

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Betegség követés molekuláris markerekkel vastagbél
adenocarcinomában**

Dr. Bádon Emese Sarolta

Témavezető:

Prof. Dr. Méhes Gábor



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2023

Betegség követés molekuláris markerekkel vastagbél adenocarcinomában

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

Írta: Dr. Bádon Emese Sarolta, okleveles orvosdoktor

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

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

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Krenács Tibor, az MTA doktora

Dr. Furka Andrea PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Németh Norbert, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Krenács Tibor, az MTA doktora

Dr. Furka Andrea PhD

Dr. Francz Mónika PhD

Prof. Dr. Pórszász Róbert PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, 2024. március 05. 14:00 óra,
DE ÁOK Belgyógyászati Intézet A épület

1. Bevezetés

A vastagbél-daganat (colorectal cancer, CRC) gyűjtőfogalom a vastag- és/vagy a végbelt érintő tumoros elváltozásokat foglalja magában, melyet a mirigyhámsejtjeinek neoplasztikus átalakulása okoz. A harmadik leggyakrabban diagnosztizált és a második leggyakoribb halálos kimenetelű tumoros megbetegedés. Kialakulásában számos genetikai és környezeti tényező egyaránt részt vesz.

A genetikai tényezők közül a humán malignus megbetegedésekben előforduló összes gén közül a *RAS*-variánsok gyakorisága a legmagasabb. A *RAS* mitogén aktivált fehérje-kináz útvonal *EGFR* gátló terápiák kontraindikációjaként, mint potenciális rákellenes szerekek a kifejlesztése nagyon ígéretes farmakológiai stratégia. Lehetővé téve a személyre szabott orvoslást a terápiás eredmény optimalizálásával és a toxicitás csökkentésével. A genetikai, genomikai és klinikai biomarkerek fejlesztése új lehetőségeket teremtettek a *RAS* közvetlen vagy a kulcsfontosságú *RAS*-effektorok hatékonyabb célba juttatására. Bár ezek az új szerek és megközelítések már ígéretes eredményeket mutattak preklinikai és klinikai vizsgálatokban, de a *RAS* jelátvitel komplexitása és az adaptív visszacsatolás lehetősége továbbra is jelentős kihívást jelent. Ezért a célzott terápiák kifejlesztéséhez a tumoros megbetegedések *RAS*-variánsoktól való tulajdonságainak és függőségének részletes megértésére lesz szükség.

A CRC-k kiváló terepet biztosítanak a daganat kialakulásában szerepet játszó genetikai változások keresésére, követésére és tanulmányozására. A bőséges klinikai és szövettani adatok arra utalnak, hogy a legtöbb, ha nem minden rosszindulatú vastagbél-daganat (carcinoma) már meglévő alapvetően nem agresszív elváltozásból (adenómából) alakul ki. A fejlődés különböző stádiumaiban lévő daganatok mintái, a nagyon kicsi adenomáktól a nagy metasztatikus carcinomáig nyerhetők a vizsgálathoz, ellentétben a legtöbb más gyakori humán tumor típussal. Továbbá a diagnosztizálására és monitorozására szolgáló invazív technikák helyére nem vagy kevésbé invazív módszerek épültek be. Ilyenek a liquid biopsziák melyek drasztikusan forradalmasították a klinikai onkológia területét, megkönnyítve ezáltal a folyamatos mintavételezést, a tumor időbeli heterogenitásának követését, a megfelelő személyre szabott terápiás sémák kidolgozását és a terápiára adott rezisztencia szűrését.

Számos olyan vizsgálat létezik, amely a tumorszövet molekuláris jellemzői vagy a rosszindulatú daganat egyéb biológiai paraméterei alapján segít kiválasztani a leghatékonyabb

kezelést. Az immunhisztokémia (IHC), azaz a szöveten belüli specifikus antigén láthatóvá tétele történelmi előrelépés volt a személyre szabott onkológiában. A polimeráz láncreakció (PCR) alapú technikák viszonylag egyszerű műszereket és infrastruktúrát igényelnek, csak parányi mennyiségű biológiai anyagot használnak fel és nagymértékben összeegyeztethetők a klinikai rutinnal. Nagy újítást jelentett a Sanger szekvenáláshoz való hozzáférés, melyet napjainkban még mindig a molekuláris diagnosztika arany standardjának tekintenek. Egyre nagyobb erőfeszítések történtek a technikai ismeretek kiszélesítésére ezen a területen, egészen a "második és harmadik generációs szekvenálási" módszerek felfedezéséig. Az újgenerációs szekvenálási (NGS) technológia a nukleinsav-szekvenálás standard koncepcióját forradalmasító technikák csoportja. Az NGS nagy sikere annak köszönhető, hogy nagyon kis mennyiségű nukleinsav felhasználásával több millió read szekvenálására képes és alkalmas komplex genomok gyors szekvenálására is, ami az idő és a költségek szempontjából egyaránt igen hatékony.

A környezeti tényezők közül a hypoxiás károsodást megkerülő adaptív mechanizmusok aktiválása a rossz prognózisú, agresszív rákos megbetegedések egyik jellemzője. Az adaptív folyamat részeként az anaerob anyagcserével rendelkező tumoros sejtekben az intracelluláris acidózis az extracelluláris pH rovására kompenzálódik, ami funkcionális változásokat indukál hypoxiás mikrokörnyezetben, elősegítve a rezisztenciát és a daganat progresszióját.

A karboanhidráz IX (CAIX) jelentős szerepet játszik a hypoxiára adott adaptív válaszban, amelyet a hypoxia indukáló faktor-1 (HIF-1) összehangol mind a normál, mind a malignus sejtekben. Sőt, a mikrokörnyezeti acidózishoz való hozzájárulása révén a CAIX részt vesz a tumor-stroma és a tumor-immunsejt interakciókban és felgyorsítja az extracelluláris mátrix degradációját, ezáltal elősegíti a savrezisztens sejtek invázióját és proliferációját. A CAIX hypoxiás stressz miatti overexpressziója különböző tumorokban kedvezőtlen prognosztikai jellemzőként definiálható. A CAIX-hez kapcsolódó intratumorális változásokat olyan komplex rezisztencia mechanizmusoknak tekintik, amelyeket a klasszikus daganatellenes gyógyszerek és biológiai terápiák nem tudnak hatékonyan semlegesíteni.

Az adatok arra utalnak, hogy a CAIX gátlásán keresztül beavatkozhatunk a tumorosejtek proliferációjába, migrációjába, inváziójába és immunogenitásába, míg az *in vivo* vizsgálatok azt mutatják, hogy az áttétes növekedés is korlátozható. E gátlás hatékonysága nagyrészt a rákos sejtek pH-szabályozásán keresztül valósul meg. A legújabb vizsgálatok azt mutatják, hogy a CAIX számos más, a rákos sejtekben aktívnak ismert jelátviteli útvonallal és mechanizmussal

is kölcsönhatásba léphet, amelyek a jelek szerint befolyásolják a rákos sejtek sugárzásra és kemoterápiára adott válaszát. A sugárzás iránti érzékenységet a pH-függő és független mechanizmusok közötti additív vagy szinergista kölcsönhatások határozhatják meg, ami arra utal, hogy a CAIX-nek számos fontos szerepe lehet a tumoros sejtekben, amelyeket potenciálisan terápiásan ki lehetne használni.

A CAIX eloszlását és dinamikus jellegét, valamint a *KRAS* mutációs státuszhoz fűződő kapcsolatát azonban korábban nem vizsgálták részletesen. Hipotézisünk szerint a daganatellenes terápiák, például a neoadjuváns terápia alapvető hatással van a malignus sejtek anyagcseréjére és perfúziójára, ami a sejtek adaptációjában, például a CAIX expresszió mérhető változásaiban is tükröződik. Modellrendszerként a végbél adenocarcinoma neoadjuváns kezelés előtti (diagnosztikus biopszia) és utáni (műtéti rezekció) mintáit értékeltük és hasonlítottuk össze a CAIX expresszió és a betegség egyéb elérhető változói tekintetében.

