

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

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

Dr. Tóth László

Témavezető:

Dr. András Csilla



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2013

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
1.Rövidítések jegyzéke	4
2.Bevezetés	6
3.Irodalmi áttekintés.....	8
3.1. Epidemiológiai adatok.....	8
3.2. A colorectalis rák kialakulása, molekuláris biológiája.....	9
3.2.1. A colorectalis rák szubtypusai a molekuláris patogenezis alapján.....	9
3.2.2. Specifikus génhibák, jelátviteli utak colorectalis carcinomában.....	11
3.2.3. A vastagbél carcinoma csoportosítása a molekuláris jellegzetességek alapján.....	20
3.3. A colorectalis carcinoma családi halmozódása.....	21
3.4. Prognosztikai faktorok, prediktív faktorok.....	23
3.4.1. Klasszikus prognosztikai faktorok.....	24
3.4.2. Molekuláris prognosztikai faktorok.....	25
3.4.3. A kemoterápia prediktív faktorai.....	26
3.5. Szöveti multiblokk- tissue microarray (TMA) módszer.....	28
4.Célkitűzés.....	32
5.Betegek, anyagok és módszerek.....	33
5.1 TMA validáció.....	33
5.2. Rhabdoid szövettani fenotípus vizsgálata.....	35
5.3.E-Cadherin- β -catenin vizsgálat.....	36
5.4. Prognosztikai vizsgálat	36
5.5. ERCC1 kimutatás és prognosztikai faktorok vizsgálata metastaticus colorectalis carcinomában.....	37
5.6. Immunhisztokémiai reakciók	37
5.6.1. Alkalmazott primer antitestek, az antitest specifikációk.....	38
5.6.2. Immunreakciók értékelése.....	41
5.7. EGFR amplifikáció kimutatása FISH reakcióval.....	42
5.8. Statisztikai elemzés	43
6.Eredmények.....	44
6.1 TMA validáció.....	44
6.2. Rhabdoid szövettani fenotípus vizsgálata.....	46

6.3. E-cadherin- β -catenin vizsgálat.....	50
6.4. Prognosztikai vizsgálat	59
6.5. ERCC1 kimutatás és prognosztikai faktorok vizsgálata metastaticus colorectalis carcinomában.....	65
6.6. EGFR amplifikáció kimutatása FISH reakcióval.....	70
7.Megbeszélés.....	73
8.Összefoglalás.....	91
9. Summary.....	92
10. Új eredmények.....	93
11.Irodalomjegyzék.....	94
12.Saját közlemények jegyzéke.....	112
12.1. Hivatalos publikációs lista.....	112
12.2. Magyar közlemények.....	117
12.3. Az értekezéshez kapcsolódó kongresszusi előadások és poszterek.....	119
13. Tárgyszavak.....	120
14. Köszönetnyilvánítás.....	121
15. Támogatások.....	122

1. Rövidítések jegyzéke

APC: adenomatous polyposis coli

AJCC: American Joint Committee on Cancer

ATM: ataxia teleangiectasia mutated

ATR: ATM and RAD3-related

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

CDK: ciklin dependens kináz

CDKN1A: ciklin dependens kináz 1A

CIMP: CpG island methylator phenotype

CIN: chromosome instability

CK: cytokeratin

COX: ciklooxigenáz

CTNNB1: β -catenin gén

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol

DCC: deleted in colon cancer

DFS: disease free survival

DNS: dezoxiribonukleinsav

EGF: epidermal growth factor

EGFR: epidermal growth factor receptor

EMA: epithelial membrane antigen

ERCC1: excision repair cross complementation group 1

FAP: familial adenomatous polyposis coli

FISH: fluorescens in situ hibridizáció

5-FU: 5-fluorouracil

GIST: gastrointestinal stromal tumour

GSK3b: glikogén szintáz kináz 3b

GTP: guanozin trifoszfát

GDP: guanozin difoszfát

HER: humán epidermális növekedési faktor család

HMB45: melanoma associated antigen antibody- human melanoma black clone

HNPCC: hereditary non polyposis colon cancer

IHC: immunhisztokémia

Ini1: integrase interactor 1
INK: inhibit CDK
Ki-67: proliferációs marker
KSH: Központi Statisztikai Hivatal
LCA: leukocytá common antigen
MAPK: mitogen activated protein kinase
MERT: malignant extrarenal rhabdoid tumour
MIB-I: Ki-67 ellenes monoklonális antitest klón jelzése
MMR: mismatch repair
MRRT: malignant renal rhabdoid tumour
MSI: microsatellite instable
MSS: microsatellite stable
mTOR: mammalian target of rapamycin
NER: nucleotide excision repair
NfκB: nuclear factor kappa B
NSCLC: non small cell lung cancer
OS: overall survival
PAS: periodic acid Schiff reagens
PCR: polimerase chain reaction
PFS: progressio free survival
PI3K: foszfatidil inozitol-3 kináz
PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10
RAS: onkogén család (rat sarcoma után elnevezve)
RB: retinoblastoma
RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction
SMA: smooth muscle actin
SMAD4: mothers against decapentaplegic homolog 4
SNP: single nucleotide polymorphism
TCF/LEF: T-cell factor/lymphoid enhancer factor
TGF: transforming growth factor
TMA: tissue microarray
TS: timidilát szintáz
WHO: World Health Organisation
Wnt: wingless and a related gene termed int 1

2. Bevezetés

A rosszindulatú daganatos megbetegedések között a vastagbélrák a nyugati világban és hazánkban is az egyik leggyakoribb, valamint a második leggyakoribb daganatos halálok a fejlett országokban [1,2]. Bár a túlélés az összes európai országban javul, mind a férfiak, mind a nők esetében, függetlenül a lokalizációtól és az életkortól, továbbra is jelentős népegészségügyi probléma. Az utóbbi évtizedekben könyvtárnyi irodalmi adat gyűlt össze a colorectalis carcinoma biológiájáról. A klinikai ismeretek mellett ma már a molekuláris patogenezis tekintetében is hatalmas információhalmaz áll rendelkezésre. Fearon és Vogelstein mára már klasszikussá vált közleménye óta már tankönyvi adat, hogy a colorectalis carcinoma kialakulása soklépcsős folyamat, mely során különféle, többnyire már jól definiált és jellemzett genetikai változások következnek be a colorectalis mucosa hámsajtjeiben, míg a malignus sejtklón megjelenik [3]. A genomot érintő változások mellett az epigenetikai változások jelentőségéről is egyre több adat gyűlik össze [4]. Az is ismert, hogy a colorectalis carcinoma genetikai szempontból nem egységes kórkép, hanem több csoportba sorolható a jelen lévő főbb molekuláris jellegzetességek alapján [5,6]. A vastagbél carcinoma kezelésében döntő jelentőségű az időben elvégzett radikális sebészeti beavatkozás. Azonban még a korai stádiumú betegség esetén is előfordul a daganat kiújulása, metastaticus betegség megjelenése. Ma már a metastatizáló vastagbélrák kezelésében is több új terápiás támadáspont jelent meg, melyek a tumorbiológiai alapkutatás mindennapi klinikai gyakorlatba történő átültetésének eredménye. Ismert adat, miszerint Dukes B2- stage II colorectalis tumoros betegekben az öt éves OS csak 60%, és a betegek egy részében metastasis alakul ki. Ebben a stádiumban a műtét utáni adjuváns kemoterápiás kezelés, az általánosan elfogadott 5FU bázisú protokollok szerint, a legtöbb irodalmi adat szerint nem eredményez szignifikáns javulást az OS tekintetében [7,8,9]. Ismertté vált az is hogy az újabb, biológiai támadáspontú terápiák nem használnak minden betegek esetében, sőt sok betegben egyáltalán nem mutható ki terápiás válasz. Ma már számos, a biológiai terápia hatékonyságát előrejelző faktor ismert [10,11].

Mindezen tények mellett igen komoly az igény a klinikai onkológia részéről, egyrészt olyan prognosztikai faktorokat keresni, melyek segítségével előrevetíthető, hogy a korai stádiumú betegek közül kinél fog a betegség kiújulni, illetve áttét fellépni. Másrészt a prognosztikai faktorok mellett a terápiás próbálkozások hatékonyságát előrejelző prediktív

faktorok iránt is jelentős érdeklődés mutatkozik. A megbízható prediktív faktorok a jelenleginél eredményesebb beteg szelekciót biztosíthatnak, és így a colorectalis carcinoma terápiája individualizálhatóvá válik.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Epidemiológiai adatok

A rosszindulatú daganatos megbetegedések között a vastagbélrák a nyugati világban és hazánkban is az egyik leggyakoribb, valamint a második leggyakoribb daganatos halálok a fejlett országokban. Az USA-ban 2013-ban a becsült adatok szerint mintegy 142000 új eset mellett 50000 beteg fog meghalni colorectalis rákban, ezzel a daganatos eredetű halálozás 15%-át eredményezve [1]. Ezzel az adattal a vastagbél carcinoma a daganatos megbetegedések incidenciáját és a daganatos halálozást tekintve a 3. helyen áll az összes daganatos betegség között. A betegség incidenciája széles megoszlást mutat, a legmagasabb a nyugati világ országaiban, a legalacsonyabb Indiában. A WHO adatai szerint évente kb. 945000 új eset kerül felismerésre, illetve kb. 492000-en halnak meg colorectalis carcinomában [12,13]. Magyarországon a daganatos betegségek között a colorectalis rák előfordulási gyakorisága mind férfiakban, mind nőkben a második helyen áll (a bőrdaganatokat nem számítva), míg a daganatos halálozási sorrendben mindkét nem figyelembe vételével, valamint a nőket és a férfiakat külön-külön vizsgálva is a második helyet foglalja el. A daganatos halálozási statisztikában férfiaknál és nőknél is a tüdőrák előzi meg, a nők esetében az emlő carcinoma a harmadik helyre szorult vissza. A Nemzeti Rákregiszter illetve a KSH adatai alapján Magyarországon 2003-ban 8658, míg 2005-ben összesen 9062 újonnan felfedezett colorectalis carcinomát jelentettek be, ebből 2003-ban 4551 férfi, 4107 nő, míg 2005-ben 4859 férfi, 4203 női beteget. Ugyanezen években a colorectalis rák okozta halálozás 2003-ban férfiaknál 2787, nőknél 2311 eset, 2005-ben férfiaknál 2462, nőknél 2095 eset volt [2, 14]. Az utóbbi 25 évben a colorectalis carcinoma abszolút számban kifejezett hazai halálozása, halálozási gyakorisága és standardizált halálozási gyakorisága mind a férfiak, mind a nők körében jelentősen nőtt, bár a növekedés üteme a legutóbbi néhány évben mérséklődött [15]. 2011-ben összesen 9952 új esetet jelentettek be, akik között 5394 férfi és 4558 nő volt. (Országos Onkológiai Intézet Rákregisztere, informális közlés) Európai adatokat tekintve, 1995-ben a vastagbélrák incidenciac 334000 fő volt, míg a vastagbélrák okozta halálozás 189000 fő volt, mindkét mutatót tekintve a második a daganatos betegségek között. Ugyanezen évben az európai országok között a magyarországi vastagbélrákos halálozás férfiak esetén a 2., nők esetén az 1. helyen állt [16]. Észak-Kelet Magyarországon jelenleg évente 100000 lakosra számítva 50-60

új megbetegedéssel kell számolni. Hazánkban eltérést találunk az előfordulási gyakoriságban az ország nyugati és keleti része között (a nyugati részen több a beteg). Egy folyamatos jobbrtolódást figyelhetünk meg a daganatok lokalizációját illetően. A túlélés az összes európai országban javul, mind a férfiak, mind a nők esetében, függetlenül a lokalizációtól és az életkortól. Az Egyesült Államok rákregiszterének adatai szerint a colorectalis rák 5 éves túlélése az összes beteg átlagát tekintve a 1975-ben 51%, 2008-ban 65% volt [1]. 2008-ban lokalizált tumoroknál 90%, regionálisan előrehaladott tumoroknál 70%, távoli áttétes tumoroknál 12% volt az 5-éves OS.

3.2. A colorectalis rák kialakulása, molekuláris biológiája

3.2.1. A colorectalis rák szubtypusai a molekuláris patogenezis alapján

A vastagbél carcinoma kialakulása többlépcsős folyamat, mely során több onkogén aktiválódása illetve tumor szuppresszor gén inaktiválódása mutatható ki. Fearon és Vogelstein klasszikus közleményükben az akkor ismert genetikai eseményeket a vastagbél carcinogenesis morfológiai lépcsőivel állították párhuzamba, ezáltal megalapozták a már évtizedes múlta visszatekintő adenoma- carcinoma szekvencia elméletet és a vastagbélrák kialakulásának többlépcsős modelljét [3]. A már klasszikussá vált közlemény megjelenése óta a vastagbélrák molekuláris hátteréről robbanásszerűen fejlődtek az ismeretek, így ma már könyvtárnyi irodalom foglalkozik a vastagbél carcinogenesis-sel. A klasszikus adenoma-carcinoma szekvencia modelltől elindulva ma már jóval komplexebb módon látjuk a vastagbél carcinoma kialakulását. Az is elfogadott, hogy több molekuláris útvonal is ismert, melyek a vastagbél carcinoma kialakulásában szerepet játszanak [5]. Az egyes molekuláris útvonalakon eltérő genetikai hátterű daganatok alakulnak ki, melyek többnyire hasonló morfológiai fenotípust mutatnak. Kivételt képez a MSI útvonalon képződő daganatok csoportja, melyek a többi tumortól némiképp eltérő morfológiát és klinikopatológiai sajátosságokat mutatnak [17].

Mai ismereteink alapján a vastagbél carcinómában észlelt genomikus és epigenetikai eltérések négy fő csoportba sorolhatók:

1. Kromoszomális instabilitás.
2. Mikroszatellita instabilitás.
3. CpG sziget metilátor fenotípus.
4. Globális DNS hipometiláció [5].

Ezek közül leggyakoribb a kromoszomális instabilitás (CIN). A vastagbél carcinomák mintegy 85%-ában megtalálható. Aneuploidia, számbeli kromoszomális eltérések, vagy multiplex szerkezeti eltérések mutathatók ki [18]. A CIN serkenti a carcinoma progresszióját,

fokozódó klonális diverzióval. A CIN kialakulásának oka változatos lehet. Az egyik potenciális lehetőség az APC gén mutációja, mely ezen csoportban gyakran kimutatható [19].

A mikroszatellita instabilitás (szokták említeni replicatio error, RER, vagy mutátor fenotípusként is) a colorectalis tumorok kb. 15%-ában mutatható ki [20]. Ezen daganatok normál kariotípussal jellemezhetők. Hátterében a mismatch repair gének inaktivációja áll, vagy aberráns metiláció vagy szomatikus mutáció révén [21, 22]. Az MSI esetek egy részének hátterében a mismatch repair (MMR) gének germline mutációja áll- ezek az esetek a HNPCC vagy Lynch-szindrómás colorectalis carcinomák. A HNPCC a leggyakoribb öröklött colorectalis carcinoma szindróma, amely az összes colorectalis carcinoma 2-4%-át teszi ki [23]. A kórkép hátterében az MMR gének- MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 és PMS2 valamelyikének germline mutációja áll. További gének (MLH3, EXO1) szerepét is feltételezik, mivel bizonyos HNPCC-s családokban egyik, fenti génben sem mutatható ki patogén mutáció. Az esetek 99%-ában azonban a MLH1, MSH2 vagy MSH6 érintett [24]. A szindróma autoszomális domináns öröklésmentet mutat. A mutációt hordozó egyének valamennyi szomatikus sejtjében jelen van a mutáns allél, míg a másik allél elvesztése az élet során a colon epithel sejtekben következik be, carcinogenesishez vezetve. A mismatch repair gének mutációjának következménye a DNS hibajavítás károsodása. Emiatt az 1-6 nukleotidból álló rövid, ismétlődő szekvenciákat tartalmazó DNS-szakaszok, a mikroszatelliták replikáció során instabillá válnak, és ezáltal megrövidülhetnek, vagy meghosszabbodhatnak. A mikrosatellita instabilitás kimutatására a nemzetközi ajánlások (Bethesda guideline) alapján 5 mikrosatellita markerből álló panel használata javasolt. (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123 és D17S20) A tumorszövetből DNS izolálás után PCR-reakcióval amplifikálják a mikroszatellitákat és a fragment hosszát gélelektroforézissel detektálják. Amennyiben a tumor a vizsgált markerek közül legalább kettőre pozitív, akkor MSI-high, ha egyre pozitív MSI low kategóriába kerül. Ha nem észlelhető egyik markerrel sem pozitívítás, úgy a tumor mikrosatellita stabilnak, MSS-nak tekintendő [25]. A MSI a HNPCC-es tumorok több mint 90%-ában kimutatható, míg a sporadikus colorectalis carcinomák 15%-ában is kimutatható mikrosatellita instabilitás. A sporadikus MSI esetekben az MMR inaktiváció legtöbbször az MLH1 aberráns metilációja révén történik. A sporadikus MSI tumorok kialakulása a serrated neoplasia útvonalon történik. Gyakori a BRAF V600E mutáció, míg a HNPCC-s tumorokban gyakorlatilag nincs BRAF mutáció [26, 27].

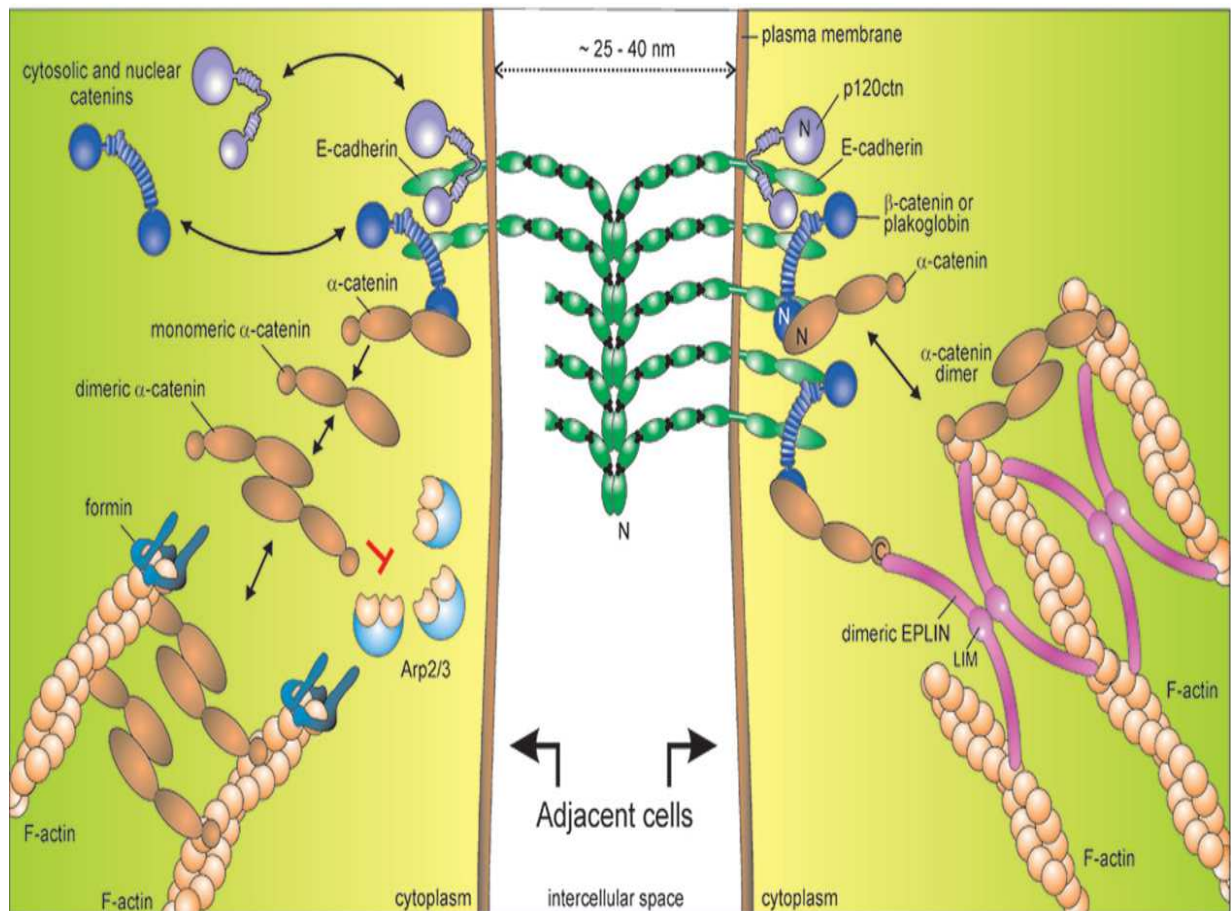
A CpG sziget metilátor fenotípus (CIMP) vagy a DNS globális hypomethylatioja epigenetikus instabilitást eredményez. Az epigenetikai instabilitás során a sejt génállománya,

a genotípus, a gének szerkezete nem változik, azonban az egyes gének transzkripciója zavart szenved. Ennek következtében olyan gének is átírásra kerülhetnek, melyek aktuálisan nem szükségesek a sejtműködéshez, pl. onkogének, vagy épp ellenkezőleg, tumor szuppresszor gének átírása maradhat el. A DNS metilációs státusz, vagy még inkább mintázat jelentőségével kapcsolatban egyre több adat kerül közlésre [28, 29]. A metiláció során a citozin 5. szénatomjához kapcsolódik metilcsoport. A reakciót DNS-metiltranszferázok irányítják. Humán sejtekben a DNS-ben lévő citozin-guanin dinukleotid szekvenciák- (CpG-szigetek) 60-65%-a metilált. A géntranszkripciót a promoter régió metiláltsága szabályozza, így leegyszerűsítve, a metiláltság mint egy kapcsoló működik a gén átírásban. Több tumor szuppresszor gén inaktivációja függ össze promoter régiójuk hipermetiláltságával, pl. a gyomorrák kialakulásában szereplő RUNX3, vagy a p16. A már fentebb említett MLH1 is a hipermetiláltság miatt veszítheti el aktivitását a sporadikus MSI tumorokban [30]. CIMP esetén gyakori a BRAF V600E mutáció, bár ennek pontos szerepe még nem ismert [31].

3.2.2. Specifikus génhibák, jelátviteli utak colorectalis carcinomában

A colorectalis carcinogenesisben több specifikus génhiba is leírásra került, illetve ismertté vált több szignál útvonal szerepe.

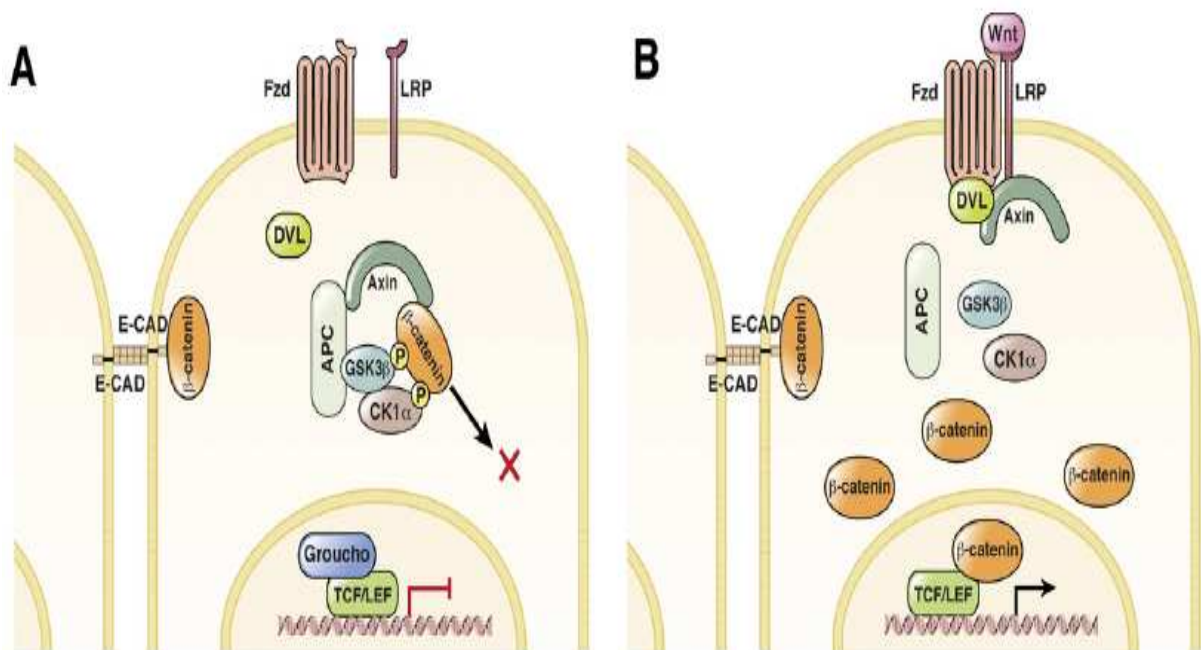
A β -catenin és az E-cadherin szerepe ismert a sejt-sejt adhézióban [32]. A sejt-sejt adhézióban fő mediátor cadherin család tagja a 120 kDa mólűyű transzmembrán glikoprotein E-cadherin, melyet a 16q22 kromoszómán lévő CDH1 gén kódol. Az extracelluláris domén kalcium függő módon kapcsolódik a szomszédos sejt cadherin molekulájához [33]. Intracellulárisan az α -catenin, β -catenin és γ -catenin az E-cadherinnel képez komplexet és biztosítja az actin cytosceletalis proteinhez való kapcsolódást [34,35]. Az E-cadherin- β -catenin komplex a sejtmembránban a zonula adherensnek megfelelően helyezkedik el. (1. ábra) Az E-cadherin intracelluláris doménjéhez kapcsolódik még a p120 protein is, melynek pontos szerepe még nem ismert [36]. A tumor metastasis képződés egyik fontos lépése az intercelluláris kapcsolatok felbomlása. Számos tumor esetében kimutatták már, hogy ebben szerepet játszik a fenti proteinek membrán expressziójának csökkenése.



