

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) TÉZISEK

**LARYNGEÁLIS ÉS HYPOPHARYNGEÁLIS
DAGANATOK ÖSSZEHASONLÍTÓ ELEMZÉSE
IMMUNHISZTOKÉMIAI ÉS KOMPARATÍV
GENOMIÁLIS HYBRIDIZÁCIÓS MÓDSZEREKKEL**

DR. JUHÁSZ ATTILA ZOLTÁN

Témavezető: Prof. Dr. Ádány Róza

**DEBRECENI EGYETEM ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM,
NÉPEGÉSZSÉGÜGYI ISKOLA,
MEGELŐZŐ ORVOSTANI INTÉZET;
ORVOSTUDOMÁNYI KAR,
FÜL-, ORR-, GÉGÉSZETI ÉS FEJ-NYAKSEBÉSZETI KLINIKA**

DEBRECEN, 2001.

1. Bevezetés, irodalmi háttér

A humán tumorok 2-3%-át a fej-nyaki régió laphám karcinómái adják, évente több mint fél millió új megbetegedést okozva.

A fej-nyaki laphám rákokat gyakori recidíva és másodlagos malignus tumor kialakulás jellemzi. A betegek 5 éves átlagos túlélése az összes daganat típus között az egyik legalacsonyabb, mindazon diagnosztikus és terápiás újdonság ellenére, melyek az utóbbi időben kerültek bevezetésre.

A tumorok kiindulási helyét figyelembe véve, a klinikai kórlefolyásban jellegzetes különbség észlelhető az anatómiailag szerves közelségben lévő szubrégiók tumorainak vonatkozásában. Míg a gége rákok kezelését követően relatíve kedvezőek a betegek életkilátásai (40-50%-ot is elérhet az 5 éves túlélési arány), addig a hypopharynx daganatos elváltozásai során ez szignifikánsan alacsonyabb, megközelítőleg 10-15% között van.

Hazánkban a daganatok száma évről évre emelkedik. Az elmúlt 25 évben a gége karcinómák okozta halálozás 2,5-szeresére nőtt, míg a hypopharynx daganatok esetében 5-szörös emelkedés következett be; így mára a gége és hypopharynx tumorok az összes daganatos halálozások 10%-áért felelősek.

Hasonlóan más gyakori daganat típusokhoz, a gégészeti betegellátás, illetve a gégészeti tumorok diagnosztikája kapcsán is alapvető fontosságú lenne a daganatok molekuláris karakterizálása, különös tekintettel a primer tumor metasztázisképző hajlamával összefüggésbe hozható markerek identifikálására, hiszen ennek ismeretében nem csak a prognózis megállapítása, de a legjobb kimenetelt biztosító optimális daganatellenes terápia megtervezése is egzakt alapokra helyeződne.

A szolid tumorok alapvető összetevője a daganatos sejtek mellett a gazdaszervezet sejtjeiből, a vér- és nyirokerekéből, valamint az extracelluláris matrixból szerveződő tumor stróma. A daganatos sejteket övező strómában épp úgy megtalálhatók a normál extracelluláris matrix komponensek, mint a csak patológias folyamatokban észlelhető, átmeneti matrix komponensek (pl. fibrin, tenascin). Az extracelluláris matrix alapvető szerepet játszik a daganatnövekedés szempontjából szupportív mikrokörnyezet megteremtésében és fenntartásában, a sejtek közötti kommunikáció mediálásában, jelentős hatást fejtve ki a sejtek differenciálódására.

Az átmeneti stróma komponensek közé tartoznak a fibrin és a tenascin. Normál szövetekben a tenascin csak igen kis mennyiségben detektálható; ezzel szemben mennyisége ugrásszerűen megnő az olyan pathológiás folyamatok helyszínein, ahol sejtproliferáció, migráció és extracelluláris matrix átépülés történik, mint például a tumornövekedés kapcsán. A tenascin számos sejt adhéziót és migrációt moduláló doménnel, illetve extracelluláris matrix molekula kötő régióval (fibronektin, proteoglikán) rendelkezik, s - feltehetőleg az epidermális növekedési faktorhoz hasonlatos szerkezeti elemeknek köszönhetően - közvetlenül stimulálja bizonyos tumor sejtek proliferációját. Így a tenascin fokozott expressziója facilitálja a malignus sejtek környező szövetekbe történő migrációját. Így érthető, hogy számos vizsgált neoplazmában a tenascin fokozott expressziója intenzív progresszióval és magas proliferációs indexsel párosul.

