1 és G2 (low-grade)	23	52,3
G3 (high-grade)	21	47,7
Primer műtét (intervallum laparotómiával)		
Optimális tumor redukció	22	50
Szuboptimális tumor redukció	22	50
Korai progresszió		
>12 hónap	14	31,8
<12 hónap	30	68,2
Teljes túlélés		
> 100 hónap	17	38,6
<100 hónap	27	61,4

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

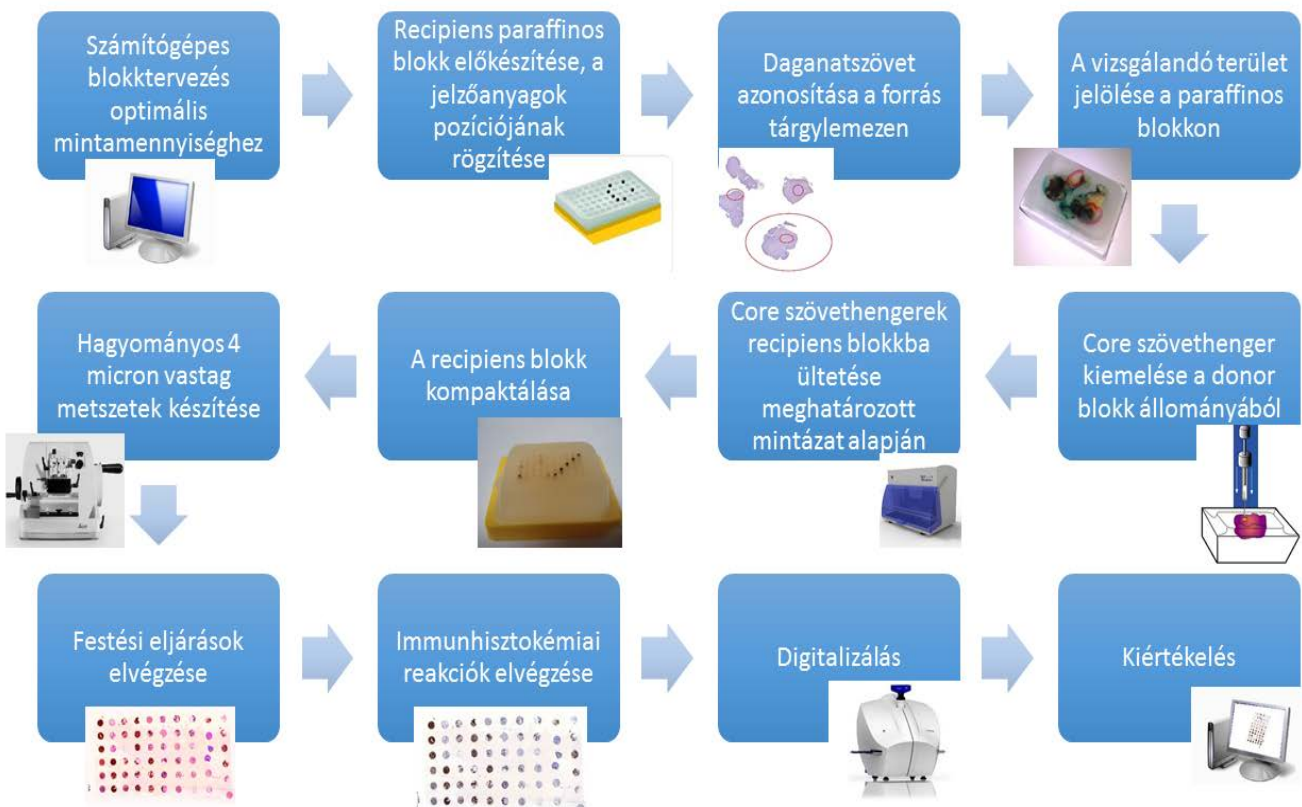
A szövetszöveti tumor és ascites minták: A vizsgált 27 esetből 21 esetben a primer daganat, míg 6 esetben valamely hasüregi áttét (cseplesz, kismedencei peritóneum, hasi zsigerek) műtéti rezekciós szövetszövetmintája állt rendelkezésre. A 27 tumorból 18 high-grade, míg 9 low-grade volt. 6 eset tartozott 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 (**II. táblázat**).

II. táblázat: Betegadatok: Tumorszövetek és ascites tumorsejtek vizsgálata

Betegadatok II.		
	N	N (%)
n = 27		
FIGO stádium		
IA	1	3,70%
IB	1	3,70%
IC	4	14,80%
IIA	3	11,10%
IIB	3	11,10%
IIIA	4	14,80%
IIIB	2	7,40%
IIIC	8	29,60%
IV	1	3,70%
Szövetszöveti típus		
Szerózus	24	88,90%
Mucinózus	1	3,70%
Endometrioid	2	7,40%
Differenciáltsági fok (grade)		
low-grade	9	33,30%
high-grade	18	66,70%

Szöveti feldolgozás, metodika

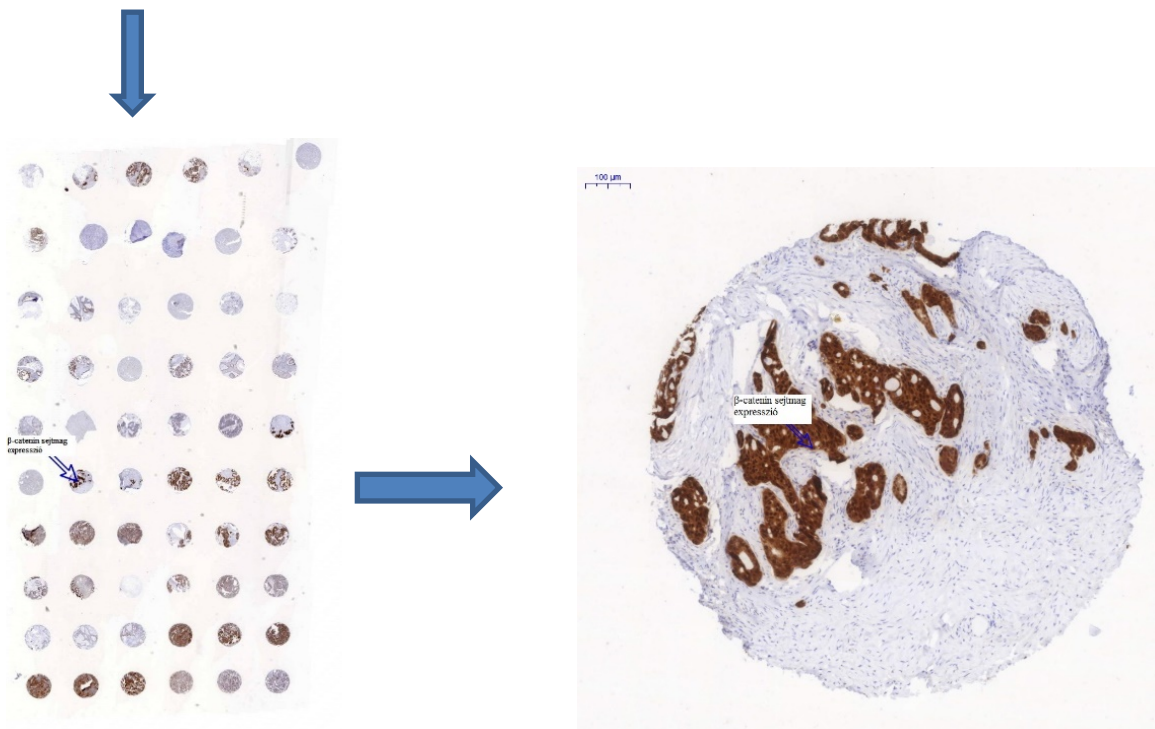
Formalin fixált, paraffin beágyazott minták ismételt szöveti verifikációja történt (TL és NB). A releváns és reprezentatív minták paraffinos blokkjaiból „hematoxyllin-eosin” festés alapján kijelölt területekből 1 mm vastag mintahenger, úgynevezett „core”-mint kiemelése történt, (TMA master, 3DHitech 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 (II. ábra, III. táblázat III-IV. ábra).



II. ábra: A szöveti multiblokk összeállításának lépései

III. táblázat: Térkép a szöveti multiblokk „donor tumor” mintáinak pontos azonosításához. A mintahengerek redundánsan vannak jelek („donor” daganat-szövetenként 3-3 mintahenger azonosítója látható”)

2011.04279	2011.04279	2011.04279	2011.06705	2011.06705	jelzőanyag
2011.06705	2011.13112	2011.13112	2011.13112	jelzőanyag	1999.04726
1999.04726	1999.04726	2000.15876	jelzőanyag	2000.15876	2000.15876
2001.11375	2001.11375	jelzőanyag	2001.11375	2001.11160	2001.11160
2001.11160	jelzőanyag	2002.09556	2002.09556	2002.09556	2002.17554
jelzőanyag	2002.17554	2002.17554	2002.18567	2002.18567	2002.18567
2004.00135	2004.00135	2004.00135	2004.00989	2004.00989	2004.00989
2004.03172	2004.03172	2004.03172	2004.04960	2004.04960	2004.04960
2004.12640	2004.12640	2004.12640	2004.12716	2004.12716	2004.12716
2004.13943	2004.13943	2004.13943	2005.07295	2005.07295	2005.07295



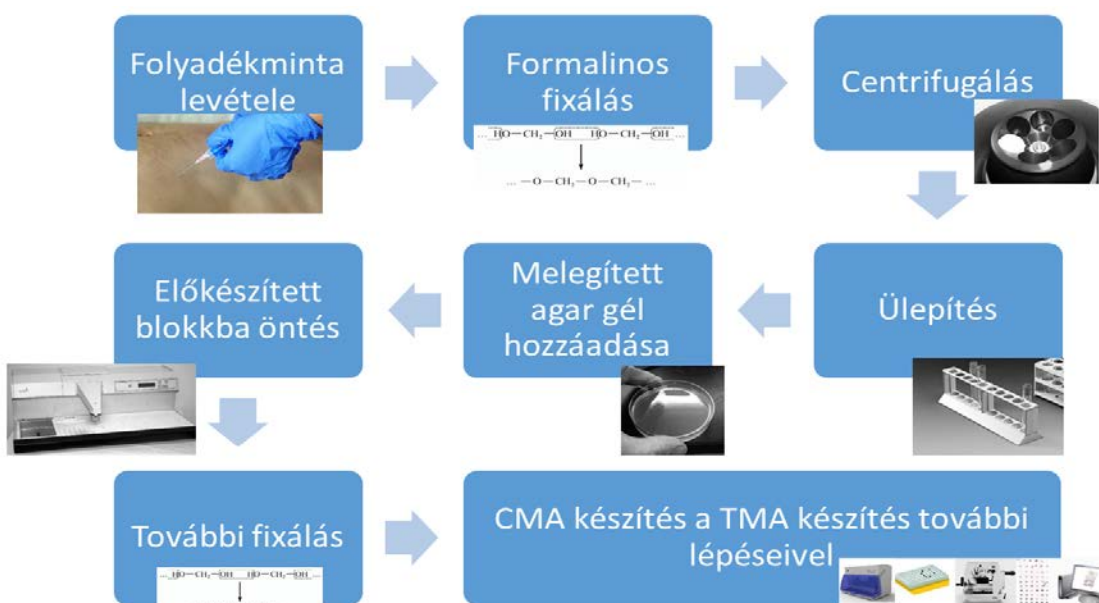
III. ábra: Szöveti multiblokk térkép 4 μm vastag metszete (2x)

IV. ábra: Pontosan azonosított mintahenger 4 μm vastag metszet és a rajta végzett β-catenin immunhisztokémiai reakció (10x)

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 sejt elemeket tartalmazó agar gél, szöveti blokk kazettába téve tovább fixáltuk, 10%-os pufferezett neutrális formalinban, majd standard szövettani víztelenítési és beágyazási procedúra került sorra (V. ábra).



V. ábra: A sejtmultiblokk összeállításának sematizált lépései láthatók

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 metanos 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 metanos 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 (IV. Táblázat).

IV. táblázat: A szöveti multiblokk és sejt-multiblokk mintáin végzett immunhisztokémiai reakciók jellemzői.

Primer antitestek, hígítások és antigén feltárás					
antitest	klón	gyártó	hígítás	antigén feltárás	eszköz
E-cadherin	NCH 38	Dako	1 : 100	(*)	Bond™ Max autostainer
B-catenin	14	BioCare Medical	1 : 200	citrát puffer ph 6.0 12 percig 120-125°C	kézi feltárás
Ki-67	MIB-I	Dako	1 : 200	(*)	Bond™ Max autostainer
p53	DO-7	Dako	1 : 200	(**)	Bond™ Max autostainer
*: Novocastra Bond Epitope Retrieval Solution 2, Leica, Code: AR9640					
** Novocastra Bond Epitope Retrieval Solution 1, Leica, Code: AR9961					

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 immunhisztokémiai 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.