1.ábra. Az E-cadherin- β -catenin szerepe a sejt adhézióban (van Roy és mtsa [34])

Az intercelluláris kapcsolatokban betöltött szerepe mellett a β -catenin a Wnt szignalizációban is szerepel [37,38,39,40]. A Wnt név a *Drosophila* Wingless- Wg- gén és a murin int-1 onkogén elnevezéséből származik, melyek ortológ felépítésűek. Ez a szignálút vonal különleges a többi foszforilációs kaskád, vagy second messenger szintézissel funkcionáló jelutakhoz képest. A normális sejt folyamatosan szintetizálja a β -catenint, és folyamatosan le is bontja, a szignálút inaktivitása esetén. Az APC protein a Wnt szignalizáció negatív regulátora. Normális Wnt szignalizáció esetén nem stimulált sejtben (receptor ligand hiányában) az APC/GSK3b axin destruktív komplex megköti a β -catenint, mely foszforilálódik és így lehetővé válik a degradációja [41]. A β -catenin degradáció APC dependens 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, ahol kötődik a TCF/LEF transzkripciós factorhoz. A TCF –család négy tagból áll (TCF1, LEF1, TCF3, TCF4). A képződő komplex aktiválja a c-myc és cyclin D1, matrix metalloproteinase7, CD44 transzkripcióját [42]. (2. ábra) Funkcionáló APC protein hiányában a β -catenin szabályozatlan intracelluláris akkumulációja és a c-myc és cyclin D1 gének konstitutív

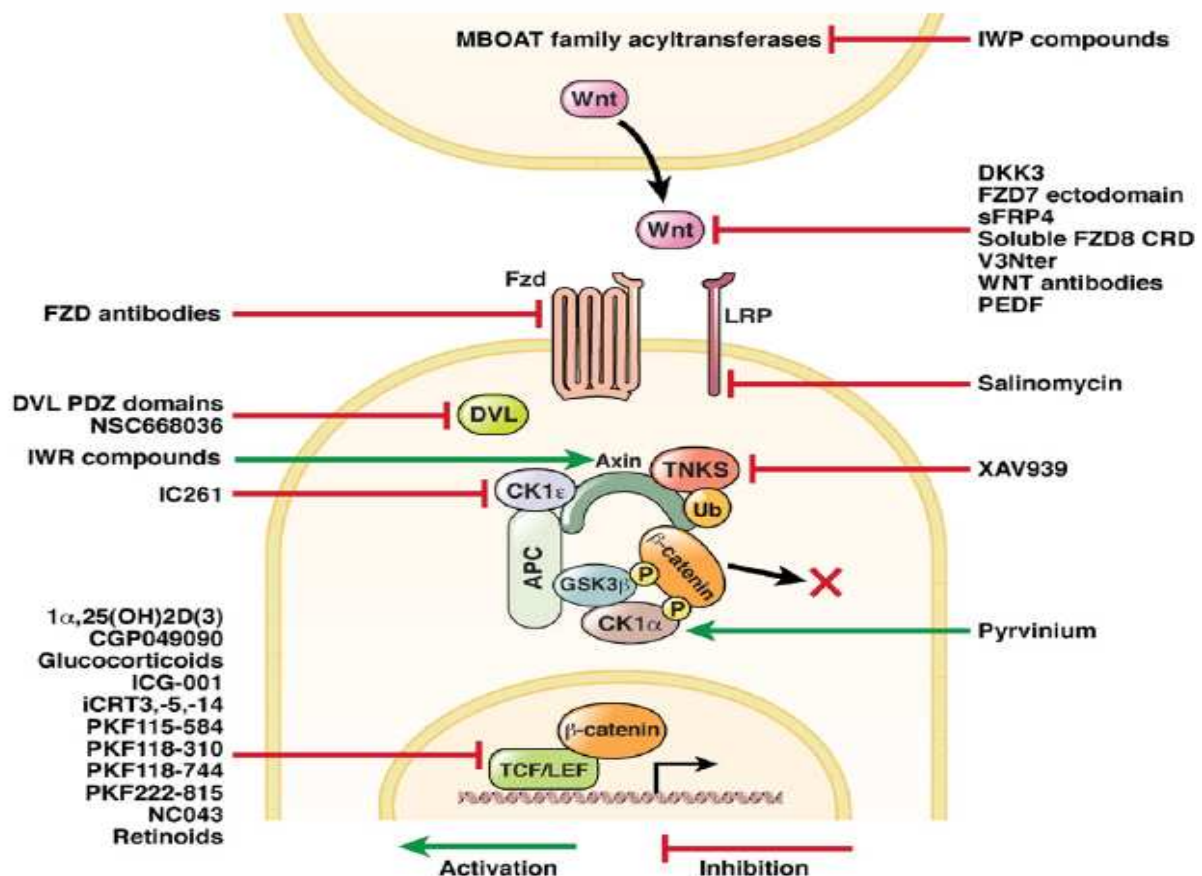
expressziója történik. A vastagbél nyálkahártyában a Wnt szignálút a crypta hám folyamatos megújulásában játszik szerepet. Mint ismert, a crypták bázisán lévő őssejtek aszimmetrikus osztódása révén keletkező egyik leánysejt fog a cryptában felfelé haladva differenciálódni és colon epithelsejtté, enterocytává alakulni. Ezen epithel sejtek a nyálkahártya felszínén leválva elpusztulnak. A Wnt ligandot a bázison lévő őssejtek körüli mesenchymalis sejtek termelik. A differenciálódó sejtben bekapcsolódik az apoptózis és a Wnt út gátlódik. Az APC vesztés vagy a β -catenin túltermelés inaktív állapotban tartja a differenciálódás és apoptózis programját [43,44,45]. A jelút résztvevői közül az APC a fő célpont vastagbélrákban, a sporadikus colorectalis rák 70%-ában észlelhető APC mutáció [46]. Az APC mutáció korai esemény, már az adenoma stádiumban kimutatható. Ritkábban a β -catenin CTNNB1 mutációja ismert. Ez gyakoribb adenomákban (12.5%), mint invazív rákokban (1.4%), ami arra utal, hogy a CTNNB1 mutációt hordozó adenomák kevésbé hajlamosak invazív rákká fejlődni [47]. Így az APC mutációi a carcinogenesisben mutatott hatásukat tekintve nem egyenértékűek a catenin mutációkkal. Ez a tény is arra utal, hogy az APC további szerepekkel is rendelkezik, a destruktív komplexben betöltött feladatán túl. [48]. A colon epithelium homeostasisa, a crypta képződés, az őssejtek aszimmetrikus osztódása, és a leánysejtek vándorlása, differenciálódása további összehangolt intracelluláris tevékenységeket is feltételez, melyek egy része a microtubulus- cytoskeleton rendszert érinti, és feltehetően ebben is fontos funkciót tölt be az APC. A β -catenin CTNNB1 mutációja gyakoribb HNPCC carcinomában, mint sporadikus carcinomákban [49].



2. ábra. A β -catenin-Wnt szignálút sématisan (White BD [37])

A β -catenin nagy központi régióval rendelkezik, melyet 12, egyenként 3 hélixből álló ismétlődések alkotnak (armadillo ismétlődés). Ehhez a struktúrához kapcsolódik a cadherin, illetve a szignalizációs szerep esetén a TCF. A protein N terminális vége foszforilálódik a destrukciós komplexben, illetve az ubikvitinálás is itt történik [38].

Intenzív kutatások folynak ezen szignálút vonal egyes állomásainak célzott gátlásának lehetőségei után (3. ábra). Jelenleg még csak in vitro kísérleti stádiumban lévő vegyületek ismertek, melyek potenciálisan befolyásolhatják a jelutat. Antitestek készültek a Wnt receptorok ellen. Másik támadáspont a TCF és β -catenin komplex képződés [50,51]. Nehézséget okoz, hogy a kötőhely átfedést mutat az E-cadherin kötőhellyel, mely a fentiek alapján fontos szerepet tölt be az intercelluláris kapcsolatokban. Ismert tény, hogy a COX gátlók csökkentik a colorectalis carcinoma kialakulás kockázatát, FAP-ban a COX-2 gátló celecoxib az FDA által engedélyezett gyógyszer. A COX-2 gátlók egyéb hatásaik mellett befolyásolhatják a Wnt jelutat is, mivel a prosztaglandinok gátolják a sejten belül a β -catenin lebontását [52].



3. ábra. A β -catenin-Wnt szignálút vonal potenciális farmakológiai befolyásolásának lehetőségei (White, BD [37])

Korábbi közlemények alapján ismert, hogy a β -catenin és intranukleáris akkumulációja és az E-cadherin membránexpressziójának csökkenése szerepet játszik a tumor progresszióban colorectalis rákban [53,54,55].

További fontos, a colorectalis carcinogenesisben szerepet játszó szignálút a transzformáló growth factor- TGF β [56]. A TGF β sejt felszíni membrán receptorral rendelkezik, melynek extracelluláris doménje felelős a ligand kötésért. Intracelluláris doménje szerin/treonin kináz aktivitással rendelkezik. Ligand kötés után a TGF β -1. és 2. receptorok heterodimert képeznek, elindítva a szignáltranszdukciót. A következő lépcső a SMAD fehérjék aktiválása, majd a SMAD2/4 vagy SMAD3/4 komplex jut be a sejtmagba, ahol gének transzkripcióját szabályozza. Célgénjei közül a ciklin dependens kináz inhibitorok jelentősek, mint a p15ink és a p21CIP, de további számos gént is szabályoz. A jelút további más jelutakat is képes aktiválni, mint a RAS/MAPK útvonal. A TGF β útvonal deregulációját több esemény is előidézhetheti, pl. a receptor inaktiválódás, ami MSI tumorokban történhet meg. Vastagbél carcinoma 30%-ában kimutatható a receptor mutációja és az esemény a késői adenoma malignus transzformációjával függhet össze. A receptor mutációja leggyakoribb MSI tumorokban, de a MSS tumorok 15%-ában is kimutatható [57,58]. A SMAD2, vagy SMAD4 mutációja is kimutatható vastagbél carcinomákban [59]. A SMAD4 génje a 18q-n helyezkedik el, mely kromoszóma régió deléciója gyakran kimutatható vastagbél carcinomában. A SMAD4 expresszió immunhisztokémiailag is kimutatható, és néhány tanulmány szerint az expressziós szintje összefüggést mutat a nyirokcsomó áttétek megjelenésével és a tumor prognózissal [60], valamint az 5-FU terápiára adott válasszal [61].

18q deléció. Ez a kromoszóma alteráció a leggyakoribb citogenetikai eltérés a vastagbél carcinomában. A 18-as kromoszóma hosszú karjának deléciója a colorectalis carcinomák kb. 70%-ában kimutatható. Ezen a kromoszóma szakaszon található többek között a SMAD4 illetve a deleted in colon cancer (DCC) génje, de a SMAD2 és SMAD7 génje is itt helyezkedik el. Így ezen kromoszómális deléció feltehetően- legalábbis részben a fentebb említett TGF β szignálút vonal deregulációja révén játszik szerepet a colon carcinogenesisben. A 18q deléció rossz prognózissal társul [62].

A p53 (TP53) egy tumor szuppresszor gén, melynek mutációja a colorectalis rákok több mint felében kimutatható [63]. A sejtciklusban betöltött szerepe miatt a genom őrzője nevet is kapta. DNS károsodás esetén megakadályozza a sejt sejtciklusba lépését és az osztódást mindaddig, míg a hibát a sejt ki nem javítja. Amennyiben nem lehetséges a hiba javítása, úgy az apoptózis programot indítja be. Normál sejtekben a p53 féléletideje igen rövid, mintegy 20 perc, majd lebomlik. DNS károsodás hatására a p53 poszttranszlációs

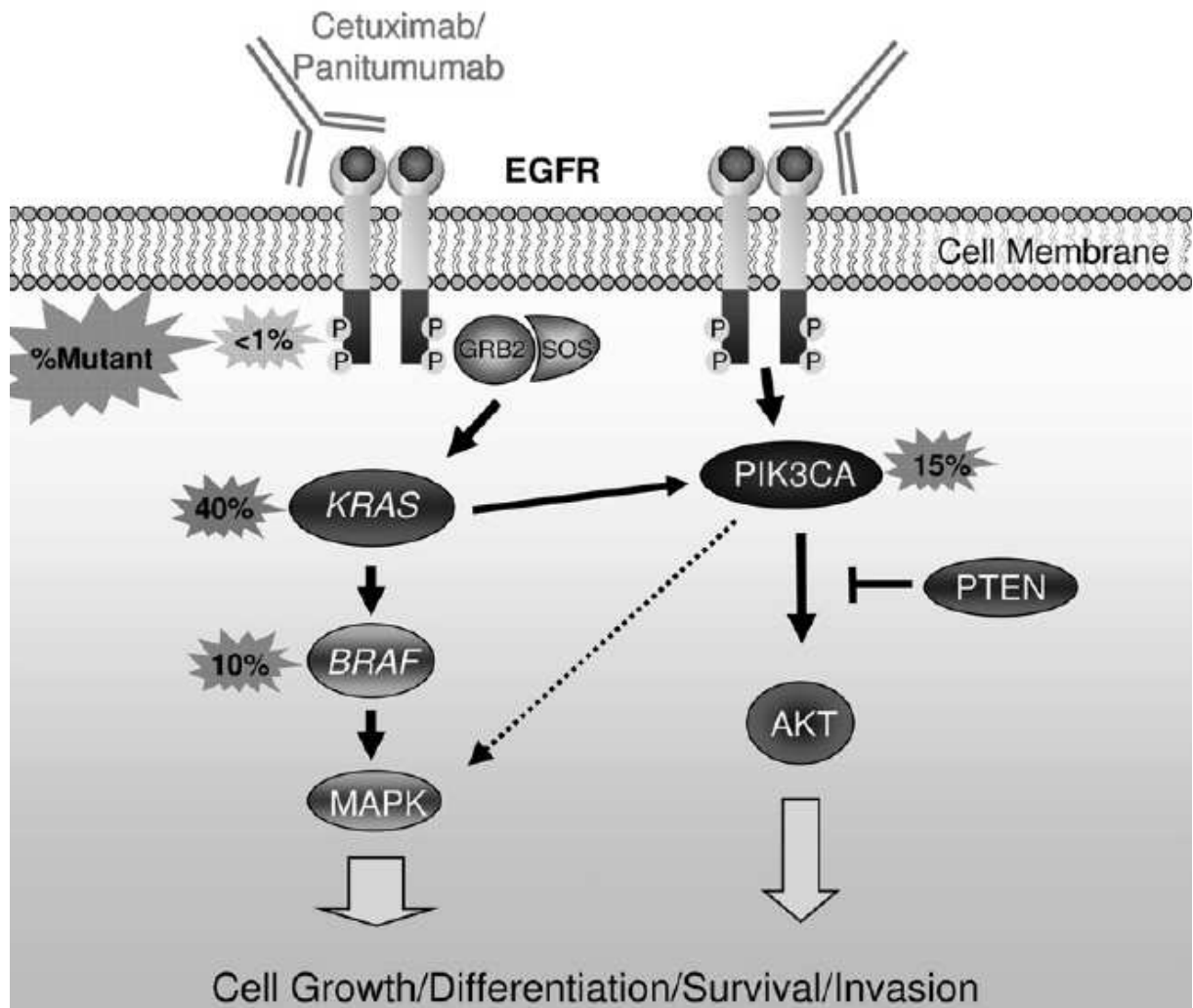
módosításon esik át, megnő a féléletideje és transzkripciós faktorként aktiválódik. A p53 által indukált gének közül a legfontosabbak sejtciklus stopot okoznak [64]. Ez a stop a G1 fázisban következik be és a CDKN1A transzkripciójával jár. Ennek terméke a CDK inhibitor p21. A p21 ciklin dependens kinázokat képes inaktiválni, illetve megakadályozza az RB protein foszforilációját [65]. Az RB protein a sejtciklus szabályozásában kulcsszerepet tölt be. Mitogén szignál hatására a ciklin dependens kinázok aktiválódnak, és hiperfoszforilálódnak az RB protein, mely ennek hatására inaktiválódik, felszabadul az E2F transzkripciós faktor. A sejt végigmegy a sejtcikluson és megtörténik a DNS replikáció. M fázisban az RB protein defoszforilálódnak, mely a sejtciklus terminálásához vezet [66]. A p53 DNS károsodást felismerő képességének mechanizmusa nem ismert, de két protein kináz, az ATM és ATR-ataxia teleangiectasia mutated proteinek szerepelnek benne. DNS hiba esetén ezen kinázok foszforilálják a p53-at és DNS hibajavító fehérjéket, aktiválva ezáltal azokat. A p53 mutáció, ha mindkét allél inaktivációjával jár, ezen hatás kiesését eredményezi [67]. P53 mutáció az adenoma malignus transzformációját segíti elő. Mint az APC, kulcsszerepet tölt be a carcinogenesisben, és bár kiterjedt kutatások folytak ezirányban, nem igazolódott sem prognosztikus, sem prediktív szerepe [68,69,70].

EGFR szignálút vonal. Az epidermális növekedési faktor szignálút vonal az elmúlt években a legismertebb intracelluláris transzdukciós út vonallá vált az onkológiában, lévén hogy több, az út vonalat szelektíven blokkolni képes vegyületet fejlesztettek ki, melyeket sikerrel alkalmaztak olyan gyakori daganatokban, mint a vastagbélrák, gyomorrák, tüdőrák és emlőrák. Az EGFR a humán epidermális növekedési faktor receptor család (HER-erB) tagja [71]. A receptor családnak négy tagja van: EGFR/HER1-4. A receptor egy tirozin-kináz aktivitással rendelkező transzmembrán protein. Aktiválódása kulcsesemény a tumor növekedésben és progresszióban, beleértve az angiogenezist, inváziót és metastasis képzést. Ligand kötés nélkül monomerként helyezkedik el a membránban. Ligand kapcsolódás után mintegy 5-10 percet tölt a membránban a receptor, majd a membránból internalizációval kerül be a sejt belsejébe. Az endosomában is kifejtheti aktiváló hatását. Az internalizált receptor lysosomákban lebomolhat, de lehetőség van defoszforilációra és az inaktivált receptor ismételt membránba kerülésére is [72,73]. Ligandjaik közül a legfontosabbak az EGF, a TGF, az amphiregulin és az epiregulin [74]. A HER2 nem rendelkezik liganddal. A receptor-ligand kapcsolódás a receptor dimerizációját eredményezi. Létrejöhet homodimer is, de leginkább heterodimer formálódik. A dimerizáció okozta szerkezeti változások teszik lehetővé az intracelluláris domain aktiválódását és a tirozin kináz aktiválódását [75]. A receptor- ligand kapcsolódás mitogen szignalizációs kaszkádot indít el, a ligand és a dimerizációs partner,

valamint esetleges internalizáció függvényében számos útvonalon, többek között a RAS-MAPK, PI3K-Akt és foszfolipáz C útvonalakon. A szignáltranszdukció eredménye a sejtproliferációt stimuláló transzkripciós faktorok aktiválása, például a Myc, RSK, NF-kappaB [76,77]. Az EGFR overexpressziója számos tumor típusban kimutatható és általában rossz prognózist jelez [78]. A tumorokban az EGFR útvonal többféleképpen kerülhet ki a szabályozás alól. Részben magának az EGFR modifikációja eredményeképp, például a receptor és/vagy a ligand fokozott expressziója révén, amit például a gén amplifikációja eredményez [79]. Másik lehetőség az EGFR gén mutációja, mely következtében ligand nélkül is képes a szignálútvezetést aktiválni. Esetleg extracelluláris részt nem tartalmazó- trunkált receptor jelenléte révén. Az EGFR mutációk túlnyomó része a 18., 19., 21. exonban található, és a tirozin kináz gátlók iránti érzékenységet felelős mutációk 99%-a is itt található [80,81]. A rezisztencia mutációk, például a T790M a 20. exonban található [82]. Ezek a felsorolt mutációk a colorectalis rákban ritkák. Az útvonal aktivációjának gyakoribb oka a jelátvitelben résztvevő további komponensek aktivációja.

Az EGFR útvonal legismertebb gátlói magát az EGFR receptort gátolják. Két csoportjuk ismert: 1. az extracelluláris domén elleni monoklonális antitestek, mint a chimericus cetuximab és a teljesen humán pamitumumab. 2. az intracelluláris tirozin kináz domént gátló kismolekulájú vegyületek, mint a gefitinib és erlotinib. Ez utóbbi vegyületek alkalmazása főképp a NSCLC kezelésében hozott eredményeket, míg a monoklonális antitestek a metastatizáló colorectalis carcinoma kezelésében használatosak [83]. Az EGFR receptor ligand kapcsolódása, több szignalizációs útvonalat indít el. Ezek a szignálútvonalak intracellulárisan szoros interakciókat mutatnak, mely a tumorsejteknek escape mechanismusokat- menekülési útvonalakat kínálhatnak a farmakológiailag blokkolt szignálút „megkerülésére”, mely a terápia rezisztencia oka lehet [11]. A számos terápia rezisztens eset miatt igen fontos olyan biomarkereket azonosítani, melyek képesek előrejelezni a terápiás hatást, és így kijelölhetik azon betegeket, akik a célzott terápiából profitálhatnak. A terápiás válasz előjelzésében több marker szerepét is vizsgálták. Természetesen legelőször az EGFR kimutathatóságát vizsgálták. Az EGFR immunhisztokémiai kimutatása (IHC) azonban nem alkalmas a terápiás válasz előrejelzésére. Kezdetben a tumorsejtek 1%-ának EGFR-pozitivitását elegendőnek vélték, azonban objektív terápiás válasz olyanokban is kimutatható volt, ahol a tumor IHC-val EGFR negatívnak bizonyult [84]. Ennek számos oka lehet: 1. Az IHC nem ugyanazt az epitópot mutatja ki, melyet a terápiás antitest felismer. 2. A tumorszövet feldolgozása okozta kimutathatósági különbségek. 3. Az IHC szemikvantitatív módszer, nagy interobszerver variációkkal. 4. Ismert, hogy a primer tumor és a metastasis

EGFR expressziója között különbség lehet [85]. 5. Az EGFR lehet alacsony és magas affinitású, melyeket az IHC nem tudja elkülöníteni [86]. 6. Az EGFR foszforilációs státusz is befolyásolja a szignálút aktivitását, melyet úgyszintén nem tud kimutatni a hagyományos IHC. 7. Végül az EGFR által aktivált szignálutak defektusai miatt is előfordulhat, hogy az EGFR jelenléte nem eredményez terápiás választ. Az EGFR gén aktiváló mutációi, melyek egyéb daganatokban pl. NSCLC-ban gyakoriak, igen ritkák vastagbél carcinomában [80,81]. A vastagbél carcinomák kis részében kimutatható a gén amplifikációja, mely FISH-el detektálható [79]. Eddigi adatok szerint azon betegek, akiknél a tumorban háromnál kevesebb EGFR génkópia mutatható ki, kicsi a terápiás válasz valószínűsége, míg az emelkedett kópiaszám esetén magasabb az EGFR-targeted terápia válasz aránya, és a PFS is hosszabb [87]. Az EGFR gén kópiaszám ugyanakkor önálló prognosztikai jelentőséggel nem rendelkezik. A fentiek mellett a jelátviteli út többi állomását is vizsgálták. A KRAS a ras géncsalád tagja, egy GTP-kötő proteint kódol, amely az egyik fontos szignáltranszducer molekula, mely önmagát inaktiválni képes, a GTP-GDP defoszforiláció révén [88]. A ras protein GTP kötődés után aktiválódik, és a szignálkaszkád következő tagját aktiválja: a RAF, majd a MAP2K aktiválódik. Aktiválódhat a PI3K is, a szignálutak kapcsolódása révén [89]. Vastagbél carcinomák 56%-ban mutatható ki mutáció a KRAS, BRAF, PI3K gének valamelyikében.(4. ábra)



4. ábra. Az EGFR szignálút és a leggyakoribb mutációk a szignálúton (Pritchard és mtsa [83])

A KRAS mutáció előfordulási aránya 35-45%, ez a legnagyobb gyakoriságú génmutáció a fentiek közül. A KRAS mutáció leggyakoribb a 2-es exon 12. (82%) vagy 13. (18%) kodonjában. Ezek a mutációk a katalitikus centrum környezetében eredményeznek változást. A mutáns KRAS gén által kódolt RAS protein a GTP kötő konformációban rögzül, a GTPáz aktivitás kiesése miatt elmarad a defoszforiláció és a protein folyamatos szignáltovábbítást végez [90]. A KRAS mutáció az adenoma- carcinoma szekvenciában az APC mutáció után következik be, de még mindig korai esemény a carcinogenesisben [91]. A primer tumor és metastasisának KRAS státusza konkordáns, csak minimális százalékban lehet különbség [92]. Ez a tény nagyon fontos, mivel az esetek többségében metastatizáló tumoros betegségben a primer tumor szövetmintája áll a molekuláris patológiai vizsgálatok rendelkezésére, és csak ritkán van lehetőség a metastasist vizsgálni. Számos tanulmány igazolta a KRAS státusz

jelentőségét az EGFR-targeted terápia hatásosságának előrejelzésében. A cetuximab vagy panitumumab hatásosságának a KRAS mutációs státusz a fő prediktora. A KRAS mutáció esetén szignifikánsan alacsonyabb a PFS, mint a vad típusú KRAS esetén. Az OPUS és CRYSTAL study-k végeredményei bizonyítják, hogy a FOLFOX/FOLFIRI kemoterápia kiegészítése cetuximabbal KRAS mutáció esetén nem lesz hatásos [93,94]. A fenti KRAS mutációk negatív prediktív értéke igen magas, azonban a 12/13 kodonban vad típusú KRAS mellett is csak a betegek 30%-ában hatékony az EGFR targeted terápia, mely további biomarkerek szerepére utal. Az egyik ilyen tényező lehet még a KRAS 61. vagy 146. kodonjában lévő mutáció is [95]. Colorectalis carcinomában a BRAF mutációk gyakorisága 10-15% körüli. A BRAF és KRAS mutáció együttesen nem fordul elő, így vad típusú KRAS esetén 10-15% a BRAF mutáció gyakorisága. A BRAF mutációk túlnyomó része a V600E jelzésű, mely egy báziscsere révén egy glutamát-valin cserét eredményez a proteinben. A BRAF mutáció gyakoribb MSI tumorokban, itt 50% körüli az előfordulása, míg MSS tumorokban 5% körüli. Azonban a HNPCC-es esetekben gyakorlatilag nincs BRAF mutáció [26]. Egyes közlemények szerint a BRAF V600E mutációt tartalmazó tumorok esetén az EGFR-targeted terápia hatástalannak bizonyult [96]. A multikináz inhibitor sorafenib helyreállíthatja az EGFR inhibitorok iránti szenzitivitást BRAF-mutáns colorectalis carcinoma sejtvonalakban. Kombinált sorafenib és cetuximab terápia hatékonysága vizsgálat alatt áll. PI3K mutációk gyakorisága vastagbél carcinomában <20%. Leggyakoribb a p110alfa katalitikus subunitot érintő mutációk. Aktiváló PI3K mutációk, vagy a jelutat negatívan reguláló PTEN expresszió elvesztése cetuximab rezisztenciával járhat [97,98]. Cetuximab rezisztens vastagbél carcinoma sejtvonal esetén cetuximab és mTOR inhibitor everolimus helyreállíthatja a cetuximab iránti szenzitivitást [99]. Colorectalis carcinomában a PI3K vagy BRAF mutáció gyakrabban fordul elő nőkben.

3.2.3. A vastagbél carcinoma csoportosítása a molekuláris jellegzetességek alapján

A fentebb leírt, illetve a további számos, nem részletezett epigenetikus és genetikai eltérések egy adott colorectalis tumorban nem mind fordulnak elő. A fenti genetikai események bizonyos csoportokban jelennek meg, és a vastagbél carcinoma molekuláris sajátosságai alapján való csoportosítására ad lehetőséget [5,6]. Ezen molekuláris patogenezis alapján különböző csoportok kimutatása bizonyos prognosztikai és terápia prediktív szereppel is bír.

Mindezen ismeretek tükrében ma úgy vélik, hogy a vastagbél carcinoma esetek túlnyomó része, mintegy 80-85%-a a klasszikus adenoma- carcinoma szekvencián keresztül fejlődik ki. Ezen tumorok genetikai hátterére jellemző a kromoszomális instabilitás, a mikroszatellita stabil megjelenés. A kromoszomális instabilitás miatt onkogének és tumor szuppresszor gének mutációi illetve deléciói halmozódnak fel. A lépcsőzetesen felhalmozódó genetikai eltérések jellegzetes morfológiával társulnak. Jellegzetes korai esemény az APC mutáció és a Wnt/catenin szignálút érintettsége, majd a KRAS mutáció gyakori előfordulása. Következő esemény lehet a 18q21 deléció, végül a p53 mutációja.