A tumor iniciáció és progresszió genetikai hipotézise szerint a tumor kialakulása egyetlen progenitor sejt klonális expansziójának következménye. A kromoszomális elváltozások olyan kritikus gének (onkogének vagy onko-szuppresszor gének) funkciójának megváltozását vagy elvesztését eredményezhetik, melyek a sejtproliferáció, sejt differenciálódás szabályozásában vagy éppen a genetikai stabilitás biztosításában játszanak alapvető szerepet. Ezeknek az eltéréseknek a felismerése és klinikai paraméterekkel történő korrelációs analízise a tumorok pathogenezisére és prognózisára vonatkozóan alapvető információkat nyújthat, alapjául szolgálva új diagnosztikus és terápiás eljárások kidolgozásának.

Kezdetben a kromoszomális eltérések tanulmányozása, hasonlóan más daganat típusokhoz, a szolid tumorok esetén is a klasszikus kromoszóma sávozásos technika alkalmazására korlátozódott. Ezen vizsgálatok során számos klonális kromoszomális aberrációt azonosítottak. Ezeknek az ismereteknek a jelentősége elvitathatatlan a fej-nyaki daganatok genetikai hátterének feltárásában. Azonban a sejtenyésztes során a sejtek genetikai állományában bekövetkező módosulások miatt nem garantálható, hogy a citogenetikai elemzés során a natív tumorra vonatkozóan kapunk információkat.

A 80-as évek végét követően egyre jelentősebbé váltak azok a molekuláris genetikai technikák, melyek segítségével a kromoszomális szintű genetikai eltérések megismerése a tumor sejtek *in vitro* tenyésztése nélkül is megvalósítható. Kiemelkedő

jelentőségű ezek közül a technikák közül a fluoreszcencia in situ (FISH) és komparatív genomiális hibridizáció (CGH).

A CGH jelentősége a tumorok teljes genomra kiterjedő gyors és átfogó genetikai analízisében ma már vitathatatlan, hiszen az ezzel a módszerrel felismert genetikai elváltozások azokra a kromoszomális régiókra mutatnak rá, melyek specifikusak lehetnek egy adott daganat típusra, továbbá a tumor progresszió meghatározott stádiumára. Ezen specifikus kromoszóma szakaszok részletesebb analízise szükséges ahhoz, hogy az adott régióban elhelyezkedő géneket, melyek sokszor eddig ismeretlen onkogének vagy tumor szuppresszor gének lehetnek, felismerjük. A CGH módszer előnye továbbá, hogy egyetlen kísérlet során lehetséges a teljes genomra vonatkozóan a kromoszomális alterációk relatív számáról információkat nyújtani. Közel diploid vagy aneuploid háttérrel rendelkező sejtek esetében a CGH a legalkalmasabb módszer a nagy gyakorisággal bekövetkező kromoszóma eltérések, illetve a sejtpopulációkban jelenlévő domináns eltérések kimutatására.

Annak ellenére, hogy a fej-nyaki daganatok kromoszomális eltéréseit leíró tanulmányok száma igen jelentős, a daganatok kialakulását és progresszióját kísérő molekuláris történések terén ismereteink meglehetősen hiányosak.

A CGH kidolgozását követően megindult annak alkalmazása fej-nyaki daganatok esetén is. Az első publikációk 1995-ben jelentek meg ezen tumorok vonatkozásában. Az eddig publikált közlemények közös jellegzetessége, hogy a fej-nyaki karcinómákat kiindulási helyüktől függetlenül, összevontan elemzik.

A különböző kiindulású laryngeális és hypopharyngeális daganatok genetikai sajátosságait azonban eddig még nem vizsgálták részletesen.

Fentiek figyelembevételével indokolt, hogy a fej-nyaki daganatok két anatómiaiailag közeli lokalizációjú, de eltérő metasztatizáló hajlamú altípusában tanulmányozzuk a tenascin expressziót és vizsgáljuk szerepét az egyes daganatok progressziójában. A tumor progresszióval együtt járó másodlagos változások megismerése mellett alapvető jelentőségű azoknak a molekuláris genetikai történéseknek a felderítése is, melyek a normál sejtek daganatos átalakulását kísérik.

2. Célkitűzések

Munkánk során célunk volt:

- a tenascin termelésének és szöveti eloszlásának jellemzése gége és hypopharyngeális kiindulású karcinómák esetén immunhisztokémiai módszerek segítségével, annak eldöntésére törekedve, hogy kimutatható-e különbség az expresszióban és a szöveti eloszlás mintázatában az eltérő kiindulású, de azonos stádiumú daganatokban;
- a tumorok stádiumával, metasztatizáló képességével összefüggésben a tenascin eloszlás jellegzetességeinek leírása;
- a követési adatok összevetése alapján a tenascin produkció prognosztikai jelentőségének tisztázása a különböző stádiumú gége és hypopharynx rákok esetén;
- a gége és hypopharyngeális daganatok genetikai eltéréseinek feltérképezése a komparatív genomiális hybridizáció módszerének alkalmazásával;
- a CGH eredmények és a klinikai adatok összehasonlítása alapján a daganat progresszióval, illetve metasztatizálási képességgel összefüggő genomiális alterációk azonosítása.