2. Célkitűzés

2.1. A *KRAS* mutáció követése és változása a Debreceni Egyetem Patológia Intézetében elérhető szövettani és liquid biopsziás mintákban

A *KRAS* mutáció vastagbél tumor szövetmintákból történő meghatározása napi rutin feladat a Debreceni Egyetem Klinikai Központ (DE KK) Patológia gyakorlatában. A gyakori előfordulás lehetőséget biztosított a multiplex, ill. metasztatikus daganatokban észlelhető eltérő *KRAS* profilok elemzésére, követésére. Prospektív vizsgálatunk célja, hogy egyes betegekben megvizsgáljuk az összes rendelkezésre álló primer és metasztatikus tumormintát, illetve egy másik tanulmány keretében három különböző időpontból (kezelés előtt, bevacizumabbal kezelt második és negyedik ciklus előtt) származó tumor és cfDNA mintákat. Reverz hibridizációval (StripAssay), Sanger-szekvenálással és NGS-el is elemzett esetekben a következő kérdésekre kerestük a választ:

- A szövettani mintákból nyert DNA mutációs státusz és az ugyanazon betegekből származó cfDNA eltérések közötti kapcsolat mennyiben egyezik.
- A *KRAS* patogén variánsok dinamikájának nyomon követése a kombinált bevacizumab kezelés során.
- A *KRAS* mutációval rendelkező metasztatikus vastagbél daganatokban (mCRC) szenvedő betegek perifériás véréből (PB) származó cfDNA molekuláris eltérés mennyiben felelt meg a tumorszövetből származó eredménynek.

2.2. A hypoxia és mutáns *KRAS* státusz kapcsolata végbél daganatokban

Retrospektív tanulmányunk célja, hogy megvizsgáljuk preoperatív neoadjuváns kezelésben részesült végbél adenocarcinomás betegek biopsziás és műtéti mintáit, valamint ugyanezen betegségben szenvedők kezeletlen biopsziás és műtéti mintáit, betekintést nyerve ezáltal a kezelt és nem kezelt kohorsz CAIX markerrel jelezett tumor hypoxia mértékébe. Ezáltal fel kívántuk mérni:

- A CAIX expresszió általános mintázatát végbél adenocarcinómában.
- A CAIX expresszióját a kezeletlen biopsziás és a preoperatív neoadjuváns terápiát (NAT) követő műtéti mintákban végbél adenocarcinómában.

- A CAIX expressziójának összefüggését a kezeletlen biopsziás és műtéti mintákban (UT-kontrollcsoport) a kezelt sebészeti mintákhoz képest (NAT).
- A CAIX expressziójának korrelációját a patológiai és biológiai státusszal, beleértve a sejtproliferációt, a tumor regressziós grádust és a *KRAS* mutációs státuszt.
- A CAIX hatását a betegek túlélésére.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A minták kiválasztása és a vizsgálat felépítése

Tanulmányunkban a DE KK Patológiai Intézetében 2015 és 2022 között diagnosztizált, archivált és molekuláris patológiai vizsgálattal igazolt *KRAS* mutáns vastagbél adenocarcinomás esetek szövettani és liquid biopsziás mintáit dolgoztunk fel. A vizsgálatot a legmagasabb etikai normáknak megfelelően végeztük, mely az országos etikai jóváhagyás hatálya alá tartozott (TUKEB referenciaszám: 60355-2/2016/EKU, 4648-6/2018/EÜIG és IV/8465-3/2021/EKU).

3.2. A minták feldolgozása

3.2.1. Tumor DNS kivonása FFPE szövetmintákból

Az FFPE (formalinban fixált, paraffinba ágyazott) tumorszövetet tartalmazó mintát abban az esetben dolgoztuk fel, ha két egymástól független patológus hematoxinin és eozin (H&E) festett tárgylemezeken > 10%-os tumor százalékos arányt állapított meg. A genomi DNS kivonása QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével történt. A DNS-koncentrációt Qubit dsDNA HS Assay Kit és Qubit 4.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével mértük.

3.2.2. cfDNS kivonása perifériás vérmintákból

A perifériás vérmintákat (liquid biopszia) három meghatározott időpontban vettük: a kezelés megkezdése előtt, a második ciklus előtt (a terápia megkezdése után 14-21 nappal) és a negyedik ciklus előtt (42-63 nap). A $10 \pm 0,1$ ml vérmintát EDTA alvadásgátolt vérvételi csövekbe (Becton Dickinson and Company, Sparks Glencoe, MD, USA) gyűjtöttük és 2 órán belül feldolgoztuk. Az izolálási folyamat két centrifugálási lépéssel kezdődött. Először a vérrel telt EDTA-s csöveket 10 percig 1300 g-n centrifugáltuk kb. 5 ml plazma nyerése céljából. A felülúszót új Eppendorf csövekbe átpipettáztuk. Az összegyűjtött felülúszót másodszor is centrifugáltuk 16000 g-n 10 percig az esetlegesen megmaradt sejttörmelékek eltávolítása érdekében. A cfDNS-t $5,0 \pm 0,5$ ml perifériás vérplazmából a QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével izoláltuk, az elúció 40 μ l elúciós pufferrel történt. A DNS-koncentrációt a Qubit dsDNA HS Assay Kit és Qubit 4.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével mértük. A cfDNS fragmens méretét és

eloszlását Bioanalyzer 2100 készülékkel (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) állapítottuk meg.

3.2.3. Mutációs státusz meghatározás

A célgének mutációs státuszának meghatározása három módszer segítségével valósult meg:

3.2.3.1. Sanger-szekvenálás

Sanger-szekvenáláshoz a *KRAS* gén 2. exonját PCR-rel amplifikáltuk 5'-GGTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG-3' és 5'-CGTCAAGGCACTCTCTGCCTAC-3' primerek segítségével. A tisztított PCR termékeket a BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit segítségével szekvenáltuk. Mintáinkat az ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével elemeztük. A Sanger-szekvenálás során keletkezett electropherogramon a variáns allélfrekvenciát (VAF) a következő képlet szerint számoltuk ki: $mA\% \text{ (mutáns allél aránya)} = \frac{H_m}{H_m + H_{wt}} \text{ (a mutáns allél csúcs magassága) / (H}_m\text{+H}_{wt} \text{ (a vad típusú allél csúcs magassága))} \cdot 100$ [16].

3.2.3.2. Reverz hibridizáció alapuló vizsgálat (StripAssay)

A reverz hibridizációt *KRAS* XL, *NRAS* XL és *BRAF* 600/601 IVD StripAssay-vel végeztük a gyártó ajánlásának megfelelően (ViennaLab Diagnostics, Bécs, Ausztria). A vizsgálat a *KRAS* gén 29 klinikailag releváns mutációját, az *NRAS* gén 22 mutációját és a *BRAF* gén 9 patogén variánsát fedi le. A vizsgálat eredményének kiértékeléséhez a hibridizációs sávokat a reagensekhez mellékelt szabványosított elrendezéssel rendelkező referencia sablonhoz igazítottuk, melynek segítségével azonosítottuk a pozitív sávokat. A reverz hibridizációs vizsgálatok cut-off értéke 1% VAF felett van.