A colorectalis carcinoma esetek fennmaradó mintegy 10-15%-a a mismatch repair gének eltérései révén alakulnak ki. Jellemző a mikroszatellita instabilitás, és ugyanakkor a kromoszóma stabilitás. Ebbe a csoportba tartozik a HNPCC-Lynch- szindróma, mely a MMR gének valamelyikének germline mutációja miatt alakul ki, és az egyik leggyakoribb öröklött vastagbélrák típus [100]. Az MSI útvonalon fejlődő colorectalis carcinomák kialakulásának morfológiai lépcsői a serrated neoplasia útvonalon helyezkednek el.

A kromoszomális instabilitás, mikroszatellita instabilitás illetve CpG sziget metilátor fenotípus, valamint a KRAS és BRAF, p53 mutációk jelenléte alapján a colorectalis carcinoma 6 genetikai alcsoportja különíthető el:

1. MSS/CIMP- (30-35%): férfi predominancia, KRAS mutáció, CIN negatív.
2. MSS/MSI-low-CIMP-0: (40%): CIN pozitív, vad típusú KRAS, BRAF, nincs nemi predilectio.
3. MSI-L/MSS/CIMP high (5-10%): idős nők, BRAF mutáció, vad típusú p53, CIN negatív. Rosszul differenciált, rossz prognózis.
4. MSI-H/CIMP high (10%): MLH1 metiláció, BRAF mutáció, vad p53 és megtartott p21 expresszió, CIN negatív- a klasszikus sporadikus MSI tumorok, idősebb nők, proximális colon, jó prognózissal.
5. MSI-H CIMP low/0 (5%): ez a csoport foglalja magába a HNPCC-es eseteket is, de van ebben a csoportban is sporadikus forma.
6. MSI-L/CIMP low (5%): MGMT metiláció, KRAS mutáció [5,6].

3.3. A colorectalis carcinoma családi halmozódása

A colorectalis carcinoma patogenezisét, molekuláris típusait áttekintve, befejezésül az öröklődés kérdésével kell foglalkozni.

Klinikai adatok alapján régóta ismert tény, hogy a vastagbél carcinomák a családi halmozódás szempontjából három csoportba sorolhatók.

Az első csoportba tartoznak a sporadikus vastagbélrákok, melyek a colorectalis carcinoma esetek túlnyomó részét, mintegy 70%-át teszik ki és nem mutatnak családi halmozódást. Ezen daganatok az egyén életében a colon epitheliumban a különféle környezeti faktorok, és carcinogének eredményezte genetikai eltérések hatására alakulnak ki.

A colorectalis carcinomák második csoportjába tartozó esetekben familiáris halmozottság áll fenn. Familiáris halmozottságról akkor beszélünk, ha legalább egy elsőfokú rokonnál ismert colorectalis carcinoma, de nem bizonyított az örökletesség. (10-30%)

A harmadik csoportba tartoznak az öröklődő colorectalis carcinoma szindrómák, melyek a családban mendeli szabályok alapján recesszív vagy domináns módon öröklődnek [101].

Az örökletes colorectalis carcinoma szindrómák közül leggyakoribb a HNPCC vagy más néven Lynch-szindróma, melyben valamelyik MMR gén germline mutációja mutatható ki [100]. Ez a csoport teszi ki az összes colorectalis carcinoma 2-4%-át. A HNPCC-re jellemző a colorectalis tumorok családi halmozódása, más szervek daganatainak társulása- elsődlegesen endometrium, húgyúti, vékonybél és ovarium carcinomák megjelenése. A HNPCC-es páciensek colorectalis tumora többnyire fiatalabb életkorban jelentkeznek, mint a sporadikus tumorok, gyakoribbak a jobb colonfélben, gyakori a synchron vagy metachron többes tumor előfordulása. Morfológiáját tekintve jellemző a mucinosus vagy medullaris tumor, illetve a tumort infiltráló lymphocyták jelenléte. Az általában kedvezőtlennek tartott szöveti típus ellenére a prognózis többnyire jobb, mint a sporadikus vastagbél carcinomákra jellemző [17].

Li-Fraumeni-szindróma: autoszomális domináns öröklésmenettel jellemezhető kórkép, melyben a p53 germline mutációja igazolható. A Li-Fraumeni-szindrómás betegekben kialakuló tumorok 7%-a vastagbélrák. Az ily módon kialakuló colorectalis carcinomák 45 éves kor körül jelentkeznek, 1:5 férfi- nő arány észlelhető [102].

Familiaris adenomatous polyposis coli szindróma, FAP: A FAP az összes colorectalis carcinoma kevesebb mint 1%-át teszi ki, gyakorisága 1/7000-1/30000 újszülött per év. Hátterében az APC gén (5q21-22) germline mutációja mutatható ki, és autoszomális domináns öröklésment jellemzi. Klinikailag a nagyszámú, akár több ezer adenomatous polyp megjelenése jellemzi, már a 10-20. életévek között. Colorectalis carcinoma kialakulása a 40. életévre csaknem 100% valószínűségű, de a carcinoma rizikó 20-25 éves korban is már 1-6%. További manifesztációi: desmoid tumorok, csont exostosisok, endostosisok, fog abnormitások. Variánsai a Gardner-szindróma, melyben multiplex epidermális cysták is jelen vannak és Turcot-szindróma, melyben agytumorok társulása is jelen van [103,104].

Juvenilis polyposis. A juvenilis polyposis gyakorisága mintegy tizede a FAP gyakoriságának. Szintén autoszomális domináns öröklésmentet jellemzi, legtöbbször a SMAD4/DPC4 tumor szuppresszor génben van mutáció. A gastrointestinalis traktusban multiplex juvenilis polyp lép fel. Colorectalis carcinoma mellett fokozott az epeúti, duodenum és pancreas tumorok valószínűsége is. A colorectalis carcinoma rizikója 30-40%, és leginkább 34-45 év között jelentkezik. Egyéb tápcsatornai rák kockázata 10-15%, melyek 58 év körül jelentkeznek [105].

A Cowden-szindróma autoszomális domináns öröklésmentű kórkép, melyben PTEN mutáció mutatható ki, és klinikailag multiplex hamartomák fellépése jellemzi. Előfordul trichilemmoma, hamartomatosus vastagbélpolypok, emlő fibroadenomák, carcinoma, pajzsmirigy follicularis adenoma illetve carcinoma [106].

Peutz-Jeghers-szindróma: autoszomális domináns öröklésmentű kórkép, melyet STK11 (LKB1) mutáció jellemez (19p13). Ez egy tumorszuppresszor gén treonin-kináz aktivitással. A mutáció a kináz domént érinti. Klinikailag mucocutan pigmentáció, a gyomorban, vékonybélben és a colonban megjelenő hamartomatosus polypok jellemzik [107]. Fokozott, csaknem 100%-os a malignus tumor rizikó, leggyakoribb az emlő, colorectalis, gyomor és pancreas carcinoma előfordulása [108].

A polyposis szindrómák közé tartozó Cronckhite-Canada-szindróma említendő végül, mely azonban nem mutat öröklődést. Alopécia, köröm rendellenességek, bőr hiperpigmentáció, és hamartomatosus polypok mellett fokozott colorectalis carcinoma rizikó jellemzi.

3.4. Prognosztikai faktorok, prediktív faktorok

A kombinált sebészi, kemoterápiás és irradiációs kezelés ellenére a vastagbélrákos betegek jelentős része a daganata következtében hal meg. A kezelés sok esetben tehát nem vezet eredményre. Emellett számos betegben súlyos mellékhatásokat okoznak a kemoterápiás szerek. A betegek adjuváns kezelése a tumor anatómiai stádiumán alapul, ennek függvényében indikáltak jelenleg a kemoterápiás protokollok. A 6 hónapos posztoperatív adjuváns kezelés III. stádiumú colon carcinomás betegekben 33%-kal csökkenti a halálozási arányt. Az 5FU leucovorinnal kombinált oxaliplatin bizonyult a leghatékonyabb adjuváns kezelésnek (3 éves DFS 78%, 5 éves DFS 73,3 % és 72,9 % 6 éves OS) [109]. A II. stádiumú betegség kezelését illetően az irodalmi adatok ellentmondásosak [7,8,9]. A kezelés gyakran hatástalan, a terápiás válasz illetve a súlyos mellékhatások fellépése nem jósolható meg.

Ennek háttérében a fentebb említett eltérő molekuláris- patológiai jellemzők állhatnak. A tumorok különböző molekuláris patológiai státusza befolyásolja a klinikai kimenetelt. Az 5 éves túlélés I. stádiumban 93,2 %, II/A stádiumban 84,7 %, II/B stádiumban 72,2 %, III/A stádiumban 83,4 %, III/B stádiumban 64,1 %, III/C stádiumban 44,3 % és IV. stádiumban 8,1%. Az AJCC új stádiumbeosztásának tekintetében a III/A stádiumú betegek túlélése szignifikánsan jobb mint a II/B stádiumú betegekénél ($P < 0,001$) [110].

A kemoterápia csak 1-5% os túlélési előnyt tud adni. Sem a terápiára adott válasz, sem az esetleges súlyos, nemritkán életveszélyes mellékhatások előrejelzése nem megoldott [111]. További prognosztikai és prediktív faktorok keresésére van szükség, hogy ki lehessen választani azon betegeket, akiknek előnyös lehet az adjuváns kezelés, és akiknél kicsi a valószínűsége a kemoterápia nemkívánatos súlyos mellékhatásainak. Az utóbbi évtized molekuláris biológiai és molekuláris patológiai kutatásai számos új információval szolgáltak a daganat kialakulással és progresszióval kapcsolatban. Lehetővé vált a carcinogenesisben szereplő bizonyos intracelluláris szignálútvonalakba történő farmakológiai beavatkozás, melyek célzott kezelés- targeted terápia, illetve biológiai támadáspontú kezelések révén váltak ismertté. A daganat prognosztikai faktorok olyan markerek, melyek a betegség viselkedését, kimenetét jelzik előre, azaz az adott tumor prognózisát mutatják meg. Számos faktor vált ismertté, melyek összefüggést mutatnak a tumor terápiára adott válaszreakciójával, így terápia prediktív faktornak tarthatók. Mindkét csoport kutatása hatalmas irodalommal rendelkezik. Napjainkban, az egyre szélesebb körben használt célzott kezelések miatt- érthető módon a figyelem a prediktív faktorokra terelődött.

3.4.1. Klasszikus prognosztikai faktorok

A colorectalis carcinoma klasszikus prognosztikai faktorai közé tartozik a tumor stádium. Jól ismertek a stádium csoportokra lebontott túlélési adatok. Dukes A: 90%, Dukes B: 60%, Dukes C: 40% és Dukes D: 10% [1].

A stádiumon belül egyértelmű a nyirokcsomó státusz szerepe. Negatív nyirokcsomó státusz esetén a vizsgált nyirokcsomók száma befolyásoló tényező. A legtöbb adat arra utal, hogy 12-nél kevesebb vizsgált nyirokcsomó alapján kimondott Dukes B stádiumban rosszabb a prognózis, mintha több nyirokcsomó vizsgálatával határozták meg a stádiumot [112, 113]. Ebben szerepet játszik az is, hogy a nyirokcsomó áttétek több mint 30%-a 5 mm-nél kisebb nyirokcsomóban jelentkeznek.

Prognosztikai faktor az életkor- rosszabb a prognózis a fiatal és időskori tumorok esetén.

A nem tekintetében a nők kilátásai szignifikánsan jobbak.

A tumor lokalizáció prognosztikai szerepét illetően megoszlanak a közölt adatok. Általában a bal oldali tumorok rosszabb prognózisúak, illetve a rectum tumorok rosszabb prognózisúak.

További prognosztikai tényezők: a sebészi szél tumormentessége, tumor depositum, illetve tumor regressziós grade, perineurális és a nyirokér- vérér invázió jelenléte, tumor szél és inflammatoricus reakció jelenléte, a szövettani típus és gradus. Ez utóbbival kapcsolatban érdemes megjegyezni, hogy például a mucinosus morfológia rossz prognózist jelez, azonban ha HNPCC-ben jelenik meg, akkor még jobb is a prognózis a konvencionális colorectalis ráknál. A perforatio vagy az obstructio is rossz prognosztikai jel [114,115,116].

A morfológiai jellemzők sorát vizsgálva, a szövettani típusok is ismert prognosztikus hatásúak. A szövettani megjelenést tekintve ismert a mucinosus, medullaris, pecsétgyűrűsejtes, illetve kissejtes típus rossz prognózisa a konvencionális (NOS) adenocarcinomához képest. A tumorsejtek rhabdoid fenotípusa különösen rossz prognózissal jár. 1978-ban írták le először a malignus rhabdoid tumort, a Wilms-tumor rossz prognózisú rhabdomyosarcomatoid variánsaként [117]. Az azóta eltelt időben számos extrarenalis lokalizációban is beszámoltak rhabdoid fenotípusú tumorok előfordulásáról, többek között lágyszövetekben, agyban, húgyhólyagban, prosztatában, uterusban és a gastrointestinalis traktusban is.

3.4.2. Molekuláris prognosztikai faktorok

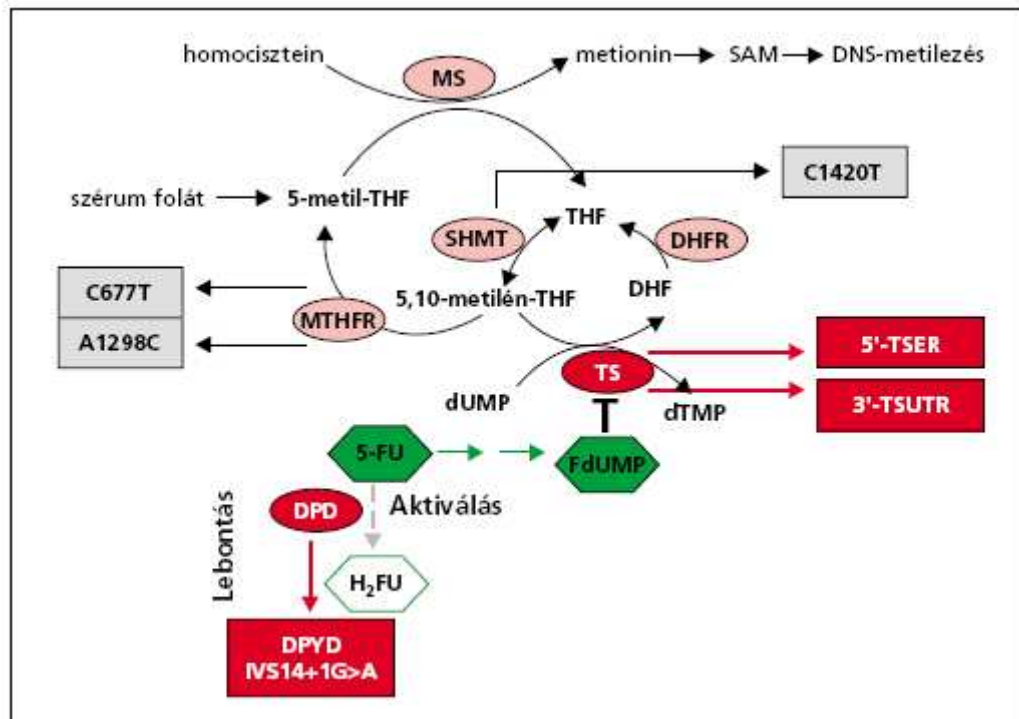
Fenti klasszikusnak tekinthető morfológiai, klinikopatológiai faktorok mellett számos, molekuláris markert vizsgáltak az utóbbi években, vajon rendelkeznek-e prognosztikus hatással. Különösen a Dukes B2- StageII tumorok esetében nagyon nagy szükség lenne prognosztikus markerekre és terápia prediktív markerekre, mert leginkább ezen betegcsoport kezelése kérdéses. Nem egyértelmű, mely betegek profitálnak az adjuváns kemoterápiából, és kik azok akiknél feltehetően nem várható terápiás válasz [118]. Míg az előrehaladott, metastatizáló colorectalis carcinoma célzott terápiájával kapcsolatban igen sok tapasztalat gyűlt össze a prediktív markerek szerepét illetően, addig ez a feladat a II. stádiumú tumorokban jórészt még megoldatlan. A számos vizsgálatot összegezve, a jelenleg leginkább elfogadott prognosztikus értékű molekuláris markerek: Mikroszatellita instabilitás (kedvező),

kromoszóma instabilitás (kedvezőtlen), 18q deléció (kedvezőtlen), BRAF V600E mutáció (kedvezőtlen), KRAS mutáció, PIK3CA mutáció- mindkettő kedvezőtlen [119,120].

3.4.3. A kemoterápia prediktív faktorai

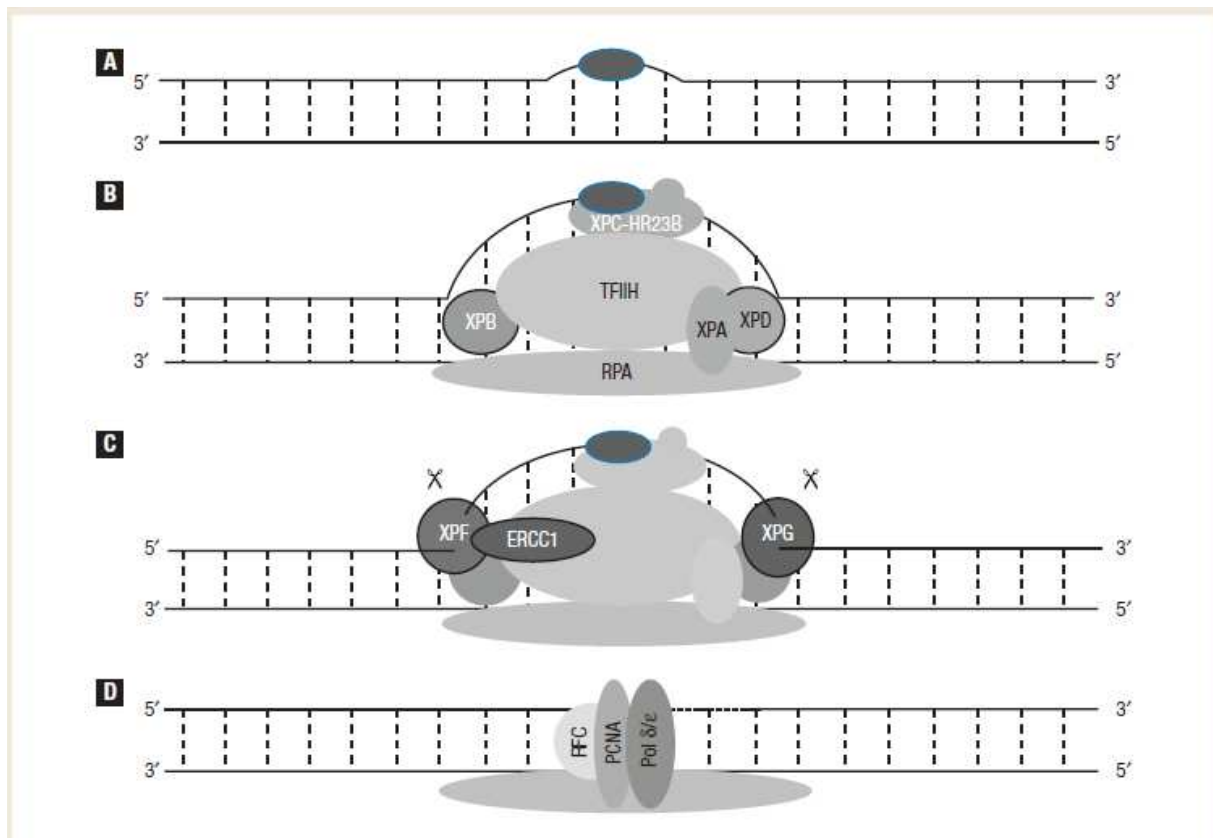
A célzott terápia fentebb részletezett biomarkerei mellett kutatások folynak a kemoterápia prediktív markerei irányában is.

A colorectalis carcinoma adjuváns kezelésében alkalmazott standard gyógyszer az 5-FU. Az 5-FU az antimetabolitok csoportjába tartozó vegyület. A pirimidinbázis módosításával, az 5. pozícióban lévő hidrogén fluorra cserélésével hozták létre. Az 5-FU hatásának fő mechanizmusa a TS gátlása. A sejtekben a timidin egyetlen de novo forrása a TS. Mivel a timidin esszenciális a DNS szintézisben, így a TS gátlása a sejt proliferatio gátlását eredményezi. Emellett hatásának másik mehanizmusa az RNS-be történő beépülése. Mivel a DNS szintézis a sejt működés esszenciális funkciója, ezért az evolúció során több anyagcsere útvonal is kialakult, így a sejtek potenciálisan alkalmazkodni képesek az antimetabolitok hatásához [121]. Ez különösen igaz a tumorsejtekre, melyekben a DNS szintézis metabolitjai de novo és salvage útvonalakon egymást kiegészítve működik (5. ábra). Mivel az adjuváns kemoterápia számos súlyos mellékhatást okozhat, így régóta fennáll az igény arra, hogy ki lehessen választani azon betegket, akiknél feltehetően hatásos lehet a kemoterápia [122, 123]. 5-FU kemoterápia esetén már ismert a MSI negatív prediktív szerepe [124]. Emellett további, az 5-FU hatást előrejelző, potenciális prediktív markerek is ismertek. A legfontosabbak a timidilát-szintáz, a timidilát-foszforiláz, dihidropirimidin-dehidrogenáz és a metilén-tetrahidrofolát-reduktáz (MTHFR). A TS expressziót számos szerző vizsgálat már colorectalis carcinomában. A fokozott TS expresszió II. stádiumú tumorokban a közlemények egy része szerint rossz prognózissal társul. Emellett a TS expresszió prediktív szerepét is vizsgálták. Korai közlemények azt mutatták, hogy a magas TS expresszió esetén kisebb az 5-FU kezelés hatása. A legpontosabb eredmények a TS mRNS-szint RT-PCR reakcióval történő meghatározásából származtak. Emellett a TS gén polimorfizmus illetve a gén esetleges amplifikációja is szerepet játszik az 5-FU rezisztencia kialakulásában [125, 126].



5. ábra Az 5-FU intracelluláris metabolizmusa és a TS kapcsolata (Kralovánszky és mtsai [126])

A metastaticus colorectalis carcinoma kezelésében a platina vegyületek közül az oxaliplatin az egyik standard gyógyszer [127]. Az oxaliplatin terápiás hatásának előrejelzésével kapcsolatban az excision repair cross complementation group 1 (ERCC1) protein szerepe vált ismertté az elmúlt években. Az ERCC1 a nukleotid exciziós repair rendszer tagja (NER), mely több mint 30 fehérjéből áll és a 2-30 nukleotid hosszúságú szakaszok helyreállítását végzi, főleg az UV-fény és a kemoterapeutikumok hatását befolyásolja [128]. Ezenkívül a gomba alkaloid, az illudin, vagy a dohányzás során a szervezetbe kerülő policiklikus aromás szénhidrogének által okozott károsodásokat is javítja. A fehérje heterodimert képez a xeroderma pigmentosum F csoportjával, és kivágják a hibát. Működésének első lépése a károsodás felismerése. A NER további folyamataiban kitekerik a károsodott DNS-t, hozzáférhetővé válik az endonukleázok számára. A kivágott 24-32 nukleotidot a DNS-polimeráz újraszintetizálja (6.ábra) [129,130]. Az ERCC1 gén expresszió mértéke arányban áll az oxaliplatinra adott válasszal. Magas ERCC1 expresszió esetén valószínű az oxaliplatinnal szembeni rezisztencia [131,132].



6. ábra. A NER szerepe (Bohanes és mtsai [128])

- A. Platina indukált DNS károsodás létrejötte
- B. DNS károsodás felismerése
- C. Endonukleázok kihalásítják a károsodott DNS szakaszt
- D. DNS repair szintézis

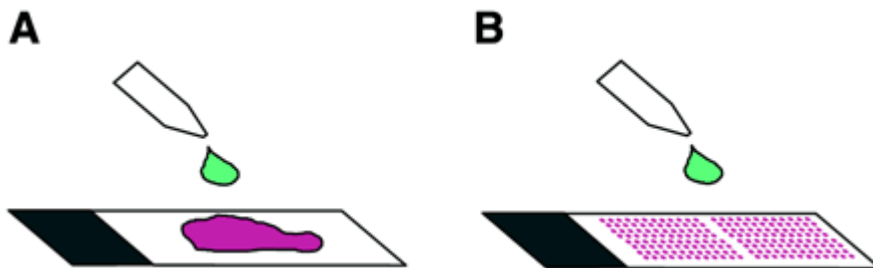
3.5. Szöveti multiblokk- tissue microarray (TMA) módszer

A TMA módszer elnevezés a szöveti multiblokk- tissue microarray angol kifejezés kezdőbetűiből származik. Mindeztidáig a módszer lényegét jobban megragadó magyar név nem született meg, így a mindennapokban szinte kizárólag az eredeti angol megnevezés rövidítése használatos. Ezen metodika viszonylag rövid múltra tekinthet vissza. 1986-ban publikálta Battifora munkacsoportja eredményeiket [133], majd a metodikát Kononen és társai tökéletesítették [134,135]. Az elmúlt években számos nagy tanulmány vizsgálta és igazolta a módszer használhatóságát, mint high throughput metodika a daganat proteomikai kutatásokban [136,137].

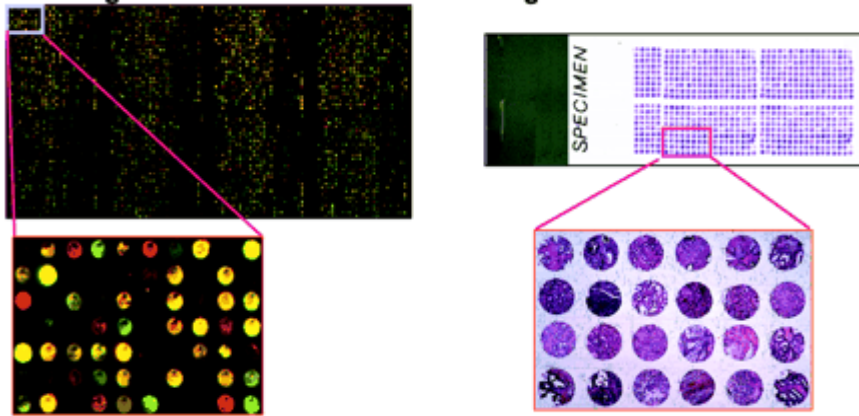
Bár elsődlegesen proteomikai vizsgálatok céljára fejlesztették ki, de alkalmas FISH reakciók segítségével DNS szintű vizsgálatok, elsősorban génamplifikációk, vagy deléciók illetve transzlokációk vizsgálatára is.

A TMA metodika lényegét nagyszámú paraffinba ágyazott szövetmintából származó szövethengerek egy recipiens blokkba összeépítése képezi, mely után a kész multiblokkokon a szokásos hisztológiai technikák, immunhisztokémiai reakciók és FISH reakciók elvégezhetőek. Egy TMA blokkba akár több száz külön-külön blokkból származó szövethengerek- core-ok építhetők egybe, így a módszer segítségével egyidejűleg lehet sok száz beteg mintáját vizsgálni (7. ábra). Ennek következtében a technika kiemelkedően kedvező költség-haszon aránnyal rendelkezik. Azonban nem csak anyagi (és kényelmi) megfontolások szólnak a TMA metodika alkalmazása mellett, hanem az a tény is, hogy ugyanazon standard reakciókörülményeket- antigén feltárás, reagens koncentráció, inkubációs idő, hőmérséklet- tudja biztosítani a vizsgált minták mindegyikénél, ami a kapott eredmények korábbinál sokkal nagyobb pontosságát eredményezi.