3. Anyagok és módszerek

A vizsgálatban feldolgozott tumor minták (n=58; 31 gége és 27 hypopharyngeális eredetű tumor) sebészi úton kerültek eltávolításra a DEOEC Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikáján. A minták tumorszövetből, valamint a tumor-normál szövethatárról kerültek kimetszésre.

Szöveti metszetek preparálása és immunhisztokémiai reakciók kivitelezése

A szövetmintákat OCT-be ágyazva, folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd további feldolgozásig - 86°C-on tároltuk. Kettős és hármas immunfluoreszcens jelzésekhez 5-7 µm vastag fagyasztott metszeteket készítettünk, melyeket acetonban fixáltunk. A nem specifikus IgG-kötődés blokkolására 5%-os normál humán szérumot alkalmaztunk. Az immunfluoreszcens reakciókat szobahőmérsékleten végeztük. A reagensek hígításához és a nem kötődött antitestek eltávolításához PBS-t (pH: 7,4) használtunk.

Kettős immunfluoreszcens reakciók

Kettős immunfluoreszcens jelzést alkalmazva az alábbi szöveti komponenseket párhuzamosan detektáltuk:

- a./ **tenascint** és **cytokeratint** (utóbbi epitheliális sejt marker fehérje),
- b./ **cytokeratint** és **proliferáló sejteket** (utóbbi Ki-67 monoklonális antitesttel, mely osztódó sejtek magantigénjét ismeri fel).

Kombinált tenascin és cytokeratin jelzés során a szöveti metszeteket humán-tenascinra specifikus monoklonális antitesttel (1:200) inkubáltuk, majd nyúlban termelt humán-pancytokeratin elleni immunszérumot (1:100) alkalmaztunk. A tenascin ellenes antitestek kötődését biotinált anti-egér-IgG (1:250) hozzáadását követően Texas Red streptavidinnel (1:40) tettük láthatóvá, míg a cytokeratin ellenes antitestek detektálását FITC-el jelzett kecske anti-nyúl-IgG (1:40) alkalmazásával végeztük.

A cytokeratin és az osztódó sejtek párhuzamos detektálása során a tenascin ellenes antitestet Ki-67 monoklonális antitesttel (1:100) helyettesítettük. A reakció minden egyéb lépése a fent leírtak szerint zajlott.

Hármas immunfluoreszcens reakciók

Hármas immunhisztokémiai reakcióval az alábbi szöveti komponenseket mutattuk ki, a reakciókat párhuzamosan, illetve egymást követően, egy szöveti metszeten végezve:

- a./ **tenascint**, **cytokeratint** és **CD-34-et** (utóbbi az endotheliális sejtek markere),
- b./ **cytokeratint**, **CD-34-et** és **osztódó sejteket** (Ki-67 monoklonális antitesttel).

A tenascin, cytokeratin és CD-34 detektálására a metszeteket először egérben termelt anti-humán-tenascin (1:200) és nyúlban termelt anti-humán-pancytokeratin (1:100) antitest, illetve immunszérum keverékével inkubáltuk, majd ezt követően a tenascin megjelenítésére a metszeteket biotinált egér-specifikus IgG-vel (1:250) és AMCA-avidinnel (1:80) reagáltattuk. A cytokeratint FITC-el konjugált nyúl-specifikus IgG-vel (1:40) vizualizáltuk. A CD-34 ellenes reakció kivitelezése előtt, a CD-34 ellenes monoklonális antitest nem specifikus kötődésének megelőzésére normál egér-szérumban (1:200) inkubáltuk a metszetet, majd phycoerythrinrel konjugált anti-CD-34 antitestet (1:2) alkalmaztunk.

A cytokeratin, Ki-67 és CD-34 kombinált reakció a fentiekől csak abban tért el, hogy az anti-humán-tenascin reagenst Ki-67 monoklonális antitesttel (1:100) helyettesítettük.

Immunhisztokémiai jelzések analízise és dokumentációja

Az immunfluoreszcens reakciók kivitelezését követően a szöveti metszeteket PBS-glycerol 1:1 arányú keverékével fedtük le. Az immunreakciók értékelésére FITC, Texas Red/phycoerythrin és AMCA jelzésekre szelektív gerjesztési és emissziós filterekkel ellátott Axioplan fluoreszcens mikroszkópot alkalmaztunk. A digitális felvételek rögzítése és feldolgozása ISIS 3 software segítségével történt. A színes mikroszkópos felvételek Digital Palette filmre készültek.