3.2.3.3. Új generációs szekvenálás (NGS) FFPE szövetmintákból

A genomiális DNS fragmentálása után NGS könyvtárakat hoztunk létre a TruSight Tumor 15 Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) segítségével. Ez a panel egy olyan célzott szekvenálási vizsgálat, mely egyidejűleg 15 génben található egy nukleotid-variánsokat (SNV-k), inszerciákat és deléciókat (indel) detektál, melyek a CRC-tumorkkal hozhatók összefüggésbe. A következő 15 gén szerepel a panelben: *AKT1*, *BRAF*, *EGFR*, *ERBB2*, *FOXL2*, *GNA11*, *GNAQ*, *KIT*, *KRAS*, *KIT*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *RET*, *TP53*. A végleges könyvtár koncentrációját Qubit

4.0 fluorométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) határoztuk meg és hígítottuk 4nM végkoncentrációra. A szekvenáláshoz MiSeq Reagent kit-et (v3 2X300 ciklus) alkalmaztunk. A könyvtár denaturáció 0,2nM NaOH hozzáadásával történt. A végső betöltési koncentráció 8 pM könyvtár és 1% PhiX volt. A szekvenálást a MiSeq használati útmutatója szerint végeztük (Illumina, San Diego, CA, USA). Az adatokat a BaseSpace TruSight Tumor 15 segítségével elemeztük. Az alkalmazással (Illumina, San Diego, CA, USA) az SNV-k és az indelek jelenlétét vizsgáltuk. A szekvenancia minőségét minden egyes minta esetében értékeltük. A kimutatási határértéket 2%-os variáns allélfrekvenciára állítottuk be. A megbízható variánsok kimutatásához >250 leolvasás lefedettségre volt szükség.

3.2.3.4. Új generációs szekvenálás (NGS) liquid biopsziából

Az NGS könyvtárakat az Archer® Reveal ctDNA™ 28 Kit (ArcherDX, Boulder, CO, USA) segítségével hoztuk létre. Ez a panel egy célzott szekvenálási vizsgálat, amely egyszerre detektálja és jellemzi az egynukleotid-variánsokat (SNV-k), inszerciókat és deléciókat (indeleket) 28 olyan génben, amelyek szolid tumorokhoz kapcsolódnak. A panel a következő 28 gént tartalmazza: *AKT1, ALK, AR, BRAF, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ESR1, FGFR1, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, MTOR, NRAS, NTRK1, NTRK3, PDGFRA, PIK3CA, RET, ROS1, SMAD4* és *TP53*. A végleges könyvtárak koncentrációját KAPA library quantification kit (Roche, Basel, Svájc) segítségével határoztuk meg és 4 nM végső koncentrációra hígítottuk. A MiSeq rendszerrel (MiSeq Reagent kit v3 600-cycle) történő szekvenáláshoz a könyvtárat 0,2 nM NaOH hozzáadásával denaturáltuk és 40 pM-ra hígítottuk Illumina (San Diego, CA, USA) hibridizációs pufferével. A végső betöltési koncentráció 10 pM könyvtár és 1% PhiX volt. A szekvenálást a MiSeq használati útmutatója szerint végeztük. Az adatokat az Archer DX Analysis szoftver Local Virtual Machine alkalmazásával elemeztük az SNV-k és indelek jelenléte szempontjából. Minden egyes minta esetében értékeltük a szekvenancia minőségét. Az illesztéshez a GRCh37 humán referencia genomot (az UCSC hg19 változatának megfelelő UCSC változatát) használtuk. A vizsgálat kimutatási határát 1%-os variáns allélfrekvenciában határoztuk meg. A megbízható variáns detektáláshoz >250 leolvasás lefedettségre volt szükség.

3.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok

A standard szövet feldolgozáshoz a tumor mintákat elsődleges vastagbél-tükrözés során nyert biopsziás mintavételből és utólagos sebészi rezekció után kaptuk PBS-pufferelt formaldehid oldatban (4%). Az FFPE beágyazást és a szövettani vizsgálatot a Debreceni Egyetem Patológiai Intézetében végeztük. A kiválasztott blokkokból 3 µm-es metszeteket készítettünk és immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatokat végeztünk.

Az automatizált IHC festés egyik részét a Bond Max festőautomatán végeztük. Az alkalmazott primer antitestek a következők voltak: anti-Ki-67, MIB-1 klón (Dako, Agilent Technologies és az anti-p53, Do-07 klón (Dako, Agilent Technologies) az anti-PMS2, EP51 klón (Dako, Agilent Technologies) anti-MLH1, G168-728 klón (Cell Marque, Rocklin, CA, USA). Az IHC reakció detektálására a Leica Bond detection kit (kat.sz. DS9800) alkalmaztuk.

A további IHC reakciókat BenchMark Ultra automatán végeztük el. Az alkalmazott primer antitestek a következők voltak: Carbonic Anhydrase IX/CAIX, EP161 klónnal (Cell Marque/Sigma-Aldrich, CA, USA), anti-MSH2, G219-1129 klónnal (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) anti-MSH6, 44-es klónnal (Biocare Medical, Pacheco, CA, USA). Az antigén-antitest kötődést az OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana) segítségével vizualizáltuk. A mintákat ezután hematoxilin II –vel felülfestettük, majd víztelenítés után lefedtük.

A Ki-67 pozitív sejtek százalékos arányával a proliferációs indexet és a p53 intenzitást jelző Histo-score-t határoztuk meg az immunfestést követően mikroszkóp segítségével. A Histo-score magában foglalta a festődés intenzitását (osztályozva: 0, nincs festődés; 1, gyenge; 2, közepes; vagy 3, erős), valamint a pozitív sejtek százalékos arányát a kvantitatív értékelést követően. A Histo-score-t a következő képlet alapján határoztuk meg: $[1 \times (\% \text{ sejtek } 1+) + 2 \times (\% \text{ sejtek } 2+) + 3 \times (\% \text{ sejtek } 3+)]$. A lehetséges pontszámok tartománya 0-tól 300-ig terjed.

Az immunfestéseket fénymikroszkóppal két szövettani szakértő egymástól függetlenül értékelték. Ha egymásnak ellentmondó értékeket tapasztaltunk, a döntést személyes megbeszélést követően közös megegyezéssel hoztuk meg. A CAIX expresszióját a festődés mértékén alapuló vizuális osztályozási rendszerrel számszerűsítettük (pozitív tumorsejtek százalékos aránya: 0-100%). A kapott százalékos expressziós értékekből medián értéket számítottunk. A CAIX IHC és az expresszió meghatározása a medián értéktől függően a további elemzéshez CAIX alacsony és CAIX magas osztályozási rendszert hoztunk létre. Az CAIX alacsony csoportba a medián alatti CAIX értékkel rendelkező összes esetet soroltuk, beleértve

a negatív festési eredményeket is, a CAIX magas csoportba pedig a mediánnal megegyező/feletti értékkel rendelkező eseteket soroltuk. A CAIX alacsony és CAIX magas kategóriákat külön értékeltük a NAT és UT csoportokon belül. Az összehasonlítás érdekében megvizsgáltuk a CAIX eloszlását és a CAIX alacsony és CAIX magas kategóriák általános jellemzőit mind a kezdeti biopsziás, mind a műtéti rezekciós mintákban.

3.4. Statisztikai elemzés és ábrák készítése

A statisztikai elemzéshez GraphPad Prism 8 statisztikai szoftvert (Dotmatics, Boston, MA, USA) használtuk. Wilcoxon matched rank tesztet, Spearman korrelációs tesztet és Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk, valamint a VassarStats (<http://vassarstats.net>, hozzáférés: 2023. január 4.) online szoftvert a Fisher-féle egzakt próba alkalmazására, amely a fehérjék expressziója, a klinikai és a szövettani paraméterek közötti statisztikai összefüggés értékelésére szolgált. Csak a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. A irodalmi áttekintésben az ábrák készítésére a www.biorender.com online felületet alkalmaztam.

4. Eredmények

4.1. Vastagbél adenocarcinomás esetek molekuláris patológiai vizsgálata

A DE KK Patológiai Intézetében 2015 és 2022 között összesen 1339 vastagbél tumoros esetben történt a MAPK útvonalban meghatározó szerepet játszó célgének *KRAS*, *NRAS* és *BRAF* molekuláris vizsgálat kérése. 1315 (98,2 %) esetben történt tényleges célgén meghatározás.

A vizsgált időintervallumban intézetünkben a férfiak (64,5%) több mint felét képezik a vastagbél tumoros beteganyagban. A vastagbél tumorok túlnyomó többsége a bal oldalt érintette. A férfiak esetében jobb/bal=12,97%/51,41%, míg a nők esetében jobb/bal=8,9%/26,09% hasonló megoszlás volt igazolható. A jobb és bal colonfélt érintő tumorok a nemek tekintetében közel azonos előfordulást mutattak (nő/férfi=0,3%/0,23%).