Nem kerülhetjük meg a módszer elvi bemutatásánál a biológiai- tumorbiológiai kutatásokban úgyszintén közkedvelt DNS chipek- chip- array metodikával történő összevetést. Míg a DNS-chip módszerrel egy-egy mintában több ezer gén expressziója vizsgálható, a TMA módszerben egy-egy gén vagy géntermék vizsgálható sok száz mintában (8.ábra) [138].



7. ábra: A hagyományos metszetkészítés (A) és a TMA (B) módszer összehasonlítása (Krenács T [138])



8. ábra: A DNS-chip és a TMA módszer összehasonlítása (Krenács T. [138])

A TMA metodika nyilvánvaló előnyei miatt rövid története ellenére is széleskörűen elterjedt, közkedvelt módszerré vált az utóbbi években a tumorbiológiai kutatásokban. Előnyei mellett azonban számos hátránya is van a metodikának. A legfontosabb hátrányok a következők: A metodika elsődlegesen paraffinos minták feldolgozására szolgál. Bár vannak informális adatok és szórványos említések friss fagyasztott szövetminták ilyen jellegű vizsgálatáról, a számos technikai buktató miatt gyakorlatilag napjainkban csak paraffinos minták jönnek számításba a TMA alapú vizsgálatoknál. Nagyon komoly hátrányaként említhető, hogy egy-egy tumor mintából csak egy kis terület -core- kerül kiemelésre és a TMA blokkba beépítésre, amely nem biztos, hogy kellően reprezentatív. A kiemelt „core” nem reprezentatív voltának számos oka lehet. 1. Előfordulhat, hogy a leg gondosabb tervezés ellenére is a core henger nem tartalmaz tumorszövetet, vagy csak minimális a tumorszövet tartalma. 2. Lehetséges, hogy túlnyomórészt necroticus terület kerül kiemelésre. 3. Ismert az intratumoralis heterogenitás jelensége, mind a tumor fenotípust, mind a genotípust illetően. A minta reprezentativitás kérdésénél nem szabad elfelejteni, hogy a klasszikus, nagy metszeten végzett immunhisztokémiai reakciók, vagy a DNS alapú vizsgálatok is a sokszor 4-10 cm mérettartományban lévő tumoroknak csak néhány százalékát vizsgálják, így az esetleges intratumoralis heterogenitás miatti eltéréseket a klasszikus vizsgálómódszerek sem tudják teljesen kiküszöbölni. 4. Továbbá a szövettani feldolgozás, fixálás, víztelenítés és paraffinba ágyazás regionális egyenetlenségei miatt előfordulhat, hogy a kiválasztott szövethenger nem megfelelő az immunhisztokémiai vizsgálat vagy FISH reakció céljára, álnegatív vagy esetleg álpozitív reakciót eredményezve. Ezeket a hibalehetőségeket kiküszöbölendő, az irodalom egy-egy tumormintából 2-5 különböző területből származó szövethenger kiemelését javasolja. A kész TMA metszetekről core-ok lesodródhatnak vagy súlyosan károsodhatnak. Az ilyen

módon elveszett, értékelhetetlen core-ok arányát 5-15% között olvashatjuk az irodalomban. Ha az egy tumorból származó core-ok több mint fele értékelhetlenné vált, akkor azon mintából új core-ok kivétele és újabb TMA konstrukciója indokolt. Esetenként a kész TMA metszeten való tájékozódási hiba eredményezhet fals adatokat. A TMA metszetben való mindenkor helyes tájékozódást a megfelelő konstrukcióval, illetve a sorok azonosítását szolgáló jelzőanyag beépítésével lehet megoldani. A legutóbbi években lehetőségessé vált és a legtöbb hisztopatológiai laborban elérhető a kész TMA metszetek digitalizálása metszet scanner alkalmazásával. A beszkenelt metszeten, a számítógép képernyőjén könnyedén lehet az egyes core-okat azonosítani.

Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a TMA-módszer munka-, anyag- és költséghatékony, aminek mértéke az egy blokkba épített minták számával arányos. Továbbá az azonos reakciókörülmények miatt a módszer kivételes mértékű standardizálást tesz lehetővé [138].

A colorectalis tumorok vizsgálatában is többen próbálkoztak a TMA módszer alkalmazásával, és több közlemény is megjelent, melyek a β -catenin- E-cadherin rendszert vizsgálták ilyen módon [139, 140, 141,142,143,144].

4. Célkitűzések

Alapvető célkitűzésünk korai stádiumú, Dukes B2– II. stádiumú colorectalis carcinoma prognosztikai faktorainak vizsgálata. Munkánkban főképp TMA metodikát és immunhisztokémiai vizsgálatokat, valamint FISH vizsgálatot kívántunk alkalmazni.

Vizsgálni kívántuk a következők:

1. Az általunk használt TMA metodika megbízhatóságát- a metodika validációját HNPCC-es vastagbél carcinomás beteganyagunkon kívántuk elvégezni, MSH2, MSH6, MLH1 mismatch repair gén proteinek immunhisztokémiai kimutatása során.

2. Vizsgálni kívántuk, hogy a β -catenin és E-cadherin expresszió immunhisztokémiai kimutatása segít-e Dukes B2- II. stádiumú colorectalis carcinoma prognózisának meghatározásában, használható-e prognosztikai faktorként.

Továbbá vizsgálni kívántuk, befolyásolja-e ezen két protein expressziója a metastasis kialakulásának valószínűségét.

3. Nagyobb betegszámú Dukes B2- II. stádiumú betegcsoportban klasszikus faktorok: életkor, tumor lokalizáció, nem, szövettani grade, feldolgozott nyirokcsomók száma, adjuváns kezelés szerepe mellett a már fentebb is említett β -catenin és E-cadherin expresszió, valamint további molekuláris markerek: p53, p21, p16, MSH2, MLH1, EGFR, TS prognosztikai szerepét is vizsgálni kívántuk.

4. Az észlelt összefüggéseket egy előrehaladott stádiumban lévő vastagbél tumoros betegcsoportban is ellenőrizni kívántuk. A β -catenin, E-cadherin, p53, p21, MSH2, MSH6, MLH1, EGFR és TS vizsgálatunkat kiegészítettük az ERCC1 protein kimutatásával, hogy megállapítsuk, az ERCC1 immunhisztokémiai kimutatása alkalmas-e az oxaliplatin terápiás válasz előrejelzésére.

5. Vizsgálni kívántuk, hogy az általunk alkalmazott TMA metodika lehetővé teszi-e FISH vizsgálatok elvégzését. Ezen összefüggésben EGFR gén amplifikáció kimutatását tűztük ki célul, párhuzamosan az EGFR expresszió immunhisztokémiai kimutatásával.

6. A rutin diagnosztikus munka során észlelt ritka, rhabdoid szövettani fenotípusú tumor részletes jellemzése mellett irodalmi áttekintést is végzünk, a rhabdoid fenotípus prognosztikai jelentőségének meghatározása céljából.

5. Betegek, anyagok és módszerek

5.1 TMA validáció

Korábbi években Klinkánkon elkezdődött a HNPCC-es vastagbél carcinomás betegek és családjaik vizsgálata. A munkacsoport eredményeit számos közleményben publikálta [145, 146,147,148,149].

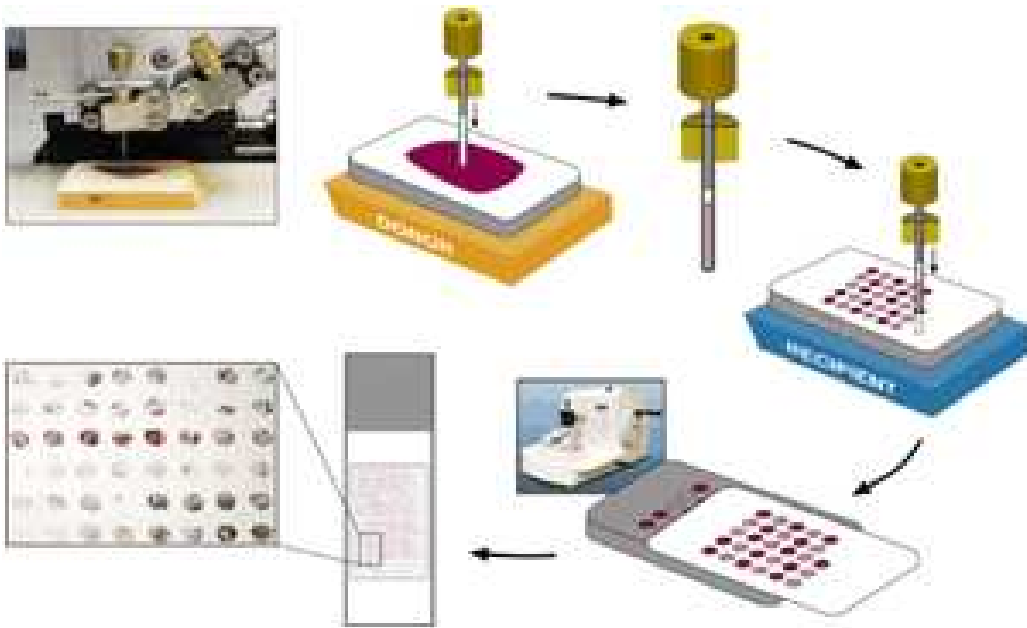
A HNPCC-es betegek azonosítására több diagnosztikus algoritmust dolgoztak ki. A Klinikánkon dolgozó munkacsoport által alkalmazott diagnosztikus panel egyik lépcsőfoka az Amsterdam kritériumok alapján szelektált colorectalis carcinomás betegek tumormintáiban a mismatch repair gén proteinek kimutatása immunhisztokémiai módszerrel [150,151,152,153]. Laboratóriumunk ezen a szinten kapcsolódott be a HNPCC-es munkacsoport vizsgálataiba.

Ezen betegcsoport mintáin kívántuk a TMA validációs vizsgálatunkat elvégezni.

Az 1996 és 2008 között a DEOEC I. és II. számú Sebészeti Klinikáin vastagbélrák miatt operált betegek közül azok kerültek kiválasztásra, akik az Amsterdam és Bethesda kritériumoknak megfeleltek. Az így kiválasztott betegek formalinban fixált, paraffinba ágyazott műtéti anyagát használtuk a mismatch repair gén proteinek kimutatására. A vizsgálatba összesen 75 beteget vontunk be, közöttük 34 nő és 41 férfi beteg volt. Minden beteg szövettani anyagából hagyományos immunhisztokémiai feldolgozással MSH2, MSH6 és MLH1 kimutatását végeztünk. A következő lépésben ugyanezen betegek műtéti anyagából szöveti multiblokkot építettünk.

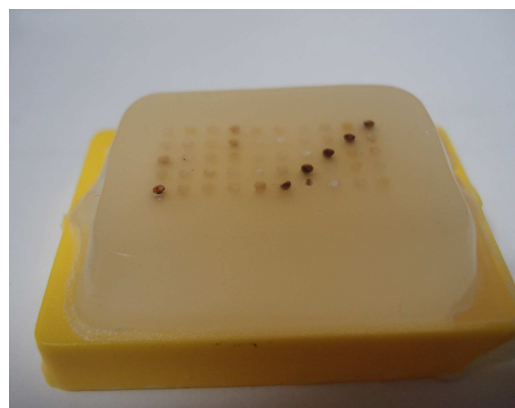
A TMA blokkok építésének első lépése a TMA blokk megtervezése, azaz mennyi szövet core beépítését tervezzük, és azok milyen elosztásban lesznek jelen, illetve milyen átmérőjűek lesznek a core-ok. A vizsgálandó tumor blokkokat donor blokknak nevezik, míg a core-okat befogadó TMA blokk a recipiens blokk. A recipiens blokk olyan paraffinblokk, mely a core-ok befogadásához szükséges méretű, tehát 0.6-3 mm-es lyukakat tartalmaz. A core-ok átmérőjének és egymástól való távolságuk függvényében a kész TMA blokk tartalmazhat 3x3-tól gyakorlatilag 10x20-ig terjedő elosztásban akár 200 core helyet is. Elméletileg lényegesen több- akár 1000 is lehetséges- illetve az irodalmi közlemények nagyobb core számokat is publikálnak, azonban a gyakorlati megfontolások ennél kisebb számokat tartanak optimálisnak. A TMA blokk építése történhet manuálisan, félautomata módszerekkel, illetve teljesen automatizáltan. Saját munkáinkban automatizált TMA építést végeztünk, TMA Master (3DHistech) készülékkel. Akár manuálisan vagy automatizáltan történik a TMA blokk építés, első lépésként mindig a donor blokkok reprezentatív területeinek kijelölését kell

elvégezni, az identikus H.E. metszetek alapján. Ezután történik a szövethengerek kiemelése és a recipiens blokkba, az előre kijelölt pozícióba behelyezése (9. ábra).



9. ábra: A multiblokk építés menete (Krenács T [138])

A kész blokkban való tájékozódást meghatározott pozíciókban elhelyezett jelzőanyag core, pl máj, vese, vagy szívizomszövet core biztosítja (10. ábra).



10. ábra: Kész szöveti multiblokk

Az elkészült TMA blokkokat termosztátban óvatosan 56 C-ra melegítjük, majd forró folyékony paraffinban (70-72 C) olvasztjuk össze. A művelet nagy figyelmet igényel, mivel a túl hosszú időtartamú összeolvasztás a teljes blokk szétfolyását eredményezi, míg a rövid

ideig tartó művelet esetén az egyes core-ok a későbbi feldolgozás során kihullhatnak. A kész TMA blokkok a továbbiakban ugyanúgy kezelendők, mint egy egyszerű szövetblokk. Minden mintából 3-3 db 1 mm átmérőjű core került kiemelésre és 5x10-es elosztású recipiens blokkba helyeztük a szövethengereket. Végül ezeken a blokkokon is elvégeztük az immunhisztokémiai reakciókat. Majd a két metodikával kapott eredményeket összevetettük, a TMA validáció céljából.

5.2. Rhabdoid szövettani fenotípus vizsgálata

Esetismertetés:

P.P. 81 éves férfibeteg. Korábbi betegségei között prostata hyperplasia miatti műtét, orrsövény műtét, lágyéksérv miatti műtét szerepel. Ismert vastagbél diverticulosisa. Angina pectoris és cardialis decompensatio miatt többször kezelték belgyógyászaton, valamint ismert hasi aorta aneurysmája.

2004. októberében subileus, véres széklet miatti belgyógyászati kivizsgálás kezdődött: gastroscopia, colonoscopia során nem észleltek tumort, hasi CT és ultrahangvizsgálat a colon descendens környezetében jelzett tumorra gyanús elváltozást.

2004. októberben ileus miatti exploratio, műtét során elzáródást okozó tumort találtak a vékonybélben, a Treitz szalagtól 1 m-re, mely a hasfalhoz ki volt tapadva. Ekkor eltávolították a tumoros vékonybélszakaszt és hasfali valamint cseplész resectiot végeztek.

2005. márciusában melaena, görcsös hasi fájdalmak miatt ismét műtét történt, hasfallal is összekapaszkodó vékonybél tumort találtak, két szakaszon resecálták a vékonybelet és a tumorosan infiltrált hasfal részletet.

2005. április végén a korábbi műtégi heg vonalában rezisztencia alakult ki, ami ismét műtétet tett szükségessé. Ez az alapfolyamat progresszióját igazolta, csak szövettani mintavétel történt. A beteg a radikális sebészi és/vagy onkológiai kezeléstől elzárkózott. Szupportív kezelés és kábító fájdalomcsillapítók alkalmazása mellett állapota fokozatosan romlott, 2005. májusában, a daganat felismerését követően 7 hónappal, keringési elégtelenségben meghalt. A család kérésére, az alapbetegség ismeretében boncolás nem történt.

Irodalom kutatás:

Rhabdoid jellegű tápcsatornai tumorokról szóló közleményeket kerestünk Pubmed és Medline adatbázisokban, vizsgálva a rhabdoid fenotípus prognosztikai jelentőségét.

5.3. E-Cadherin- β -catenin vizsgálat

Betegkiválasztás

Vizsgálatunkban a DE OEC Sebészeti Klinikáin 1996-2001 között operált 79 Duke's B2 stádiumú vastagbél carcinomás beteg műtéti anyagait használtuk fel. A betegek patológiai adatai az eredeti szövettani leletből, a klinikai adatok a betegek klinikai rekordjaiból származtak. A betegek életkora 35-85 év volt, átlagéletkor 65,8 év, 39 nő és 40 férfi volt. Átlagos követési idő 52 hónap volt. Valamennyi beteg, aki high-risk csoportba tartozott és emiatt szükséges volt, 5FU adjuváns kezelést kapott, a rectum tumoros betegek pedig emellett irradiációban is részesültek. Metastasis megjelenése esetén további kemoterápia történt. A betegek klinikopatológiai adatait az I. táblázat mutatja be.

TMA építés

A vizsgálatba bevont tumoros szövetminták formalinban fixáltak, paraffinba ágyazottak. Valamennyi eset H.E. metszeteit újra áttekintettük, a diagnózis revidálása céljából. Kijelöltünk minden esetben három-három reprezentatív területet a TMA építéshez. Az innen kiemelt 1 mm vastag core-ból szöveti multiblokkot készítettünk.(3DHistech TMA Master) Ebből a TMA blokkból 5 micron vastagságú, egymást követő metszeteket készítettünk a H.E. festéshez és az immunhisztokémiai reakciókhoz. A 79 tumorból összesen 237 core-t építettünk az 5x10-es TMA blokkokba. A vizsgálatok során 12 esetben az egyik vagy mindkét immunreakció esetén az egy tumorból származó 3 core-ból 2, vagy esetleg mindhárom értékelhetetlen volt. Ez lehetett a core elvesztése miatt, vagy mert a core nem reprezentatív területből származott, mert necroticus, vagy túl kevés tumorsejtet tartalmaz, vagy egyáltalán nincs benne tumoros szövet, vagy az immunhisztokémiai reakció nem volt értékelhető. Ezen esetekben a primer tumorblokkból újabb reprezentatív területekből kiemelt core-okkal egy további TMA blokkot építettünk.

5.4. Prognosztikai vizsgálat

Retrospektíve értékeltük 100, T3N0 stádiumú, 1997-2003 között a DE OEC-en operált és kezelt colorectalis carcinomás beteg klinikai adatait. A betegek formalinban fixáltak, paraffinba ágyazott műtéti anyagát használtuk TMA metodikával és immunhisztokémiai reakciókkal a p53, p21-waf, p16, β -catenin, E-cadherin, EGFR, MLH1, MSH2 és TS protein expressziót

vizsgáltuk. A patológiai adatok az eredeti hisztopatológiai leletekből származtak, míg a klinikai adatok a kórlapokból származtak. A kapott eredményeket összevetettük a betegek túlélési adataival (5 éves OS és 3 éves DFS). Elemeztük az életkor, tumor lokalizáció, és az eltávolított nyirokcsomók számának prognosztikai szerepét is.

Valamennyi páciens kuratív sebészeti beavatkozáson esett át, és a sebészi szélek negatívak voltak. Valamennyi páciens, aki kapott kemoterápiát (high-risk betegek), 5FU+LV adjuváns kezelésben részesült.

A betegek tumorának paraffin blokkjaiból a fenti módon TMA blokkokat építettünk. Esetenként 3-3 core henger lett kiemelve és a recipiens blokkba helyezve.

5.5. ERCC1 expresszió immunhisztokémiai kimutatása és prognosztikai faktorok vizsgálata metastaticus colorectalis carcinomában

28, a DE OEC Onkológiai Tanszéken oxaliplatin kemoterápiában részesült, metastaticus vastagbél carcinomás beteg formalinban fixált, paraffinba ágyazott primer tumorának immunhisztokémiai vizsgálatát végeztük el. Minden esetben a primer tumor műtéti anyagát vizsgáltuk. A betegek a primer tumor eltávolítását követően 5FU alapú adjuváns kemoterápiát kaptak, majd a metastasis megjelenését követően oxaliplatin terápiában részesültek. A ciklusok száma átlagosan 7 (2-20) volt. A betegek klinikai adatait kórlapjaikból kerestük ki. A hisztopatológiai adatok az eredeti szövettani leletből, és a metszetek ismételt áttekintéséből származtak. Valamennyi tumor paraffin blokkjából a fenti módon TMA blokkot építettünk. A 28 beteg mintáiból összesen 84 core került beépítésre a TMA blokkokba. Ezen TMA blokkokon immunhisztokémiai reakciókat végeztünk, minden esetben 10 protein expresszióját vizsgáltuk: p53, p21, MLH-1, MSH-2, MSH-6, EGFR, β -catenin, E-cadherin, timidilát szintáz és ERCC1.

A 84 coreból összesen 8db (9.5%) volt értékelhetetlen, de valamennyi esetben legalább 2 core értékelhető volt, így újabb TMA konstrukció nem vált szükségessé.

5.6. Immunhisztokémiai reakciók

Az immunhisztokémiai reakciókhoz mind a teljes metszetek, mind a TMA blokkok esetén 5 micron vastagságú, egymást követő metszeteket készítettünk. Az immunhisztokémiai reakció

elvégzéséhez a metszeteket deparaffináltuk, rehidráltuk leszálló alkoholsorban. Endogén peroxidáz blokkolást végeztünk 0,5%-os metanolos hidrogén-peroxid oldattal 30 percen keresztül, majd desztillált vizes öblítés után antigén feltárást végeztünk, az adott antitestnek megfelelő módon. A metszeteket ezután pH 7,4-es PBS oldatban mostuk. A metszeteket a primer antitesttel inkubáltuk 37 C-on egy órán át.

5.6.1. Alkalmazott primer antitestek, az antitest specifikációk

A vizsgálatainkban alkalmazott antitesteket, és azok specifikációit a következő táblázatok tartalmazzák: TMA validáció: I. táblázat, rhabdoid szövettani fenotípus vizsgálata: II. táblázat, β -catenin-E-cadherin vizsgálat: III. táblázat, prognosztikai vizsgálat: IV. táblázat, ERCC1 vizsgálat: V. táblázat, EGFR expresszió vizsgálata: VI. táblázat.

I. táblázat. TMA validáció során alkalmazott antitestek

Primer antitest	klón	hígítás	gyártó
MSH2	G219-1129	1:100	Becton-Dickinson
MSH6	Clone 44	1:100	Becton Dickinson
MLH1	G168-15	1:100	Becton-Dickinson

II. táblázat. Rhabdoid szövettani fenotípus vizsgálata során alkalmazott antitestek

Primer antitest	klón	hígítás	gyártó
panCytokeratin	MNF116	1:50	Dako
Cytokeratin 7	OV-TL 12/30	1:100	Dako
Cytokeratin 20	CK205	1:50	Novocastra
LCA	T29/33	1:50	Dako
S100	Polyklonal	1:100	Dako
HMB45	HMB45	1:50	Dako
SMA	1A4	1:100	Dako
Desmin	D33	1:100	Dako
CD34	QBEnd/10	1:50	Novocastra
C-kit	Polyklonal	1:400	Dako
CD30	Ki-1	1:40	Dako
Bcl6	PG-B6p	1:20	Dako
CD3	PS1	1:50	Novocastra
CD20	L26	1:200	Dako
Ki-67	MIB-I	1:100	Novocastra
Her2	CB11	1:40	Novocastra
Vimentin	V9	1:100	Novocastra
Ini-1	H-300	1:400	Santa Crus Biotechnology
P53	DO-7	1:50	Dako

III. táblázat. E-cadherin- β -catenin vizsgálat során alkalmazott antitestek

Primer antitest	klón	hígítás	gyártó
β -catenin	C19220	1:100	Transduction Laboratories
E-cadherin	36	1:100	Transduction Laboratories

IV. táblázat. Prognosztikai vizsgálatban alkalmazott antitestek

Primer antitest	klón	hígítás	gyártó
β -catenin	C19220	1:100	Transduction Laboratories
E-cadherin	36	1:100	Transduction Laboratories
MSH2	G219-1129	1:100	Becton-Dickinson
MLH1	G168-15	1:100	Becton-Dickinson
P53	DO-7	1:50	Dako
P21 waf1	4D10	1:40	Novocastra
EGFR	EGFR.25	1:15	Novocastra
Thymidilate synthase	TS106	1:100	Chemicon
P16	GH12	1:100	Novocastra

V. táblázat. ERCC1 vizsgálat során alkalmazott antitestek

Primer antitest	klón	hígítás	gyártó
β -catenin	C19220	1:100	Transduction Laboratories
E-cadherin	36	1:100	Transduction Laboratories
MSH2	G219-1129	1:100	Becton-Dickinson
MSH6	Clone 44	1:100	Becton Dickinson
MLH1	G168-15	1:100	Becton-Dickinson
P53	DO-7	1:50	Dako
P21 waf1	4D10	1:40	Novocastra
EGFR	EGFR.25	1:15	Novocastra
Thymidilate synthase	TS106	1:100	Chemicon
ERCC1	8F1	1:50	Neomarkers

VI. Táblázat. EGFR expresszió vizsgálata során alkalmazott antitest

Primer antitest	klón	hígítás	gyártó
EGFR	EGFR.25	1:15	Novocastra

Kétszeri 7,4-es pH-jú PBS oldatban való mosás után hozzáadtuk a szekunder antitestet: LSAB (biotinnal kötött 2. antitest, DAKO), majd 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Előhíváshoz EnVision és DAB módszert, magfestéshez hematoxylint használtunk, majd víztelenítés és lefedés történt.

5.6.2. Immunreakciók értékelése

Az immunreakciók értékelésénél külön vizsgáltuk a β -catenin membrán és magfestődést, míg E-cadherin esetében csak a membrán festődést tekintettük pozitívnak. A normál colon mucosa epithelsejtjei erős E-cadherin és β -catenin membrán pozitivitást mutatnak. Az egyes esetek festődését a következőképp értékeltük, a korábbi tanulmányok értékelési rendszereit is figyelembe véve: β -catenin membrán és mag pozitivitás: A tumorsejtek < 10%-a festődik, negatív, a tumorsejtek 11-50% festődik 1+, 51-100 % festődik 2+. E-cadherin esetén a tumorsejtek 0-75%-a mutat membránfestődést: negatív, 76-90% membránfestődés: 1+ pozitív, 91-100% festődés esetén 2+ pozitív. A későbbi statisztikai feldolgozás során az 1+ illetve 2 + eseteket vettük pozitívnak.

A normál colon mucosa sejtjei illetve a lamina propria kis lymphocytái MSH2 és MLH1 és MSH6 pozitívak, a pozitivitás a magban látható. A mutációt szenvedett gén kóros fehérjét termel, ez esetben az immunhisztokémiai reakció negatív. MLH1, MSH2, MSH6 pozitív, ha nukleáris festődés volt a tumorsejtekben.

p53 értékelése:

0-25%-festődés	1+
26-50%	2+
51-75%	3+
76-100%	4+

P21 pozitív, ha a tumorsejtekben nukleáris festődés volt.

EGFR score – A DAKO pharmdx egfr kit scoring rendszerét használtuk, az irodalmi adatoknak megfelelően [154]. A statisztikai feldolgozásban a score 1-3+ festődést értékeltük pozitívnak, a score 0 esetén negatívnak.

Timidilát-szintáz: A festődő sejtek arányát és a festődés intenzitását figyelembe véve az irodalmi adatok alapján: festődési intenzitás: mérsékelt 1, közepes 2, erős 3. Festődő sejtek aránya 0-33%-1, 34-66%-2, és 64-100%-3. A két érték szorzatából kapott értéket tekintettük a TS expresszió mértékének.