A klinikai és immunhisztokémiai adatok összehasonlító analízise

Az immunhisztokémiai sajátosságokat a daganatok TNM stádium beosztásával, valamint az érintett betegek recidíva és halálozási adataival összevetve analizáltuk. A statisztikai analízis során F-próbát alkalmaztunk.

A CGH analízis során vizsgált minták eredete

CGH-val összesen 23 fej-nyaki tumor mintát analizáltunk, melyek részben a DEOEC Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikájának, valamint a SOTE Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikájának műtéti anyagából származtak. 14 minta

gégéből kiinduló primer tumorból, míg 9 hypopharyngeális eredetű daganatból került kimetszésre oly módon, hogy a nem tumoros „sejt-kontamináció” minimális legyen.

DNS preparálás és CGH hibridizáció

A tumor mintákat a sebészi kimetszést követően – 80 °C-on tároltuk. A DNS extrakcióhoz alternálva 6 és 30 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A 6 µm-es metszetek hagyományos haematoxylin-eosin festéssel kerültek morfológiai feldolgozásra. Azon minták 30 µm-es párja került CGH-hoz felhasználásra, melyekben legalább 70% volt a tumorsejtek aránya. A DNS hibridizációt Kallioniemi és mtsai. által leírt módon végeztük, kisebb módosításokkal, az alábbiak szerint.

A tumor mintákból a DNS-t fenol:kloroform:izo-amilalkohol (PCI, 26:25:1) oldattal extraháltuk proteináz-K kezelést követően, standard protokoll alapján. Egészséges egyén perifériás véreinek mononukleáris sejtjeiből normál DNS-t hasonló módon izoláltunk. A DNS minták koncentrációját fluorimetriás módszerrel határoztuk meg. A tumor DNS jelzése zölden fluoreszkáló SpectrumGreen-12-dUTP-vel, a normál DNS jelzése pedig vörösen fluoreszkáló SpectrumRed-5-dUTP-vel, nick-transzlációval történt. A kísérleti körülményeket úgy állítottuk be, hogy a jelzett DNS fragmentumok hossza 300 és 2000 bázispár között legyen.

A 200-200 ng jelzett tumor és normál DNS-t, valamint 20 µg jelöletlen humán Cot-1 DNS-t tartalmazó DNS keveréket nátrium-acetáttal és hideg etanollal kicsaptuk. A DNS-t levegőn megszárítottuk és hibridizációs oldatban feloldottuk. A hibridizációs elegyet 73 °C-on denaturáltuk, majd 37 °C-on 30 percig állni hagytuk (preannealing lépés). A normál kromoszómákat tartalmazó CGH lemezeket 73 °C-on denaturáltuk, majd emelkedő koncentrációjú etanol sorban dehidráltuk. A hibridizációs elegyet tárgylemezre cseppentettük és légmentesen lezártuk. A hibridizáció 37 °C-on 72 órán át nedves kamrában történt. A hibridizációs lemezekről a nem hibridizálódott DNS-t az alábbiak szerint távolítottuk el: a lemezeket három egymást követő lépésben hibridizációs mosófolyadékban, majd kétszer 2 X SSC-ben, ezt követően egyszer 2 X SSC-ben és kétszer PN pufferben mostuk, majd a lemezeket ultratiszta vízben leöblítettük és levegőn megszárítottuk. A sejtmagokat anti-fade oldatban oldott 0,15 µg/ml 4,6-diamino-2-fenilindollal (DAPI) festettük. Egy negatív (különböző jelzésű normál-normál DNS) és egy pozitív kontrollt (SpectrumGreen-dUTP-jelzett,

citogenetikailag részletesen jellemzett MPE-600 emlőtumor sejtvonal) használtunk a CGH eredmények validitásának biztosítására.

Digitális képanalízis

A CGH hibridizáció értékelésére fluoreszcens mikroszkóphoz kapcsolt számítógépezérelt kvantitatív képfeldolgozó rendszert alkalmaztunk. A fluoreszcens képek rögzítése (mintánként 8-10 metafázis) monokróm CCD kamerával történt. Minden metafázisról 3 fekete-fehér fluoreszcens képet rögzítettünk. A kék fluoreszcencia (DAPI festés) a kromoszómák azonosítására szolgált, a zöld fluoreszcencia a hibridizálódott tumor DNS-től, míg a piros fluoreszcencia a hibridizálódott normál DNS-től származott. Automatikus háttérkorrekciót követően megszerkesztettük a kromoszómák kariogramját a DAPI festés alapján. A kromoszomális eltérések meghatározása a zöld/vörös fluoreszcencia intenzitás hányados alapján történt a kromoszóma preparátumokon. Az egyes metafázisokra vonatkozó kromoszóma profilokat átlagolva az adott tumorra jellemző átlag eltérések térképét kaptuk meg. DNS többletként definiáltuk azokat az eltéréseket, melyeknél a zöld/vörös fluoreszcencia intenzitás arány meghaladta az 1,15-öt, míg DNS veszteségnek határoztuk meg azokat az alterációkat, melyeknél ez az arány 0,85 alatti értéknek adódott. (ezeket az ún. diagnosztikai háttér értékeket normál-normál hibridizációk átlagértékeiből határoztuk meg). Tekintettel arra, hogy a Cot-1 DNS blokkolja a kromoszómák centroméra közeli heterokromatin régióiban a DNS kötődését, ezeket a kromoszomális szakaszokat a CGH analízis során nem értékeltük.