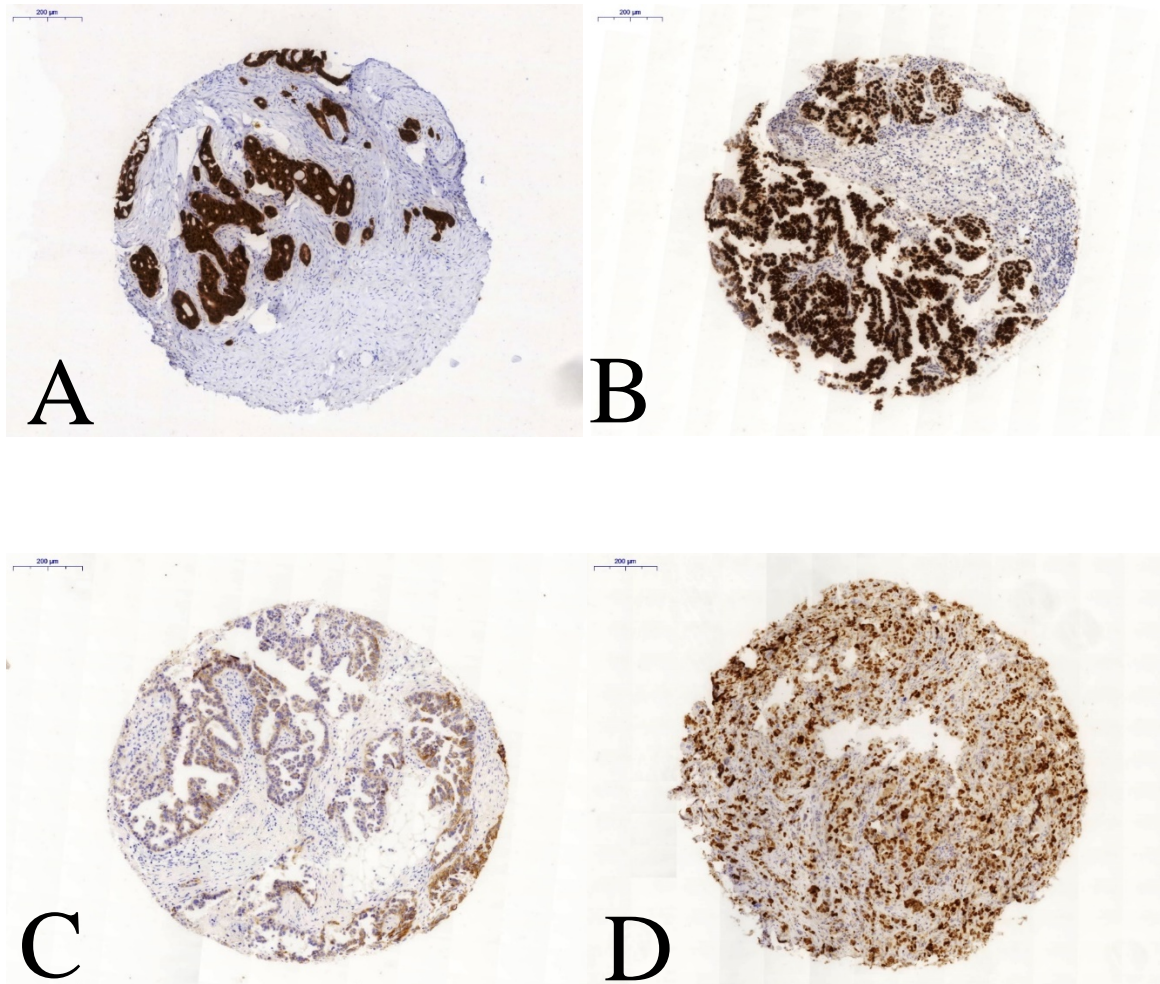
Ki-67 expresszió: „Low-grade” tumorok esetében a Ki-67 proliferációs frakció 43%-os volt, míg „high-grade” tumorok tekintetében 66,7%-os. Optimális tumorredukció esetén a minták 40,9%-a mutatott Ki-67 sejtmagi expressziót, míg a szuboptimális tumor redukciós beavatkozások 68,1%-a. A serosus daganatok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



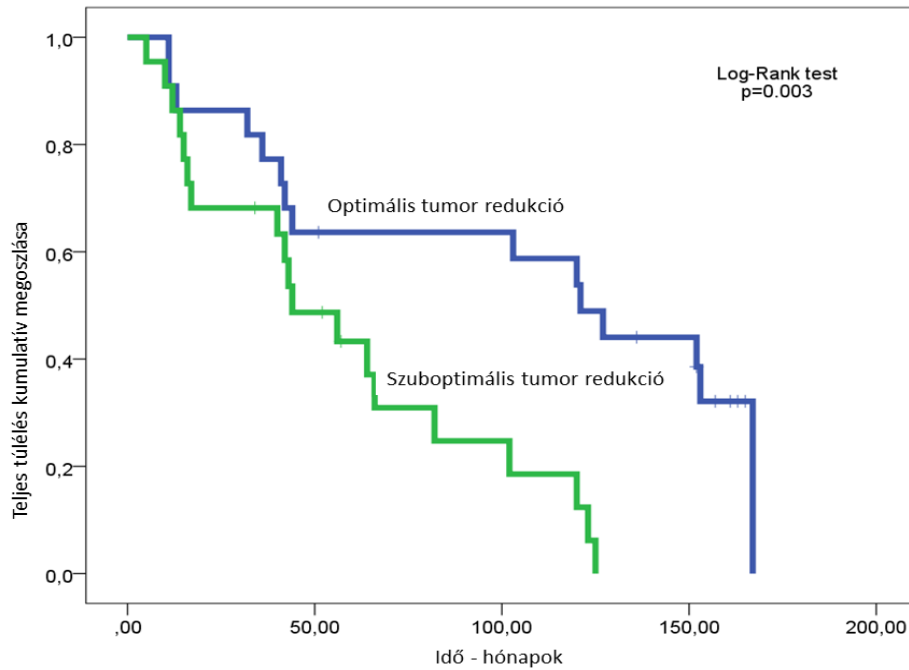
VI. ábra: Fehérék expressziója és a túlélés közötti kapcsolat vizsgálata: (A: β -catenin expresszió; B: p53 expresszió; C: E-cadherin expresszió; D: Ki-67 expresszió; 100x-os nagyítás) A kiértékelés során p53 és Ki-67 esetében sejtmagi, E-cadherin esetében sejtmembrán reakciót értékeltünk. β -catenin esetében sejtmembrán és sejtmagi pozitivitást is értékeltünk.

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.

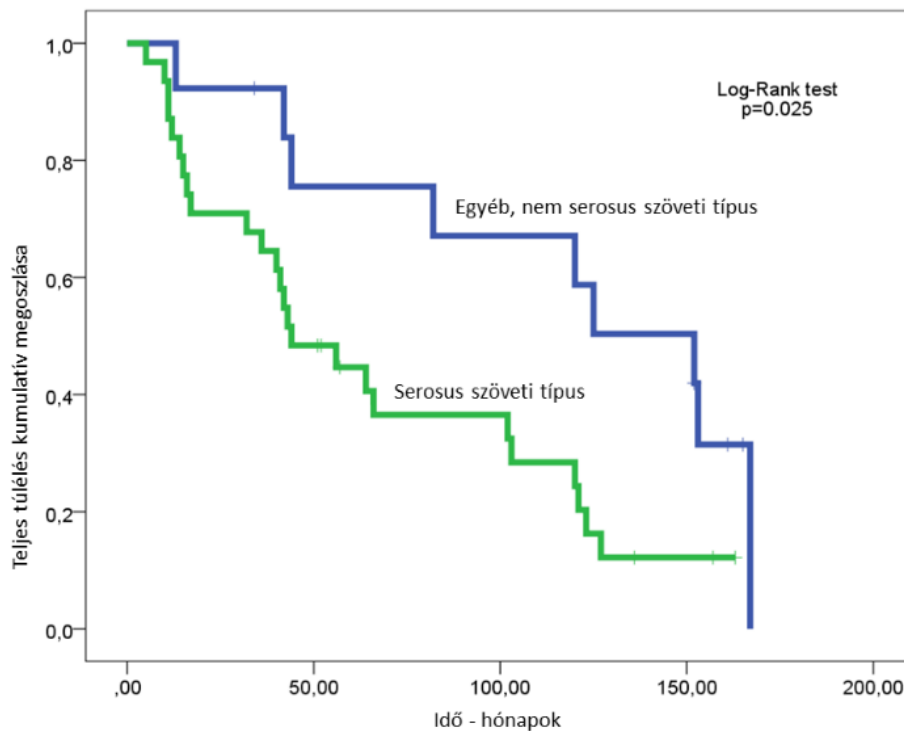
Hosszú távú túlélés: Egyváltozós analízissel a serosus fenotípus potenciális negatív hatással rendelkezik a teljes túlélésre vonatkozólag (68,03 mo. vs. 117,01 mo.; **p = 0,025**), mely mellett az optimális tumor redukciós eljárás potenciális pozitív hatással rendelkezik a szuboptimális sebészi terápiával 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) **V. táblázat, VII-XI. ábra.**

V. táblázat: Prognosztikai vizsgálat eredményeit összefoglaló táblázat. Egy- és többváltozós, hosszú távú túlélés kimutatására irányuló analízis.

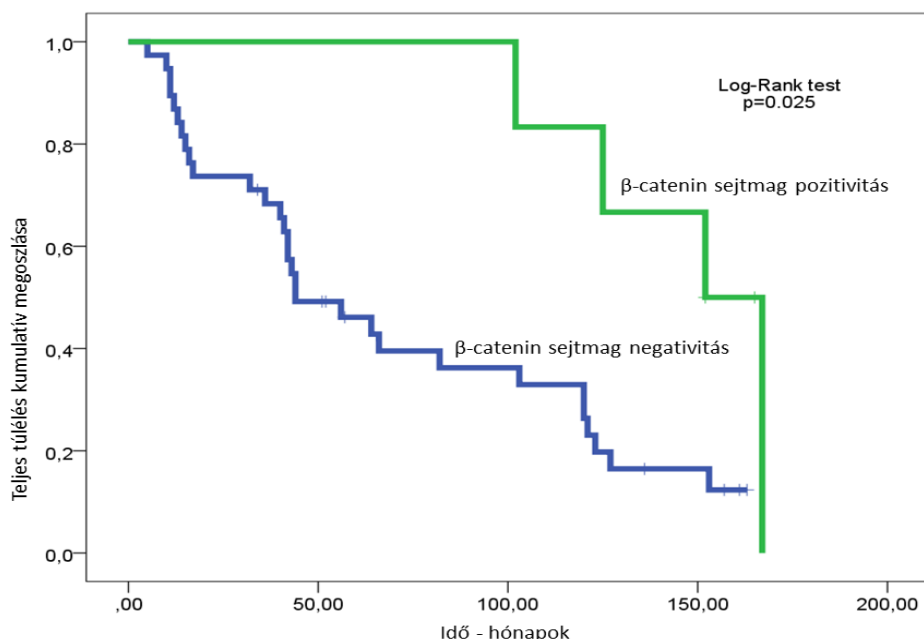
Egy- és többváltozós analízis a teljes túlélés függvényében					
Változók		Kaplan-Meier (Log-Rank teszt)		Cox regresszió	
		n=44	Mean (95% CI) (months)		HR (95% CI)
				p	p
Kor (évek)					
65 ≤	20 (45)		90,68 (63,43-117,92)	0,535	
<65	24 (55)		76,94 (53,70-100,18)		
Szöveti típus					
szerózus	31 (70)		68,03 (48,98-87,08)	0,025	
egyéb	13 (30)		117,01 (85,07-148,96)		
Reziduális tumorméret					
szuboptimális	22 (50)		57,48 (39,37-75,60)	0,003	0,325 (0,147-0,718)
optimális	22 (50)		105,36 (78,83-131,89)		
Tumor grade					
high-grade	21 (48)		67,61 (41,91-93,31)	0,279	
low-grade	23 (52)		96,31 (73,4-119,59)		
β-catenin sejtmembrán reakció					
pozitív	33 (75)		84,87 (63,63-106,11)	0,783	
negatív	11 (25)		77,89 (45,81-109,98)		
β-catenin sejtmag reakció					
pozitív	6 (14)		146,67 (123,62-169,73)	0,025	3,54 (1,06-11,89)
negatív	38 (86)		71,84 (54,05-89,63)		
E-cadherin membrán reakció					
pozitív	34 (77)		78,94 (59,07-98,82)	0,491	
negatív	10 (33)		97,56 (59,23-135,89)		
P53					
pozitív	25 (57)		70,40 (49,64-91,16)	0,057	
negatív	19 (43)		99,80 (71,10-128,50)		
Ki-67					
pozitív	24 (55)		69,74 (46,11-93,37)	0,165	
negatív	20 (45)		96,70 (70,75-122,65)		



VII. ábra: Kaplan-Meier analízis diagram: A teljes túlélés kumulatív megoszlása a tumorszövet optimális eltávolításának függvényében. Az optimális tumor redukció túlélésre gyakorolt hatása pozitív prediktív értékű.



VIII. ábra: Kaplan-Meier analízis diagram: A teljes túlélés kumulatív megoszlása a serosus szöveti típus függvényében. A szerózus fenotípus hosszú távú túlélésre gyakorolt hatása negatív prediktív értékű.

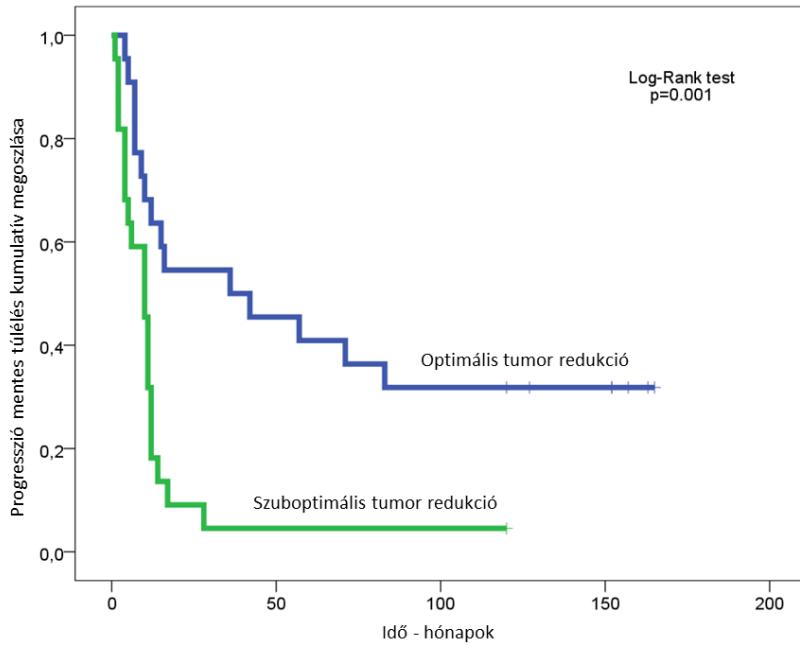


IX. ábra: Kaplan-Meier analízis diagram: a teljes túlélés kumulatív megoszlása a tumorszövet nukleáris β -catenin expresszió függvényében. A nukleáris β -catenin a hosszú távú túlélés prediktív markere. Egyedül a hosszú távú túlélők mintáiban észlelt jelenség, korai progressziót mutató esetekben nem expresszáldott.