ERCC1 marker esetében a festődő sejtek aránya alapján 1+, 2+, 3+ pozitivitást értékeltünk, ha 0-33, 34-66, illetve 67-100% festődés volt. Negatív a reakció, ha egyáltalán nem volt specifikus festődés.

A kész IHC reakciók értékelése történhet hagyományos úton, de lehetőség van a kész metszetek digitalizálására és a reakciók digitális kiértékelésére is (3Dhistech- Mirax).

Az immunhisztokémiai reakció során legtöbb esetben belső pozitív kontrollként szolgált a normál colon mucosa, valamint a nyálkahártyában jelen lévő lymphocyták. A normál colon epithelialis sejtek E-cadherin, β -catenin membran pozitivitást mutatnak, MLH1, MSH2, MSH6 magpozitivitás látható. A jelzőanyagként a TMA blokkokba épített májszövet sejtjei β -catenin és E-cadherin membránpozitivitást mutatnak, mely ilyen módon külső pozitív kontrollként szolgál. További esetekben külső pozitív kontrollnak biztosan pozitív tumort építettünk a blokkba, a negatív kontrollnál pedig nem adtuk hozzá a primer antitestet.

5.7. EGFR amplifikáció kimutatása FISH reakcióval

Az E-cadherin- β -catenin study tumormintáin, a kész TMA blokkokon EGFR FISH reakciót végeztünk, PathVysion EGFR Dual color FISH teszttel. Referencia gén a CEP7. A reakcióhoz valamennyi TMA blokkból 5 mikron vastagságú metszeteket készítettünk. A metszetek deparaffinálása után Proteináz K emésztést végeztünk 5 percig, majd a probe hozzáadása után DNS denaturáció történt 90 C-on. DNS hibridizáció 37 C-on történt egy éjszakán át thermobrite manualis FISH platformon. A metszetek eltávolítása után posthybridisatio stringency mosás történt. Háttérfestésként 4,6-diamidino-2-fenilindolt (DAPI, Vysis) alkalmaztunk.

A kész metszeteket Olympus BX51 fluoreszcens mikroszkóppal, DAPI/orange/green tripla szűrővel vizsgáltuk. Minden esetben konszekutívan 20-20 db, elhatárolódó, jól körülírt tumorsejtet vizsgáltunk és számoltuk meg az EGFR gén szignált és a referencia gén szignált. Az átlagos sejtenkénti EGFR szignálok számát osztva a centroszóma referencia gén szignál

sejtenkénti átlagával, megállapítható, hogy van-e gén amplifikáció. Ha a CEP7 jelek számának sejtenkénti átlaga 2.5-nél több, a 7. kromoszóma poliszómiája igazolható.

A FISH reakciókkal párhuzamosan, ezeken TMA blokkokon EGFR immunhisztokémiai reakciót is végeztünk. A felhasznált antitest és a reakció értékelése a fentebb említett módon történt.

5.8. Statisztikai elemzés

Mind az E-cadherin- β -catenin, mind a prognosztikai studyban valamint ERCC1 studyban különféle antigének expresszióját és egyéb ismert prognosztikai faktorokat elemeztünk, összevetve az 5 éves OS és 3 éves DFS adatokkal. A statisztikai feldolgozásban független T próbát, chi négyzet tesztet, Pearson-Spearman korreláció analízist használtunk. A túlélési adatokat Kaplan- Meier függvényekkel elemeztük. Egyes eredményeinket multivariáns analízisben Cox-regressziós tesztel is vizsgáltuk. A statisztikai analízist az SPSS 15.0 statisztikai szoftverrel végeztük (Chicago, IL). $P < 0.05$ tekintettük szignifikánsnak.

A TMA validációs tesztben a kétfajta metodikával kapott eredmények elemzéséhez SPSS-PC 11.0 statisztikai programot használtunk. Az összehasonlításhoz Kappa-tesztet alkalmaztunk, mely lehetővé teszi két (vagy több) különböző módszerrel, vagy megfigyelő (orvos) által végzett diagnosztikus eljárás adatainak konkordancia értékelését. A Kappa- mutatót a megfigyelt és a véletlen konkordancia becsült értékeiből számítják. A mutató alapján a konkordanciát 5 fokozatú skálán fejezik ki. A null hipotézis (a két módszer vagy értékelő között nincs különbség) z-próbával is tesztelhető.

6. Eredmények

6.1. TMA validációs vizsgálat

Az immunhisztokémiai reakciók eredményeként mindhárom mismatch repair géntermék esetén pozitivitást a magban kaptunk. A pozitív esetekben a tumorsejtek magjában pozitív festődést észleltünk, míg negatív esetekben egyáltalán nem volt magfestődés a tumorsejtekben. Az eredmények értékelése során a három vizsgált marker sejtmagi megjelenését mind a 75 betegnél külön-külön elemeztük.

MLH1 vizsgálata során a két módszer 66 esetben egyezést, 5 esetben eltérést mutatott, valamint további 4 esetben valamelyik eljárás nem volt értékelhető. (VII. táblázat)

VII. táblázat: A két módszer értékelése Kappa-teszttel MLH1 esetén

		Hagyományos MLH1		Összesen
		+	-	
TMA MLH1	+	56 (a)	4 (b)	60 (a+b)
	-	1 (c)	10 (d)	11 (c+d)
	összesen	57 (a+c)	14 (b+d)	71 (n)

Mindkét módszerrel pozitivitást 56, negativitást 10 esetben kaptunk MLH1 vizsgálatánál. A standardnak vett hagyományos módszer által negatív esetek közül négyet nem mutatott ki a TMA, illetve a pozitívak közül egyet negatívnak jelölt. 5 esetben tehát eltérés volt a két módszer között.

$$\text{Kappa} = \frac{\text{megfigyelt-véletlen}}{1\text{-véletlen}} = 0,758$$

Az MSH2 vizsgálatokor 72 eset volt értékelhető, ezek közül 64 egyezést és 8 különbséget találtunk. A táblázat alapján kiderül, hogy mindkét módszer pozitív 61 esetben, és negatív 3 esetben volt, ami megadja a 64 egyezést. A TMA módszer 3 esetben nem mutatta ki a hagyományos vizsgálat alapján pozitív eseteket, valamint 5 alkalommal pozitív helyett negativitást mutatott. 8 alkalommal tehát a két módszer között eltérést találtunk. A fenti adatok alapján a kappa értéke 0,368. (VIII. táblázat)

VIII. táblázat: A két módszer összehasonlítása MSH2-nél

		Hagyományos MSH2		Összesen
		+	-	
TMA MSH2	+	61	3	64
	-	5	3	8
	Összesen	66	6	72

Az MSH6 kimutatása 18 esetben nem volt értékelhető, 54 egyezést és 3 eltérést tapasztaltunk 49 esetben mindkét módszer pozitívnak, míg 5 alkalommal mindkettő negatívnak bizonyult. További 3 esetben pedig a TMA a standardnak vett hagyományos módszerrel szemben nem mutatta ki a negativitást. A kapa értéke 0,741. (IX. táblázat)

IX. táblázat: A két módszer összehasonlítása MSH6-nál

		Hagyományos MSH6		Összesen
		+	-	
TMA MSH6	+	49	3	52
	-	0	5	5
	Összesen	49	8	57

A kapa értékelése: ha a kapa: 1,00-0,81 , az egyezés: kitűnő
0,80-0,61 jó
0,60-0,41 közepes
0,40-0,21 gyenge
0,20-0,00 rossz

MLH1 és MSH6 esetén tehát a kapott kapa érték jónak, míg MSH2-nél gyengének bizonyult. Ezután a kapott értékből z-próbát végeztünk melynek eredményeként MLH1-nél $p < 0,001$, MSH6-nál $p < 0,001$, mely erős egyetértést jelent. MSH2-nél a $p = 0,002$, ami azonban csak gyenge egyezést jelent.

Ez utóbbi eredményeinket csak fenntartással fogadtuk, mivel az alkalmazott antitest sok esetben nem adott értékelhető eredményt, ebben az esetben tudtuk a legkevesebb mintát értékelni, és ezen eredmények értékével kapcsolatban is voltak aggályaink.

6.2. Rhabdoid szövettani fenottípus vizsgálata

Az első műtét során (2004. október) 20 cm hosszú vékonybélszakaszt távolítottak el, melynek centrumában 13 cm-es, a bélfal teljes vastagságát érintő, kifeléyesedett tumor volt.

A második műtét során (2005. március) egy 17 és egy 19 cm-es vékonybélszakaszt resecáltak, melyekben egy 8x9, illetve egy 4x5 cm-es tumor volt, mely főképp a mesenteriumban helyezkedik el, de a bélfalat is beszűri és a nyálkahártyát kifeléyesíti. (11.ábra)

Az utolsó műtétnél (2005. április) 3 db, 0,8-1,5 cm-es, és egy 7x5 cm-es hasfali szövetrészlet excisiója történt, melyekben tömött, szürkésfehér, helyenként bevérzett, illetve necroticus tumorszövet volt.

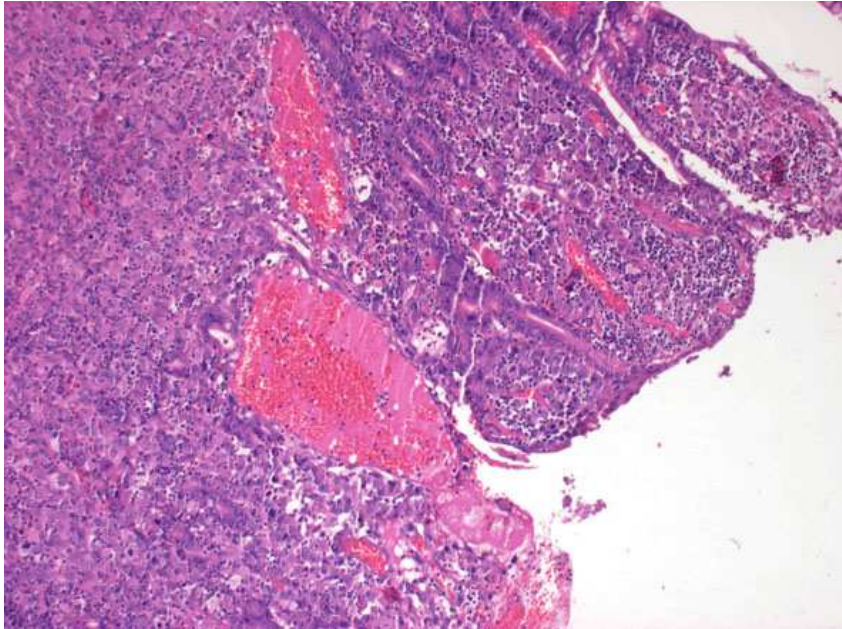


11.ábra. A tumor makroszkópos megjelenése.

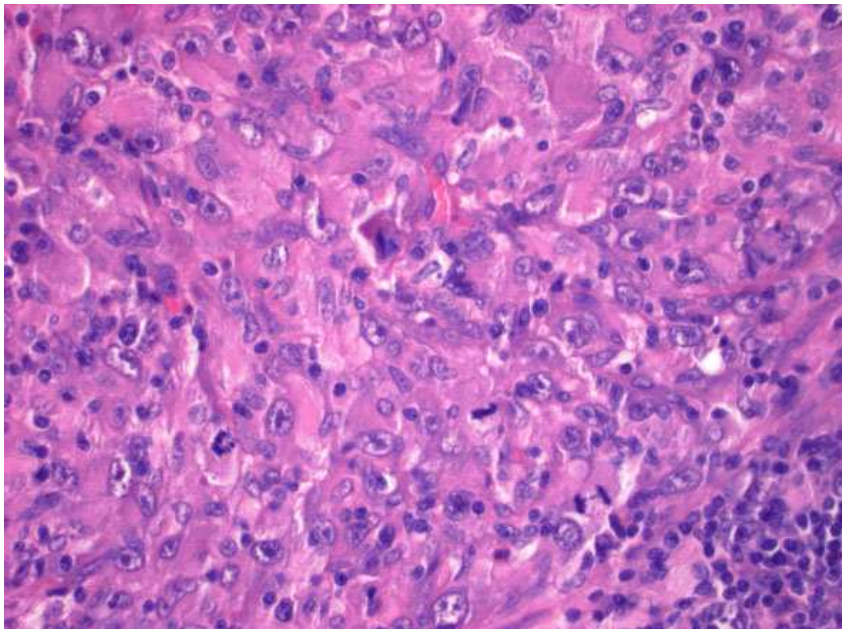
Mikroszkópos lelet

Mindhárom műtési anyagban ugyanazon szöveti felépítésű tumor látható. A daganat solid sejtmézökből áll, mirigyképződés nincs, számos göcban necrosis és vérzések láthatók. (12.

ábra) Az egyes tumorsejtek széles, egynemű, eosinophil cytoplasmával rendelkeznek, a cytoplasmában hyalin inclusiok láthatók, a változatos méretű magokban a nucleolus sokszor prominens. Az oszlási frekvencia magas, a mitosisok többsége patológiás. (13. ábra) PAS reakció negatív. Bár a resecált bélszakaszokban lévő tumorok exulceráltak, a környező vékonybél mucosában nem volt dysplasia.

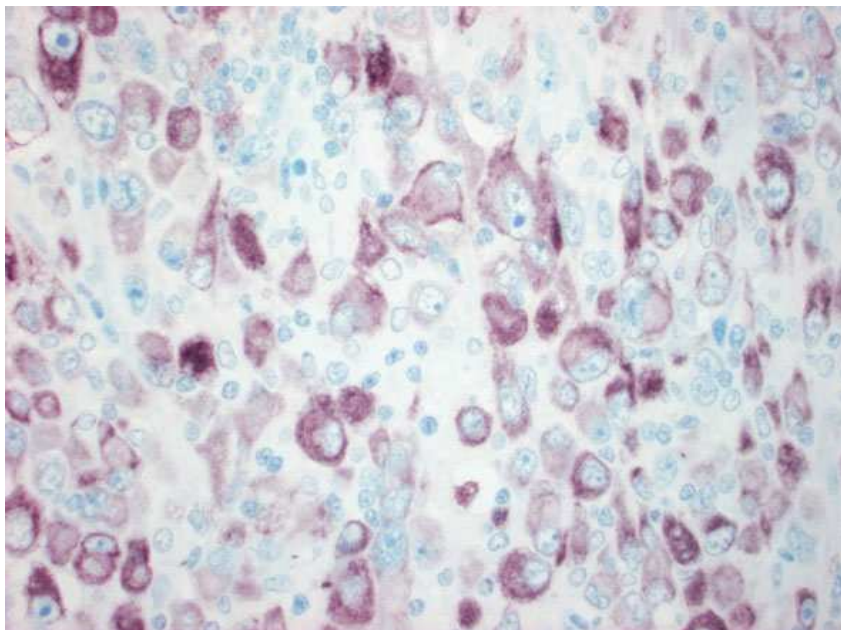


12. ábra. HE, 100x

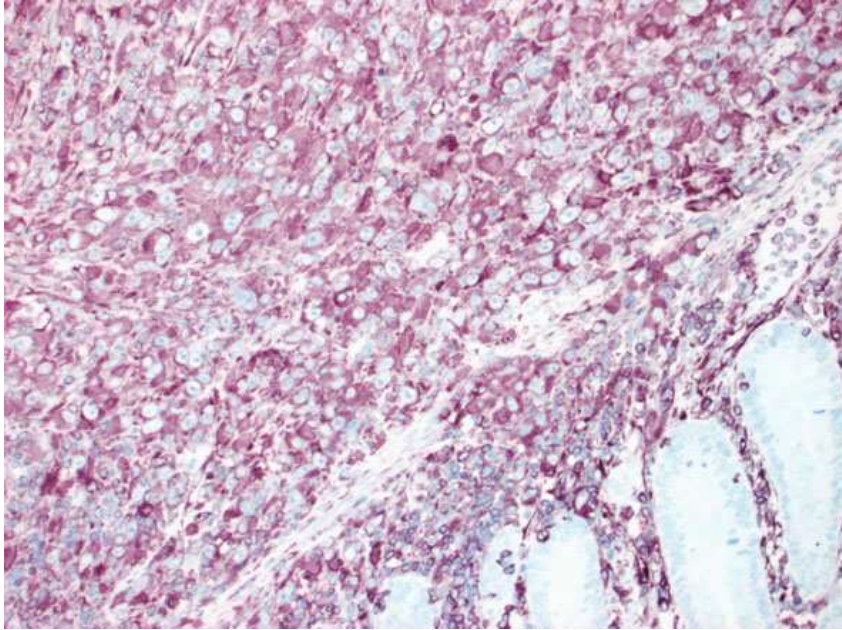


13. ábra. HE, 400x

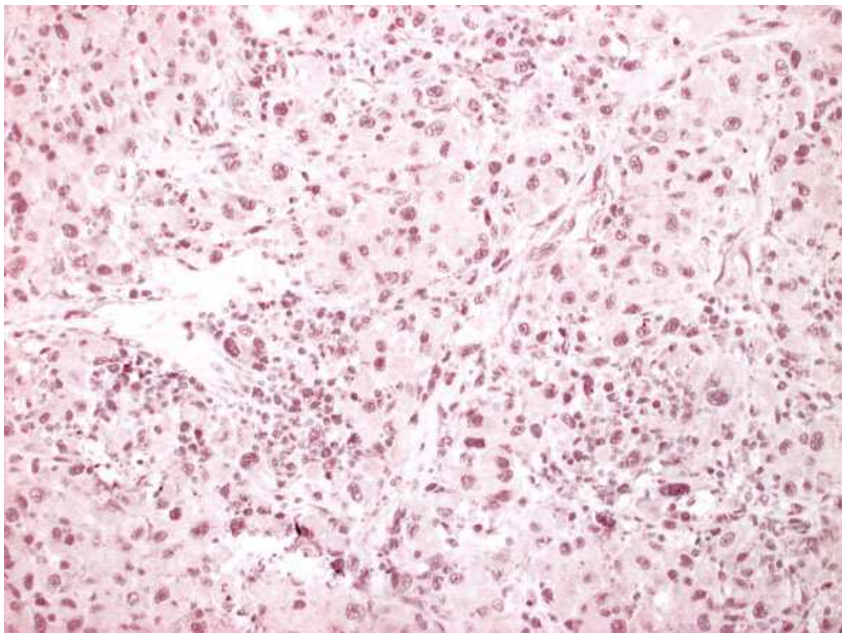
Részletes immunhisztokémiai vizsgálat történt. A tumorsejtek diffúz panCK és vimentin pozitivitása (14.a. és 14. b. ábra) és fokális EMA pozitivitása mellett a CK7-, CK20-, LCA-, S100-, HMB45-, SMA-, desmin-, caldesmon-, CD34- és C-kit, CD30-, bcl6-, CD3-, CD20-, E-cadherin- és p27- ellenes antitestek negatív reakciót adtak. Ennek alapján lymphoma, melanoma, myogen tumor, GIST kizárható volt. Ki-67 festődési index (MIB-1 antitesttel) magas volt, mely korrelált az észlelt igen magas mitoticus aktivitással. Prognosztikailag kedvezőtlen jelként értékeltük a csaknem diffúz p53 pozitivitást és a számottevő Her2 reaktivitást (Score ++). Ini1 ellenes antitesttel a tumorsejtekben magfestődést észleltünk (15. ábra).



14 a. ábra. panCK, 400x



14 b. ábra. Vimentin, 200x



15. ábra, Ini1, 200x

A szöveti/citológiai kép és az immunfenotípus bizonyította, hogy a tumor rhabdoid carcinoma volt, amely a kórlefolyás során megőrizte ezt a jellegét.

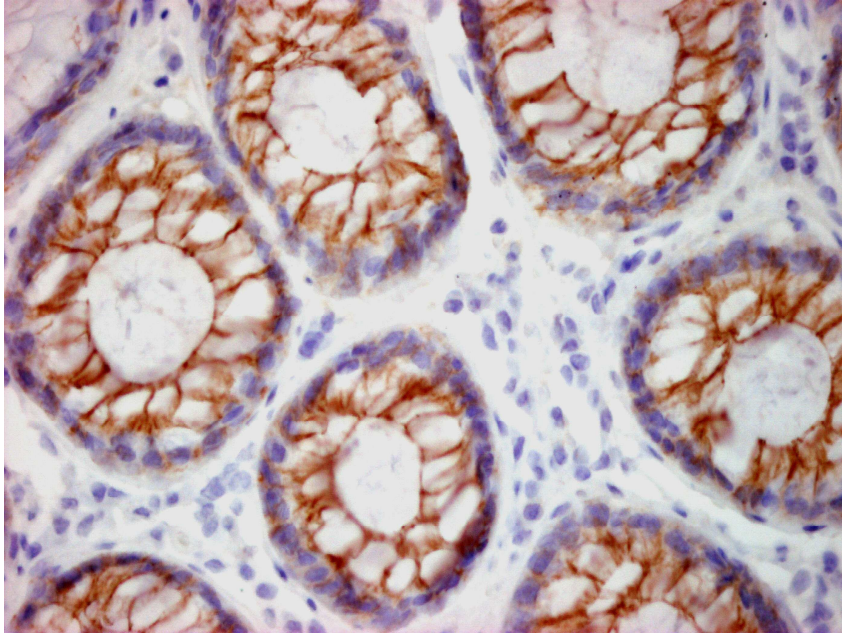
6.3. E-cadherin β -catenin vizsgálat

79, Dukes B2 stádiumú (pT3N0 TNM stádium) colorectalis carcinomát vizsgáltunk. 3 beteg a műtétet követő 6 héten belül elhunyt, sepsis illetve posztoperatív szövődmények miatt. További 6 betegről nem állt rendelkezésre a műtét után további klinikai adat. Ezeknek a betegeknek az adatait a későbbiekben nem vettük figyelembe a túlélési adatok statisztikai feldolgozásában, így a túlélési adatok csak 70 beteg esetében voltak értékelhetők. Az 5-éves OS arány 59%, a 3-éves DFS arány 64% volt. A betegek klinikopatológiai adatai a X. táblázatban láthatók.

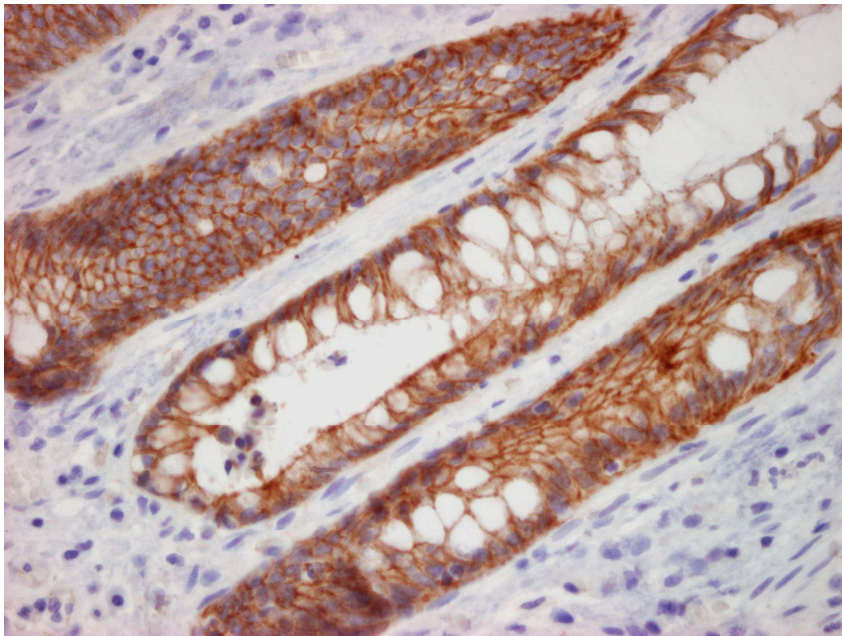
X. táblázat. A betegek klinikopatológiai adatai

Betegek száma	79
életkor	65,8 (35-85)
nem	
férfi	40
nő	39
Tumor lokalizáció	
jobb colonfél	19(24,1%)
bal colonfél	29 (36,7%)
Rectum	31 (39,2%)
Grade	
Jól és közepesen differenciált (G1-G2)	64 (81%)
rosszul differenciált (G3)	15 (19%)
Átlagos követési idő	52 hónap
5 éves OS	59%
3 éves DFS	64%

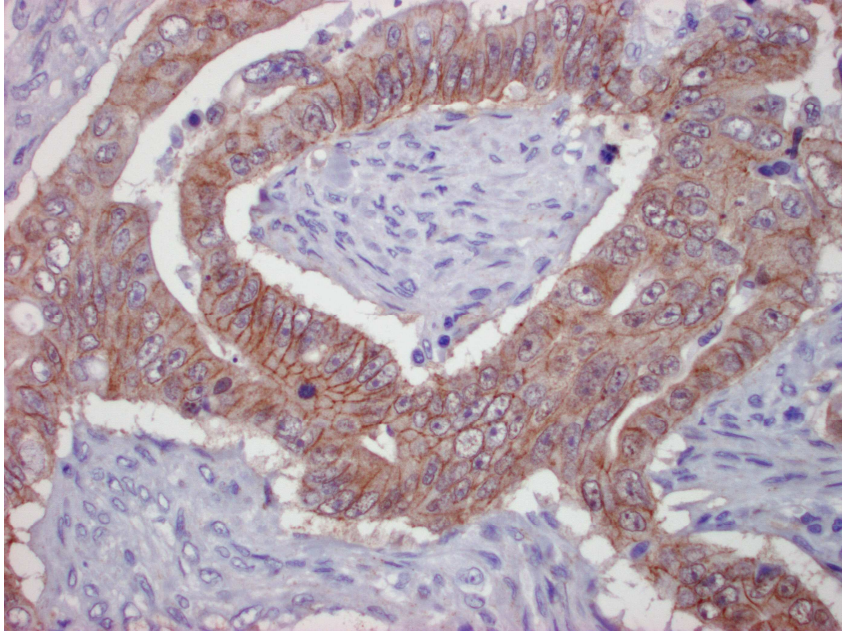
A normál colon nyálkahártya erős membranosus festődést mutatott mind a β -catenin mind az E-cadherin esetén. (16. a. és 16. b. ábra). Membranosus β -catenin expresszió 52 esetben volt megfigyelhető míg 27 eset negatív volt. (17. ábra). Nukleáris β -catenin expresszió 36 esetben volt detektálható, míg 43 eset negatív volt. (18. ábra). E-cadherin membranosus festődés 46 esetben volt, 33 eset negatív volt (19. ábra). A két protein expressziós profilja a XI. táblázatban látható.