4. Eredmények

A tenascin eloszlás jellegzetességei gége és hypopharynx daganatokban

Vizsgálati anyagunkban a gége (55 év) és hypopharynx (50 év) daganatos betegek életkora nem különbözött szignifikánsan ($F=0,1$), s a daganat eltávolítása után az átlagos követési idő közt sem volt jelentős eltérés ($F=3,8$).

A hypopharynx karcinómákat a gége tumorokhoz képest jelentősen fokozott metasztatizálási képesség, gyakoribb és korábban jelentkező recidív tumor képződés, ezek következtében emelkedett daganatos halálozás jellemezte. A tumormentes

túlélés a hypopharynx karcinómák esetén szignifikánsan rövidebb volt ($F=4,55$). A sebészi beavatkozáskor észlelt nyaki metasztázisok aránya, a műtét után észlelt recidívák arányával egyetemben jelentősen magasabb voltak a hypopharynx daganatok esetében. Összesen 15 daganatos halálozást észleltünk 58 esetből a követési időszak alatt, melynek megoszlása az alábbiak szerint alakult: gége tumorral összefüggő halálozást 6, hypopharynx daganat következtében történő halálozást 9 betegünk esetében regisztráltunk.

Az összes vizsgált metszetben sikerült kimutatni a tenascin jelenlétét, de mind az intenzitásban, mind az eloszlásban jelentős különbségeket figyeltünk meg.

Mind a gége, mind a hypopharynx szövettanilag normál, tumormentes részében a tenascin szinte kizárólag a felszíni epithélium bazális membránjával kapcsolatos volt kimutatható. Sem a kötőszövetben, sem az erek falában nem volt tenascin jelölődés, és az epitheliális sejtek is negatívnak bizonyultak.

Azon specifikus határ-régiókban, melyek a normál hám és a proliferatív tumoros epithélium határán találhatók, kifejezett strómális tenascin jelölést figyeltünk meg. A sávyszerű, folytonos bazális membránt tenascinban gazdag zóna váltotta fel a szubepitheliális kötőszövetben. Ilyen típusú eloszlást korai stádiumú (T1-2N0) laryngeális tumor mintákban és igen korai (T1N0) hypopharynx daganatokban észleltünk.

A tumor progresszió későbbi szakaszaiban a strómával szoros kontaktusban számos osztódó sejtet tudtunk kimutatni Ki-67 jelzéssel. Ezen túl kifejezetten fokozott tenascin produkciót észleltünk a tumoros és normál szövet határán. Ilyen mintázatot főként T2-T3 stádiumú gége tumorokban, és ritkábban T2 stádiumú hypopharynx daganatokban észleltünk.

A tumoros progresszió előrehaladott stádiumaiban a tumorról határos stróma területeken észlelhető tenascin akkumuláción kívül finom trabekulákban, és gyűrűszerű, 5-20 μm -es átmérőjű struktúrákban is megjelent a tenascin. A preparátumokban intenzív strómális tenascin jelölődés volt megfigyelhető a malignus sejt-fészkek és -szigetek között és körül, de maguk a tumorsejtek nem rendelkeztek tenascin immunreaktivitással. Az oszló sejtek nem csupán a tumor perifériás területein, hanem a tumorfészkeken belül is kimutathatók voltak. Ilyen tenascin eloszlást csak igen előrehaladott, metasztatizáló gége (T4) és hypopharynx (T3-T4) tumorokban láttunk.

A cytokeratin, tenascin és CD-34 együttes kimutatására alkalmazott hármas immunfluoreszcens reakció segítségével egyértelműen bebizonyítottuk, hogy a gyűrűszerű struktúrákat, melyek intenzív TN jelölést mutattak, CD-34-pozitív endotheliális sejtek veszik körül, melyek ereket jelölnek, és a finom trabekulák is longitudinálisan átmetszett ereknek felelnek meg. Amikor cytokeratin, Ki-67 és CD-34 kimutatását végeztük hármas jelzéssel, az ereket nagyszámú proliferáló sejt övezte. Ez a kép csak a tumor progresszió végső szakaszaira volt jellemző, döntően hypopharynx tumorokban, és szoros korrelációt mutatott a metasztatizáló képességgel, korai recidívával és a daganatos halálozással. Azon betegeink mintáiban, akiket az utánkövetés alatt elveszítettünk, szinte kizárólag ilyen tenascin eloszlást észleltünk. Hasonló festődést gége tumorokban csak igen előrehaladott esetekben figyeltünk meg.