A vizsgálataink során felmértük a MAPK útvonal általunk vizsgált mutáns és vad típusú vastagbél daganat eseteinek számát, melynek során a vad típus az esetek több mint felében fordult elő. Továbbá vizsgáltuk a MAPK útvonalban szerepet játszó mutációk előfordulásának gyakoriságát, melynek következtében vad típus igazolódott az esetek több mint felében, ezt követte a mutáns *KRAS*, *BRAF* és legvégül az *NRAS*. A mutáns esetekben vizsgáltuk az egyes *KRAS* variánsok százalékos gyakoriságát. A leggyakrabban előforduló variáns a Gly12Asp (29,57%), melyet a Gly12Val (23,25%), a Gly13Asp (16,51%), a Gly12Cys (9,08%), a Gly12Ala (8,25%) és a Gly12Ser (4,95%) követett.

4.2. A *KRAS* státusz vizsgálata és dinamikája multiplex vastagbél adenocarcinómában – esetbemutató

2015-től 2022-ig a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Patológiai Intézetében 25 primer vastagbél adenocarcinomás esetben szekunder metasztázis szekvenciális vizsgálatát végeztük. Ezekben az esetekben a *KRAS* státusz meghatározása, összehasonlítása volt a cél a primer és metasztatikus vastagbél adenocarcinómákban. Eseteink között szerepelt egy különleges négy egyidejűleg fennálló, különálló vastagbél daganatból álló, többszörös áttéteket okozó vastagbél daganat, melynek klonalitását és genetikai variációját követtük nyomon négy évre visszamenőleg. Vizsgálatunk célja az egyes vastagbél adenocarcinoma góccok retrospektív azonosítása molekuláris genetikai módszerekkel, a primer tumorok és a távoli áttétek közötti

klonális kapcsolatok kimutatása. E célból új generációs szekvenálást alkalmaztunk melyhez egy 15 génes szolid tumor génpanelt (Illumina MiSeq platform) alkalmaztunk. Az NGS eredményeinket reverz hibridizációs teszttel (StripAssay) és hagyományos Sanger-szekvenálással is megerősítettük.

Egy 57 éves férfi esetében cachexiát, laza széket és vérzékenységet észleltek a Debreceni Egyetem Gasztroenterológiai Osztályán. Az ultrahang- és hasi CT-vizsgálat jelentős bélfal megvastagodást, valamint a jobb colonfél (flexura hepatica) régiójában térfoglaló folyamatot írt le, mérsékelt paraaortikus nyirokcsomó megnagyobbodás és a máj VIII. szegmensében metasztázisnak megfelelő 3,2 cm-es elváltozások mellett. A preoperatív vastagbéltükrözés során nyert szövettan tubulovillosus adenomát igazolt, high grade dysplasiával. A tumor általi fenyegető bélelzáródás miatt subtotalis colectomiára került sor metasztazektómiával. A CT-leletben leírt a máj VI-VIII. szegmensében lévő metasztázis inoperábilisnak bizonyult, de a műtét során a máj III. szegmensében talált két kisebb metasztatikus góccok eltávolításra kerültek. A műtét előtt neoadjuváns terápia nem történt.

A műtéti minta részletes patológiai vizsgálata során igazolódott 1) egy 9,5 cm-es mérsékelt differenciált adenocarcinoma a coecumból, már meglévő villosus polippal; 2) egy 4 cm-es, rosszul differenciált adenocarcinoma a májhajlatból, már meglévő villosus polippal; 3) egy 8 cm-es mérsékelt differenciált adenocarcinoma a colon transversumból, meglévő villosus polippal; 4) egy 5 cm-es rosszul differenciált adenocarcinoma a colon transversum régiójából, meglévő polip nélkül; és 5) két necroticus metasztatikus góc (0,8 és 1,3 cm) a máj III. szegmenséből, cribriform szerkezettel. A szövettani mintázat általában mikroglanduláris volt, korlátozott tömegű mucinosus komponenssel. A patológiai stádium pT3 N0 M1 volt. Az IHC-val meghatározott MLH1, MSH2, MSH6 és PMS2 fehérjék expressziója megtartott volt.

A sebészeti minta molekuláris vizsgálata során *KRAS* mutációt azonosítottunk a primer tumorban (2. exon, 12. kodon, c.35G>T; p.Gly12Val). A posztoperatív restaginget követően további májmetasztázisok jelenlétét állapítottunk meg és első vonalbeli kombinált kemo- és biológia terápia (Folfiri és Bevacizumab) mellett döntöttek. Közel egy évvel később a CT-vizsgálattal megállapított regresszió lehetővé tette a máj műtéti feltárását (M2). A beteg posztoperatív Xelox terápiában részesült, de súlyos intolerancia alakult ki a terápiával szemben (hasmenés és kéz-láb szindróma), ezért a kezelést Folfoxra váltották. Hét hónap múlva a CT progressziót igazolt és újabb májmetasztázist távolítottak el, majd posztoperatív

deGramount terápiát alkalmaztak (M3). Kilenc hónappal később további három független májmetasztázist távolítottak el (M4). Ezután a mellkas CT tüdőmetasztázisokat igazolt.

Az M3 mintából Sanger-szekvenálással meghatározott *KRAS* vad típusú státusz alapján másodvonalbeli Vectibix és Folfiri kezelést kezdtek, azonban további regressziót nem sikerült elérni. Az utolsó sebészeti beavatkozás a tüneteket okozó metasztatikus gerinctumor (M5) dekompesszív rezekciója volt, melyet a harmadik vonalbeli Lonsurf terápia követett.

4.2.1. *KRAS* konfirmálási vizsgálatok

Az NGS-sal kapott *KRAS* eredmények összetettsége miatt két alternatív platformon végeztünk konfirmációt. A reverz hibridizáción alapuló StripAssay az összes, korábban NGS-sal kimutatott variánst azonosította, de nem kvantifikálható. A klasszikus bidirekcionális Sanger-szekvenálás megegyező eredményt adott az NGS vizsgálatokkal, kivéve alacsony VAF (<10%) esetén.

4.2.2. NGS-alapú mutációs profil meghatározás

A 15 génből álló solid tumor panel vizsgálata során a *KRAS* és a *TP53* génekben számos mutációt azonosítottuk, míg a többi gén (beleértve a *BRAF*, az *EGFR* és az *NRAS* géneket) nem volt érintett. A preoperatív colonoscopos biopsziában (B) a *KRAS* c.35G>A; p.Gly12Asp variánst (variáns allélfrekvencia-VAF: 10,2%) mutattuk ki, hasonlóan az első primer tumormintához (T/1) (*KRAS* c.35G > A; p.Gly12Asp, VAF: 40,6%). A második vastagbél-daganat mintában (T/2) vad típusú *KRAS*-t detektáltunk. A harmadik vastagbél-tumorban (T/3) a *KRAS* c.34G>T; p.Gly12Cys variánst (VAF: 16,2%), a negyedik primer tumorban (T/4) pedig a *KRAS* c.35G>T; p.Gly12Val variánst (VAF: 15,1%) igazoltuk. A vastagbél műtét időpontjában eltávolított májmetasztázisok eltérő genotípust mutattak: az első tumorban (M1/1) vad típusú *KRAS*-t, a második tumorban (M1/2) pedig patogén *KRAS*-változatot (c.34G>T; p.Gly12Cys, VAF: 19,1%) mutattunk ki. Ugyanezt a *KRAS*-változatot igazoltuk (VAF: 6,4%) a 11 hónappal később rezekált második máj metasztázisban (M2). A harmadik időpontból származó máj metasztázisban (M3, 18 hónap) nem igazoltunk *KRAS* variánst. Az utolsó két időpontból származó metasztatikus mintákban (M4, 27 hónappal és M5, 36 hónappal az elsődleges műtét után) ismét a *KRAS* c.34G>T; p.Gly12Cys variáns fordult elő, bár eltérő allélfrekvenciával (VAF: 2,0%, illetve 32,1%).