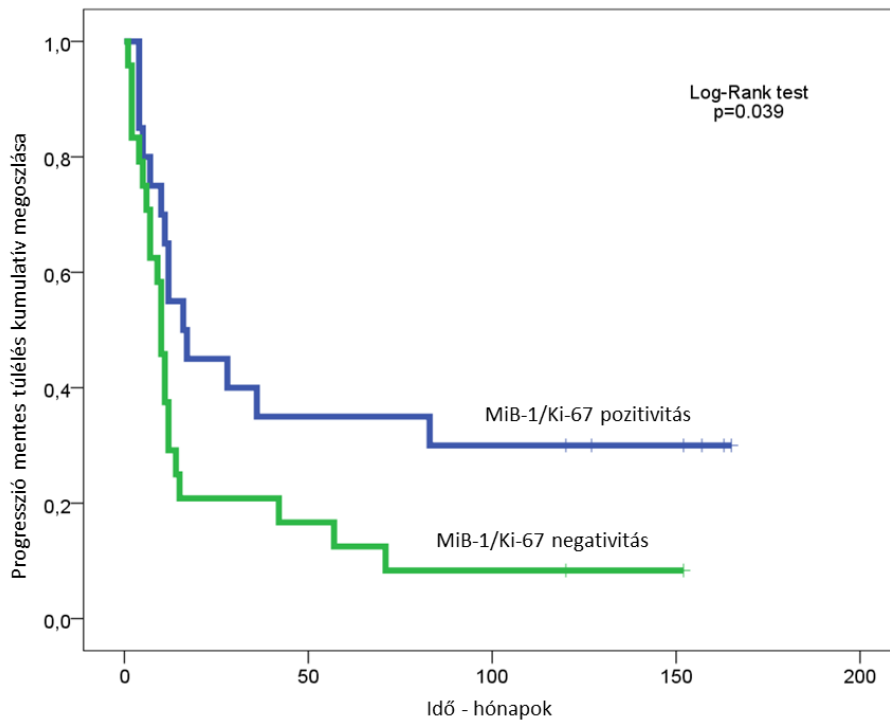
Progresszió mentes túlélés: Az optimális tumor eltávolítás pozitív prediktív értékkel rendelkezik, összehasonlítva a szuboptimális tumor eltávolítással, statisztikai analízissel mind az egyváltozós (14,00 mo vs. 42,93 mo.; $p = 0,001$), mind a többváltozós (0,329; $p = 0,002$) analízissel kimutathatóan. 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.; $p = 0,039$) (VI. táblázat).

VI. táblázat: Prognosztikai vizsgálat eredményeit összefoglaló táblázat. Egy- és többváltozós, korai progresszió kimutatására irányuló analízis.

Egy- és többváltozós analízis a progresszió mentes túlélés függvényében							
Változók		Kaplan-Meier (Log-Rank teszt)			Cox regresszió		
	n=44	Mean (95% CI) (hónapok)			HR (95% CI)		
Kor (évek)				p		p	
65 ≤	20 (45)	39,75 (16,92-62,57)			0,999		
<65	24 (55)	43,96 (18,80-69,12)					
Szöveti típus							
szerózus	31 (70)	33,55 (15,20-51,90)			0,232		
egyéb	13 (30)	64,69 (26,75-102,64)					
Reziduális tumorméret							
szuboptimális	22 (50)	14,00 (4,01-23,99)			0,001	0,325 (0,147-0,718)	0,002
optimális	22 (50)	42,93 (25,20-60,66)					
Differenciáltsági fok (grade)							
G3	21 (48)	27,52 (8,75-46,30)			0,065		
G1, G2	23 (52)	55,87(28,51-83,23)					
β-catenin sejtmembrán reakció							
pozitív	33 (75)	47,03 (25,40-68,66)			0,55		
negatív	11 (25)	27,18 (5,60-48,76)					
β-catenin sejtmag reakció							
pozitív	6 (14)	93,33 (34,27-152,40)			0,102	3,54 (1,06-11,89)	
negatív	38 (86)	34,71 (17,96-51,46)					
E-cadherin sejtmembrán reakció							
pozitív	34 (77)	41,76 (22,11-61,42)			0,967		
negatív	10 (33)	45,70 (6,92-84,48)					
P53							
pozitív	25 (57)	32 (13,22-50,78)			0,248		
negatív	19 (43)	55,26 (24,99-85,54)					
Ki-67							
pozitív	24 (55)	26 (9,35-42,65)			0,039		
negatív	20 (45)	61,95 (31,47-92,43)					



X. ábra: Kaplan-Meier analízis diagram: A korai progresszió kumulatív megoszlása az optimális, sebészi tumor eltávolítás függvényében. Optimális tumor redukció mellett a korai daganatos kiújulás kevésbé gyakori.



XI. ábra: Kaplan-Meier analízis diagram: a korai progresszió kumulatív megoszlása a Ki-67 expresszió függvényében. A pozitív Ki-67 immunhisztokémiai reakció esetén várható a korai tumor progresszió.

A β -catenin nukleáris expressziót mutató 6 esetből 3 esetben, 12 hónapon túli tumor relapszust regisztráltunk, melyek közül egyben a sebészi tumor redukció szuboptimális volt. A platina reindukciós terápia ez esetben is sikeresnek bizonyult, a beteg 100 hónapot meghaladó teljes túlélést mutatott.

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 folyadék citológiai minták és szöveti tumor (primer tumor, áttét) minták immunhisztokémia reakciók százalékos megoszlási eredményét az alábbi táblázatok mutatják (**VII-X. táblázat**).

VII. táblázat: Primer tumor, metasztázis és ascites tumorsejtek összehasonlító táblázata. Az immunhisztokémiai és immuncitokémiai reakciók a vizsgált szövetminták és folyadék citológiai minták átlagos expresszióját mutatják.

Immunhisztokémiai és immuncitokémiai expressziós profil 1.						
	Tumorszövet			Ascites		
	primer tumor	metasztázis		primer tumor	metasztázis	
	n=21	n=6	p	n=21	n=6	p
p53	41,48±34,90	66,33±41,38	0,151	28,95±35,70	48,00±44,77	0,319
Ki-67	19,62±20,72	16,00±17,80	0,702	25,65±19,86	26,00±33,67	0,976
E-cadherin	32,14±27,41	28,60±36,28	0,809	42,10±29,94	26,50±33,71	0,287
β-catenin	82,00±16,84	76,67±17,80	0,505	55,09±33,35	73,80±26,42	0,258

VIII. táblázat: A tumorszövetek és ascites tumorsejtek átlagos expresszióját összehasonlító táblázata. Az immunhisztokémiai és immuncitokémiai reakciók a vizsgált szövetminták és folyadékcitológiai minták átlagos expresszióját mutatják.

Immunhisztokémiai és immuncitokémiai expressziós profil 2.				
	n=	Tumorszövet	Ascites	p
p53	25	45,56±38,00	32,76±37,47	0,001
Ki-67	25	19,08±20,56	25,72±22,38	0,101
E-cadherin	25	31,40±29,11	39,52±31,07	0,294
β-catenin	26	82,19±15,57	58,77±32,52	0,006

IX. táblázat: Immunhisztokémiai expressziós profil, a daganatok differenciáltsági fokának függvényében. Az immunhisztokémiai és immuncitokémiai reakciók a vizsgált szövetminták és folyadékctológiai minták átlagos expresszióját mutatják.

Immunhisztokémiai és immuncitokémiai expressziós profil 3.						
	Primer tumor			Ascites		
	low-grade	high-grade		low-grade	high-grade	
	n=9	n=18	p	n=9	n=18	p
p53	24,89±25,68	58,06±37,52	0,039	2,43±1,99	44,56±38,14	0,067
Ki-67	6,22±6,87	25,11±21,30	0,004	6,86±6,39	33,06±22,12	0,002
E-cadherin	33,75±32,71	30,44±27,42	1,000	40,22±29,12	37,59±32,61	0,571
β-catenin	78,67±18,01	81,89±16,69	0,660	54,38±33,85	60,72±32,71	0,559

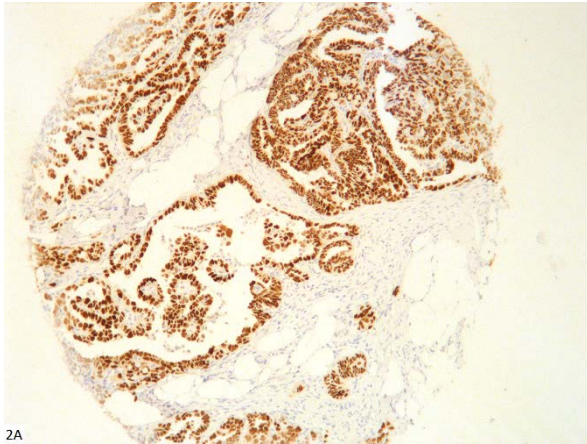
X. táblázat: Expressziós profil a tumor stádiumának függvényében. Az immunhisztokémiai és immuncitokémiai reakciók a vizsgált szövetminták és folyadékctológiai minták átlagos expresszióját mutatják.

Immunhisztokémiai és immuncitokémiai expressziós profil a tumor stádiumának függvényében						
	Primer tumor			Ascites		
	I-es stádium	II-IV-es stádium		I-es stádium	II-IV-es stádium	
	n=6	n=21	p	n=6	n=21	p
p53	44,17±34,71	47,81±38,55	0,837	19,20±27,09	36,15±39,48	0,377
Ki-67	11,67±10,84	20,86±21,50	0,326	14,40±9,58	28,55±23,90	0,054
E-cadherin	44,83±29,07	27,45±27,83	0,196	40,00±37,58	38,14±30,15	0,907
β-catenin	86,00±17,03	79,33±16,93	0,404	21,83±17,90	69,85±27,33	<0,001

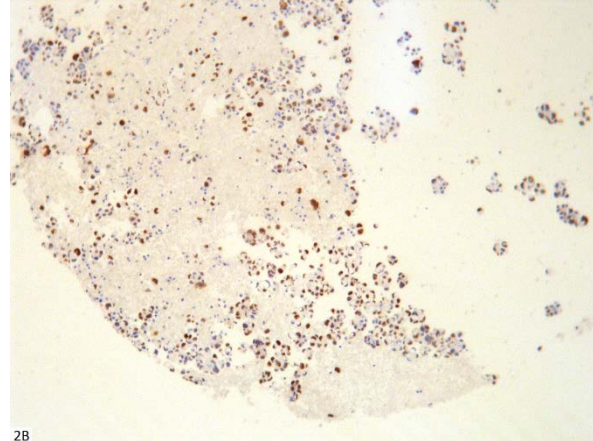
A tumorszövetek immunhisztokémiai reakcióit és a malignus ascites immuncitokémiai jelölődését az alábbi ábra párok szemléltetik (XII-XIX. ábra).