CGH-val kimutatható kromoszomális eltérések gége tumorokban

Molekuláris genetikai vizsgálataink célja az eltérő prognózisú gége és hypopharynx tumorok kromoszomális eltéréseinek feltérképezése és ezen eltérések összehasonlítása volt. A daganatok genetikai változásait a komparatív genomialis hibridizáció módszerének alkalmazásával vizsgáltuk. A módszert sikeresen adaptáltuk a gégeből és a hypopharynxból származó tumor minták vizsgálatára.

A CGH-val analizált karcinómák közt a gégetumorok 14%-ban adtak metasztázist, a hypopharynx daganatok ennél lényegesen nagyobb gyakorisággal metasztatizáltak (66%).

Valamennyi tumorban kromoszóma szegmentek számbeli eltéréseit regisztráltuk, melyek vagy a teljes kromoszómát vagy a kromoszómák egyes régióit érintették. A kromoszomális alterációk átlagos száma 5,36-nak adódott, ami tumoronként változó számban jelentkezett, 1-10 eltérés/tumor tartományban. A kromoszomális szakaszokon kimutatható DNS többlet gyakoribb volt, mint azok hiánya. A leggyakoribb a 3-as és 8-as kromoszóma hosszú karját érintő amplifikáció volt, mindkét kromoszomális kar alterációja 57%-os gyakorisággal fordult elő. A második leggyakoribb eltérés a 11-es kromoszóma hosszú karjára lokalizálódó DNS többlet volt (50%), a legkisebb közös eltérés ezen a karon a 11q13 lókus regionális amplifikációját jelentette. Ezeknek az eseteknek a kétharmadában a 11q14-qter

deléció is kimutatható volt. DNS többletet figyeltünk meg továbbá az 5p és 9p (21%-ban), valamint a 2q és 7p karokon (14%-ban).

A 11-es kromoszóma hosszú karján észleltünk a leggyakrabban deléciót (42%). Ezzel megegyező gyakorisággal tapasztaltunk DNS hiányt a 3p karon (42%), míg a 8-as és 9-es kromoszómák rövid karjain 21%-ban találtunk DNS vesztést. Hasonló eltérés mutatkozott a 18q szakaszon az esetek 14%-ában.

CGH-val kimutatható kromoszomális eltérések hypopharynx tumorokban

A vizsgálatban szereplő hypopharynx rákok (n=9) közül 6 adott metasztázist. A hypopharynx daganatok analizálása során a genetikai eltérések átlagos száma 5,55 volt tumoronként (2-11 alteráció/tumor). A DNS szakaszok amplifikációja ebben a tumor csoportban is gyakoribb volt (átlagosan 2,88; tartomány 1-6), a DNS hiányokhoz képest (átlagosan 2,66; tartomány 1-5). A leggyakoribb a 3-as kromoszóma hosszú karjára lokalizálható DNS többlet volt (77%). A 3-as kromoszóma teljes hosszú karjára kiterjedő eltérés 44%-ban volt megfigyelhető, 2 esetben ez a teljes rövid kar delécióval társult, izokromoszóma képződésre utalva. A második leggyakoribb amplifikáció a 11-es kromoszóma rövid karjára lokalizálódott (33%), ami minden esetben a 11q13 sávot érintette, és mindössze egy tumornál társult a disztális kromoszómarészlet (11q14-qter) deléciójával. A 7q és 12p karokat érintő DNS többleteket 22%-ban figyeltük meg.

A leggyakrabban DNS vesztéssel érintett kromoszómaszakasz a 3-as kromoszóma rövid karja volt (66%). Lényegesen ritkábban észleltünk a 9p és a 18q karokon fellépő deléciókat (33%), míg az 1p, 2q, 4p és 7q karokon hasonló eltérést 22%-ban figyeltünk meg.

A gége és hypopharynx karcinómák kromoszomális eltéréseinek összehasonlítása

Összehasonlítva a két tumor típus esetén CGH-val észlelt kromoszomális eltéréseket, hasonlóságokat és lényeges eltéréseket egyaránt tapasztaltunk. A tumoronkénti átlagos genomiális eltérések száma megközelítőleg azonos volt a kétféle lokalizációjú daganatban.