4.2.3. TP53 géneltérések vizsgálata

Tizenhat *TP53* génvariánst detektáltunk a 13 elemzett mintában, melyek VAF-ja 2,9 és 72,8% között mozgott. A *TP53* gén c.820G>T; p.Val274Phe variánst a T/3 primer tumorban igazoltuk, mely az összes metasztatikus tumorban megjelent. Az M2 és M3 mintákban alacsony allélfrekvenciával fordultak elő (7,1 és 3,14). Az utolsó két metasztatikus mintában (M4 és M5) ez a variáns magas allélfrekvenciát (72,8 és 45,6% VAF) mutatott. A retrospektív elemzés során a p53 fehérje immunhisztokémiai vizsgálata is megtörtént az összes szövettani mintán, melyen különböző expressziós mintázatok igazolódtak. Az 5% VAF felett az IHC reakció mintázata megfelelt a mutáns fehérje jelölődésének. Kivéve a kezdeti biopsziás mintát (B) és a T/1 és T/4 primer tumorokat, minden minta magas H-score értéket mutatott, melyek mutáns fenotípusú reakcióra utalnak és a kapott NGS eredményekkel egybehangzóak.

4.3. Tumor heterogenitás követése a KRAS gén esetében szövettani és liquid biopsziás mintákban

A tumor heterogenitás a daganatok egyik legfontosabb jellemzője, amely jelentősen hozzájárul a betegség progressziójához és a terápia rezisztenciájához. Mint azt az előzőekben is bemutattuk a reziduális és recidív tumoros góccok genetikailag eltérő szubklónokat képviselhetnek, amelyek nem minden esetben kerülnek felismerésre, mivel az ismételt mintavétel általában korlátozott. A keringő szabad DNS (cfDNS) vizsgálata a perifériás vérplazmából (liquid biopszia, LB) egy hatékony eszköz a daganat genetikai eltéréseinek nyomon követésére.

További tanulmányunkban szintén a genetikai variabilitást vizsgáltuk, amelyet metasztatikus *KRAS* mutáns CRC-ban szenvedő betegeknél figyelhetünk meg. A mintákat 2020 szeptembere és 2022 augusztusa között gyűjtöttük primeren igazolódott esetekben, akik elsődleges mintavételen estek át. A Debreceni Egyetem Patológiai Intézetében működő molekuláris daganatpatológiai laborban összesen 211/490 (43,06%) CRC-s szövetmintát vizsgáltunk a megjelölt időpontban a *KRAS*, *NRAS* és *BRAF* státuszának a meghatározására.

A vizsgált *KRAS* mutáns esetekből 12/211 (5,68%) alkalommal többszörös *KRAS* variáns igazolódott. Ezekben az esetekben a szövettani mintákat (primer tumor és metasztázis) StripAssay és Sanger-szekvenálással is vizsgáltuk, valamint NGS-t és StripAssays-t végeztünk az összes LB mintákból is.

A betegkövetés minden kritériuma három esetben teljesült (mintavétel kezelés előtt, a második ciklus előtt és a negyedik ciklus előtt), ahol lehetővé vált a prospektív perifériás vérmintavétel és cfDNS izolálás. A betegek a mutáns *KRAS* státusz miatt kombinált bevacizumab kemoterápiában részesültek.

A primer tumorminták *KRAS*, *NRAS* és *BRAF* mutációs státuszát magas szenzitivitású reverz hibridizációs technológiával (StripAssay) vizsgáltuk az 1-3. eset összes rendelkezésre álló szövetmintáján. A primer tumorban azonosított mutációkat Sanger-szekvenálással is megerősítettük.

A Sanger electropherogramok VAF-ját minden szövettani mintában meghatároztuk (cut-off >5%). A *KRAS* patogén variánsok VAF tartománya 5-50% között mozgott (átlagosan 19,3%). A cfDNS koncentrációk 0,6 és 55,0 ng/μl között mozogtak (átlag 6,33 ng/μl), ami a DNS tartalom nagyfokú változékonyságát jelzi.

4.3.1. *KRAS* státusz követése LB mintából (1. eset)

66 éves férfi hasi fájdalommal, étvágytalansággal és haematochezia tüneteivel jelentkezik. A preoperatív vastagbéltükrözés a flexura hepatica magasságában tumortömeget igazolt, a szövettani kép tubulovillosus adenomát igazolt, high grade dysplasiával. A CT jelentős jobb oldali bélfal megvastagodást, a flexura hepatica régiójában tumortömeget, valamint multiplex jobb oldali májmetasztázisokat, loco-regionális, mesenterialis és máj hilusi nyirokcsomó megnagyobbodást mutatott. Jobb oldali hemicolecctomia után adenocarcinoma G2, pT3 pN1a patológiai stádium igazolódott 1/15 pozitív nyirokcsomóval. A beteg bevacizumab és xelox terápiában részesült mutáns *KRAS* státusza miatt.

A primer tumor rezekciós mintáit (R1-R5), a metasztázisok (M) és a három cfDNS mutációs státuszát vizsgáltuk. Az R3 és R5 mintákban két *KRAS*-variánst mutattunk ki (c.34G>T; p.Gly12Cys és c.35G>T; p.Gly12Val). Az R1 mintában csak a c.34G>T; p.Gly12Cys mutációt azonosítottuk, míg az R2, R4 és M mintákban a másik genotípust (c.35G>T; p.Gly12Val) igazoltuk. Az első és a második plazmamintában (LB1, LB2) *KRAS* c.34G>T; p.Gly12Cys aberrációt azonosítottunk, míg a harmadik plazma cfDNS (LB3) *KRAS* negatív lett. A LB-ból származó StripAssay-vel kapott eredményeinket NGS-sal konfirmáltuk. A 28 gén elemzésére alkalmas NGS panel alkalmazása során *KRAS* c.34G>T; p.Gly12Cys mutációt azonosítottunk egyetlen patogén variánsként az LB1 és LB2 mintákban 3,0%-os és 1,5%-os VAF értékekkel, az LB3 minta szintén negatív lett.

4.3.2. KRAS státusz követése LB mintából (2. eset)

Egy 70 éves férfi esetében végbéltükrözést végeztek, mivel a végbélnyílás közelében majdnem teljes szűkületet okozó daganatos elváltozás igazolódott. A CT és az MRI tumortömeget mutatott ki a végbél területén, regionális perirectalis érintettséggel, nyirokcsomó megnagyobbodással és multiplex májmetasztázisokkal. A biopszia kórszövetteni vizsgálata adenocarcinomát (G2) igazolt, ennek megfelelően a beteg első vonalbeli neoadjuváns radio-kemoterápiát kapott. A nyirokcsomó- és a májmetasztázisok nem voltak operálhatóak, így műtétre nem került sor. A bevacizumab, xelox kezelés 189 nappal a diagnózis után kezdődött, az LB1 ekkor történt.

A primer tumor reverz hibridizációs és NGS vizsgálata során *KRAS* c.38G>A, p.Gly13Asp és *NRAS* c.37G>C, p.Gly13Arg patogén variánst mutatta ki. Ezzel szemben az első vonalbeli neoadjuváns kezelést követően az LB1-ban két új *KRAS* variáns igazolódott: c.35G>A; p.Gly12Asp és c.35G>T; p.Gly12Val. A második cfDNS-ben (LB2) csak a c.35G>C; p.Gly12Ala variáns jelent meg. A harmadik plazmamintában (LB3) a c.35G>C; p.Gly12Ala mellett a c.35G>A; p.Gly12Asp változat is megjelent, akárcsak az LB1 mintában. *NRAS* mutációt azonban egyik plazma cfDNS-ben sem találtunk.

A RAS variánsokon kívül a következő génmutációk igazolódtak NGS segítségével: *MET* c.2908C>T; p.Arg970Cys, *NTRK1* c.1702C>T; p.His568Ter és *NTRK1* c.1730G>T; p.Gly577Val, amelyek folyamatosan jelen voltak a követés során a liquid biopsziás mintákban. A VAF közel 50%-a ezen elváltozások esetében germline eredetre utalhat.