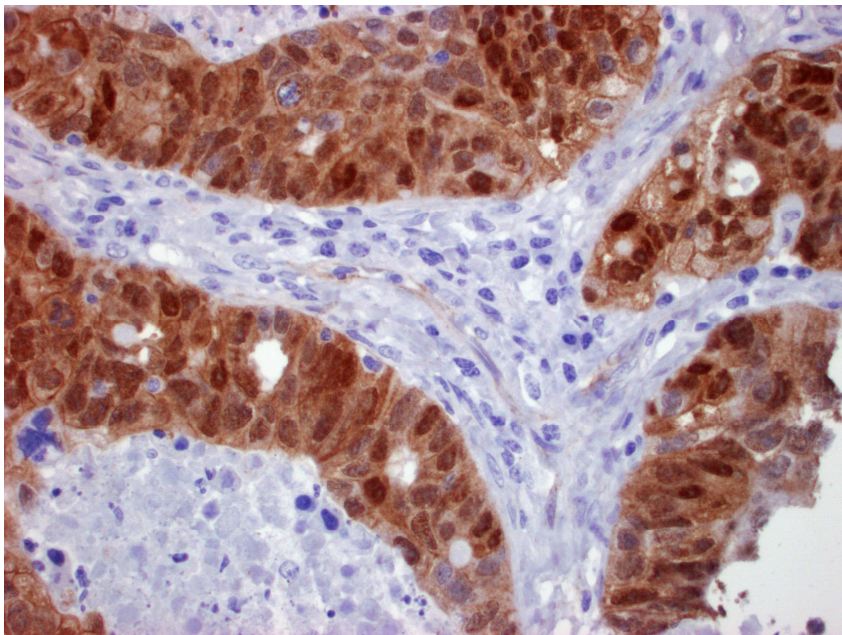
16.a. ábra. Normál colon mucosa E-cadherin festődés, 200x



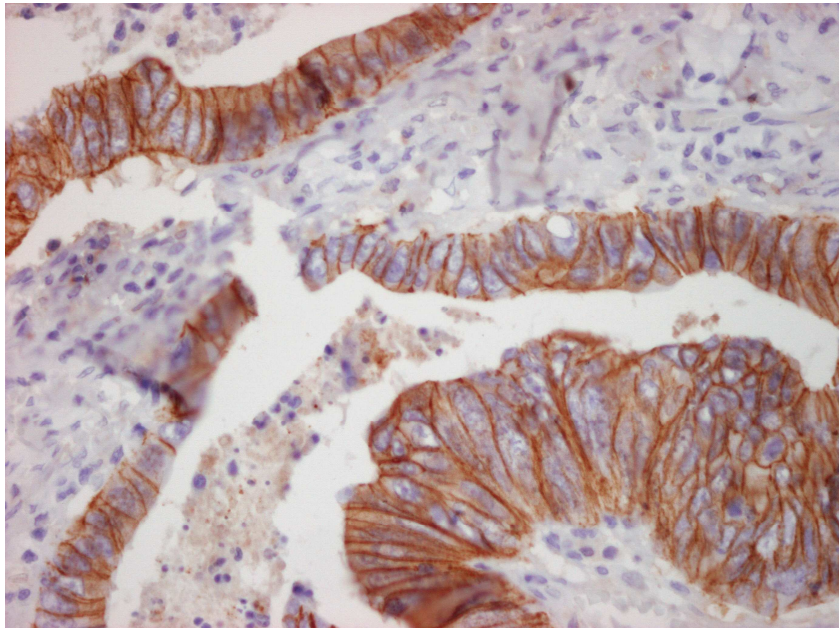
16.b. ábra. Normál colon mucosa β -catenin festődés 200x



17. ábra. colorectalis carcinoma β -catenin membrán festődés 200x



18. ábra. colorectalis carcinoma β -catenin nukleáris festődés 200x

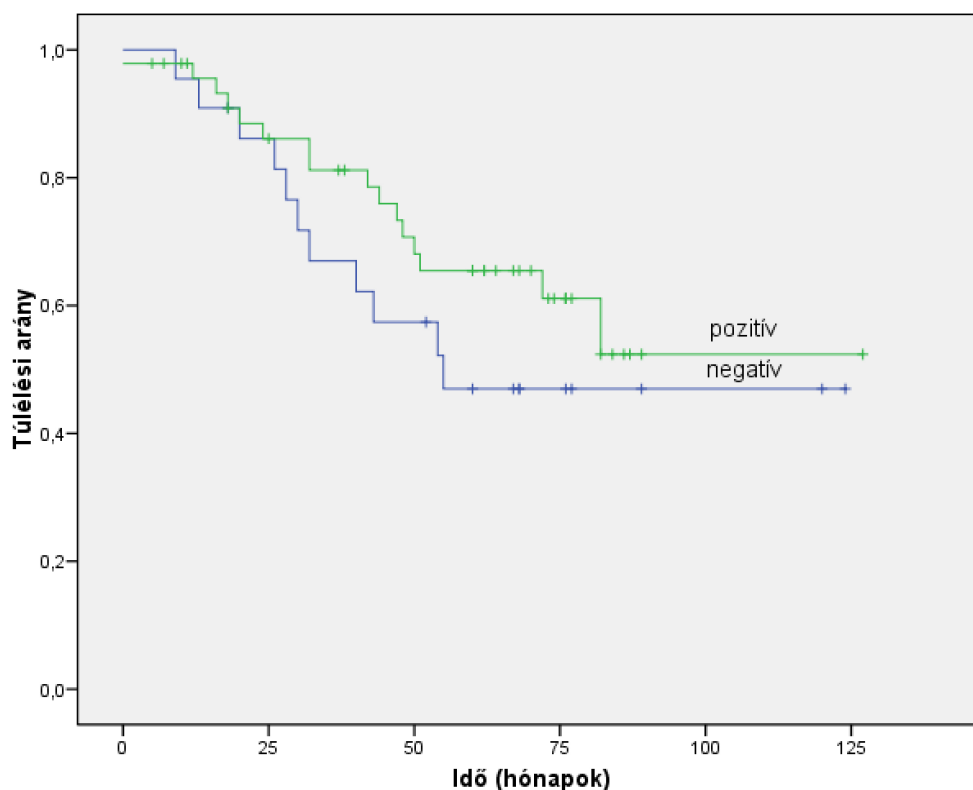


19. ábra. colorectalis carcinoma E-cadherin membrán festődés, 200x

XI. táblázat. β -catenin és E-cadherin festődés, és OS valamint DFS

	Membranosus β -catenin festődés	Nukleáris β -catenin festődés	E-cadherin festődés	5 éves OS	3 éves DFS
Összes beteg	65,8%	45,6%	58,2%	59%	64%
Colon csoport	72,3%	42,6%	61,7%	69%	73%
Rectum csoport	58,1%	51,6%	54,8%	42%	46%

A teljes betegpopulációban, a membranosus β -catenin expressziót mutató esetek OS jobb volt, mint ahol nem volt β -catenin expresszió, azonban ez a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns, $p=0.280$ (20. ábra). A DFS tekintetében nem volt különbség, $p=0.442$. A nukleáris β -catenin expresszió vagy az E-cadherin expresszió sem az OS, sem a DFS-ben nem tudott különbséget tenni a betegek között. Mindazonáltal megfigyelhető volt, hogy ha vagy a β -catenin vagy az E-cadherin membranosus festődést mutatott, az OS jobb volt, mint azon esetekben ahol mindkét reakció negatív volt, azonban ez az eredmény nem volt statisztikailag szignifikáns ($p=0.492$).



20. ábra. β -catenin membranosus festődés és OS, valamennyi beteg

A megfigyelési periódusban 23 betegben alakult ki metastaticus betegség. A metastasis kialakulásnak nagyobb volt a valószínűsége a β -catenin membranosus negatív csoportban, mint a pozitív csoportban. A statisztikai analízis fényében ($p=0.062$) ez a megfigyelés inkább tendenciának tartható, mely további megerősítést igényel. Azon esetekben ahol a β -catenin nukleáris expressziót mutatott, a metastasis rizikója nagyobb volt és ez az eredmény statisztikailag szignifikánsnak bizonyult, $p=0.022$. Nem lehetett az E-cadherin expresszió és a metastaticus betegség kialakulása között kapcsolatot kimutatni. Ha sem a β -catenin, sem az E-cadherin nem mutatott membranosus festődést, a metastaticus betegség szignifikánsan gyakoribb volt, összevetve azon esetekkel, melyekben mindkét protein membranosus expressziót mutatott, $p=0.047$. (XII. táblázat)

XII. táblázat. Metastasis kialakulása és β -catenin és E-cadherin festődés, teljes beteg populáció

	Metastaticus betegség	Nem- metastaticus betegség	P érték
Membranosus β -catenin festődés	52,2%	74,4%	0,062
Nukleáris β -catenin festődés	65,2%	36,2%	0,022*
E-cadherin festődés	52,2%	59,6%	0,369
E-cadherin és β -catenin membranosus festődés	26,1%	51%	0,047*.

statisztikai szignifikancia (*) $p < 0.05$.

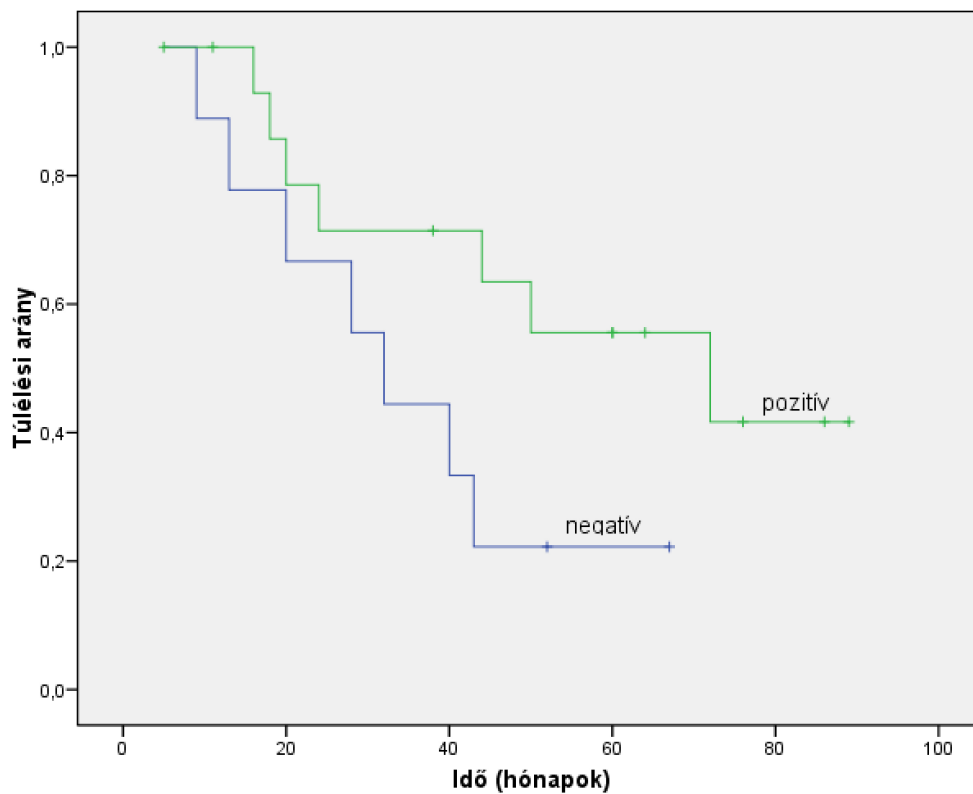
48 beteg tumora volt a jobb vagy bal colonfélben. Ezen betegek átlagéletkora 67,6 év volt (48-83 év). Ebben a betegcsoportban 23 nő és 25 férfi volt. 39 tumor jól vagy közepesen differenciált volt, míg 9 eset volt rosszul differenciált. A betegség klinikai kimenetele, a prognózis statisztikailag függetlennek bizonyult a β -catenin és E-cadherin expressziós mintázattól.

Ebben a betegcsoportban 12 betegben alakult ki metastasis az utánkövetés során. Nem volt különbség a metastasis kialakulásának valószínűségében a különböző protein expressziót mutató betegek esetén (XIII. táblázat).

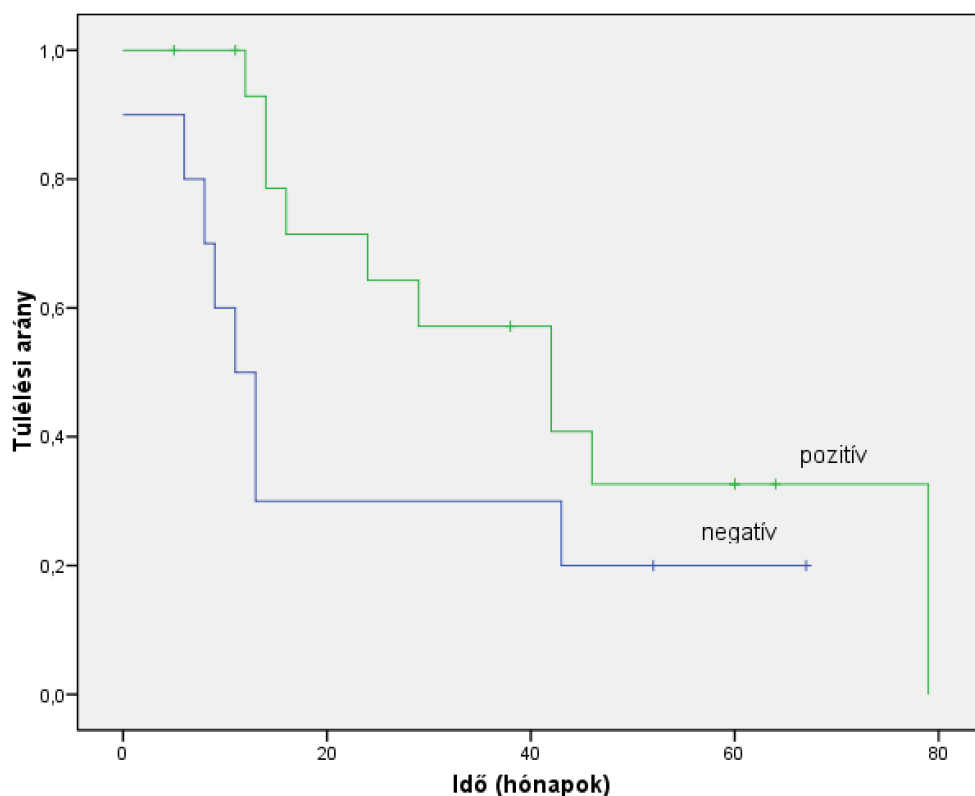
XIII. táblázat. Metastasis kialakulása és β -catenin és E-cadherin festődés, colon csoport

	Metastaticus betegség	nem-metastaticus betegség	P érték
Membranosus β -catenin festődés	66,6%	71,8%	0,504
Nukleáris β -catenin festődés	58,3%	37,5%	0,184
E-cadherin festődés	58,3%	59,4%	0,607

31 betegben volt rectum carcinoma. Ezen betegek átlagéletkora 63,1 év volt (35-85 év). Ebben a csoportban 16 nő és 15 férfi volt. 25 tumor volt jól vagy közepesen differenciált, míg 6 eset rosszul differenciált volt. A β -catenin membranosus expressziója 18 esetben volt megfigyelhető (58,1%), 13 eset (41,9%) negatív volt. A β -catenin nukleáris expressziója 16 esetben (51,6%) volt detektálható, 15 eset (48,4%) negatív volt. E-cadherin membranosus festődés 17 esetben (54,8%) volt észlelhető, 14 eset (45,2%) volt negatív. Az öt éves OS 42% volt, míg az átlagos OS 44,3 hónap volt. A 3 éves DFS 46% volt, az átlagos DFS 29,1 hónap volt. Megfigyelhető volt egy trend, miszerint azon betegeknél, ahol membranosus β -catenin expresszió volt, mind a DFS és az OS jobb volt, azonban ez az eredmény nem ért el statisztikailag szignifikáns szintet [$p=0,087$ és $0,085$] (21. és 22. ábra). Nem volt különbség az OS és DFS tekintetében sem a nukleáris β -catenin pozitív és negatív esetek, sem az E-cadherin pozitív és negatív betegek között.



21. ábra. Membranosus β -catenin festődés és OS, rectum csoport



22. ábra. β -catenin membranosus festődés és DFS, rectum csoport

Ebben a betegcsoportban 11 betegben alakult ki áttét. A metastasis kialakulás valószínűsége szignifikánsan nagyobb volt azon esetekben melyek nem mutattak β -catenin membranosus festődést, mint ahol volt membranosus expresszió ($p=0,024$). Ha a β -catenin nukleáris expressziót mutatott, a metastasis kialakulás valószínűsége szintén szignifikánsan nagyobb volt ($p=0,047$). Nem találtunk kapcsolatot az E-cadherin expressziós mintázat és a metastaticus betegség kialakulása között (XIV. táblázat).

XIV. táblázat. Metastasis kialakulása és β -catenin és E-cadherin festődés, rectum csoport

	Metastaticus betegség	nem-metastaticus betegség	P érték
Membranosus β -catenin festődés	36,4%	80%	0,024*
Nukleáris β -catenin festődés	72,7%	33,3%	0,047*
E-cadherin festődés	45,4%	60%	0,368

statisztikai szignifikancia (*) $p < 0,05$.

Multivariáns logisztikus regressziós analízist végeztünk, a betegek életkora, a tumor grade és lokalizáció, E-cadherin/ β -catenin membranosus és nukleáris expresszió bevonásával meghatározni, melyik paraméterek rendelkeznek prediktív értékkel a metastasis kialakulás valószínűségének meghatározásában. A multivariáns analízis nem segített további szignifikáns korreláció kimutatásában ezen paraméterek között, összevetve az univariáns analízissel kapott eredményekkel. (XV. táblázat).

XV. táblázat. Metastasis kockázat multivariáns analízis, valamennyi beteg

	Sig.	Exp (B)	95.0 % C.I. for Exp(B)	
			lower	upper
életkor	0,661	0,988	0,938	1,042
Grade	0,249	2,235	0,570	8,774
E-cadherin festődés	0,970	1,022	0,332	3,140
Membranosus β - catenin festődés	0,436	,581	0,148	2,276
Nukleáris β - catenin festődés	0,222	2,256	0,611	8,321
tumor lokalizáció	0,200	2,070	0,681	6,293
constant	0,920	1,219		

Végezetül, csak a metastaticus betegeket vizsgálva (23 eset) ebben a betegcsoportban szignifikánsan jobb volt a DFS a β -catenin membranosus festődést mutató betegek körében, mint a negatív esetekben [36,58 hónap vs. 14,55 hónap] ($p=0,011$). Az OS is jobb volt a membranosus β -catenin festődést mutató betegekben ($p=0,032$). Emellett az E-cadherin expressziót mutató betegekben is látható volt egy tendencia a jobb DFS és OS tekintetében, azonban ez nem bizonyult szignifikánsnak statisztikailag (29,5 hónap vs. 22,7 hónap,

p=0,851). A membranosus β -catenin expresszió elvesztése mellett a metastasis hamarabb jelent meg (27,16 hónap vs. 13,18 hónap; p=0,05). A membranosus E-cadherin expresszió elvesztése esetén is korábban jelent meg a metastasis, de ez az eredményünk nem ért el statisztikailag szignifikáns szintet (24 hónap vs. 16,63 hónap; p=0,16).

6.4. Prognosztikai vizsgálat eredményei

Az átlagos követési idő 50,86 (\pm 30,32) hónap volt. Férfi/nő arány 48:52, átlagéletkor 66,9 (\pm 11,30) év (35-91) volt és 11% volt 50 évesnél fiatalabb, 53% 51-70 év közötti és 36% volt 70 évesnél idősebb. Szignifikánsan kisebb volt a 3 éves DFS az 50 évesnél fiatalabb betegek csoportjában (43%, p=0,01), illetve ezt követte a 70 évesnél idősebbek csoportjában észlelt DFS (46%). Legkedvezőbb 3 éves DFS adatok a középkorú betegek csoportjából származtak (82%). Az 5 éves OS a 70 évesnél idősebb betegek csoportjában volt a legrosszabb (38%, p=0,002) összevetve az 50 évnél fiatalabbakkal (68%) és a középkorúakkal (70 %). A tumor lokalizáció is szignifikánsan befolyásolta a 3 éves DFS-t (p=0,048): jobb colonfél 72%, bal colonfél 67% és rectum 45%, míg az 5 éves OS (p=0,044) a következő volt: jobb colonfél 66%, bal colonfél 60%, és rectum 41%. Az eltávolított és feldolgozott nyirokcsomók száma 0 és 12 között volt, ezt két csoportba osztottuk: 0-4 és 5-12 vizsgált nyirokcsomó. Szignifikánsan kedvezőbb 5 éves OS volt az 5-12 vizsgált nyirokcsomójú betegek csoportjában (50% vs. 75%, p=0,035) és a 3 éves DFS is kedvezőbb volt (45,1% vs. 70%, p=0,022). A nem nem befolyásolta a prognózist. A XVI. táblázatban láthatók a betegek klinikopatológiai adatai.

XVI. Táblázat. A betegek klinikopatológiai adatai

Betegek száma	100
életkor	66,9 év (35-91)
nem	
férfi	52
nő	48
Tumor lokalizáció	
Jobb colonfél	25
bal colonfél	38
Rectum	37
Grade	
Jól és közepesen differenciált (G1-G2)	83
rosszul differenciált (G3)	17
Átlagos követési idő	50,86 hónap
5 éves OS	55%
3 éves DFS	70%

Az 5 éves OS azon betegeknél, akikben nem alakult ki metastasis a követési idő alatt 76,6 % volt, míg a metastasis képződéssel járó betegeknél 14,5 % ($p < 0,001$).

Az esetek 81 %-ában a tumor jól vagy közepesen differenciált volt. Rosszul differenciált volt a tumor az esetek 19%-ában. A grade függvényében nem volt különbség a túlélési adatokban (54,4% vs. 56,6%, $p=0,619$).

Továbbiakban vizsgáltuk az 5-FU kezelés hatását. A colon tumoros betegek 65%-a kapott 5-FU adjuváns terápiát. Nem volt szignifikáns korreláció az 5 éves OS eredményekben a kezelt és nem kezelt beteg csoportja között (62% vs. 56%, $p=0,461$).

P53 expressziót 89 esetben vizsgáltunk, pozitív az esetek 59%-ában volt jelen. Ezen korai stádiumú betegeink csoportjában nem tudtuk a p53 negatív prognosztikus értékét igazolni (59,5% vs. 52,5%), és a különbség nem volt szignifikáns ($p=0,238$).

Az esetek 85%-ában láttunk p21 pozitívítást és a túlélési különbség itt sem volt szignifikáns ($p=0,101$).

P53 és p21 negatívítást a betegek 43%-ában volt; p53 negatívítást p21 pozitívítással az esetek 39%-ában, p53 és p21 egyidejű pozitívítást 4%, míg egyidejű negatívítást az esetek 10%-ában

volt látható. Az egyidejű p53 és p21 pozitív festődési mintázat szignifikánsan rosszabb túléléssel járt ($p=0,041$).

Eseteink 73%-ában volt p16 pozitívítás, de nem mutatkozott szignifikáns túlélési differencia ($p=0,422$).

A β -catenin membrán expressziót 91 betegben értékeltük. Az esetek 61% mutatott pozitívítást. Azon esetekben ahol nem volt észlelhető β -catenin membrán expresszió, az 5 éves OS alacsonyabb volt (37,4% vs. 66,4%, $p=0,012$), és a 3 éves DFS is szignifikánsan kisebb volt (45,5% vs. 70,8% $p=0,025$). Ez az eredmény megerősíti a β -catenin- E-cadherin vizsgálatban észlelteket.

A metastasis megjelenéséig eltelt idő is rövidebb volt azon betegekben, ahol nem lehetett β -catenin membrán expressziót kimutatni (11,71 vs. 36,23 hónap, $p=0,002$). Azon betegek csoportjában, ahol a követési idő alatt recidíva és metastasis alakult ki (31%) a DFS hosszabb volt β -catenin membrán pozitív esetekben (11,78 vs. 33,67 hónap) és ez a különbség szignifikánsnak bizonyult ($p=0,021$). Ebben a válogatott betegcsoportban a β -catenin membrán negatív esetekben (46%) kisebb volt az 5 éves OS, mint a β -catenin pozitív esetekben (5,9% vs. 33,3 %) és ez a különbség szignifikáns ($p=0,008$). Azokban a betegekben, akiknél a követési idő alatt nem alakult ki áttét, a β -catenin membrán pozitív esetek aránya 74,4%, csaknem szignifikáns különbséggel az 5 éves OS-ben ($p=0,062$).

Nukleáris β -catenin expressziót 90 esetben vizsgáltunk, és 43% lett pozitív, de nem volt különbség a túlélésben (46,7% vs. 61,9%, $p=0,173$) és a 3 éves DFS tekintetében (60,7% vs. 64,1%, $p=0,173$), és a metastaticus betegcsoportban sem volt különbség ebben a tekintetben.

E-cadherin pozitívítás a vizsgált 90 eset 55%-ában volt, és sem az 5 éves OS nem volt szignifikáns különbség (58,5% vs. 51,8, $p=0,247$), sem a 3 éves DFS-ben (69,2% vs. 52,3%, $p=0,367$). E-cadherin negatív betegekben a metastasis hamarabb lépett fel, mint az E-cadherin pozitív betegekben, de az eredmény nem szignifikáns (19,6 hónap vs. 27,74 hónap, $p=0,194$).

A XVII. táblázatban látható a β -catenin és E-cadherin festődés, valamint az OS kapcsolata.

XVII. táblázat. β -catenin és E-cadherin festődés, valamint az OS kapcsolata

	Membranosus β -catenin festődés	Membranosus β -catenin negatív	Nukleáris β -catenin festődés	Nukleáris β -catenin negatív	E-cadherin festődés	E-cadherin negatív
összes beteg %-ban	61%	39%	43%	57%	55 %	45 %
5 éves OS	66,4%	37,4%	46,7%	61,9%	58,5%	51,8%
3 éves DFS	70,8%	45,5%	60,7%	64,1%	69,2%	52,3%

Az EGFR pozitív betegek aránya 54% volt és nem befolyásolta a túlélési adatokat ($p=0,992$). Vizsgáltuk a tumorok MLH1 és MSH2 expresszióját is. Az MLH1 negatív eseteinkben (4%) sem áttét, sem recidíva nem következett be az utánkövetési periódusban, és valamennyi beteg életben volt. MLH1 és MSH2 pozitivitás az esetek 77%-ában volt jelen, de nem mutatkozott különbség a túlélésben ($p=0,934$).

TS pozitivitást az esetek 29%-ában találtunk, azonban nem volt prognosztikus értéke ($p=0,476$).

A Chi-négyzet teszt használatával szignifikáns kapcsolatot észleltünk a β -catenin és E-cadherin membrán expresszió között ($p=0,023$), és a metastasis képződés és a membranosus β -catenin expresszió elvesztése között ($p=0,008$), valamint a metastasis képződés és a β -catenin nukleáris expresszió megjelenése között ($p=0,002$). Nem volt kapcsolat az E-cadherin expresszió és a metastasis képződés között ($p=0,266$).

Spearman's korrelációs tesztet használva az adatok elemzésére, erős negatív korrelációt találtunk a β -catenin membranosus illetve nukleáris expressziója között (R =correlation coefficient $-0,510$, $p<0,001$), valamint a β -catenin membranosus expressziója és a metastasis megjelenése között (correlation coefficient $-0,280$, $p=0,007$). Erős pozitív korreláció volt az E-cadherin és membranosus β -catenin expresszió között (correlation coefficient $0,261$, $p=0,009$), nukleáris β -catenin festődés és a metastasis megjelenése között (correlation coefficient $0,321$, $p=0,002$), valamint a p21 festődés és a tumor recidíva között (correlation coefficient $0,331$, $p=0,005$). Eredményeink gyenge negatív korrelációt mutattak a feldolgozott nyirokcsomók száma és a beteg elhalálása között (correlation coefficient $-0,214$, $p=0,042$),

valamint a feldolgozott nyirokcsomók száma és a metastasis megjelenése között (correlation coefficient $-0,203$, $p=0,050$). Végül a membranosus β -catenin expresszió és a beteg halála között is gyenge negatív összefüggés mutatkozott (correlation coefficient $-0,259$, $p=0,013$). Gyenge pozitív korreláció mutatkozott a p16 festődés és az E-cadherin expresszió között (correlation coefficient $0,236$, $p=0,036$), valamint a grade és a metastasis képződés között (correlation coefficient $0,212$, $p=0,044$). A korrelációs teszt eredményeit a XVIII. táblázat mutatja.