Szöveti multiblokk mintahenger

Sejt-multiblokk mintahenger



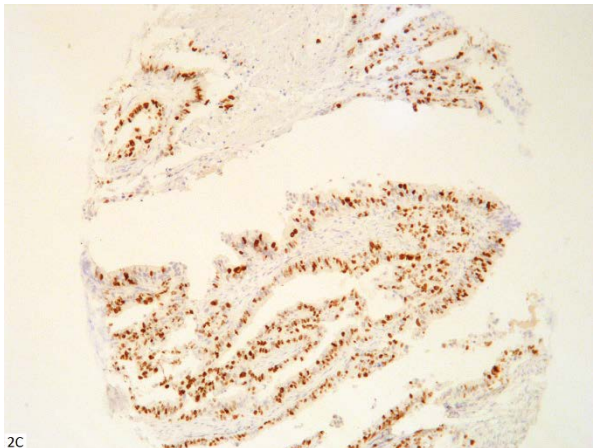
2A



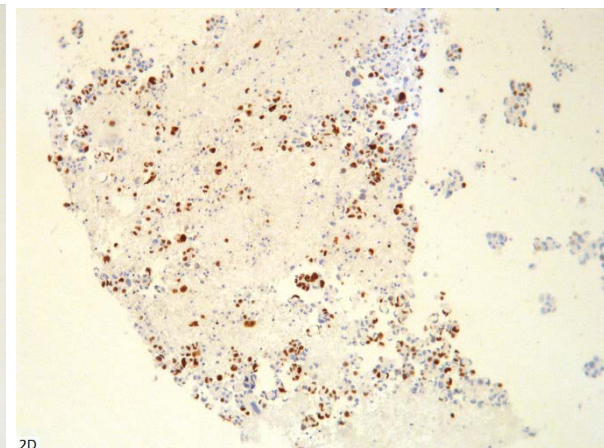
2B

XII. ábra: p53 immunhisztokémiai reakció sejtmagi jelölődése szolid tumorban (100x)

XIII. ábra: p53 immuncitokémiai jelölődése malignus ascites sejtblokk mintájában (100x)



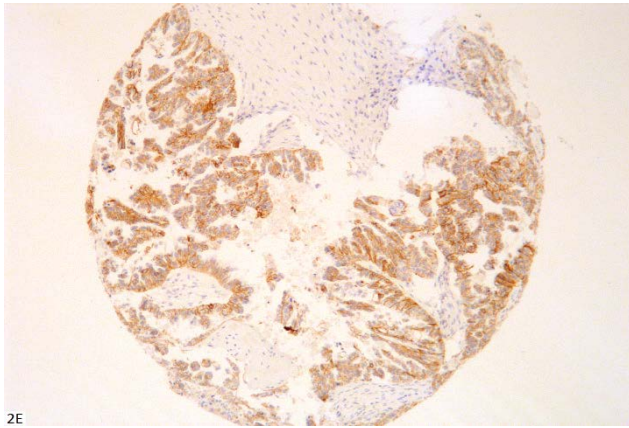
2C



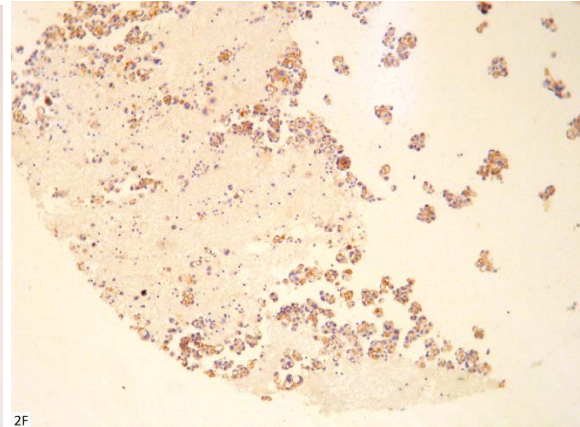
2D

XIV. ábra: Ki-67 immunhisztokémiai reakció sejtmagi jelölődése szolid tumorban (100x)

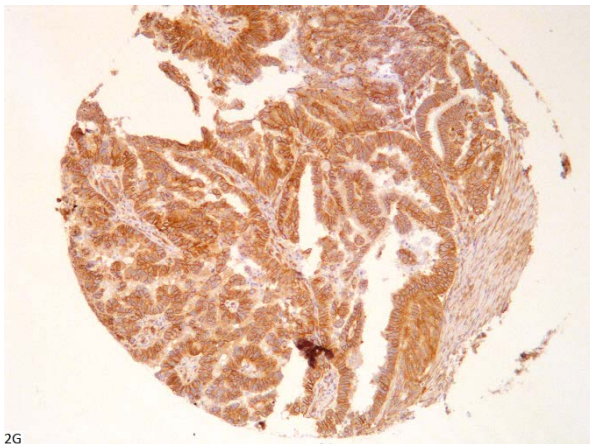
XV. ábra: Ki-67 immuncitokémiai reakció sejtmagi jelölődése malignus ascites sejteken (100x)



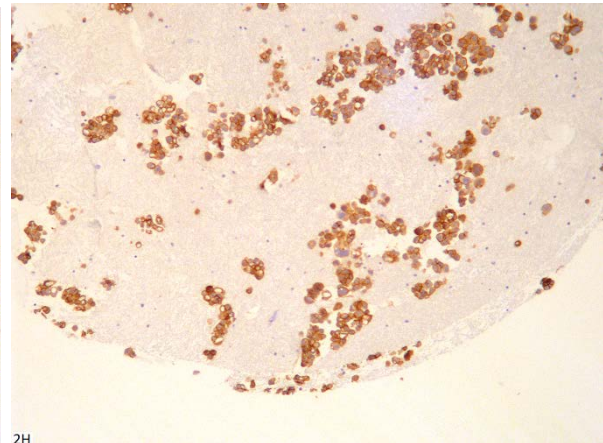
XVI. ábra: E-cadherin immun-hisztokémiai reakció szolid tumorban **(100x)**



XVII. ábra: E-cadherin immun-hisztokémiai reakció malignus ascites sejtblokk mintájában **(100x)**



XVII. ábra: β -catenin immunhisztokémiai reakció szolid tumorban **(100x)**



XIX. ábra: β -catenin immunhisztokémiai reakció malignus ascites sejtblokk mintájában **(100x)**

Tumorszövetek 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 sejtjei 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 sejtjei és a mellette lévő ascites által hordozott tumorsejtek ugyanakkor hasonló adhéziós molekula expressziós profilt mutattak. Az ascitesben lévő tumorsejtek szignifikánsan alacsonyabb p53 expresszióval jellemezhetők, ugyanakkor emelkedett a proliferációs aktivitásuk.

Eredmény összefoglalás:

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.

Megbeszélés

Olyan kifejezetten magas mortalitású megbetegedés esetében, mint a malignus petefészek daganat különösen, fontos a kliniko-patológiai korreláció elemzés. A petefészek daganatok esetén ez nem könnyű feladat, mivel a petefészek epithelialis daganatai heterogén csoportot alkotnak, és ez együtt jár a változatos molekuláris háttérrel. Az epithelialis petefészek daganatok molekuláris patogenezis szerint alapvetően két fő csoportba, high-grade és low-grade; a besorolás alapját a háttér molekuláris mechanizmusok adják.

A low-grade daganatok BRAF, KRAS, ARID1A, PTEN, CTNNB1, PIK3CA, ERBB2 és esetleges járulékos TP53 gén mutációval rendelkeznek, mind morfológiailag, mind genetikailag különböznek. Egyedüli hasonlóság a többnyire kevésbé progresszív, alkalmanként indolens lefolyás. Habár e tumoroknál is az esetek kb. 30%-ában előrehaladott stádium észlelhető, a kimenetel kedvezőbb.

A high-grade tumorok esetében viszonylag homogén genetikai mutációs profil áll a háttérben, melyek alapja a TP53 génmutáció. E mellett számos további, leginkább csak addicionális, a TP53 génmutáció által kiváltott további mutációk alakulnak ki. A TP53 gén mutációja szoros összefüggést mutat a BRCA gének mutációival, több más daganatos betegség egyidejű fennállását is eredményezhetik. A TP53 gén jelentős tumor szuppresszor gén, mutációja több egyéb daganatban (pl. „colorectalis” daganatok) is kimutatható (128). A TP53 gén és fehérje termékének sejtproliferáció gátlása és apoptózis indukciója a sejtmagban váltja ki hatását, megakadályozva a kontrollálatlan DNS transzkripciót; hatására a hibás szakaszok tovább örökítése nem megy végbe, a „forrás-genom” konzerválása megtartott. A p53-p21 szoros interakciója által a sejtciklus G1 fázisában kiváltott stop hatására a sejt kilép a sejtciklusból, a DNS javítása elkezdődhet. Amennyiben a szomatikus sejtek genetikai állomány károsodása olyan mértékű, hogy a javítás várható sikerrel nem jár, a p53 fehérje apoptózis indukáló hatása érvényesül (129). A TP53 gén mutációja valamennyi malignus tumor között a legmagasabb arányú, sporadikus tumorok mintegy 50%-ában p53 diszfunkció miatt a „ciklus-kontroll” elvész, ami emelkedett proliferációs aktivitást eredményez. Ez általánosan rossz prognózissal jár.

A TP53 gén mutációja direkt kimutatható DNS szekvenálással, illetve a p53 fehérje immunhisztokémiai módszerrel azonosítható sejtmagra lokalizálódó pozitivitással

jellemezhető (130). A TP53 gén mutáció fokozott proliferációt eredményez és az apoptózis funkció gátlásához, valamint kromoszómális instabilitáshoz vezet (130). Több szerző is rámutatott a high-grade petefészek daganatok kialakulásában meghatározó jelentőségű TP53 gén mutációra, mely kifejezetten rossz prognózissal, progresszív állapotromlással jár; a betegek a diagnózis pillanatában már előrehaladott stádiumban vannak. (131). Eredményeink is ugyanezt mutatják - a high-grade daganatok szignifikánsan magasabb p53 fehérje expressziót mutattak. Vizsgálati anyagunkban a high-grade daganatok és társuló ascites p53 fehérje expressziója a low-grade, daganatokhoz és társuló asciteshez képest magasabb volt. Mindemellett megemlíthető, hogy az ascitesben lévő tumorsejtek p53 fehérje expressziója szignifikánsan csökkent a primer tumorhoz képest. Figyelembe véve a szomatikus TP53 gén mutációt, mint korai esemény az ovariális karcinogenezisben, nagy valószínűséggel ennek hatása a metasztázis képzésre inkább következmény. A metasztatikus fenotípus indukciós hatású faktora, ám a daganatos terjedés fenntartásában, illetve a metasztatizálásban szerepe korlátozott lehet (132, 133).

A fenti gondolatmenetek értelmében némi magyarázatra szorul az, hogy prognosztikai vizsgálatunkban az előrehaladott petefészek daganatok között a p53 fehérje expresszió pozitív, „high-grade” daganatok nem képviseltek irodalmi értékeket képviselő százalékos arányt. Adatainkat több tényező magyarázza. Egyrészt túlélési vizsgálatunk beteg/minta populációja erősen szelektált, mivel egy határozottan kedvezőtlen és kedvező kórlefolyást mutató beteg csoportot kívántunk összehasonlítani. A DEOEC (később DEKK) Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájának csaknem egyedülálló évtizedes beteg követési és utógondozási profilja lehetőséget teremtett a hosszú távú túlélés vizsgálatára pontosan dokumentált betegmintákon. A szélső vizsgálati „end-point”-ok (12 hónapon belüli recidíva, 100 hónapon túli teljes túlélés) szelekciós alapon zárták kis azon betegek nem kyszámú csoportját, akik esetben biztató eredményű primer tumor redukció, illetve platina szenzitivitás ellenére egy évet meghaladóan progrediáltak vagy nagy számban az általunk definiált hosszú távú túlélés előtt elhaláloztak. Ez a populáció irodalmi adatok szerint is igen jelentős méretű (134). Másrészt, mint ahogy vizsgálatunk rámutatott és ezt a patogenezis is megerősíti a β -catenin expresszió és a háttérben álló CTNNB1 génmutáció előfordulhat, de nem jellemző a serosus fenotípusú daganatokra - különösképp nem a high-grade típusra (36). Ezek alapján az általunk észlelt β -catenin expresszió, mely

egyszerre mutatkozik a sejtmembránon (valójában a citoplazmában a sejtmembrán belső oldalához kötődve) és a sejtmagban, olyan jelenség, mely leginkább a „nem-serosus” és „nem- világos-sejtes” fenotípusra jellemző. Felmerülhet további kérdés, hogy a patogenezis ismeretében miért tulajdonítunk jelentőséget a nem serosus daganatok jellemző β -catenin expressziójának (135, 136). Erre a molekuláris háttér komplexitása ad választ. Wnt - β -catenin tengely nem csupán egy egyirányú, kizárólagos jellegű aktiválódási útvonal. Ismeretes a β -catenin nem kanonikus útvonalának aktivációja különböző ligandok általi is megvalósulhat. Adott esetben a Wnt jelátviteli útvonal és célzott sejtmagi hatások sejtfelszíni ligand kapcsolódása nélkül is létrejöhetnek (137, 138). Ennek alapján a daganatsejtek egy belső, genetikai, epigenetikai szabályozó rendszer által alternatív aktiválódása következtében indukálhatnak további folyamatokat - külső befolyás nélkül, más aktivációs útvonal érintésével. Az E-cadherin és β -catenin sejtmembrán asszociált intercelluláris kapcsolatot fenntartó és jelátvitelben szerepet játszó folyamatok szoros egységét képezi, mely a két molekula és velük összefüggésben levő jelátviteli útvonalak és hatásfolyamok párhuzamos vizsgálata indokolt. A két molekula egymásra hatása legalább annyira szoros, mint az egymástól független szerepe.

Az irodalomban számos tanulmány foglalkozott az E-cadherin és β -catenin expresszió petefészek karcinogenezisben betöltött szerepével. Számos kutatócsoport más-más aspektusból vizsgálta a molekuláris és immunfenotípusos jellegzetességeket (136). Egyes közlemények szerint a β -catenin membrán pozitivitása, illetve annak erőssége prognosztikus jelentőséggel rendelkezik (139). A folyamat hátterében a Wnt jelátviteli útvonal aktivációja tehető felelőssé, ami adott körülmények között alternatív módon is aktiválódhat, ezzel a daganatsejt a túlélés, apoptózis gátlás, proliferáció determinált útjára lép (135). Az irodalmi adatokat is figyelembe véve munkánk során könnyen reprodukálható kategóriákat állítottunk fel a reakciók kiértékeléséhez. Ellentétben egyes irodalmi adatokkal, egyezve más szerzők munkáival a jelölődés erősségének bonyolult, nehezen reprodukálható és meglehetősen szubjektív vizsgálata helyett „cut-off” értéket határozzunk meg, illetve átlagos reakciópozitivitást, százalékosmegoszlást vizsgáltunk. Eredményeinket számos korábbi tanulmány támogatja (140). Habár irodalmi adatok szerint ismert az E-cadherin ovariális karcinogenezisben betöltött szerepe (vizsgálati anyagunkban korai progresszióra és hosszú távú túlélésre nem volt hatással), nem szabad elfelejteni, hogy ez, az általunk is alaposan vizsgált molekula

számos más peritonealis disszeminációt okozó daganatban előfordul (86). Mi több, epithelialis daganatok esetében az E-cadherin expresszió, más daganatoknál az E-cadherin vesztés egyfajta metasztatikus fenotípusra jellemző (104). Ezen a ponton válik érdekessé a celluláris kapcsoló struktúrák és társuló jelátviteli utak vizsgálata, különösen a hasüregi daganatos disszeminációban betöltött szerepe. A malignus epitelsejtek kilépve a szöveti környezetükből folyadékterbe jutnak, ahol számos, eddig vélhetően nem ismert (vagy nem tudunk róla) sejtfelszíni etióppal, „proteoglycanokkal”, fehérjékkel találkoznak. Ezek döntő része peritonealis mezotelsejtek felszínén van, illetve a peritonealis folyadékban sodródik. A levált daganatsejtek ebben a milióban e felszíni molekulákkal és ez által a jelen levő sejtekkel intim viszonyba kerülnek - daganatos terjedése megvalósul (141). Egy sor molekuláris, morfológiailag is megjelenő („sferoid”, PMS, fibronektin kapcsolódás) változás áll fenn, mely az ovariális daganatsejt és a peritonealis sejtek közötti aktív interakció alapja (86).