A *MET* NM_000245.4: c.2908C>T; (p.Arg970Cys) variáns NM_001127500.3: c.2962C>T; (p.Arg988Cys) néven is ismert. Az *in silico* predikciók ellentmondásosak a károsító hatásokat illetően. Az ACMG (American College of Medical Genetics) szintén benignus kategóriába sorolja az eltérést. Az *NTRK1* NM_002529.4: c.1702C>T variánst p.Gln568Ter stop kodonnal járó trunkált fehérjét eredményez, azonban klinikai jelentősége ismeretlen. Az *NTRK1* NM_002529.4: c.1730G>T; (p.Gly577Val) variánst c.1712G>T-ként azonosítottuk az NM_001012331.2 segítségével.

4.3.3. KRAS státusz követése LB mintából (3. eset)

Egy 77 éves férfi esetében 2015-ben vastagbéltükrözést végeztek, melynek eredményeképpen a haránt vastagbelet elzáró daganatot találtak. A nyert biopsziás minta adenocarcinomát igazolt. Bal hemicolecctomiát végeztek melynek során metasztatikus

nyirokcsomó eltávolítás is történt. A kórszövettani vizsgálat adenocarcinomát G3, pT3 pN2b, míg a molekuláris vizsgálat mutáns *KRAS* státuszt igazolt. A műtétet követően a beteg első vonalbeli adjuváns kemoterápiában részesült (Folfox), távoli metasztázis és reziduális tumor még nem volt igazolható képalkotó eljárással. 2020-ban, négy évvel és öt hónappal később hasi CT vizsgálat solid elváltozást írt le a hasnyálmirigyben, amelyből mintát vettek. A kórszövettan és az immunfenotípus megerősítette a vastagbél adenocarcinomából származó metasztatikus jelleget. Bevacizumab- és xelox-terápia mellett döntöttek, amely előtt az első perifériás vérmintát (LB1) levettük. A korábbi esetekhez hasonlóan a cfDNS vizsgálatot a terápiás séma második (LB2) és negyedik (LB3) ciklusa után is megismételtük. A primer tumor és a hasnyálmirigy metasztázis azonos c.38G>A; p.Gly13Asp *KRAS* variánst mutatott, míg az elsődleges műtét idejéből származó nyirokcsomó metasztázis c.34G>T; p.Gly12Cys patogén variánst tartalmazott. Az eredeti c.38G>A; p.Gly13Asp aberrációt csak az első PB cfDNS-ben (LB1) azonosítottunk. A második plazmamintában (LB2) két új variáns, a c.34G>T; p.Gly12Cys (VAF: 2%) és a c.35G>A; p.Gly12Asp (VAF: 2%) variáns igazolódott. Ezen kívül a harmadik cfDNS-ben csak a c.34G>T; p.Gly12Cys (VAF: 1,5%) aberráció jelent meg.

4.4. Hypoxia és adaptáció vizsgálata kezelt (NAT) és nem kezelt (UT) végbél carcinomában

Végbél adenocarcinomával diagnosztizált, preoperatív neoadjuváns kezelésben (NAT csoport) részesült betegből származó 55 kezelés előtti biopsziát és kezelés utáni sebészeti mintát dolgoztunk fel. Ezenkívül 34 biopsziát és műtéti mintát vontunk be kezeletlen végbél adenocarcinomás esetekből (UT csoport). A NAT-en átesett betegek az előírt protokollok alapján a következő kezelésekből részesültek: Capecitabin monoterápiás protokoll 2500 mg/m²; Mayo protokoll: Fluorouracil (5-FU) 425 mg/m² és kalcium-folinát (FOL) 20 mg/m² és fluorouracil (5-FU) monoterápiás protokoll 500 mg/m². Minden beteg sugárterápiában részesült (50,4 Gy összdózis (1,8 Gy/nap, 5 nap/hét) kemoterápiával együtt, kivéve kettő esetet akik csak sugárterápiában részesültek. A kiválasztási kritériumok közé tartozott, hogy az esetek TNM II.-es stádiumú besorolásba tartozzanak, mely a neoadjuváns kezelés előfeltétele, valamint mind a biopszia, mind a rezekciós minta reprezentatív tumorszövetet tartalmazzon a CAIX expresszió pontos elemzéséhez. Összehasonlítottuk az alapvető klinikai és szövettani paramétereket, beleértve a nemet, a tumor grádust és mélységet, az áttétek

jelenlétét/hiányát, a mucinosus fenotípust, a *KRAS* státuszt, a neoadjuváns kezelés típusát és a tumor regressziós grádusát.

4.4.1. A CAIX expressziós mintázat végbél adenocarcinomában

A CAIX kifejeződése nagyon változó formában és mennyiségben fordult elő az értékelt végbél adenocarcinomás mintákban. Általában a tumorsejtek szelektív festődése volt megfigyelhető, míg a normál/érintetlen végbélnyálkahártya negatívnak bizonyult a CAIX tekintetében. A daganatos területeken belül, jellegzetes és szelektív sejtmembrán festődést figyeltünk meg változó intenzitással. Ami az egyes esetek eloszlását illeti, a necrotikus területekkel való szoros összefüggést ismertünk fel, melynek során erős perinecroticus tumorsejt jelölést láttunk. A necrosissal való összefüggést közelebbről is megvizsgáltuk a sebészeti rezekciós mintákon: a kiértékelt NAT 55 műtéti mintából 40 (72,72%) esetben fordult elő necrosis. A 40 esetből 24 esetben (60%) láttunk a perinecroticus területek körül CAIX pozitivitást és 16 (40%) esetben nem azonosítottunk CAIX expressziót. Az UT rezekált mintákban, a 34 értékelt mintából 29 esetben (85,29%) azonosítottunk a tumor szövetben necrosist, melyek közül 26 (89,65%) mutatott CAIX pozitivitást a necrotikus terület körül, míg 3 (10,34%) minta a CAIX tekintetében negatívnak bizonyult.

Érdekes módon a CAIX expresszió a mérsékelt dysplasiás területekben is gyakran előfordult, jól elkülönülve a normál hámtól vagy az alacsony fokú elváltozásoktól. Mérsékelt dysplasticus elváltozások esetében, a membrán jellegzetes CAIX expresszióval rendelkezett. A NAT műtéti minták 55 esetéből 5 (9,09%) esetben, míg az UT műtéti minták 34 esetéből szintén 5 (14,7%) esetben volt jelen a CAIX expresszió a dysplasticus területekben. A mirigyhám eredetű neoplasztikus sejtcsoportok mellett, a CAIX expresszióját a tumoros neostromában is megfigyeltük. Fokozott CAIX expressziót láttunk a tumoron belül a neostromában a NAT műtéti minták 55 esetéből 24 (43,63%) esetben, míg 31 (57,37%) esetben a stroma CAIX negatívnak mutatkozott. A 34 esetből álló UT csoportban a sebészeti minták közül csak 9 (26,47%) esetben láttunk CAIX pozitivitást a stromát illetően.

4.4.2. A CAIX expresszió dinamikája neoadjuváns kezelésben részesült végbél (NAT) adenocarcinoma eseteiben (n=55)

A CAIX expresszióját minden mintában a pozitív tumoros területek százalékos arányának a meghatározásával adtuk meg. A pozitívitas mértékét összehasonlítottuk a kezelés előtti és utáni mintákban. Statisztikai feldolgozás során a NAT biopsziás és a NAT műtéti mintáinak

elemzésével a CAIX jelentős növekedését észleltük a kezelést követően (átlag $21,8 \pm 24,9$ SD vs. $39,4 \pm 29,4$ SD), ami statisztikailag szignifikánsnak bizonyult (Wilcoxon matched rank teszt $p < 0,0001$). Továbbá pozitív korreláció igazolódott a biopszia és a műtéti minta között (Spearman korrelációs teszt $p < 0,0001$, rho: 0,5654).