A kromoszóma szakaszokat érintő alterációk részletes elemzése során megállapítottuk, hogy a leggyakoribb eltérés a 3-as kromoszóma hosszú karjának DNS többlete volt, melyet a gégetumorok 57%-ában, illetve a hypopharynx daganatok 77%-ában tudtunk detektálni.

A 11-es kromoszóma hosszú karját érintő amplifikáció a gége daganatok felében, illetve a hypopharynx rákok harmadában volt kimutatható. A hosszú kar disztális részletének hiánya szintén a laryngeális tumorok esetében volt gyakoribb (47%-ban fordult elő), míg csak egyetlen hypopharyngeális tumorban észleltük.

Csak gégetumorokban tapasztaltuk a 8p kar vesztését (21%). Ezzel ellentétesen csak hypopharynx rákokban fordult elő az 1-es kromoszóma rövid karjának delécióna, míg gyakrabban észlelt alteráció volt ebben a daganat típusban a 7p és 12p karok DNS többlete, valamint a 2q, 4p, 7q és 14q karok DNS-hiánya.

A leglényegesebb különbség a 8-as kromoszóma hosszú karjának amplifikációja volt: az általunk gége tumorokban 57%-os gyakorisággal észlelt 8q DNS többletet egyetlen általunk vizsgált hypopharynx daganatban sem sikerült kimutatnunk.

5. *Diszkusszió*

Eredményeink megerősítik az irodalomban korábban már leírt, a gége és hypopharyngeális daganatokhoz rendelhető eltérő prognosztikai sajátosságokat, másrészt új adatokat szolgáltatnak a tumor progresszióval összefüggő tenascin expresszióban bekövetkező változásokról és genetikai eltérésekről.

Megfigyeltük, hogy a tenascin produkció és eloszlás a gége és hypopharynx karcinómákban, a tumor progressziójával párhuzamosan változik és szoros korrelációt mutat a daganat metasztatizáló képességével, recidíva hajlamával. Sikerült bizonyítanunk a tenascin expresszió és neovaszkularizáció kapcsolatát a daganatok növekedése során. Jelentős megfigyelést tettünk a tenascin ér-asszociált akkumulációjának kimutatásával. Igazoltuk a tenascin szerepét a tumor progresszió, neovaszkularizáció és metasztatizálás folyamatában, így bebizonyosodott, hogy a tenascin expresszió megléte és eloszlási mintázata kiváló prognosztikai faktorként használható fel az egyes fej-nyaki tumorok klinikai viselkedésének előrejelzésében.

A kétféle kiindulású daganat kromoszomális eltérései között számos hasonlóságot mutattunk ki, azonban szembetűnő különbözőségeket is feltártunk.

A kromoszomális eltérések részletes vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a nagy gyakorisággal észlelt eltérések közül a legjelentősebb a 8q kar DNS többletének kizárólagosan gége tumorokban való előfordulása volt. Az eltérések ezen a kromoszómán a 8q23 lókuszra koncentráálódtak. Feltételezhető jelentőségét abban látjuk, hogy az ide lokalizálható *C-MYC* onkogén gégetumorok esetén a tumorsejtek apoptotikus sejtelhalásának elősegítésével járulhat hozzá ezen daganatok ritkább metasztázis képzéséhez, ezzel jobb prognózisához. Hasonló megfigyelést tettünk a 11q13 sáv eltéréseinek tekintetében is. Míg az egyébként számos ismert és jelentősnek tartott onkogént hordozó kromoszómarészlet amplifikációja bizonyos tumorokban rossz prognosztikai jelnek számít, addig az általunk elemzett fej-nyaki daganatokban ez a fenomén nem igazolódott.

Ezeket a különbségeket magyarázhatják az azonos patológiai megjelenés ellenére a háttérben fennálló genetikai sajátosságok, de nem zárhatók ki a főbb karcinogének eltérő expozíciójából eredő eltérések sem.

Fentiek alapján úgy véljük, hogy a különféle lokalizációjú tumorok jól definiálható, eltérő genetikai változásokon mennek keresztül progressziójuk során és az azonos kromoszomális eltérések jelentősége is különböző lehet. E miatt indokoltnak tartjuk a kiindulási régió függvényében értékelni az egyes genomiális eltéréseket, melyek fenti eredményeink alapján hasznosak lehetnek az adott tumor prognózisának becslésekor.

Közlemények jegyzéke

A tézishez felhasznált közlemények

Juhász A, Bárdos H, Répássy G, Ádány R (2000): Characteristic Distribution Patterns of Tenascin in Laryngeal and Hypopharyngeal Cancers. The Laryngoscope. 110:84-92.