A disszeminációt követően a már klinikai jeleket mutató, előrehaladott stádiumot okozó hasüregi kiterjedés mögött egy másik érdekes kliniko-patológiai jelenség mutatkozik. Egyedül a petefészek karcinómák és petefészek asszociált (petevezető, primer peritonealis daganat) daganatok kapcsán része a terápiának a radikális, optimális tumor redukció, mely adott esetben akár kiújulás esetén is elvégezhető (6). Amennyiben más daganatok - hasnyálmirigy, gyomor, vastagbél - hasüregi disszeminációt mutatnak, a stádium előrehaladottsága miatt tumorvolumen csökkentő célú sebészi beavatkozás már nem történik, szisztémás/palliatív terápia kezdődik (142). Ezzel ellentétben hasüregi disszeminációt mutató petefészek terápia szerves része az optimális tumor redukció (143, 144). A sebészi beavatkozás akár a kemoterápia előtt, illetve közben elvégezhető függően a beteg aktuális állapotától, a daganatos kiterjedéstől (145, 146). Az onkosebészeti beavatkozás lehetőségét és jelentőségét az ovariális daganatsejtek és peritónium közötti interakció teremtheti meg. A peritónium és a peritonealis üreg, amellet, hogy teret és lehetősége biztosít a daganatsejtek szabad vándorlásának, egyfajta barriert is jelent (147). Az implantálódott és valódi metasztázisként funkcionáló, „desmoplasticus” stromával rendelkező ovariális tumorszövet góccok valódi, mély - más tumorokban jól ismert - penetrációs képességgel nem rendelkeznek, illetve ez a hatási itt kevésbé érvényesül (148). A hasüregi daganatszövet nodulusokat képezve szűri át a hasüreget, egyre komplexebb adhéziókat okozva, de még mindig viszonylag felszínesen - kiterjedt

destrukció nélkül (85). Ez az eltérő morfológiai jelenség teremti meg a lehetőségét a szolid tumorok körében kivételes radikális sebészi-onkológiai beavatkozásoknak, amelyeknek a tumor tömeg redukció mértéke szerinti fokozata, a vizsgált időszakhoz képest jelentősen emelkedett, a klinikai és patológiai tapasztalatok és műszerpark fejlődése következményeként. Napjainkra a beteget akár tumor mentessé tevő radikális sebészeti tumorredukció az előrehaladott stádiumú petefészekrák multimodális onkoterápiájának meghatározó tényezőjévé vált, a beavatkozást a kórlefolyás során, szükség esetén akár többször is alkalmazva.

Az epithelialis petefészek daganatokat háttérben álló molekuláris eltérések klinikailag nem mindig azonosíthatók. Annak ellenére, hogy a sokrétű molekuláris háttér tipizálható, a klinikai gyakorlat és adatbázisunk eredménye azt mutatja, hogy a petefészek daganatok az esetek felében már jelentős hasüregi terjedést mutatnak a diagnózis pillanatában. E két faktor - molekuláris fenotípus és malignus ascites - komplex vizsgálata és klinikai környezetben való értelmezésére van szükség, amennyiben hatékony, sikeres terápia alkalmazása a cél.

A klasszikus prognosztikai faktorok továbbra is meghatározóak, melyet vizsgálatunk is alátámasztott – az optimális tumor redukció, a serosus fenotípus önálló prognosztikus értékkel rendelkezik. Jelen tanulmányban szelektált, homogén betegcsoportjainkon végzett kísérleteink során is ezt vizsgáltuk adhéziós jelátviteli molekula - E-cadherin, β -catenin, Ki-67 proliferációs marker és p53 tumor szuppresszor gén – fehérje expressziós elemzésével. Irodalmi adatoknak megfelelően, saját anyagunkon is bebizonyosodott, hogy a „high-grade” ovárium tumorok magasabb proliferációs aktivitással rendelkeznek, mint a „low-grade” tumorok (139, 149). Megerősítettük, hogy a p53 expresszió a „high-grade” daganatokban gyakrabban fordul elő. Mindemellett új eredmény, hogy előrehaladottabb tumorstádiumban az E-cadherin expresszió alacsonyabb, mint a korai stádiumokban. A β -catenin immunhisztokémiai jelölődés némileg alacsonyabb előrehaladottabb stádiumban. Az áttéti tumorok E-cadherin és β -catenin expressziója hasonló az előrehaladott primer tumorokéhoz, miközben az ascites tumorsejtjeiben az E-cadherin expresszió fokozódik, a β -catenin membrán expressziójában markáns csökkenés figyelhető meg. Mindemellett a sejtmagban észlelt β -catenin pozitivitás ugyancsak előrehaladott daganatok esetében a hosszú távú túléléssel mutat összefüggést.

Kijelenthető, hogy a primer és áttéti tumorok eltérő fehérje expressziós profilt mutatnak a vizsgált markerekkel – a szöveti tumorok jobban elkülönülnek a malignus ascitestől – vagyis az általunk vizsgált mintákban, az általunk vizsgált markerekkel a szöveti daganatok több hasonlóságot mutatnak egymással, legyenek akár primer, akár metasztatikus tumorok, mint az ascitessel. A daganatos hasüregi folyadékban látható sejtek immun profil erőssége eltér a szöveti tumorokétól. Az E-cadherin - β -catenin komplexet érintő expressziós aszinkronia és a komplexszel összefüggő jelátviteli utak kiváltotta immunfenotípus változások alapját képezik a petefészek karcinómák hasüregi folyadéktérben való terjedésnek.

E folyamatok összessége bizonyos mértékig morfológiai értelemben vett fenotípusos változást is magában hordoz, mellyel a sejtek részben elveszítve epithelialis jellegüket, „mesenchymalisalodnak”, aktív mozgási képességre tesznek szert, melyhez a folyadéktér és peritonealis mezotél biztosítja a megfelelő közeget (EMT-MET).

Észleléseinket alátámasztó lehetséges magyarázat háttérében olyan mechanizmusok állnak, melyek összetett rendszerének feladata a daganatsejt változatos környezetben való életben tartása, további kilátásainak biztosítása, a proliferáció lehetővé tétele. Az epitelsejtek helyhez kötöttek, alapvetően stabil, illetve permanens állapotban vannak, önálló helyváltoztatásra „már” nem képesek. Ezzel ellentétben a daganatok nőnek, terjednek, helyet változtatnak, vérerekbe, nyirokerekbe terjedhetnek, testüregekbe infiltrálhatnak. Ehhez az energiaigényes folyamatsorozathoz szükséges az epitelsejtek intrauterin fejlődésének egy bizonytalan, de korai szakaszában elveszített funkció „visszanyerése” - a daganatsejtek ismét mozgásképesé válhatnak. A funkció „visszanyeréséhez” az intercelluláris kapcsolóstruktúrák felbomlásához, a sejtvezeték átrendeződéséhez van szükség. A daganatsejtek az ascites folyadéktérben sajátos alakot öltenek („spheroid”), korábbtól eltérő integrin expressziós profilt váltanak, illetve mátrix metalloproteázokat termelnek, alkalmassá téve őket a helyváltoztatásra, illetve képessé az időzített megtapadásra. Az egyik legjelentősebb sejtmembrán asszociált kapcsoló struktúra az E-cadherin, mely széles körben vizsgált, és jól ismert intracelluláris doménjének a β -cateninrel való összefüggése.

A hasüregi disszemináció folyamán egy igen komplex és aktív folyamat, folyamatsorozat zajlik le. Ennek elengedhetetlen részese a leváló, „mesenchymalizálódó”, morfológiailag megváltozó epitelsejt, melynek sejt felszíni

epitópjai és citoszkéletális struktúrái átrendeződnek a lehető legjobb „utazási feltételeket” biztosítva. További sarkalatos pont a keringő, levált, megtapadásra készen álló „mesenchymalizálódott” epitél sejt fogadására alkalmas peritonealis felület. A PMS-ek sajátos „elidősülő”, de aktívan funkcionáló különleges felületet alkotnak, melyek egyszerre válnak alkalmas felületévé és akadályává a megtapadásnak. Amint a megtapadás létrejött, a szokványos metasztázis kialakulással ellentétben a peritóneum stromális kompartmentje által barrierizált növekedés indulhat meg. Emiatt a penetrációs készség és a „mass forming” jelenség reciprok módon van jelen - ami a petefészek daganatok terápia lehetőségét részben adja. Ez a térben és időben egységesített folyamat, melyhez elengedhetetlen egy olyan korai daganatsejteket érintő intracelluláris változás, mint az EMT, majd reverz MET - amit a peritóneum felől MMT kísér. Az átmenet során a daganatsejtek közötti adhézió felbomlik, a citoskeleton reorganizálódik, az adhéziós molekulaprofil megváltozik. Általánosan jellemző az E-cadherin expresszió csökkenése, míg a „mesenchymális” sejtekre jellemző N-cadherin expresszió megjelenik („cadherin-switch”), a β -catenin intracellulárisan rekompartimentalizációdik. A tumorsejtek megtelepedését követően, a kitapadás lokális befejeződése után „mesenchymális-epitheliális transitio” indul meg. A tumorsejtek ismét jelentősebb mértékben expresszálják az E-cadherin sejtfelszíni adhéziós molekulát, az N-cadherin regressziója figyelhető meg.

Jelen tanulmányunk eredményei is ezt az elgondolást támasztják alá. Az adhéziós molekula expressziós profilban észlelt változások arra utalnak, hogy a primer szöveti epithelialis petefészek karcinómák és peritonealis áttétek immunmorfológiai eltéréseik ellenére jobban hasonlítanak egymásra, mint az ascites sejtjei. A petefészek daganatok társuló malignus asciteseinek immunprofilja merőben más jellegzetességeket mutat vizsgálati anyagunkban. A háttérben, feltételezhetően, azon adaptációs készség állhat, amely a daganatsejtek fokozott túlélési képességét erősíti. Egyfajta EMT - MET közötti átmeneti állapotot vehetnek fel, mely egyszerre teszi őket képessé a leválásban, mozgásban, megtapadásban. Ennek az átalakulásnak a levezénylésében számos szignálút vonal időzített bekapcsolása szükséges, melyek indukálásában a malignus ascites speciális mikrokörnyezete, azt itt lévő további sejtek - tumor asszociált makrofágok, T-sejtek, illetve számos citokin, növekedési faktorok játszanak szerepet (150). Nagy valószínűséggel ez a disszociált, általunk „epithelial-

mesenchymal uncertainty” állapotként jelzett forma az, amely nem melleleg alapját képezheti az platina terápia hozzáférhetőségnek.

A Ki-67 proliferációs markert az aktív sejtciklusban G1, S, G2 és M fázisban lévő sejtek expresszálják. Magasabb tumor stádium esetén magasabb proliferációs aktivitást láttunk, ugyanakkor a metasztázisokban némileg alacsonyabb indexet észleltünk, míg az ascitesben levő tumorsejtek fokozott proliferációs aktivitást mutatnak. Az ascitesben észlelt magasabb proliferációs aktivitás háttérében a tumorsejtek optimális számban tartása állhat mint cél, a mihamarabbi és legteljesebb kolonizáció érdekében (151).

Vizsgálatainkat „microarray” technikára alapoztuk a TMA és CMA metodikát alkalmazva. A szöveti microarray metodika kifejlesztésében az első mérföldkő Battifora nevéhez fűződik-„multitumor tissue block” (113). Később a metodikát mai formájában Kononen, Kallioniemi és társai tökéletesítették (114, 115). Az elmúlt években számos nagy tanulmány vizsgálta és igazolta a módszer használhatóságát, bizonyítva, hogy az irodalomban elismert „high-throughput”-tal rendelkezik (152). TMA és CMA metodika segítségével nagyobb számban, költséghatékonyan, homogén kísérletes körülmények között figyelhettük meg az expressziós profilokat. A TMA metodika hibájaként felróható a forrás tumorszövet kis részletének vizsgálata, a teljes metszethez viszonyítva – ez az esetleges intratumorális tumor heterogenitás miatti hibákat eredményezhet. Számos más munkacsoporthoz hasonlóan, több mintahenger beültetése történt, mellyel a minták alulreprezentáltságát igyekeztünk kivédeni. Több mintahenger TMA blokkba való beépítése nagyobb reakció- és értékelési biztosságot és reprezentativitást adott. Az intratumorális heterogenitás miatt a szöveti metszeteken és „donor blokkokon” való előzetes tájékozódás elengedhetetlen, tervezett, célzott feladat. A randomszerű mintavétel következményesen rontja a reprezentativitást. Minél több mintahenger beültetése történik, minél nagyobb keresztmetszetű mintahengerekkel, egy bizonyos határig, várhatóan annál nagyobb lesz a reprezentativitás. Mindemellett, a nem értékelhető esetek aránya is csökken. Vitathatatlan előny az időben és térben különösen magas szintű standardizált reakciókörülmények megteremtése, mely a rutin szövetmetszeteken végzett vizsgálatok értékét is meghaladja.