A további összehasonlítás érdekében az 55 NAT és 34 UT végbéldaganatos eseteinket pontosan felosztottuk a CAIX százalékos mediánja függvényében és CAIX alacsony és CAIX magas carcinomáknak minősítettük őket. Az elérhető klinikopatológiai adatokat is kiértékeljük a lehetséges különbségek bemutatására a CAIX expressziója függvényében. A legfontosabb összefüggést a CAIX expresszió mértéke és a tumor mutáns *KRAS* státusza között (biopsziás $p < 0,0151$; sebészeti minták $p < 0,0316$) találtunk, míg más klinikopatológiai paraméterekkel nem találtunk összefüggést.

4.4.3. A kezeletlen (UT) végbél adenocarcinoma CAIX expressziójának vizsgálata

(n = 34)

A kezeletlen végbél adenocarcinoma mintákat mint kontroll csoportot a korábban bemutatott módon értékeltük. A CAIX expressziója nagyon változó volt, az értékek 0 és 80% között mozogtak. A NAT tumor csoporttal ellentétben az UT biopszia és az UT sebészeti minta statisztikai elemzése nem eredményezett statisztikailag szignifikáns különbséget a CAIX expresszió tekintetében (átlag $15,0 \pm 21,3$ SD vs. $20,0 \pm 23,2$ SD, Wilcoxon matched rank test $p < 0,073$), de a biopsziás és a sebészeti minták közötti korreláció jól kimutatható volt (Spearman korrelációs teszt $p < 0,0001$, rho: 0,8077).

Az UT csoportban is a CAIX alacsony és CAIX magas medián szerinti osztályozást a kapcsolódó klinikopatológiai adatok elemzése követte. Hasonlóan a NAT carcinoma csoporthoz hasonlóan, statisztikailag szignifikáns korrelációt találtunk a CAIX expressziója és a *KRAS* státusz között, de csak a biopsziás CAIX értékek tekintetében (biopsziás $p < 0,0454$; sebészeti minták $p < 0,0921$). Minden más értékelt paraméter független volt a CAIX státusztól.

4.4.4. Tumor regressziós grádus és CAIX a NAT biopsziás és NAT műtéti mintákban

(n = 55)

A neoadjuváns kezelés hatásának vizsgálatára a terápiát követően nyert NAT műtéti mintákban a WHO ajánlásai szerint meghatároztuk a tumor regressziós grádust Mandard féle osztályozás (TRG) szerint. Az így kapott TRG-t kapcsolatát vizsgáltuk a kezelés utáni minta CAIX

expressziójával, de a kezelés előtti biopsziás minták CAIX expressziójával is a lehetséges prediktív jellemzők érdekében. A kezelés előtti biopsziák értékelésénél a TRG2-3 esetek többsége a CAIX alacsony (64,3 és 61,9%), és fordítva, a TRG4-5 esetek többsége a CAIX magas fenotípushoz (71,4 és 83,3%) társult. Ezzel szemben a CAIX expresszió a NAT-t követően általában megnövekedettnek bizonyult, CAIX magas fenotípust mutattak (71,4% és 100,0%).

4.4.5. KRAS státusz és CAIX expresszió a NAT és az UT esetekben

Meghatároztuk a *KRAS* mutációs profilt a tanulmányba bevont összes végbél adenocarcinomás esetből, ami lehetővé tette a CAIX expressziós adatokkal való összehasonlítását. A *KRAS* mutáns és vad típusú tumor csoportok összehasonlítása jelentős különbségeket igazolt, mivel a *KRAS* mutáns minták esetében a CAIX kifejeződése sokkal magasabbnak bizonyult. A CAIX expresszió és a *KRAS* státusz korrelációja statisztikailag szignifikánsnak bizonyult a NAT biopsziákban, a sebészeti mintákban és az UT biopsziákban, de az UT sebészeti rezekciós mintákban nem, a Fisher egzakt teszt szerint ($p < 0,05$).

Mivel a *KRAS* mutáns végbél adenocarcinómák szignifikánsan nagyobb arányban képviselték magukat a CAIX magas csoportban, mind a NAT, mind az UT minták esetében, kombinált elemzést is végeztünk a *KRAS* státuszhoz kapcsolódó pontos CAIX értékek felhasználásával az egységes végbéldaganat kohorszban ($n = 89$, mutáns $n = 46$, vad típusú $n = 43$). A várakozásoknak megfelelően a CAIX expressziós értékek szignifikánsan magasabbnak bizonyultak a *KRAS* mutáns esetekben (kezdeti biopsziák: vad típusú átlag $16,28 \pm 24,34$ SD vs. mutáns átlag $27,67 \pm 24,6$ SD; Mann-Whitney teszt $p = 0,0138$; NAT és UT sebészeti minták: vad típusú átlag $25,51 \pm 25,10$ SD vs. mutáns átlag $43,15 \pm 27,62$ SD; Mann-Whitney teszt $p = 0,002$).

4.4.6. A betegek túlélése és a CAIX expressziója NAT és UT mintákban

Ezután a CAIX expressziójának összefüggését vizsgáltuk a NAT biopsziás és műtéti mintákban a teljes túlélés (OS) és a progressziómentes túlélés (PFS) tekintetében. A statisztikai elemzés (Kaplan-Meier-görbék) szerint a CAIX magas és CAIX alacsony kategóriák között nem volt mérhető szignifikáns különbség az OS vagy a PFS tekintetében (OS biopsziás minták $p = 0,9769$ vs. sebészeti minták $p = 0,6585$; PFS biopsziás minták $p = 0,2129$ vs. $0,7382$). Hasonlóképpen, az UT biopsziás és műtéti minták értékelése sem eredményezett szignifikáns korrelációt az OS és PFS, valamint a CAIX alacsony és CAIX magas expressziós csoportok között (OS biopsziák $p = 0,1620$ vs. műtéti minták $p = 0,7940$; PFS biopsziák $p = 0,4830$ vs. $p = 0,1380$).

4.4.7. Sejtproliferáció és CAIX expresszió

Kutatásunk során a CAIX expressziójának vizsgálata mellett kitértünk a proliferációs aktivitás expressziós mintázatának a megfigyelésére is az UT és NAT csoportokban. Az UT csoportban (n = 34) a kezeletlen biopsziák és műtéti minták esetében a proliferációs aktivitás expressziójának értékei szoros összefüggést mutattak (kezeletlen biopszia átlag $55,8 \pm 16,54$ SD vs. kezeletlen műtéti minta átlag $57,79 \pm 19,97$ SD), statisztikailag szignifikáns különbség nem volt igazolható (Wilcoxon matched rank teszt $p < 0,1671$). Továbbá pozitív korreláció (trend) igazolódott a kezeletlen biopszia és a műtéti minta között (Spearman korrelációs teszt $p < 0,0001$, rho: 0,9371).

Ezzel ellentétben a kezeletlen biopsziák és a kezelt műtéti minták esetében a kezdeti proliferációs aktivitás jelentősen csökkent a kezelés hatására. Statisztikailag szignifikáns különbség igazolódott a Ki-67 expresszió tekintetében (kezeletlen biopszia átlag $56,82 \pm 24,29$ SD vs. kezelt műtéti minta átlag $32,04 \pm 23,62$ SD, Wilcoxon matched rank test $p < 0,0001$), de a kezeletlen biopsziás és a kezelt sebészeti minták közötti enyhe korrelációt láttunk (Spearman korrelációs teszt $p < 0,404$ rho: 0,2772)

Ezenfelül a CAIX és a Ki-67 végbéltumoron belüli expressziós mintázatának vizsgálata során megfigyeltük, hogy az esetek többségében a kezeletlen esetekben a magasabb Ki-67 expressziós értékekhez alacsonyabb CAIX expressziós érték tartozott, míg a kezelt esetek többségében magasabb CAIX expressziós értékekhez alacsonyabb Ki-67 expressziós aktivitás társult. A Ki-67 expressziós értékek szignifikánsan magasabbnak bizonyultak a biopsziás mintákban a CAIX expressziós mintázathoz képest (kezdeti biopsziák: CAIX átlag $21,78 \pm 24,97$ SD vs. Ki-67 átlag $56,82 \pm 24,29$ SD ; Mann-Whitney teszt $p < 0,0001$; NAT sebészeti minták: CAIX átlag $39,44 \pm 29,47$ SD vs. Ki-67 átlag $32,04 \pm 23,62$ SD; Mann-Whitney teszt $p = 0,2630$).