XVIII. táblázat. A vizsgált faktorok közötti korreláció, a Spearman's correlatio teszt alkalmazásával

Spearman's correlation	Nuclearis β -catenin	E-cadherin	nyirokcsomók száma	életkor	nem	Grade	P53	P21	P16	EGFR	TS	Metastasis	recidiva	exit
Membranous β -catenin	R=-0.510 p<0.001	R=0.261 p=0.009	R=0.082 p=0.415	R=-0.171 p=0.090	R=0.134 p=0.185	R=-0.075 p=0.455	R=-0.026 p=0.802	R=-0.141 p=0.215	R=0.093 p=0.414	R=-0.094 p=0.411	R=-0.134 p=0.240	R=-0.280 p=0.007	R=0.073 p=0.496	R=-0.259 p=0.013
Nuclearis β -catenin		R=-0.067 p=0.511	R=-0.040 p=0.691	R=0.203 p=0.044	R=-0.126 p=0.212	R=0.178 p=0.077	R=0.003 p=0.980	R=0.038 p=0.742	R=0.139 p=0.221	R=0.097 p=0.397	R=0.011 p=0.967	R=0.321 p=0.002	R=-0.121 p=0.256	R=0.133 p=0.210
E-cadherin			R=-0.161 p=0.109	R=-0.080 p=0.431	R=-0.035 p=0.726	R=-0.178 p=0.077	R=0.080 p=0.435	R=-0.142 p=0.212	R=0.236 p=0.036	R=0.081 p=0.478	R=-0.113 p=0.324	R=-0.117 p=0.271	R=-0.008 p=0.943	R=-0.157 p=0.138
nyirokcsomók száma				R=0.057 p=0.572	R=0.120 p=0.234	R=0.128 p=0.205	R=0.040 p=0.694	R=-0.093 p=0.416	R=-0.090 p=0.430	R=0.162 p=0.155	R=-0.086 p=0.455	R=-0.203 p=0.050	R=-0.118 p=0.269	R=-0.214 p=0.042
életkor					R=0.044 p=0.590	R=0.055 p=0.590	R=-0.128 p=0.213	R=-0.046 p=0.688	R=-0.095 p=0.410	R=0.229 p=0.044	R=0.154 p=0.182	R=0.169 p=0.110	R=-0.099 p=0.355	R=0.415 p<0.001
nem						R=-0.079 p=0.433	R=-0.020 p=0.845	R=0.146 p=0.198	R=-0.082 p=0.474	R=0.168 p=0.140	R=0.014 p=0.900	R=-0.086 p=0.419	R=0.170 p=0.110	R=0.032 p=0.736
Grade							R=-0.207 p=0.041	R=-0.002 p=0.985	R=-0.015 p=0.899	R=0.132 p=0.247	R=0.076 p=0.510	R=0.212 p=0.044	R=-0.053 p=0.621	R=0.111 p=0.294
P53								R=-0.153 p=0.283	R=0.098 p=0.368	R=-0.104 p=0.368	R=-0.020 p=0.864	R=0.047 p=0.658	R=-0.234 p=0.027	R=-0.105 p=0.327
P21									R=0.009 p=0.934	R=0.050 p=0.663	R=0.188 p=0.100	R=0.062 p=0.610	R=-0.331 p=0.005	R=0.167 p=0.168
P16										R=-0.171 p=0.133	R=0.118 p=0.306	R=0.076 p=0.534	R=-0.031 p=0.801	R=0.059 p=0.661
EGFR											r=0.094 p=0.413	R=0.064 p=0.596	R=-0.032 p=0.792	R=0.022 p=0.857
TS												R=0.226 p=0.062	R=-0.032 p=0.795	R=0.142 p=0.243
Metastasis													R=-0.112 p=0.293	R=0.587 p<0.001
recidiva														R=0.144 p=0.175

Az adatokat multivariáns analízisben Cox-regressziós teszttel is kiértékeljük. Az eredmények a XIX. táblázatban láthatók. A membranosus β -catenin expresszió ($p=0,026$), a feldolgozott nyirokcsomók száma ($p=0,005$) és az életkor ($p<0,001$) bizonyult független prognosztikai markernek.

XIX. táblázat. A vizsgált markerek Cox regressziós analízise.

Variable	Relative Risk	CI	p
Membranous β -catenin	2,700	1,129-6,454	0,026
Nukleáris β -catenin	1,307	0,572-2,987	0,526
E-cadherin	0,909	0,455-1,818	0,788
nyirokcsomók	4,077	1,518-10,953	0,005
életkor	3,767	1,970-7,203	<0,001
Nem	0,675	0,335-1,359	0,675
Lokalizáció	0,411	0,161-1,048	0,063
p21	0,817	0,289-2,306	0,702
p16	0,401	0,133-1,205	0,104
EGFR	0,737	0,275-1,977	0,544
TS	1,628	0,691-3,835	0,265

6.5. ERCC1 expresszió immunhisztokémiai kimutatása és prognosztikai faktorok vizsgálata metastaticus colorectalis carcinomában

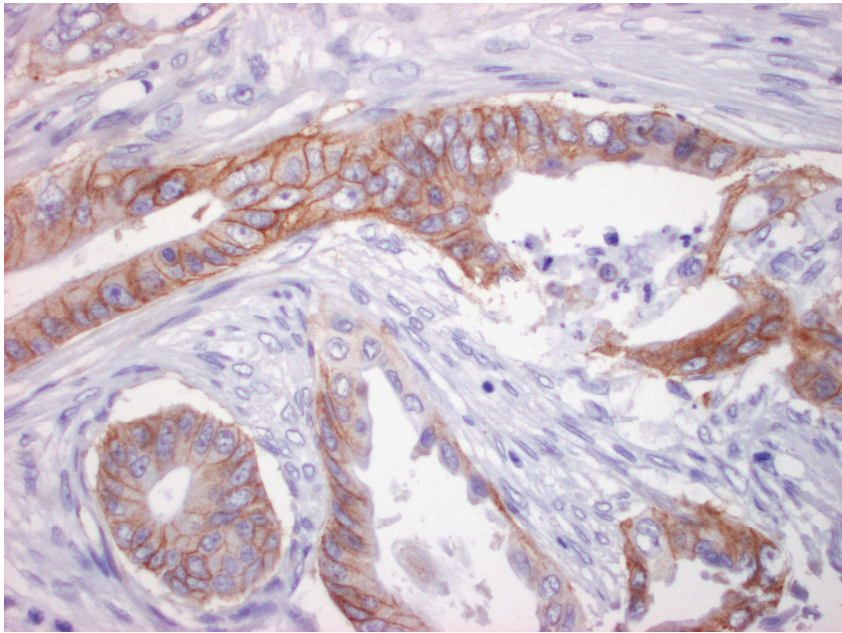
A vizsgált 28 beteg közül 19 férfi, és 9 nő volt, az átlagéletkoruk 61,5 év. 17 colon és 11 rectumos lokalizációjú esetünk volt. Az átlagos túlélés 28 hónap, a metastaticus túlélés 21,5 hónap volt és 8% volt az 5 éves túlélés. Az IHC eredmények értékelése során a tíz vizsgált marker megjelenését mind a 28 betegnél külön-külön elemeztük.

A p53 esetében az esetek 50%-ban (14 eset) találtunk pozitivitást.

Az E-cadherinnél az esetek 50%-ban (14 eset) találtunk membranosus festődést.

A β -catenin esetében külön vizsgáltuk a membrán-, illetve a magpozitivitást. Membránpozitív az esetek 46%-a volt (13 eset), míg 39%-os volt a magpozitivitás (11 eset).

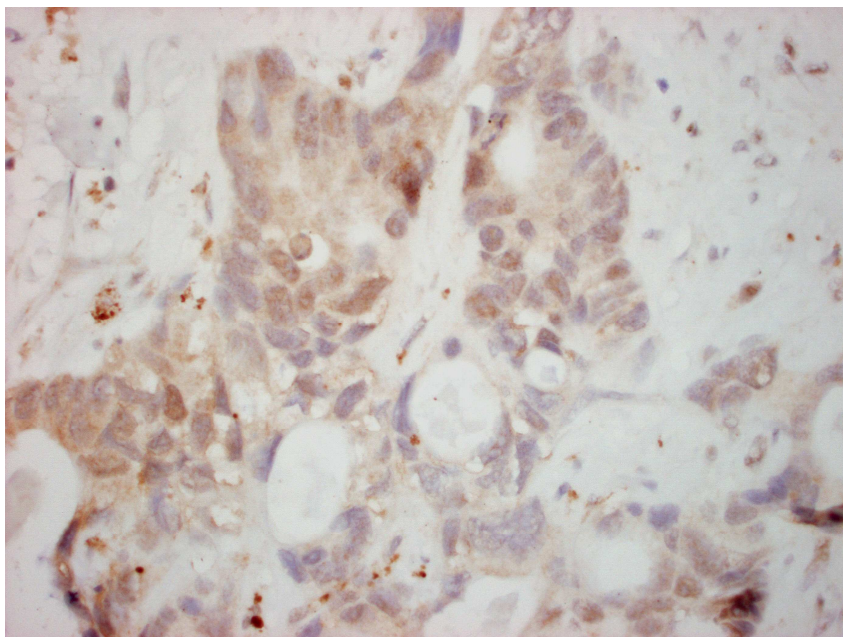
Az EGFR esetében csak a membránfestődést vizsgáltuk (23. ábra). 28%-os (8 eset) a membránfestődést adó minták száma.



23. ábra. EGFR 3+ membránpozitivitás, 400x

Az MLH1, MSH2, MSH6 esetében magfestődést értékeltünk. Az MLH1 esetében 42%-os (12 eset), az MSH 2 esetében 57%-os (16 eset), és az MSH6 esetében 32%-os (9 eset) a magpozitivitást adó minták száma.

A timidilát-szintáz és az excision repair cross-complemetation group 1 (ERCC1) (24. ábra) esetében a citoplazmatikus festődést értékeltük.



24. ábra: Az ERCC1 citoplazmatikus festődése, 400x

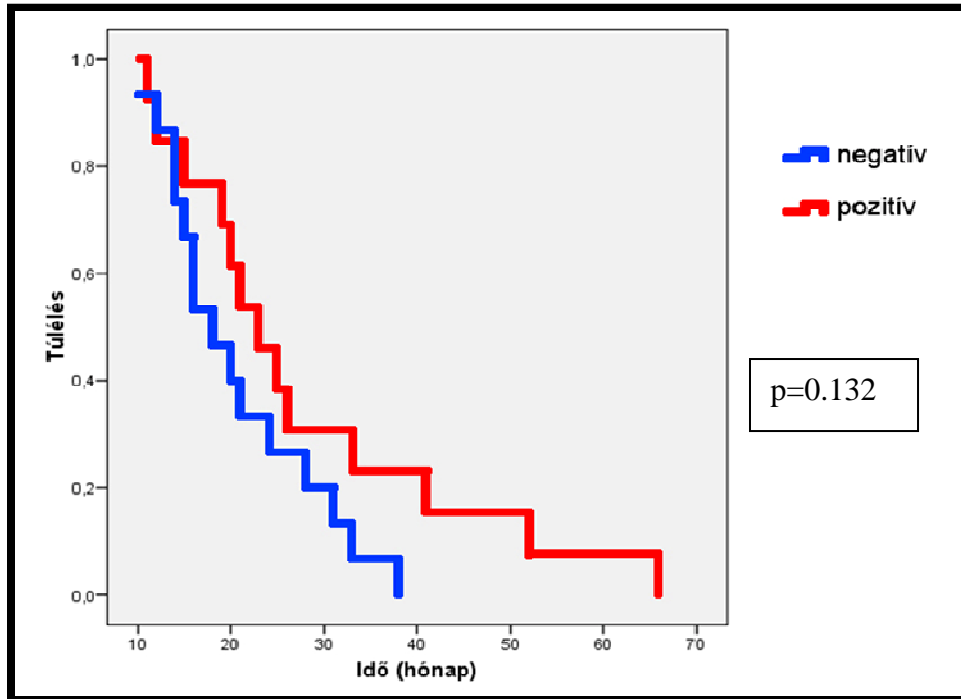
A TS esetén 17%-os (5 eset) a citoplazmatikus festődés, míg az ERCC1 esetén 60%-os (17 eset).

Az eredmények, mind a 10 vizsgált marker tekintetében a XX. táblázatban láthatók.

XX. táblázat. A vizsgált markerek expressziója

Markerek	össz. pozitív eset	össz. negatív eset
p53	14	14
p21	0	28
β-catenin mag	11	17
β-catenin membrán	13	15
E-cadherin	14	14
MLH1	12	16
MSH2	16	12
MSH6	9	19
EGFR	8	20
ERCC1	17	11
TS	5	23

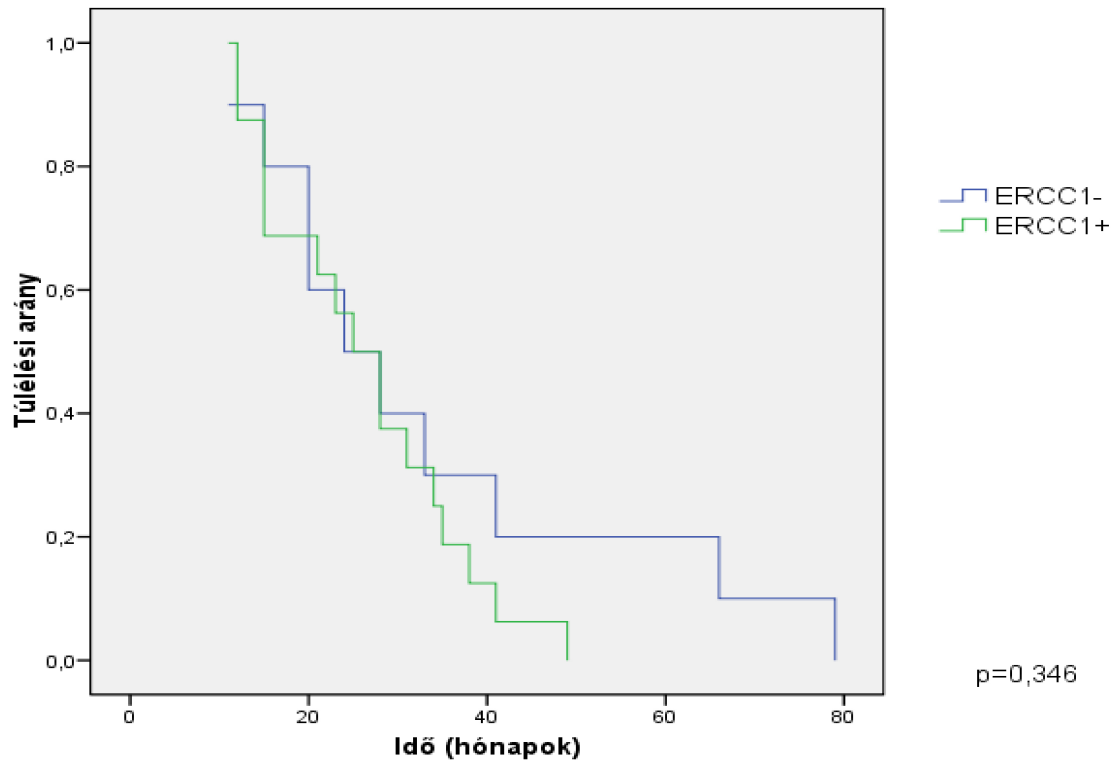
Ezen adatok alapján készült Kaplan-Meier grafikonok elemzéséből azt kaptuk, hogy a β -catenin membránexpresszió és metastaticus túlélés összefüggését vizsgálva (25. ábra) a membrán pozitív esetekben jobb eredményeket kaptunk ($p=0,132$).



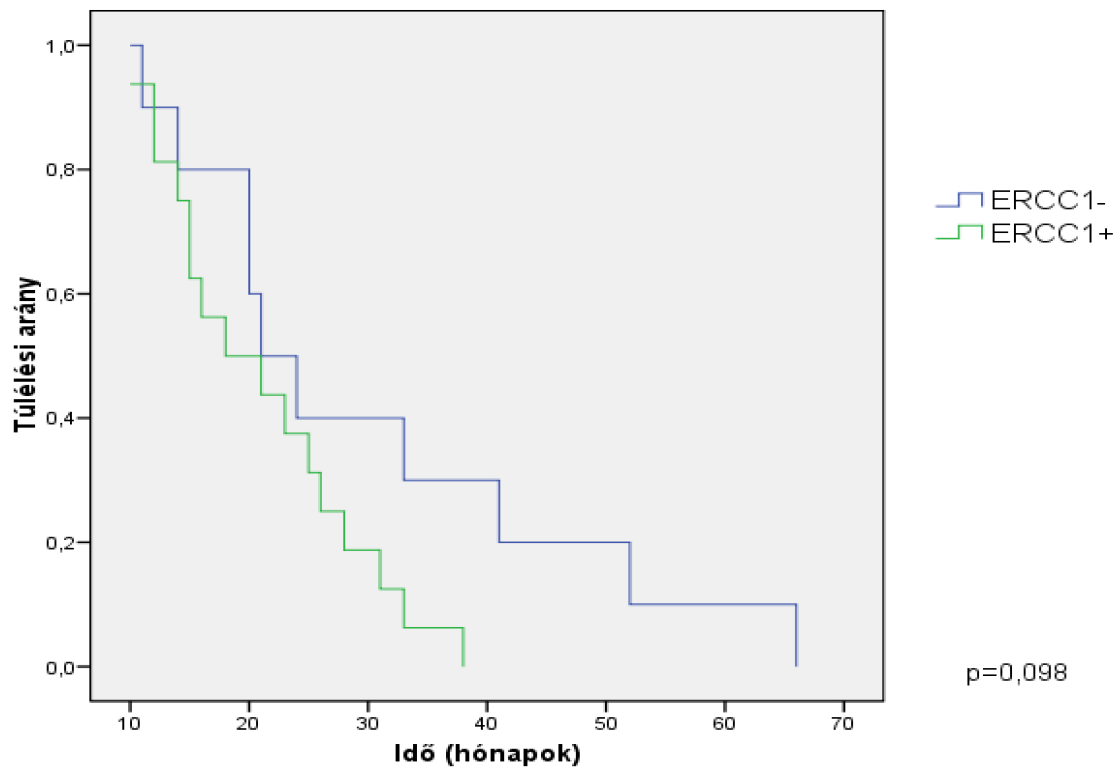
25. ábra. A β -catenin membránexpresszió és metastaticus túlélés közötti összefüggés

17 beteg esetében találtunk intenzív vagy közepes ERCC1 festődést. Az általunk alkalmazott antitesttel és a reakciókörülményeink között (antigénfeltárás, és higítás) az ép nyálkahártya nem mutat festődést az ERCC1 esetében.

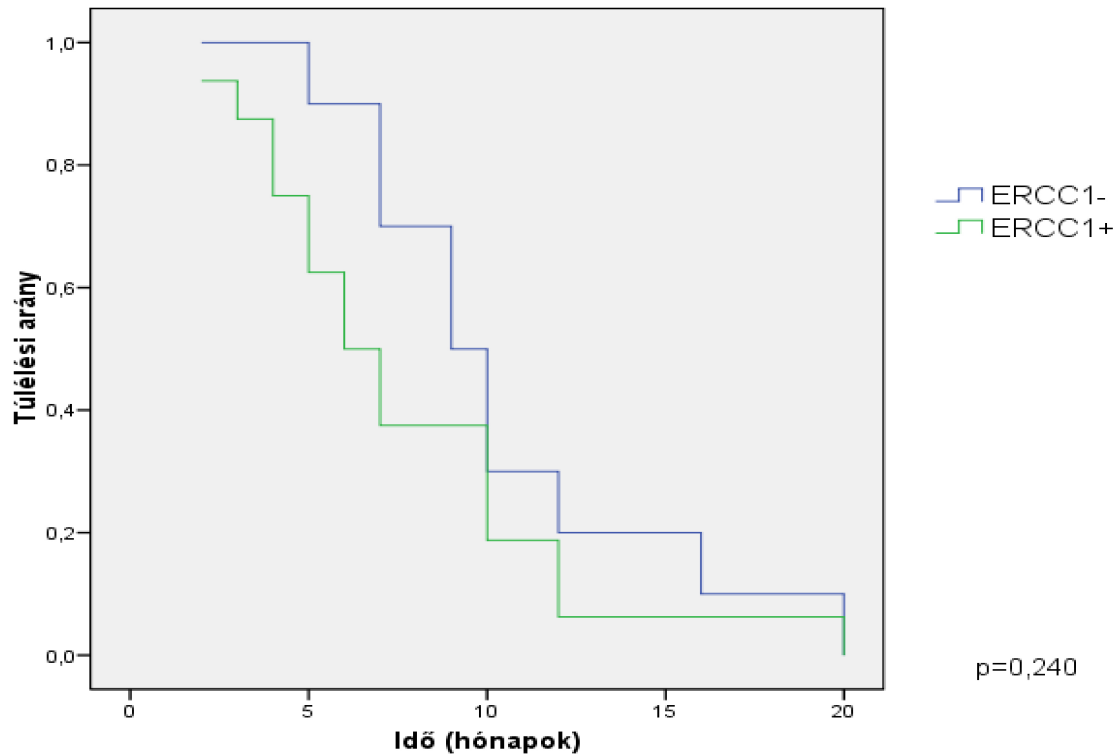
Az ERCC1 és az össz túlélés (26. ábra, $p=0,346$) a metastaticus túlélés (27. ábra, $p=0,098$) és a progressziómentes túlélési idő (28. ábra, $p=0,240$) vonatkozásában is látható, hogy az ERCC1 negatív esetekhez jobb prognózis társul.



26. ábra. ERCC1 és össztúlélés.



27. ábra. ERCC1 és metastaticus túlélés

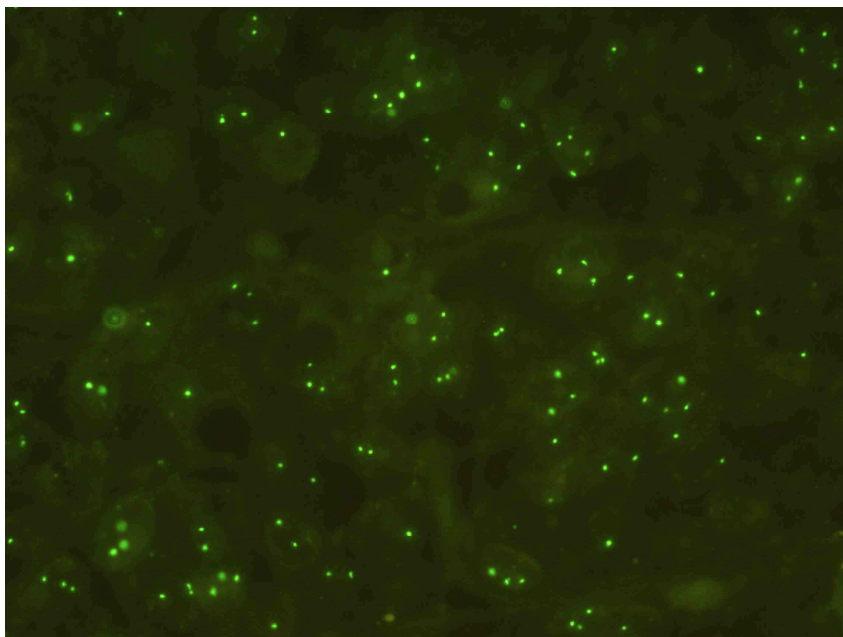


28. ábra. ERCC1 és a progressziómentes túlélési idő

Az általunk vizsgált többi marker (p53, p21, MLH-1, MSH-2, MSH-6, EGFR, E-cadherin, timidilát szintáz) és a klinikai kimenetel között nem találtunk összefüggést.

6.6. EGFR amplifikáció kimutatása FISH reakcióval

79 tumormintából épített TMA blokkokon végeztünk EGFR amplifikáció kimutatásra FISH reakciót. (A vizsgálatot az E-cadherin- β -catenin study tumormintáin végeztük.) A reakció 74 esetben volt értékelhető. 7 esetben észleltünk amplifikációt (9.4 %). Az észlelt amplifikáció mértéke 2-4 közötti volt. (29. ábra)



29. ábra. EGFR amplifikáció kimutatása FISH reakcióval

Az amplifikációt mutató esetek klinikai lefolyását áttekintve, megállapítható volt, hogy közülük 6 esetben sem áttét, sem recidíva nem jelentkezett, az utánkövetési idő alatt mind életben voltak. Átlagos utánkövetési idő 94 hónap (72-124 hónap) Egy betegben jelentkezett áttét, ez a beteg a tumoros betegség következtében elhunyt. Ezen beteg esetében a DFS 1 hónap, az OS 12 hónap volt. Így a génamplifikáció esetén az áttét kialakulás valószínűsége 14,3%, míg az amplifikációt nem mutató esetekben (67 eset) az áttét kialakulás valószínűsége 29,8% volt. (Ezen esetek közül 20 volt metastaticus beteg).

Az EGFR FISH reakciók és az elvégzett EGFR immunhisztokémiai vizsgálatok eredményét a XXI. táblázat tartalmazza. Jelen vizsgálatban is a prognosztikai studyban észlelthez közel hasonló arányban találtunk EGFR immunhisztokémiai pozitivitást. (55,7%-54%).

XXI. táblázat. EGFR FISH és EGFR immunhisztokémiai reakciók eredményei

	Összes eset	FISH pozitív, amplifikált	FISH negatív, nem amplifikált
EGFR IHC score 3+	3 (3,8%)	1 (14,3%)	2 (3%)
EGFR IHC score 2+	9 (11,4%)	3 (42,9%)	4 (6%)
EGFR IHC score 1+	32 (40,5%)	1 (14,3%)	28 (41,8%)
EGFR IHC score 0	35 (44,3%)	2 (28,6%)	33 (49,2%)
	79	7	67

Az eredmények alapján látható, hogy az összes esetben EGFR IHC pozitivitás előfordulási aránya 55,7%-os volt, a score 2-3+ esetek aránya 15,1% volt. EGFR génamplifikáció esetén 71,4% volt az IHC pozitivitás, a score 2-3+ érték gyakorisága 57,1% volt. Nem amplifikált tumorokban 50,7% volt az IHC pozitivitás, míg a score 2-3+ 9%-os gyakoriságú volt. Ugyanakkor az is látható, hogy az amlifikált esetek között volt score 1+ és score 0 IHC is, valamint fordítva, a nem amplifikált esetekben is előfordult score 2-3+ IHC eredmény is.

A vizsgálat eredményeképp megállapítható volt, hogy az általunk alkalmazott FISH metodika alkalmas TMA metszeteken történő felhasználásra is.

Vizsgálatunk főképp a FISH reakció TMA blokkon történő kivitelezhetősége céljából készült. Statisztikai feldolgozásban ezek az adatok nem szerepeltek, és eredményeinket nem publikáltuk.

7. Megbeszélés

TMA validáció

A TMA validációs tesztünk az irodalomban olvashatónak megfelelő eredménnyel zárult [152]. Ez alapján úgy ítéltük meg, hogy a kidolgozott metodikánk alkalmas a célul kitűzött prognosztikai faktor vizsgálatra.