IF:1,266

Bárdos H, **Juhász A**, Répássy G, Ádány R (1998): Fibrin Deposition in Squamous Cell Carcinomas of the Larynx and Hypopharynx. Thrombosis Haemostasis. 80:767-772.

IF:3,726

Juhász A, Balázs M, Sziklay I, Répássy G, Ádány R: Characteristic Genetic Alterations and Their Prognostic Significance in Laryngeal and Hypopharyngeal Carcinomas Revealed by CGH. *(Közlésre elküldve)*

A témában megjelent egyéb közlemények:

Lukits J, Tímár J, **Juhász A**, Döme B, Paku S, Répássy G (2001): Progression difference between cancers of the larynx and hypopharynx is not due to tumor size and vascularization. Otolaryngology, Head and Neck Surgery. 125:18-22.

IF: 0,893

Juhász A, Bárdos H, Répássy G, Ádány R (1997): Characteristic distribution patterns of tenascin in laryngeal and hypopharyngeal cancers. Thrombosis Haemostasis Suppl: 353. (abstract)

Bárdos H, **Juhász A**, Répássy G, Ádány R (1997): Fibrin depozíció laryngeális és hypopharyngeális tumorokban. Magyar Onkológia. 41:246. (absztrakt)

Juhász A, Bárdos H, Répássy G, Ádány R (1997): A tenascin eloszlás sajátosságai különböző invazivitású laryngeális és hypopharyngeális tumorokban. Magyar Onkológia. 41:246. (absztrakt)

Répássy G, Forster-Horváth Cs, **Juhász A**, Ádány R, Tamássy A, Tímár J (1998): Expression of Invasion Markers CD44v6/v3, NM23 and MMP2 in Laryngeal and Hypopharyngeal Carcinoma. Pathology Oncology Research. 4:14-21.

Lukits J, Döme B, **Juhász A**, Paku S, Tímár J, Répássy G (2000): Gége- és hypopharyngeális rákok jellemzése – Tumorméret és vaszkularizáció. Magyar Onkológia. 44:239-245.

Répássy G, Hirschberg A, Jókay I, Tóth L, Rezek Ö, **Juhász A** (2000): Supracricoid horisontális laryngectomia. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat. XLVI:91-98.

Répássy G, Hirschberg A, Rezek Ö, Kisely M, Tóth Á, **Juhász A** (2000): Supracricoid laterális gégereseccio a sinus piriformis rák kezelésére. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat. XLVI:155-162.

Répássy G, Tamás L, Forster-Horváth Cs, **Juhász A**, Tímár J (2001): A metasztatikus fenotípus jellemzése gége és hypopharynx tumorokban az NDP kináz A/NM-23H1/NME1 expresszió alapján. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat. XLVII:4-7.

Az értekezés témájához kapcsolódó előadások, posztterek jegyzéke:

Juhász A, Répássy G: A tenascin eloszlás sajátosságai különböző invazivitású laryngeális és hypopharyngeális tumorokban. A Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesületének Szakcsoporthülése, Budapest, 1997. Április 9. (előadás)

Juhász A: A tenascin eloszlás sajátosságai gége és hypopharynx tumorok esetén. DOTE, PhD Konferencia 1997/1998., 1998. Március 30.-Április 03. (előadás)

Juhász A, Bárdos Helga, Répássy Gábor, Ádány Róza: A tenascin eloszlás sajátosságai különböző invazitású gége és hypopharynx tumorokban. (Absztrakt:E131) A Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesületének 35. Kongresszusa, Pécs, 1998. Június 17-20. *(előadás)*

Bárdos H, **Juhász A**, Répássy G, Ádány R: Fibrin deposition and tenascin expression in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. 17th International Cancer Congress, Rio de Janeiro, Brasil, 1998. August 23-28. *(előadás)*

Juhász A, Bárdos H, Répássy G, Ádány R: Characteristic distribution patterns of tenascin in laryngeal and hypopharyngeal cancers. XVIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Florence, Italy, 1997. June 6-12. *(poszter)*

Juhász A, Bárdos H, Répássy G, Ádány R: A tenascin eloszlás sajátosságai különböző invazitású laryngeális és hypopharyngeális tumorokban. A Magyar Onkológusok Társaságának XXII. nemzeti kongresszusa, Budapest, 1997. november 10-12. *(poszter)*

Bárdos H, **Juhász A**, Répássy G, Ádány R: Fibrin depozíció laryngeális és hypopharyngeális tumorokban. A Magyar Onkológusok Társaságának XXII. nemzeti kongresszusa, Budapest, 1998. November 10-12. *(poszter)*

Juhász A: Gége és garat tumorok genetikai sajátosságainak vizsgálata komparatív genomiális hybridizációval. A Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesületének jubileumi, 36. Nemzeti kongresszusa, Hévíz, 2000. Október 24-28. *(poszter)*