A TMA metodikát már 2002-ben megpróbálták adaptálni a citológiai minták vizsgálatára. Moskaluk, majd Waterworth mutatta be a citológiai microarray metodikát (125, 126). 2006-ban Bubendorf szerkesztőségi közleményében hívta fel a figyelmet a TMA citológiai alkalmazásának lehetőségeire. Kiemelte, hogy a citológiai TMA alkalmas lehet azon esetekben, ahol nem áll rendelkezésre szövetminta, csupán a malignus effúziókból, cisztikus tumorokból vagy metasztázisokból nyert citológiai minták. Kiválóan alkalmas lehet a metasztázis képzés mechanizmusának vizsgálatára. Ugyanakkor meglepőnek tartotta, hogy ezirányban még nem jelentek meg közlemények. Bár a CMA metodika validációját Pu és munkatársai elvégezték, és azóta a TMA alkalmazásával számos vizsgálat eredményét publikálták, mégis, az eltelt egy évtizedben csak szórványosan, néhány munkacsoport alkalmazta a CMA metodikát (153, 154). A Bubendorf által felvetett lehetőség- a metasztázis képződés patomechanizmusának vizsgálata- legjobb tudomásunk szerint ezidáig még egy közleményben sem szerepelt. Mindazonáltal, az eddigi próbálkozások nyomán haladva, magunk is megpróbáltuk a CMA módszert alkalmazni, a TMA-val elért korábbi tapasztalatainkból kiindulva. Magunk vastagabb mintahenger átmérőt (2mm) választottunk, a reprezentativitás és a nagyobb sejtszám elérése céljából. Korábbi szerzők adatai alapján mi is a 3 mintahenger / minta számot tartjuk ideálisnak, melyről már bebizonyosodott, hogy magas konkordanciát mutat az egész metszeten végzett vizsgálatok eredményével (155).

Figyelembe véve a jelenlegi irodalom és jelenlegi kutatási trendek irányait, azon vizsgálatok, amelyekben kevésbé a tumor/stróma arány, mintsem inkább a tumor, gyulladásos infiltrátum viszonyának felderítése a cél javasolható a folyadék alapú mintahenger alapú metodika használata. Kiválóan alkalmas lehet a TMA/CMA technika T-sejtek és tumorsejtek százalékos expressziós arányának kimutatására. A tumorsejtek vizsgálata melletti malignus effúziókban lévő sejtes elem vizsgálatára, így a metasztázis képzés további eseményeinek vizsgálatára is alkalmas a metodika, például a mellüregi folyadékban és a már fennálló pl. tüdőkarcinóma immunblokádnak irányú vizsgálatára is.

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.

Összefoglalás

Előrehaladott epithelialis eredetű petefészek daganatok esetében számítani lehet a korai relapsusra, illetve a kedvezőtlen teljes túlélésre; a FIGO stádium, tumor grádus, szöveti típus és reziduális tumorszövet jelenléte a legfontosabb kliniko-patológiai prognosztikus jellemző. Mindezek ellenére az irodalomban nem ismeretlen a hosszú távú túlélés. Az epithelialis eredetű petefészek daganatok további jellegzetessége a malignus ascites képzés és peritonealis terjedés, metasztázis képzés, melyben a sejtheadziós molekulák alapvető szerepet játszanak - e folyamat hátterében ún. „epithelialis-mesenchymalis” átalakulás áll.

Tanulmányunk célja a β -catenin, E-cadherin, p53, és Ki-67 molekuláris / immunhisztokémiai faktorok vizsgálata a következő kérdésekben: Megjósolható-e a korai progresszió, illetve a hosszú távú túlélés, a klasszikus prognosztikai faktorok mellett immunhisztokémiai reakcióval? Igazolható-e a fenti molekulák interakciója, expressziós profiljuk változása a petefészek daganatok áttétképződésében? Alkalmos-e a citológiai microarray (CMA) technika áttét, illetve malignus ascites sejtblokk alapú vizsgálatára?

Módszerek: β -catenin, E-cadherin, Ki-67, and p53 immunhisztokémiai reakciók vizsgálatát végeztük előrehaladott petefészek daganatok esetében, összehasonlítva a klasszikus prognosztikai faktorokkal – az eredményt statisztika analízissel igazoltuk. A petefészek daganatok szöveti tumoros és ascites immunhisztokémiai mintáit szöveti és citológiai microarray módszerrel hasonlítottuk össze.

Eredmények: A reziduális tumorszövet a legjelentősebb kedvezőtlen független prognosztikus faktor a teljes túlélés tekintetében ($p = 0.003$, $p = 0.005$) – mely az irodalomban széleskörűen igazolt. A β -catenin sejtmagi jelölődése kedvező független prognosztikus faktora az előrehaladott petefészek daganatoknak a hosszú távú túlélés előrejelzésében, szerepe lehet a platina szenzitivitás és reindukció előre jelzésében. Az E-cadherin expresszió az ascites tumorsejtjeiben magasabbnak mutatkozott, a primer tumorokéhoz képest, ($p=0.294$), ellentétben a β -cateninnel, amely jelölődése szignifikáns csökkenést mutatott az ascites sejtjeiben, a primer tumorokéval összevetve ($p=0.006$). A Ki-67 alacsonyabb, a p53 magasabb expressziót mutatott a primer tumorokban, mint az ascitesben – p53 esetében az eredmény szignifikánsnak mutatkozott ($p=0.001$). Mindkét prognosztikus marker szignifikánsan emelkedett volt a high-grade primer tumorokban és az ascitesben is ($p=0.039$, $p=0.004$).

Megbeszélés: A klasszikus prognosztikai faktorok mellett a sejtmagi jelölődést mutató β -catenin reakció a hosszú távú túlélés prognosztikus markere, szerepet játszhat a platina-érzékenység kimutatásában. Az általunk vizsgált immunhisztokémiai markerek szöveti tumor sejtjei és ascites tumorsejtek expressziós profil változásainak hátterében az „epithelialis-mesenchymalis” átalakulás állhat; a megfigyelések alapjául szolgáló CMA módszer adekvát és ésszerű, használata alkalmazható és javasolható ascites minták disszeminált petefészek eredetű tumorsejtek analíziséhez.

Summary

Classical clinical parameters as histomorphology, grade, FIGO stage, and residual tumour mass have strong prognostic value in advanced epithelial ovarian carcinomas (AEOC). Most AEOCs are associated with early recurrence and poor overall survival (OS). Despite of early recurrence, general poor outcome, both high grade tumours or tumours with advanced FIGO stage at the time of diagnosis, in some of such cases, long-term survival (LTS) has been recorded . Moreover, peritoneal dissemination accompanied by ascites formation is also common in epithelial ovarian cancer (EOC). Adhesion molecules are crucial in metastatic spread and the latter involves epithelial-mesenchymal transition (EMT).

The aim of this study was to compare the utility of “classical” prognostic factors to molecular factors such as β -catenin, E-cadherin, p53, and Ki-67 labelling index determination in predicting long-term survival and to clarifying whether these molecules are inter-related in metastatic ovarian cancer, whether there are any possible correlation between cell adhesion molecular expression profiles, the proliferative activity and p53 expression of tumor cells and tumor grade and stage. We tested the cytology microarray (CMA) technique in analyzing metastasis formation.

Methods: The expression of β -catenin, E-cadherin, Ki-67, and p53 was determined by immunohistochemistry (IHC) in AEOC. Correlation was sought for between expression of these proteins and the status of classical features related with overall survival of patients -statistical evaluation was made. Both tumorous and ascitic samples from EOC patients were examined by using tissue microarray (TMA) and cytology microarray (CMA), respectively. CMA blocks were constructed using cores from each cell block of the ascitic specimens. Expression of E-cadherin, β -catenin, Ki-67 and p53 was immunohistochemically detected both in TMA and CMA blocks.

Results: As expected, residual tumour size was an independent adverse prognostic factor for OS ($p = 0.003$, and $p = 0.005$). Nuclear expression of β -catenin in advanced ovarian cancer of LTS patients proved to be not only an independent favourable predictor of OS ($p = 0.025$, $p = 0.041$) but also showed strong correlation with platinum sensitivity and platinum re-induction. E-cadherin expression was higher in ascitic cells than in primary tumor cells ($p=0.294$). β -catenin expression was significantly lower in ascitic cells than in primary tumor cells ($p=0.006$). Expression of Ki-67 was lower and expression of p53 was higher in primary tumors than in ascitic cells, for p53 the difference was significant ($p=0.001$). Both Ki-67 and p53 expression elevated significantly in high-grade primary tumor cells and in ascites cells ($p=0.039$, and $p=0.004$).

Conclusions: Translocation of stabilized β -catenin from cytoplasm to the nucleus plays an important role in predicting platinum sensitivity. Epithelial-mesenchymal transition-mesenchymal-epithelial transition is suggested as the best descriptive term for our IHC observations which accompany increased proliferative activity of ascitic cells. The CMA method is an adequate and reliable method for the analysis of ascitic tumor cells disseminating from ovarian malignancies.

Irodalom jegyzék

1. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med*. 2017 Feb;14(1):9-32.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018 Jan;68(1):7-30.
4. Siegel RL, Sahar L, Portier KM, Ward EM, Jemal A. Cancer death rates in US congressional districts. *CA Cancer J Clin*. 2015 Sep-Oct;65(5):339-44.
5. Bookman MA. Optimal primary therapy of ovarian cancer. *Ann Oncol*. 2016 Apr;27 Suppl 1:i58-i62.
6. Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2002 Mar 1;20(5):1248-59.
7. Colombo N, Pecorelli S. What have we learned from ICON1 and ACTION? *Int J Gynecol Cancer*. 2003 Nov-Dec;13 Suppl 2:140-3.
8. Paclitaxel plus carboplatin versus standard chemotherapy with either single-agent carboplatin or cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in women with ovarian cancer: the ICON3 randomised trial. *Lancet*. 2002 Aug 17;360(9332):505-15.
9. Hernádi Z, Krommer K, Mayer Á, Pulay T, Szánthó A, Thurzó L, Huga S: Conventional and high-dose cyclophosphamide+cisplatin (CP) chemotherapy of the advanced stage ovarian cancer in amifostine cytoprotection. *Int J Gynecol Cancer* 1999, 9, 5 S1
10. Becker G, Galandi D, Blum HE. Malignant ascites: systematic review and guideline for treatment. *Eur J Cancer*. 2006 Mar;42(5):589-97.
11. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.
12. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>
13. Stewart BW, Kleihues P et al (eds) (2003) World cancer report. World Health Organization International Agency for Research on Cancer Press, Lyon, p 219
14. Surveillance, Epidemiology, End Results (SEER). http://www.seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html?statfacts_page=ovary.html&x=15&y=17
15. Ottó Sz, Kásler M: Rákmortalitás és incidencia hazánkban az európai adatok tükrében. *Magyar Onkológia*, 2002, 46: 111-117
16. Goodman MT, Shvetsov YB. Incidence of ovarian, peritoneal, and fallopian tube carcinomas in the United States, 1995-2004. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Jan;18(1):132-9.
17. Surveillance, Epidemiology, End Results (SEER). http://www.seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html?statfacts_page=ovary.html&x=15&y=17
18. Kumaran GC, Jayson GC, Clamp AR. Antiangiogenic drugs in ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2009 Jan 13;100(1):1-7.
19. Wimberger P, Lehmann N, Kimmig R, Burges A, Meier W, Hoppenau B, et al. Impact of age on outcome in patients with advanced ovarian cancer treated within a prospectively randomized phase III study of the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group (AGO-OVAR). *Gynecol Oncol*. 2006 Feb;100(2):300-7.
20. Gilks CB, Ionescu DN, Kalloger SE, Kobel M, Irving J, Clarke B, et al. Tumor cell type can be reproducibly diagnosed and is of independent prognostic significance in patients with maximally debulked ovarian carcinoma. *Hum Pathol*. 2008 Aug;39(8):1239-51.
21. Alphas HH, Zahurak ML, Bristow RE, Diaz-Montes TP. Predictors of surgical outcome and survival among elderly women diagnosed with ovarian and primary peritoneal cancer. *Gynecol Oncol*. 2006 Dec;103(3):1048-53.

22. Tetsche MS, Dethlefsen C, Pedersen L, Sorensen HT, Norgaard M. The impact of comorbidity and stage on ovarian cancer mortality: a nationwide Danish cohort study. *BMC Cancer*. 2008 Jan 29;8:31.
23. Tanner EJ, Zahurak ML, Bristow RE, Diaz-Montes TP. Surgical care of young women diagnosed with ovarian cancer: a population-based perspective. *Gynecol Oncol*. 2008 Nov;111(2):221-5.
24. Beral V, Doll R, Hermon C, Peto R, Reeves G. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet*. 2008 Jan 26;371(9609):303-14.
25. Kurian AW, Balise RR, McGuire V, Whittemore AS. Histologic types of epithelial ovarian cancer: have they different risk factors? *Gynecol Oncol*. 2005 Feb;96(2):520-30.
26. Tan DS, Kaye S. Ovarian clear cell adenocarcinoma: a continuing enigma. *J Clin Pathol*. 2007 Apr;60(4):355-60.
27. Choi JH, Wong AS, Huang HF, Leung PC. Gonadotropins and ovarian cancer. *Endocr Rev*. 2007 Jun;28(4):440-61.
28. Ness RB, Modugno F. Endometriosis as a model for inflammation-hormone interactions in ovarian and breast cancers. *Eur J Cancer*. 2006 Apr;42(6):691-703.
29. Hernádi Z., Huga S., Lukácskó L. et al.: Rezisztencia a petefészekrákos betegek platina-bázisú kemoterápiája során – a paclitaxel, mint kezelési lehetőség. *Magy. Nőorv. L*. 2001;64:249
30. Markman M, Rothman R, Hakes T, Reichman B, Hoskins W, Rubin S, et al. Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J Clin Oncol*. 1991 Mar;9(3):389-93.
31. Bhoola S, Hoskins WJ. Diagnosis and management of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol*. 2006 Jun;107(6):1399-410.
32. Parmar MK, Ledermann JA, Colombo N, du Bois A, Delaloye JF, Kristensen GB, et al. Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. *Lancet*. 2003 Jun 21;361(9375):2099-106.
33. Bookman MA. Extending the platinum-free interval in recurrent ovarian cancer: the role of topotecan in second-line chemotherapy. *Oncologist*. 1999;4(2):87-94.
34. Winter WE, 3rd, Maxwell GL, Tian C, Carlson JW, Ozols RF, Rose PG, et al. Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 2007 Aug 20;25(24):3621-7.
35. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67.
36. Kurman RJ, Shih Ie M. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol*. 2016 Apr;186(4):733-47.
37. Seidman JD, Horkayne-Szakaly I, Haiba M, Boice CR, Kurman RJ, Ronnett BM. The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin. *Int J Gynecol Pathol*. 2004 Jan;23(1):41-4.
38. Ardighieri L, Zeppernick F, Hannibal CG, Vang R, Cope L, Junge J, et al. Mutational analysis of BRAF and KRAS in ovarian serous borderline (atypical proliferative) tumours and associated peritoneal implants. *J Pathol*. 2014 Jan;232(1):16-22.
39. Longacre TA, McKenney JK, Tazelaar HD, Kempson RL, Hendrickson MR. Ovarian serous tumors of low malignant potential (borderline tumors): outcome-based study of 276 patients with long-term (> or =5-year) follow-up. *Am J Surg Pathol*. 2005 Jun;29(6):707-23.
40. Shvartsman HS, Sun CC, Bodurka DC, Mahajan V, Crispens M, Lu KH, et al. Comparison of the clinical behavior of newly diagnosed stages II-IV low-grade serous carcinoma of the ovary with that of serous ovarian tumors of low malignant potential that recur as low-grade serous carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2007 Jun;105(3):625-9.
41. Maniar KP, Wang Y, Visvanathan K, Shih Ie M, Kurman RJ. Evaluation of microinvasion and lymph node involvement in ovarian serous borderline/atypical proliferative serous tumors: a morphologic and immunohistochemical analysis of 37 cases. *Am J Surg Pathol*. 2014 Jun;38(6):743-55.