5. Főbb eredmények és következtetések

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

- A vastagbélben megjelenő többszörös primer tumorok metasztatizáló képességei eltérnek. Vizsgált esetünkben egy tumorgóc szolgált az összes áttét forrásaként, hangsúlyozva az elsődleges tumor molekuláris biológiai jellemzőinek fontosságát.
- Az egy betegben előforduló multiplex primer vastagbédaganatok és távoli áttétek vizsgálata során minden primer és áttétes gócot célszerű külön értékelni, mivel az egyes gócok egyedi genetikai profillal rendelkeznek. Az eltérő gócokat külön entitásnak lehet tekinteni és a gócok heterogenitásának megfelelően különálló kezelési lehetőséget kellene mérlegelni.
- Egyes szöveti biopsziák nem informatívak, vagy nem képesek azonosítani a klinikailag releváns genetikai változásokat, a rebiopszia viszont körülményes, nem is mindig kivitelezhető invazív mintavevő módszer. Ezért a liquid biopszia nyújtotta diagnosztikus lehetőség előnyös és egyre gyakrabban reális alternatíva.
- A liquid biopszia, vagyis a perifériás vérben található cfDNA elemzése, lehetővé teszi a daganatos betegség folyamatos genetikai monitorozását és a különböző prediktív génvariánsok azonosítását.
- A liquid biopszia különösen a metasztatikus CRC-k esetén nélkülözhetetlen az anti-EGFR terápiával szembeni rezisztencia és különböző gyógyszerrezisztencia mechanizmusainak azonosításában, az időbeli heterogenitás nyomonkövetésében, ezáltal a személyre szabott terápia kiválasztásában.
- A *KRAS* mutáns szubklónok megjelenése és eltűnése a vastagbél daganat lefolyása során a vártnál gyakrabban dinamikus eltéréseket mutat.
- Kezeletlen és neoadjuváns kezelésben részesült végbél tumorban a hypoxiás stressz hatására a CAIX kiemelkedően specifikus sejtmembrán lokalizációt mutatott és heterogén formában volt jelen a tumoros sejtekben.
- A kezelés utáni szövetmintákban szignifikáns CAIX expresszió emelkedést tapasztaltunk, míg a nem kezelt mintákban eltérés nem volt jellemző.
- A terápia hatékonyságának vizsgálata során a kezelés előtti biopsziák értékelésénél a TRG2-3 esetek többsége a CAIX alacsony és fordítva, a TRG4-5 esetek többsége a CAIX magas fenotípushoz társult, ami a kezelés sikertelenségének fokozott lehetőségét

jelezheti a kezdetben CAIX magas tumorok esetében. Ezzel szemben a CAIX expresszió a terápiát követően általában megnövekedettnek bizonyult, mely alapján korlátozott/a kezelésre nem reagáló (TRG4-5) tumorok CAIX magas fenotípust mutattak.

- A *KRAS* mutáció jelenléte magas CAIX expresszióval társult mind a kezelés előtt, mind a kezelés után. A CAIX által jelzett adaptációs mechanizmus valószínűleg kiemelt szerepet játszik a *KRAS* mutáns végbéltumoros sejtek anyagcseréjének és rezisztenciájának szabályozásában.
- A kezelés előtti mintákban a magas sejtproliferációs értékekhez alacsonyabb CAIX expresszió tartozott, míg a kezelés utáni mintákban a terápia által kiváltott hypoxiás stressz hatására a proliferációs aktivitás jelentős mértékben csökkent, a CAIX expressziója az eseteink túlnyomó többségében fokozódott.
- A CAIX potenciálisan hasznos lehet a kezelés utáni tumorok jellemzésére, de prediktív szerepe továbbra is vitatott marad CRC-ben.

6. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/426/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bádon Emese Sarolta

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bádon, E. S.**, Beke, L., Mokánszki, A., András, C., Méhes, G.: Carbonic Anhydrase IX Expression and Treatment Response Measured in Rectal Adenocarcinoma Following Neoadjuvant Chemo-Radiotherapy.
Int. J. Mol. Sci. 24 (3), 1-16, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24032581>
IF: 5.6 (2022)
2. **Bádon, E. S.**, Mokánszki, A., Mónus, A., András, C., Méhes, G.: Clonal diversity in KRAS mutant colorectal adenocarcinoma under treatment: Monitoring of cfDNA using reverse hybridization and DNA sequencing platforms.
Mol. Cell. Probes. 67, 1-8, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2022.101891>
IF: 3.3 (2022)
3. **Bádon, E. S.**, Mokánszki, A., Mónus, A., András, C., Damjanovich, L., Méhes, G.: Quadruplicate Synchronous Adenocarcinoma of the Colon With Distant Metastases-Long-Term Molecular Follow-Up by KRAS and TP53 Mutational Profiling.
Diagnostics (Basel). 10 (6), 1-13, 2020.
IF: 3.706

További közlemények

4. Matolay, O., **Bádon, E. S.**, Balázs, L., Juhász, P., Csonka, T., Méhes, G.: A szénsavanhidráz IX szerepe a malignus daganatok progressziójában - lehetséges terápiás célpont?
Magy Onkol. 65 (2), 157-166, 2021.
5. Mokánszki, A., **Bádon, E. S.**, Mónus, A., Tóth, L., Bittner, N., Méhes, G.: Cell-free DNA From Pleural Effusion Samples: is It Right for Molecular Testing in Lung Adenocarcinoma?
Pathol. Oncol. Res. 27, 1-7, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/pore.2021.613071>
IF: 2.874





6. Mokánszki, A., Chang Chien, Y. C., Mótyán, J. A., Juhász, P., **Bádon, E. S.**, Madar, L., Szegedi, I., Kiss, C., Méhes, G.: Novel RB1 and MET Gene Mutations in a Case with Bilateral Retinoblastoma Followed by Multiple Metastatic Osteosarcoma.

Diagnostics. 11 (1), 1-11, 2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics11010028>

IF: 3.992

7. Molnár, C., **Bádon, E. S.**, Mokánszki, A., Mónus, A., Beke, L., Györy, F., Nagy, E. V., Méhes, G.: High Genetic Diversity and No Evidence of Clonal Relation in Synchronous Thyroid Carcinomas Associated with Hashimoto's Thyroiditis: a Next-Generation Sequencing Analysis.

Diagnostics. 10 (1), 1-11, 2020.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics10010048>

IF: 3.706

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 23,178

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 12,606

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

Debrecen, 2023.09.15.



Támogatások

A kutatás az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-3-II-DE-502, ÚNKP-21-3-II-DE-277 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Prof. Dr. Méhes Gábornak a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Patológiai Intézet vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított doktori tanulmányaim sikeres elvégzéséhez és dolgozatom megírásához. Köszönöm segítőkész támogatását, a türelmét, a belém fektetett bizalmát, emberségét, valamint a szaktudását, amellyel rávezetett a tudományos orvosi gondolkodás menetére, mely számomra példaértékű útravaló, mind az életben, mind pedig az orvosi szakmában.

Köszönöm továbbá Dr. Mokánszki Attilának és Mónus Anikónak, hogy mély betekintést nyerhettem szaktudásuk által a molekuláris daganatpatológia diagnosztikai hátterébe úgy elméleti, mint gyakorlati szinten egyaránt, valamint a molekuláris labor minden egyes dolgozójának a folyamatos segítségért és támogatásért.

Köszönöm Dr. András Csillának a minták gyűjtésében nyújtott segítségéért és munkám támogatásáért.

Köszönettel tartozom Beke Líviának a feltétel nélküli állandó segítségéért az immunhisztokémiai festések kivitelezésében.

Köszönettel tartozom a Patológia Intézet minden egyes dolgozójának akik közvetlenül vagy közvetve valamilyen módon segítették munkám

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