42. Kurman RJ, Vang R, Junge J, Hannibal CG, Kjaer SK, Shih Ie M. Papillary tubal hyperplasia: the putative precursor of ovarian atypical proliferative (borderline) serous tumors, noninvasive implants, and endosalpingiosis. *Am J Surg Pathol*. 2011 Nov;35(11):1605-14.
43. Wu R, Hendrix-Lucas N, Kuick R, Zhai Y, Schwartz DR, Akyol A, et al. Mouse model of human ovarian endometrioid adenocarcinoma based on somatic defects in the Wnt/beta-catenin and PI3K/Pten signaling pathways. *Cancer Cell*. 2007 Apr;11(4):321-33.
44. Saegusa M, Hashimura M, Yoshida T, Okayasu I. beta-Catenin mutations and aberrant nuclear expression during endometrial tumorigenesis. *Br J Cancer*. 2001 Jan;84(2):209-17.
45. Catusus L, Bussaglia E, Rodriguez I, Gallardo A, Pons C, Irving JA, et al. Molecular genetic alterations in endometrioid carcinomas of the ovary: similar frequency of beta-catenin abnormalities but lower rate of microsatellite instability and PTEN alterations than in uterine endometrioid carcinomas. *Hum Pathol*. 2004 Nov;35(11):1360-8.
46. Mayr D, Hirschmann A, Lohrs U, Diebold J. KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: a comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. *Gynecol Oncol*. 2006 Dec;103(3):883-7.
47. Willner J, Wurz K, Allison KH, Galic V, Garcia RL, Goff BA, et al. Alternate molecular genetic pathways in ovarian carcinomas of common histological types. *Hum Pathol*. 2007 Apr;38(4):607-13.
48. Wu CH, Mao TL, Vang R, Ayhan A, Wang TL, Kurman RJ, et al. Endocervical-type mucinous borderline tumors are related to endometrioid tumors based on mutation and loss of expression of ARID1A. *Int J Gynecol Pathol*. 2012 Jul;31(4):297-303.
49. Ryland GL, Hunter SM, Doyle MA, Rowley SM, Christie M, Allan PE, et al. RNF43 is a tumour suppressor gene mutated in mucinous tumours of the ovary. *J Pathol*. 2013 Feb;229(3):469-76.
50. Auersperg N. The origin of ovarian carcinomas: a unifying hypothesis. *Int J Gynecol Pathol*. 2011 Jan;30(1):12-21.
51. Adler E, Mhawech-Fauceglia P, Gayther SA, Lawrenson K. PAX8 expression in ovarian surface epithelial cells. *Hum Pathol*. 2015 Jul;46(7):948-56.
52. Kuhn E, Ayhan A, Bahadirli-Talbott A, Zhao C, Shih Ie M. Molecular characterization of undifferentiated carcinoma associated with endometrioid carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2014 May;38(5):660-5.
53. Vang R, Shih Ie M, Kurman RJ. Fallopian tube precursors of ovarian low- and high-grade serous neoplasms. *Histopathology*. 2013 Jan;62(1):44-58.
54. Howitt BE, Hanamornroongruang S, Lin DI, Conner JE, Schulte S, Horowitz N, et al. Evidence for a dualistic model of high-grade serous carcinoma: BRCA mutation status, histology, and tubal intraepithelial carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2015 Mar;39(3):287-93.
55. Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D, Garsed DW, George J, Fereday S, et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature*. 2015 May 28;521(7553):489-94.
56. Jin Z, Ogata S, Tamura G, Katayama Y, Fukase M, Yajima M, et al. Carcinosarcomas (malignant müllerian mixed tumors) of the uterus and ovary: a genetic study with special reference to histogenesis. *Int J Gynecol Pathol*. 2003 Oct;22(4):368-73.
57. Abeln EC, Smit VT, Wessels JW, de Leeuw WJ, Cornelisse CJ, Fleuren GJ. Molecular genetic evidence for the conversion hypothesis of the origin of malignant mixed müllerian tumours. *J Pathol*. 1997 Dec;183(4):424-31.
58. Green KJ, Getsios S, Troyanovsky S, Godsel LM. Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Feb;2(2):a000125.
59. Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Aug;6(8):622-34.
60. Kurokawa H, Ikura M. [Perspectives on structure elucidation of the cadherin-catenin complex]. *Seikagaku*. 2006 Jul;78(7):595-600.
61. Hulpiau P, van Roy F. Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Feb;41(2):349-69.
62. Gloushankova NA, Rubtsova SN, Zhitnyak IY. Cadherin-mediated cell-cell interactions in normal and cancer cells. *Tissue Barriers*. 2017 Jul 3;5(3):e1356900.

63. Burgess AW, Faux MC, Layton MJ, Ramsay RG. Wnt signaling and colon tumorigenesis--a view from the periphery. *Exp Cell Res*. 2011 Nov 15;317(19):2748-58.
64. Horst D. [Plasticity of WNT signaling activity in colorectal cancer]. *Pathologe*. 2012 Nov;33 Suppl 2:194-7.
65. Kikuchi A. Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Feb 16;268(2):243-8.
66. Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J*. 1998 Mar 2;17(5):1371-84.
67. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006 Nov 3;127(3):469-80.
68. Grigoryan T, Wend P, Klaus A, Birchmeier W. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev*. 2008 Sep 1;22(17):2308-41.
69. White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/beta-catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology*. 2012 Feb;142(2):219-32.
70. Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*. 1996 May 1;10(9):1054-72.
71. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000 Nov 16;408(6810):307-10.
72. Yeo CQX, Alexander I, Lin Z, Lim S, Aning OA, Kumar R, et al. p53 Maintains Genomic Stability by Preventing Interference between Transcription and Replication. *Cell Rep*. 2016 Apr 5;15(1):132-46.
73. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug 29;92(18):8493-7.
74. Lin SC, Skapek SX, Lee EY. Genes in the RB pathway and their knockout in mice. *Semin Cancer Biol*. 1996 Oct;7(5):279-89.
75. Sperka T, Wang J, Rudolph KL. DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Sep;13(9):579-90.
76. Curtin JC, Spinella MJ. p53 in human embryonal carcinoma: identification of a transferable, transcriptional repression domain in the N-terminal region of p53. *Oncogene*. 2005 Feb 24;24(9):1481-90.
77. Corney DC, Flesken-Nikitin A, Choi J, Nikitin AY. Role of p53 and Rb in ovarian cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2008;622:99-117.
78. Wang Y, Li J, Booher RN, Kraker A, Lawrence T, Leopold WR, et al. Radiosensitization of p53 mutant cells by PD0166285, a novel G(2) checkpoint abrogator. *Cancer Res*. 2001 Nov 15;61(22):8211-7.
79. Shih Ie M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*. 2004 May;164(5):1511-8.
80. Bar JK, Grelewski P, Popiela A, Noga L, Rabczynski J. Type IV collagen and CD44v6 expression in benign, malignant primary and metastatic ovarian tumors: correlation with Ki-67 and p53 immunoreactivity. *Gynecol Oncol*. 2004 Oct;95(1):23-31.
81. Liu J, Geng X, Li Y. Milky spots: omental functional units and hotbeds for peritoneal cancer metastasis. *Tumour Biol*. 2016 May;37(5):5715-26.
82. Coccolini F, Gheza F, Lotti M, Virzi S, Iusco D, Ghermandi C, et al. Peritoneal carcinomatosis. *World J Gastroenterol*. 2013 Nov 7;19(41):6979-94.
83. Nowicka A, Marini FC, Solley TN, Elizondo PB, Zhang Y, Sharp HJ, et al. Human omental-derived adipose stem cells increase ovarian cancer proliferation, migration, and chemoresistance. *PLoS One*. 2013;8(12):e81859.
84. Gerber SA, Rybalko VY, Bigelow CE, Lugade AA, Foster TH, Frelinger JG, et al. Preferential attachment of peritoneal tumor metastases to omental immune aggregates and possible role of a unique vascular microenvironment in metastatic survival and growth. *Am J Pathol*. 2006 Nov;169(5):1739-52.

85. Low RN. MR imaging of the peritoneal spread of malignancy. *Abdom Imaging*. 2007 May-Jun;32(3):267-83.
86. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol*. 2010 Sep;177(3):1053-64.
87. Mikula-Pietrasik J, Sosinska P, Janus J, Rubis B, Brewinska-Olchowik M, Piwocka K, et al. Bystander senescence in human peritoneal mesothelium and fibroblasts is related to thrombospondin-1-dependent activation of transforming growth factor-beta1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Sep;45(9):2087-96.
88. Kawanishi K, Yamato M, Sakiyama R, Okano T, Nitta K. Peritoneal cell sheets composed of mesothelial cells and fibroblasts prevent intra-abdominal adhesion formation in a rat model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016 Oct;10(10):855-66.
89. Mutsaers SE. The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Jan;36(1):9-16.
90. Witowski J, Ksiazek K, Warnecke C, Kuzlan M, Korybalska K, Tayama H, et al. Role of mesothelial cell-derived granulocyte colony-stimulating factor in interleukin-17-induced neutrophil accumulation in the peritoneum. *Kidney Int*. 2007 Mar;71(6):514-25.
91. Ksiazek K, Mikula-Pietrasik J, Catar R, Dworacki G, Winckiewicz M, Frydrychowicz M, et al. Oxidative stress-dependent increase in ICAM-1 expression promotes adhesion of colorectal and pancreatic cancers to the senescent peritoneal mesothelium. *Int J Cancer*. 2010 Jul 15;127(2):293-303.
92. Lopez-Anton M, Rudolf A, Baird DM, Roger L, Jones RE, Witowski J, et al. Telomere length profiles in primary human peritoneal mesothelial cells are consistent with senescence. *Mech Ageing Dev*. 2017 Jun;164:37-40.
93. Sosinska P, Mikula-Pietrasik J, Ryzek M, Naumowicz E, Ksiazek K. Specificity of cytochemical and fluorescence methods of senescence-associated beta-galactosidase detection for ageing driven by replication and time. *Biogerontology*. 2014 Aug;15(4):407-13.
94. Strobel T, Cannistra SA. Beta1-integrins partly mediate binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro. *Gynecol Oncol*. 1999 Jun;73(3):362-7.
95. Lessan K, Aguiar DJ, Oegema T, Siebensohn L, Skubitz AP. CD44 and beta1 integrin mediate ovarian carcinoma cell adhesion to peritoneal mesothelial cells. *Am J Pathol*. 1999 May;154(5):1525-37.
96. Kenny HA, Chiang CY, White EA, Schryver EM, Habis M, Romero IL, et al. Mesothelial cells promote early ovarian cancer metastasis through fibronectin secretion. *J Clin Invest*. 2014 Oct;124(10):4614-28.
97. Deng G, Qu J, Zhang Y, Che X, Cheng Y, Fan Y, et al. Gastric cancer-derived exosomes promote peritoneal metastasis by destroying the mesothelial barrier. *FEBS Lett*. 2017 Jul;591(14):2167-79.
98. Yokoi A, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ishikawa M, Ikeda SI, Kato T, et al. Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer. *Nat Commun*. 2017 Mar 6;8:14470.
99. Mikula-Pietrasik J, Stryczynski L, Uruski P, Tykarski A, Ksiazek K. Procarcinogenic activity of senescent cells: A case of the peritoneal mesothelium. *Ageing Res Rev*. 2018 May;43:1-9.
100. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Feb;4(2):118-32.
101. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1420-8.
102. Veatch AL, Carson LF, Ramakrishnan S. Differential expression of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in ascites and solid human ovarian tumor cells. *Int J Cancer*. 1994 Aug 1;58(3):393-9.
103. Imai T, Horiuchi A, Wang C, Oka K, Ohira S, Nikaido T, et al. Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am J Pathol*. 2003 Oct;163(4):1437-47.
104. Symowicz J, Adley BP, Gleason KJ, Johnson JJ, Ghosh S, Fishman DA, et al. Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*. 2007 Mar 1;67(5):2030-9.

105. Shield K, Riley C, Quinn MA, Rice GE, Ackland ML, Ahmed N. Alpha2beta1 integrin affects metastatic potential of ovarian carcinoma spheroids by supporting disaggregation and proteolysis. *J Carcinog*. 2007 Jun 14;6:11.
106. Casey RC, Burlison KM, Skubitz KM, Pambuccian SE, Oegema TR, Jr., Ruff LE, et al. Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids. *Am J Pathol*. 2001 Dec;159(6):2071-80.
107. Witz CA, Montoya-Rodriguez IA, Cho S, Centonze VE, Bonewald LF, Schenken RS. Composition of the extracellular matrix of the peritoneum. *J Soc Gynecol Investig*. 2001 Sep-Oct;8(5):299-304.
108. Heath RM, Jayne DG, O'Leary R, Morrison EE, Guillou PJ. Tumour-induced apoptosis in human mesothelial cells: a mechanism of peritoneal invasion by Fas Ligand/Fas interaction. *Br J Cancer*. 2004 Apr 5;90(7):1437-42.
109. Sher I, Adham SA, Petrik J, Coomber BL. Autocrine VEGF-A/KDR loop protects epithelial ovarian carcinoma cells from anoikis. *Int J Cancer*. 2009 Feb 1;124(3):553-61.
110. Nishida N, Yano H, Komai K, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 2 are related closely to the prognosis of patients with ovarian carcinoma. *Cancer*. 2004 Sep 15;101(6):1364-74.
111. Koo M, Squires JM, Ying D, Huang J. Making a Tissue Microarray. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:313-23.
112. Groseclose MR, Massion PP, Chaurand P, Caprioli RM. High-throughput proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarrays using MALDI imaging mass spectrometry. *Proteomics*. 2008 Sep;8(18):3715-24.
113. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest*. 1986 Aug;55(2):244-8.
114. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*. 2001 Apr;10(7):657-62.
115. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998 Jul;4(7):844-7.
116. Diaz LK, Gupta R, Kidwai N, Sneige N, Wiley EL. The use of TMA for interlaboratory validation of FISH testing for detection of HER2 gene amplification in breast cancer. *J Histochem Cytochem*. 2004 Apr;52(4):501-7.
117. Gancberg D, Di Leo A, Rouas G, Jarvinen T, Verhest A, Isola J, et al. Reliability of the tissue microarray based FISH for evaluation of the HER-2 oncogene in breast carcinoma. *J Clin Pathol*. 2002 Apr;55(4):315-7.
118. Packeisen J, Buerger H, Krech R, Boecker W. Tissue microarrays: a new approach for quality control in immunohistochemistry. *J Clin Pathol*. 2002 Aug;55(8):613-5.
119. Voduc D, Kenney C, Nielsen TO. Tissue microarrays in clinical oncology. *Semin Radiat Oncol*. 2008 Apr;18(2):89-97.
120. Richani K, Romero R, Kim YM, Cushenberry E, Soto E, Han YM, et al. Tissue microarray: an effective high-throughput method to study the placenta for clinical and research purposes. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2006 Aug;19(8):509-15.
121. Pires AR, Andreiuolo Fda M, de Souza SR. TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. *Diagn Pathol*. 2006 Jul 25;1:14.
122. Choi CH, Kim KH, Song JY, Choi SJ, Kim L, Park IS, et al. Construction of high-density tissue microarrays at low cost by using self-made manual microarray kits and recipient paraffin blocks. *Korean J Pathol*. 2012 Dec;46(6):562-8.
123. Leong AS, Leong TY. Standardization in immunohistology. *Methods Mol Biol*. 2011;724:37-68.
124. Pinder SE, Brown JP, Gillett C, Purdie CA, Speirs V, Thompson AM, et al. The manufacture and assessment of tissue microarrays: suggestions and criteria for analysis, with breast cancer as an example. *J Clin Pathol*. 2013 Mar;66(3):169-77.

125. Moskaluk CA, Stoler MH. Agarose mold embedding of cultured cells for tissue microarrays. *Diagn Mol Pathol*. 2002 Dec;11(4):234-8.
126. Waterworth A, Hanby A, Speirs V. A novel cell array technique for high-throughput, cell-based analysis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2005 Jul-Aug;41(7):185-7.
127. Bubendorf L. Tissue microarrays meet cytopathology. *Acta Cytol*. 2006 Mar-Apr;50(2):121-2.
128. Iacopetta B. TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat*. 2003 Mar;21(3):271-6.
129. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):323-31.
130. Bukholm IK, Nesland JM. Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), bcl-2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas. *Virchows Arch*. 2000 Mar;436(3):224-8.
131. Wong KK, Tsang YT, Deavers MT, Mok SC, Zu Z, Sun C, et al. BRAF mutation is rare in advanced-stage low-grade ovarian serous carcinomas. *Am J Pathol*. 2010 Oct;177(4):1611-7.
132. Steinestel K, Eder S, Schrader AJ, Steinestel J. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Transl Med*. 2014;3:17.
133. Li L, Li W. Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. *Pharmacol Ther*. 2015 Jun;150:33-46.
134. Griffiths RW, Zee YK, Evans S, Mitchell CL, Kumaran GC, Welch RS, et al. Outcomes after multiple lines of chemotherapy for platinum-resistant epithelial cancers of the ovary, peritoneum, and fallopian tube. *Int J Gynecol Cancer*. 2011 Jan;21(1):58-65.
135. Badiglian Filho L, Oshima CT, De Oliveira Lima F, De Oliveira Costa H, De Sousa Damiao R, Gomes TS, et al. Canonical and noncanonical Wnt pathway: a comparison among normal ovary, benign ovarian tumor and ovarian cancer. *Oncol Rep*. 2009 Feb;21(2):313-20.
136. Rosen DG, Zhang Z, Chang B, Wang X, Lin E, Liu J. Low membranous expression of beta-catenin and high mitotic count predict poor prognosis in endometrioid carcinoma of the ovary. *Mod Pathol*. 2010 Jan;23(1):113-22.
137. Gatcliffe TA, Monk BJ, Planutis K, Holcombe RF. Wnt signaling in ovarian tumorigenesis. *Int J Gynecol Cancer*. 2008 Sep-Oct;18(5):954-62.
138. Aberle H, Schwartz H, Kemler R. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem*. 1996 Jun 15;61(4):514-23.
139. Bodnar L, Stanczak A, Cierniak S, Smoter M, Cichowicz M, Kozlowski W, et al. Wnt/beta-catenin pathway as a potential prognostic and predictive marker in patients with advanced ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2014 Feb 6;7:16.
140. Green SK, Francia G, Isidoro C, Kerbel RS. Antiadhesive antibodies targeting E-cadherin sensitize multicellular tumor spheroids to chemotherapy in vitro. *Mol Cancer Ther*. 2004 Feb;3(2):149-59.
141. Bristow RE, del Carmen MG, Kaufman HS, Montz FJ. Radical oophorectomy with primary stapled colorectal anastomosis for resection of locally advanced epithelial ovarian cancer. *J Am Coll Surg*. 2003 Oct;197(4):565-74.
142. van Zelm R, Coeckelberghs E, Sermeus W, Aeyels D, Panella M, Vanhaecht K. Protocol for process evaluation of evidence-based care pathways: the case of colorectal cancer surgery. *Int J Evid Based Healthc*. 2018 Sep;16(3):145-53.
143. Bristow RE, Santillan A, Salani R, Diaz-Montes TP, Giuntoli RL, 2nd, Meisner BC, et al. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel versus intravenous carboplatin and paclitaxel chemotherapy for Stage III ovarian cancer: a cost-effectiveness analysis. *Gynecol Oncol*. 2007 Sep;106(3):476-81.
144. Abaid LN, Goldstein BH, Lopez KL, Micha JP, Brown JV, 3rd, Rettenmaier MA, et al. The prognostic significance of optimal debulking in the setting of a complete clinical response for advanced ovarian carcinoma patients receiving maintenance chemotherapy. *Arch Gynecol Obstet*. 2011 May;283(5):1127-31.
145. Williams L, Brunetto VL, Yordan E, DiSaia PJ, Creasman WT. Secondary cytoreductive surgery at second-look laparotomy in advanced ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol*. 1997 Aug;66(2):171-8.
146. Creasman WT. Second-look laparotomy in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 1994 Dec;55(3 Pt 2):S122-7.

147. Kenny HA, Lengyel E. MMP-2 functions as an early response protein in ovarian cancer metastasis. *Cell Cycle*. 2009 Mar 1;8(5):683-8.
148. Douglass HO, Jr., Penetrante RB. Pancreatic cancer. Why patients die. *Int J Pancreatol*. 1990 Aug-Nov;7(1-3):135-40.
149. Rosso M, Majem B, Devis L, Lapyckyj L, Besso MJ, Llauro M, et al. E-cadherin: A determinant molecule associated with ovarian cancer progression, dissemination and aggressiveness. *PLoS One*. 2017;12(9):e0184439.
150. Kim G, Davidson B, Henning R, Wang J, Yu M, Annunziata C, et al. Adhesion molecule protein signature in ovarian cancer effusions is prognostic of patient outcome. *Cancer*. 2012 Mar 15;118(6):1543-53.
151. Mishra SK, Crasta JA. An immunohistochemical comparison of P53 and Bcl-2 as apoptotic and MIB1 as proliferative markers in low-grade and high-grade ovarian serous carcinomas. *Int J Gynecol Cancer*. 2010 May;20(4):537-41.
152. Resnick MB, Routhier J, Konkin T, Sabo E, Pricolo VE. Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study. *Clin Cancer Res*. 2004 May 1;10(9):3069-75.
153. Wu X, Zahari MS, Renuse S, Jacob HK, Sakamuri S, Singal M, et al. A breast cancer cell microarray (CMA) as a rapid method to characterize candidate biomarkers. *Cancer Biol Ther*. 2014;15(12):1593-9.
154. El Hag MI, Ha J, Farag R, El Hag AM, Michael CW. Utility of GATA-3 in the work-up of breast adenocarcinoma and its differential diagnosis in serous effusions: A Cell-Block Microarray Study. *Diagn Cytopathol*. 2016 Sep;44(9):731-6.
155. Toth L, Andras C, Molnar C, Tanyi M, Csiki Z, Molnar P, et al. Investigation of beta-catenin and E-cadherin expression in Dukes B2 stage colorectal cancer with tissue microarray method. Is it a marker of metastatic potential in rectal cancer? *Pathol Oncol Res*. 2012 Apr;18(2):429-37.

Tárgyszavak

β-catenin	β-catenin
E-cadherin	E-cadherin
p53	p53
Ki-67	Ki-67
hosszú távú túlélés	long term survival
progresszió mentes túlélés	progression free survival
kemoterápia	chemotherapy
sebészi tumor redukció	surgical tumor reduction
ascites	ascites
sejtblokk	cell multiblock
multiblokk	multiblock

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm 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 szövetmintákat 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 kíséretetk.

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

Függelék

Konferencia megjelenések, poszterek:

dr. Nagy Bence, Dr. Tóth László, Prof. Dr. Molnár Péter, Prof. Dr. Méhes Gábor, Prof. Dr. Thurzó László, Prof. Dr. Póka Róbert, Prof. Dr. Hernádi Zoltán, Nukleáris β -catenin expresszió - a hosszú távú túlélés makere előrehaladott epithelialis petefészek daganatokban, Fiatal Patológusok Találkozója 2018 Siófok, 2018. október 4–6. - **előadás**

Nagy Bence. Molekuláris gyneko-onkológia. Magyar Nőorvos Társaság Cervixpathologia Szekció XXII. Tudományos és Továbbképző Ülés Hajdúszoboszló, 2017. március 24-25. - **előadás**

Nagy B, Tóth L, Molnár P, Méhes G, Thurzó L, Póka R, Hernádi Z. β -catenin nuclear positivity as a predictive marker of long-term survival in advanced epithelial ovarian cancer XXXI International Congress of the IAP and 28th Congress of the ESP 25 – 29 September 2016 Congress-Centrum Ost Koelnmesse, Cologne, Germany www.iap2016.com www.esp-congress.org - **poszter**

Nagy Bence, Tóth László, Hodoniczki László, Póka Róbert, Hernádi Zoltán Serosus petefészek daganatok és preneoplasticus állapotai 73. Patológus Kongresszus Siófok, 2017. szeptember 28-30. - **poszter**

Zsuzsanna Zita Orosz; Amir H. Shemirani; Helga Bárdos; **Bence Nagy**; Andrea Facskó; András Berta; Róza Ádány; László Muszbek; Cellular Factor XIII is Present in the Corneal Stroma, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.. 2016; 57(12):2368. ARVO Annual Meeting Abstract September 2016 Cellular Factor XIII is Present in the Corneal Stroma - **előadás**

Dajnoki, Z., Mócsai, G., Kapitány, A., Béke, G., Gáspár, K., Emri, G., **Nagy, B.**, Dezső, B., Szegedi, A.: Immune-mediated skin inflammation is the same atopic dermatitis patients with or without filaggrin mutation. *Bőrgyógyász. Venerol. Szle.* 90 (6), 271, 2014. – **poszter**

Dajnoki, Z., Mócsai, G., Kapitány, A., Gáspár, K., Emri, G., Veres, I., **Nagy, B.**, Beke, L., Dezső, B.: No difference in skin inflammation between atopic dermatitis patients with or without filaggrin mutation. *J. Invest. Dermatol.* 134 (S2), S49, 2014. – **poszter**

Dajnoki, Z., Mócsai, G., Gáspár, K., Emri, G., Veres, I., Beke, L., **Nagy, B.**, Szegedi, A.: Filaggrin mutáns és vad típusú atópiás dermatitises betegek bőrléziójának immunhosztokémiai vizsgálata és összehasonlítása. *Bőrgyógyász. Venerol. Szle.* 89 (6), 165, 2013. – **előadás**

Murányi, M., Tóth, G., Kajtár, B., **Nagy, B.**, Tóth, C., Flaskó, T.: pT0 stádiumú prosztatatarákos eseteink. *Uroonkológia.* 7 (1), 18, 2010. – **poszter**