A TMA metodikát Hector Battifora írta le először [133], majd Kononen és társai tökéletesítették [134,135]. Az elmúlt években számos nagy tanulmány vizsgálta és igazolta a módszer használhatóságát, mint high throughput metodika a daganat proteomikai kutatásokban [137]. A colorectalis tumorok vizsgálatában is többen próbálkoztak a TMA módszer alkalmazásával, és több közlemény is megjelent, melyek a β -catenin- E-cadherin rendszert vizsgálták ilyen módon [139-144]. Sokan a TMA metodika hibájának tartják, hogy csak a tumor kicsiny részét vizsgálja. Ezt igyekeztünk mi is a többi munkacsoportéhoz hasonlóan, azzal kivédeni, hogy egy-egy tumorból, több reprezentatív területből kiemelt core-okból állítottuk össze a TMA blokkokat. Nem szabad elfelejteni, hogy a klasszikus, nagy metszeten végzett immunhisztokémiai reakciók, vagy a DNS alapú vizsgálatok is a sokszor 4-10 cm mérettartományban lévő tumoroknak csak néhány százalékát vizsgálják, így az esetleges intratumoralis heterogenitás miatti eltéréseket a klasszikus vizsgálmódszerek sem tudják teljesen kiküszöbölni. Minél több core, illetve minél nagyobb keresztmetszetű core kerül beépítésre egy-egy tumorból a TMA blokkba, annál nagyobb lesz a reprezentativitás. Párhuzamosan csökken a nem értékelhető esetek aránya (különösen a keresztmetszet növelésével). A core keresztmetszet növelésével csökkenthető a csak necroticus területet, illetve csak kötőszövetet tartalmazó core-ok aránya. Ugyanis kis core keresztmetszet esetén, a leggondosabb core kijelölés esetén is előfordulhat kiterjedt necrosisokat tartalmazó tumor vagy kiváló poszt- kemo-radioterápiás regressziót mutató fibroticus tumor esetén, hogy a kiemelt core nem tartalmaz értékelhető tumorszövetet. Azonban ezzel egyidejűleg a hatékonyságot csökkentjük. Így egy optimális középutat kell találnunk a TMA konstrukcióban, mely biztosítja a reprezentativitást és az értékelhetőséget, de nem vesz el a módszer high throughput jellege sem. A TMA metodika másik óriási előnye a reakciókörülmények nagyfokú standardizálásában rejlik, és a legtöbb szerző egyetért abban, hogy ez az előnyöket és hátrányokat mérlegelve, a TMA javára dönti el a kérdést.

Mivel a TMA metodikával, a TMA validációval kapcsolatban már számos közlemény jelent meg, eredményeink nem szolgáltatnak új információt, ezért nem publikáltuk szakfolyóiratban, csak egy hazai kongresszuson mutattuk be.

Rhabdoid szövettani fenotípus vizsgálata

A rutin diagnosztikus tevékenység során az ismertett betegben egy igen ritka tumort észleltünk. A részletes immunhisztokémiai vizsgálat tárta fel a daganat valódi típusát. 1978-ban írták le a Wilms tumor ritka, monophasisos solid, vagy rhabdomyosarcomatoid variánsaként a rhabdoid tumort [117], melyet jelenleg külön entitásként malignus renalis rhabdoid tumorként (MRRT) neveznek. Feltehetően a vese medullában lévő primitív pluripotens sejtekből származik, nem mutat myogen differenciációra utaló ultrastrukturális vagy immunhisztokémiai jeleket. Agresszív viselkedésű tumor, mely többnyire már a diagnózis időpontjában metastaticus terjedést mutat. Később hasonló fenotípusú tumorok előfordulásáról számoltak be, számos extrarenalis lokalizációban, többek között lágyrészekben, agyban, pancreasban, májban, húgyhólyagban. Ezeket a daganatokat, melyek a vesében leírt rhabdoid tumorról azonos citológiai vonásokat mutatnak, malignus extrarenalis rhabdoid tumorként említik (MERT [155]). A központi idegrendszerben, gyermekkori előfordulású atypusos rhabdoid/teratoid tumorban is hasonló citológiai jellegzetességek figyelhetők meg [156]. Az első leírás óta száznál több MERT eset került publikálásra. A malignus rhabdoid tumor és az atypusos rhabdoid/teratoid tumor gyermekkori előfordulású, igen agresszív biológiai viselkedésű tumor, melyek hisztogenezise bár ismeretlen, de feltehetően hasonló neoplasmáknak felelnek meg. Atypusos teratoid/rhabdoid tumorban kimutatták a 22q11.2 lokalizációjú hSNF5/INI1 tumor szuppresszor gént érintő kromoszóma deléciókat, mint karakterisztikus eltérést [157]. Ezen citogenetikai eltérés kimutatható FISH reakcióval. Az INI1 BAF47 protein elleni antitesttel végzett immunhisztokémiai reakcióval számos normál sejttípusban látható nukleáris festődés, míg a rhabdoid tumor sejtei negatívak. Belső pozitív kontrollként szolgálnak a reakcióhoz az endothel sejtek és a lymphocyták [158]. Előfordulhat szekunder fenotípusos megjelenésként rhabdoid komponens számos egyéb, többnyire felnőttkori distinctív tumorban, mint adenocarcinoma, különféle sarcoma, melanoma. Feltehetően rosszul differenciált tumorok heterogén csoportjáról van szó, melyek közös hisztológiai tulajdonságok mellett jelentős különbségeket mutatnak a renalis rhabdoid tumorokhoz képest. A rhabdoid vonások itt csak nonspecifikus fenotípust jelentenek, mely számos tumorban, így carcinomákban is megfigyelhető [159,160]. A MRRT-ban leírt

jellegzetes cytogenetikai eltéréshez hasonlóként leírtak néhány MERT esetben is [161], de a composit rhabdoid fenotípusú tumorok többségében nem mutatták ki ezen cytogenetikai abnormitást, a rhabdoid meningeomák kivételével. Az esetünkben észlelt In11 nucleáris festődés összhangban van az eddig közölt adatokkal. A composit rhabdoid tumoros esetekben immunhisztokémiai vizsgálattal nem mutatható ki az INI1 festődés hiánya, mely, AT/RT tumorok esetében diagnosztikus értékű [158,162]. A hSNF5/INI1 funkció befolyásolja az actin-cytoskeleton rendszert, mely magyarázatot adhat a rhabdoid jellegre [163]. Siratsuchi és kollégái kimutatták rhabdoid tumorban a cytokeratin 8 gén mutációját, mely intracytoplasmaticus intermediar filamentum inclusio képződést eredményez [164,165]. Lehetséges, hogy a rhabdoid morfológia a hisztogenezistől függetlenül, hasonló molekuláris mechanizmussal jön létre [162].

A rendelkezésre álló számítógépes adatbázisok áttekintésével 22 korábbi, gastrointestinalis előfordulású rhabdoid carcinomát találtunk, melyek közül 7, a jelen közölt esettel együtt mindösszesen 8 volt primer vékonybél eredetű [160,166,167,168,169,170]. (XXII. táblázat). A további 15 eset közül 3 oesophagus, 7 gyomor, és 4 vastagbél tumor volt [160,171,172,173,174,175,176,177,178,179]. (XXIII. táblázat). Az irodalomban 4 vastagbélben előforduló rhabdoid tumor ismert. Ezen eseteket nem szerinti megoszlása 2 férfi és 2 nő. Átlagéletkor 76,7 év (72-84) volt. A túlélés minimális, 3 beteg 3 hónapon belül meghalt, a negyedik 1 évet élt a diagnózis után.

XXII. táblázat. Primer vékonybél rhabdoid tumorok

eset	Szerző/study	Életkor/ nem	Lokalizáció	Metastasis	Túlélési idő (hónapok)	Életben van (hónapok)
1	Chen et al [166]	54/M	jejunum	regionális nyirokcsomó, máj, peritoneum, kismedence, sigmabél serosa	2	-
2	Al-Nafussi [167]	65/M	jejunum	mellékvese, cervicalis nyirokcsomó	3	-
3	Lee et al [168]	58/M	duodenum	vékonybél, mediastinalis nyirokcsomó	<1	-
4	Amrikachi et al [160]	70/F	vékonybél	retroperitoneum	10	-
5	Abdulkader et al [169]	58/M	vékonybél	máj, mko. mellékvese	meghalt posztopera tive	-
6	Abdulkader et al [169]	56/M	ileum	nincs	-	18
7	Kunze et al [170]	52/M	jejunum	mellkasfal, mko. mellékvese, nyirokcsomók, tüdő	2 hét	-
8	Jelen eset	81/M	jejunum	peritoneum, hasfal, ileum	7	-

XXIII. táblázat. További, nem vékonybél lokalizációjú gastrointestinalis rhabdoid tumorok

eset	Szerző/study	Életkor/ nem	Lokalizáció	Metastasis	Túlélési idő (hónapok)	Életben van (hónapok)
1	Amrikachi [160]	73/M	nyelőcső	nincs	-	9
2	Amrikachi [160]	61/M	nyelőcső	mellkasi folyadék	3	-
3	Ng WC [171]	49/M	nyelőcső	nyirokcsomók	12	-
4	Amrikachi [160]	52/M	gyomor	máj, nyirokcsomók	4	-
5	Read et al [172]	59/F	gyomor	máj, tüdő	4	-
6	Pinto et al [173]	73/F	gyomor	köldök régió	3	-
7	Ueyama et al [174]	63/M	gyomor	máj	2	-
8	Ueyama et al [174]	60/M	gyomor	nem igazolt	-	49
9	Ueyama et al [174]	68/M	gyomor	nincs	-	60
10	Ueyama et al [174]	58/M	gyomor	nincs	6	
11	Chetty et al [155]	72/F	colon	máj, nyirokcsomók	3	-
12	Marcus et al [176]	84/F	colon	nem igazolt	-	12
13	Yang et al [177]	75/M	colon	nyirokcsomók	<1	-
14	Nakamura et al [178]	76/M	colon	máj, pancreas, vese, nyirokcsomók	3	-
15	Ohgaki [179]	41/M	mesenterium	nem igazolt	2 hét	-

Az extrarenalis rhabdoid tumorok többnyire gyermekkori előfordulást mutatnak, míg az eddig közölt gastrointestinalis lokalizációjú rhabdoid jellegű carcinomák időskorban jelentkeztek, átlagéletkor 64,4 év (49-84) volt. Míg a MERT esetek nemi megoszlása a közölt legnagyobb sorozatokban közel egyenlő [155], addig a gastrointestinalis rhabdoid tumorok férfiakban gyakoribb előfordulásúak (férfi: nő arány 3,4:1). A primer vékonybél rhabdoid tumorok esetén az átlagéletkor 61,7 év (52-81év), a nem szerinti megoszlásban kifejezett férfi túlsúly (férfi: nő arány 7:1) tapasztalható. A gastrointestinalis, és ezen belül vékonybél lokalizációjú rhabdoid tumorok, hasonlóan a többi MERT és MRRT esethez, agresszív viselkedésűek, a prognózis rossz, a betegek többsége (75%) a diagnózist követő 6 hónapon belül meghalt.

Specifikus kezelés jelenleg sem ismert. Jelen közölt eset szövettani megjelenésében és immunfenotípusában, valamint klinikopatológiai sajátosságaiiban megegyezett a korábban leírt esetekkel. Megtalálható volt a bőséges eosinophil cytoplasma, nagy nucleolusok. Úgyszintén közös a már ezidáig bemutatott esetekkel, hogy igen magas proliferációs aktivitás mutatható ki, Ki-67 magas festődési indexet mutat. Immunfenotípusát tekintve jellemző a panCK és vimentin koexpresszió, fokális EMA pozitivitással. További specifikus cytokeratinok- CK7, CK20 negatívak. LCA, S100, HMB45, lymphoid markerek negatívak. Az SMA, caldesmon, desmin, CD34, C-kit negativitás a sarcomákat zárja ki. Esetünkben is immunhisztokémiai vizsgálattal csaknem valamennyi tumorsejt p53 nukleáris pozitivitást mutatott, amint az kimutatható számos MERT és MRRT és Wilms tumor esetében [180].

Összefoglalva, a rhabdoid jellegű gastrointestinalis tumorok ritkák. A rhabdoid fenotípus rossz prognózissal társul, az ilyen tumorok nem reagálnak a konvencionális kezelésekre. A korábban közölt, nem gastrointestinalis lokalizációjú MERT esetektől jelentősen különböző életkori előfordulás, és az igen kifejezett férfi túlsúly is jelzi, hogy a MERT a tumorok heterogén csoportja. Ugyanakkor felvethető, hogy a gastrointestinalis rhabdoid tumorok önálló szubtípust képeznének a gastrointestinalis carcinomákon belül. Ennek igazolására természetesen az eddig közölt esetek összehasonlító molekuláris patológiai vizsgálata lenne szükséges.

E-cadherin β -catenin vizsgálat

Az irodalomban számos tanulmány foglalkozott az elmúlt csaknem két évtizedben az E-cadherin- β -catenin expresszió colorectalis carcinogenesisben betöltött szerepével. Ma már tankönyvi adat, hogy a vastagbél tumorok genetikailag heterogének. A molekuláris pathogenesis szerint alapvetően két fő csoportba sorolhatók. Többségükre (80%) a kromoszóma instabilitás jellemző, míg kisebb csoportjuk esetén a mismatch repair gének mutációja és microsatellita instabilitás jellemző. Az első csoport tumorai esetén jól jellemzett génhibák halmozódnak fel a colorectalis carcinogenesis stádiumaiban, melyek egyik legfontosabbika az APC- β -catenin rendszert érinti, és ez már a carcinogenesis korai szakaszában kimutatható [5,6]. Az irodalomban olvasható közlemények eredményei nem egységesek, és sokszor ellentmondóak az általunk is vizsgált proteinek prognosztikai illetve prediktív szerepét illetően. A legtöbb közlemény szerint, a β -catenin illetve E-cadherin membrán pozitivitása esetén jobb a betegség prognózisa, hosszabb túlélési idő várható, ritkább a metastasis megjelenése [181-185]. A β -catenin nukleáris expresszióját rossz

prognosztikai faktornak tartják [186]. Ezen eredményekkel saját vizsgálataink megállapításai részben összhangban vannak.

Eredményeinket áttekintve és összegezve a következőket állapíthattuk meg. A teljes beteganyagunk tekintetében a β -catenin membrán expressziójának elvesztése esetén rosszabb volt az OS, mint membrán pozitívitás esetén, a különbség azonban nem bizonyult szignifikánsnak. Nem sikerült szignifikáns kapcsolatot találni az E-cadherin expressziója és a vizsgált klinikai paraméterek, tehát az OS és DFS között. Az összes beteg esetében, a β -catenin membrán negatívitás és nukleáris pozitívitás mellett gyakoribb az áttétképződés, és ez a kapcsolat a nukleáris expresszió esetén szignifikáns. Az is látható volt, hogy ha sem az E-cadherin, sem a β -catenin nem mutatott membrán festődést, akkor gyakoribb volt a metastasis megjelenése, mint ha mindkét protein membrán festődést mutat.

A betegeket a tumor lokalizációja alapján két csoportra bontva, már jelentős különbségek voltak tapasztalhatók. A colon tumoros betegeink között gyakorlatilag nem mutatkozott összefüggés a β -catenin- E-cadherin expressziós változások és az OS és DFS között. Ezekben a betegeknél nem mutatkozott kapcsolat a metastasis megjelenése és a β -catenin, valamint E-cadherin expressziós mintázat között.

A rectum tumoros csoportban eleve kisebb volt az OS és a DFS. Ezen túlmenően nagyobb arányban észleltük a β -catenin és E-cadherin membránexpresszió elvesztését is. A β -catenin membrán negatívitás esetén rosszabb OS volt, mely azonban nem ért el szignifikáns értéket. Ebben a csoportban a metastasis megjelenése szignifikánsan gyakoribb a β -catenin membrán expresszió elvesztése esetén, illetve szintén szignifikánsan gyakoribb a β -catenin nukleáris expressziója esetén.

Végül az is megállapítható volt, hogy a metastaticus betegek csoportjában a β -catenin membrán negatívitás esetén szignifikánsan hamarabb jelent meg az áttét, valamint a DFS is rosszabb. E-cadherin membrán negatívitás esetén is hamarabb jelentkezett áttét, azonban ez nem volt szignifikáns.

Eredményeink közül hangsúlyozandó, hogy mi főképp a rectum tumoros betegek csoportjában tudtunk erős kapcsolatot kimutatni a β -catenin- E-cadherin expressziós mintázata és a betegség kimenetele között, míg a colontumoros betegeknél csak tendencia volt, vagy egyáltalán nem találtunk összefüggést. A jobb- illetve bal colonfél tumoraiban észlelt adatokat nem értékeltük külön, részben az egyes csoportokban lévő relatíve kis betegszám miatt. Tehát az alcsoport analízis alapján a rectum tumoros csoport betegeiben láthatók szignifikáns összefüggések. Így a teljes betegcsoport tekintetében a szignifikáns összefüggések háttérében részben az ebben az alcsoportban látott korrelációk állhatnak. Ez a

megfigyelés is alátámasztja, hogy a colorectalis carcinoma genetikailag heterogén betegség. A jobb- illetve bal colonfél, valamint rectum tumorainak patogenezeise eltér egymástól. Az általunk megfigyelték szerint a rectum tumorok áttétképzésében kiemelkedő jelentőségű szerepet játszik a β -catenin- E-cadherin rendszer.

A prognosztikai vizsgálat betegcsoportunk idevonatkozó eredményei is alátámasztották az E-cadherin- β -catenin vizsgálat során észlelt megfigyeléseket, bár ezen betegcsoportban nem vizsgáltuk részleteiben külön a colon-, illetve külön a rectum tumoros betegek expressziós mintázatát és annak kapcsolatát a klinikopatológiai paraméterekkel. Ebben a vizsgálatban azonban már nem csak tendencia volt a β -catenin membrán expresszió és a prognózis között, hanem a membrán pozitív esetekben szignifikánsan jobb volt mind az OS és a DFS is. Cox regressziós tesztben a β -catenin membrán expresszió független prognosztikai faktornak bizonyult.

Tanulmányunkban a Spearman's correlatio tesztben erős negatív korrelációt találtunk a β -catenin membranosus és nukleáris festődése között, valamint a β -catenin membranosus expressziója és a metastasis kialakulása között. Erős pozitív korreláció volt az E-cadherin és β -catenin membranosus festődése között, a β -catenin nukleáris expressziója és a metastasis képződés között.

Ha nem észlelhető a membránban β -catenin expresszió, a prognózis rosszabb, gyakrabban alakul ki metastasis és a metastasis is hamarabb jelenik meg.

Az ellentmondó irodalmi adatok, illetve az általunk észlelték háttérében nagyon sok tényező állhat. Sok, eddig megjelent közlemény klinikopatológiailag nem egységes betegcsoportot vizsgált, korai és előrehaladott stádiumú, colon- illetve rectum tumoros betegek egyaránt szerepeltek az egyes tanulmányokban. Van néhány közlemény, ahol szigorúan szelektálták a bevont eseteket, és csak stage I-II eseteket vizsgáltak [187, 188, 140], sőt egy munkacsoport csak korai rectum tumoros betegeket tanulmányozott [141]. A mi vizsgálatunkban csak pT3, Dukes B2 stádiumú betegek kerültek beválasztásra. Azon betegek, akik kaptak adjuváns kezelést, a standard 5-FU kemoterápiában részesültek, a rectum tumoros betegek emellett radioterápiát is kaptak. Így a betegeinket klinikopatológiai szempontból relatíve homogén csoportnak tartjuk. Eltéréseket fedezhetünk fel az egyes közleményekben metodikailag is. A metodikai különbségek között említendő, hogy az egyes szerzők más- és más antitesteket használtak fel munkájukban. A témában megjelent közleményeket áttanulmányozva, arra a következtetésre juthatunk, hogy nincs egységes, mindenki által elfogadott scoring rendszer, a β -catenin- E-cadherin expresszió értékelésére. Így a cut-off érték megválasztása önmagában a közölt eltérő eredmények egyik fontos magyarázata lehet.

Mi az utóbbi években egyre népszerűbb TMA metodikát választottuk a vizsgálatainkhoz, melyet Hector Battifora írt le először [133], majd Kononen és társai tökéletesítették [134,135]. Az elmúlt években számos nagy tanulmány vizsgálta és igazolta a módszer használhatóságát, mint high throughput metodika a daganat proteomikai kutatásokban [136,137,138]. A colorectalis tumorok vizsgálatában is többen próbálkoztak a TMA módszer alkalmazásával [139,140,141,142,143,144,189], és több közlemény is megjelent, melyek a β -catenin- E-cadherin rendszert vizsgálták ilyen módon [143,189]. Megjelent olyan tanulmány is, mely a TMA metodika validációját mutatta be, colorectalis carcinomas mintákon [144]. A TMA alkalmazható tumor progressziós vizsgálatokra is. Az adenoma- carcinoma szekvencia során bekövetkező catenin expressziós mintázat változásainak vizsgálatára is kiválóan alkalmas ez a módszer [143,144]. A TMA metodika óriási előnye a reakciókörülmények standardizálásában rejlik, és a legtöbb szerző egyetért abban, hogy ez az előnyöket és hátrányokat mérlegelve, a TMA javára dönti el a kérdést. A fenti metodikai illetve betegkiválasztási különbségek mellett azonban részben a β -catenin- E-cadherin rendszer colorectalis carcinogenesisben betöltött szerepének komplexitása is magyarázhatja az eredmények eltéréseit.

A malignus tumorok alapvető biológiai jellemzője az invázió és metastasis képzés. Ezek a rákos halálozás fő okai.

A tumor progresszió és a többlépcsős metastasis képződés folyamatának egyik legfontosabb és első eseménye a sejt-sejt adhézió felbomlása. Mint ahogy az a különféle tanulmányokban olvasható, a β -catenin és az E-cadherin központi szerepet játszik az epithelialis szövetekben illetve carcinomákban a sejt-sejt adhézióban. [32] A tumorsejtek sejt-sejt adhéziójában és sejt-ECM adhézióban szereplő glikoproteinek szerepet játszanak az invazív és metastaticus fenotípus kialakulásában. A különféle sejt adhéziós molekulák közül a cadherineket leginkább a homophil sejt-sejt adhézióban játszanak szerepet, míg a sejt-endothel kapcsolódásért az immunoglobulin superfamily és a selectinek felelősek.

A cadherineket membrán asszociált adhéziós proteinek, melyek komplexet képeznek intracellularis proteinekkal, mint β - és γ -catenin [34,35]. Az E-cadherin gén a 16-os kromoszómán helyezkedik el. Az E-cadherin egy kalcium dependens transzmembrán protein, melynek nagy extracelluláris és relative kicsi intercelluláris doménje van, mely utóbbi cytoplasmaticus proteinekhez kötődik, főképp a β -cateninhez. Ez a kötődés alapvető jelentőségű a stabil sejt-sejt adhézióban [33]. A cadherineket csökkent szintje a sejt adhézió gyengüléséhez vezet. Számos esetben kimutatható az E-cadherin mutáció és a β -catenin protein kötő képesség csökkenése. A carcinoma sejtek disszociációja lehetővé teszi a a stroma inváziót és a metastasis képződést [32,181,182]. Ismert, hogy a gyomor sigillocellularis

carcinomái, vagy a lobularis emlőcarcinoma, melyek kifejezetten invazív tumorok, E-cadherin negatívak [190,191]. Ezekben a tumorokban a nagy metastatizáló képesség egyik főszereplője a tumorsejtek E-cadherin expressziójának elvesztése. A familiáris diffus gyomor carcinoma szindróma hátterében ismert az E-cadherin gén germline mutációja [192]. Emellett független prognosztikai faktor sporadikus gyomorrákban is [190]. Összefüggést találtak nyelvrák esetén is a túlélés és az E-cadherin- β -catenin expresszió között [193]. A csökkent β -catenin expresszió kimutatható volt további más epithelialis tumorokban és prognosztikai értékűnek bizonyult húgyhólyag, gyomor, prostata és nyelőcső rákban is [194-197].

Azonban azt is figyelembe kell venni, hogy a keringésbe került, és a távoli szövetekbe eljutott tumorsejteknek a megtapadáshoz illetve proliferáló metastaticus szövetszaporulat létrehozásához szükség van adhéziós molekulákra. Így a tumorsejtek primer tumorról történő leválásánál előny az adhéziós molekulák hiánya, de a megtapadásnál már hátrány [198]. Mivel a sejt-sejt adhézióban számos egyéb molekula is szerepel, és tumorsejtek megtapadását is számos más körülmény befolyásolja, így érthető, hogy bizonyos esetekben kifejezett szerepet kap a metastasis képződésben az E-cadherin- β -catenin rendszer, míg más tumorok esetében nem lehet összefüggést találni. Sőt, önmagában az egyes komponensek immunhisztokémiai kimutathatósága még nem jelenti a biológiailag aktív, funkcionáló és főképp kooperáló proteinek jelenlétét. Egy munkacsoport a foszfo- β -catenin nukleáris expresszióját vizsgálta, mely a tényleges biológiai funkciót betöltő aktív protein, szemben a legtöbb tanulmányban- és a jelen közleményben is vizsgált nem- foszforilált proteinekkel. Ők arra a megállapításra jutottak, hogy a nukleáris foszfo- β -catenin expresszió esetén jobb a prognózis [199].

A két protein kooperáló funkciójára utal azon eredményünk, mely szerint ha valamelyik kimutatható a membránban, akkor jobb az OS, mintha mindkettő membrán negatív lenne.

A metastasis képződés soklépcsős eseménysor, melyben az E-cadherin- β -catenin rendszer mellett egyéb tényezők is szerepet játszanak, így többek között további adhéziós molekulák, matrix metalloproteázok stb.

A β -catenin nukleáris expressziója is fontos esemény a colorectalis carcinogenesisben, számos gén transzkripcióját indítja el. A vastagbélben a crypták bázisán állandó sejtproliferáció van, mely biztosítja a nyálkahártya folyamatos megújulását. A proliferáció szabályozásában fontos szerepet tölt be a Wnt- β -catenin-TCF/LEF útvonal [43,44,45]. Szokatlan a szignalizációs útvonalak között ez a szignálútvonal, amennyiben itt a „second messenger”-ként felfogható β -catenin folyamatosan képződik, és bomlik le a destruktív komplex segítségével. A szignálútvonal aktiválódása esetén a lebomlás függesztődik fel, és a

β -catenin felhalmozódik, be tud jutni a magba, ahol kifejti hatását [41]. Mivel a colon tumorok kromoszomális instabilitással járó csoportjában a β -catenin- APC rendszer rendellenességei többnyire megfigyelhetők, és általában már a carcinogenesis korai szakaszában [46,47], így részben érthető, hogy ez a rendkívül komplex intracelluláris hálózatokban résztvevő protein immunhisztokémiai kimutathatósága miatt mutat ellentmondásos eredményeket a prognózis tekintetében. Számos közlemény megállapította már, hogy jelentős genetikai különbség van a jobb illetve bal colonfél, valamint a rectum tumorai között. A bal colonfél és rectum tumoraira inkább a chromoszomális instabilitás, az APC, p53 mutációk jellemzőek, míg a jobb colonfél tumorai között gyakoribb a mikroszatellita instabilitás, és a mismatch repair gének mutációja. Ezzel a megállapítással összhangban vannak az eredményeink, mi is a rectum tumoros betegcsoportunkban kaptunk összefüggést a β -catenin- E-cadherin rendszerben észlelt expressziós változások és a prognózis között [200].

A vastagbél carcinoma okozta halálozás egyik legfontosabb oka a távoli metastasisok megjelenése. Régóta igény a klinikum részéről, hogy előre lehessen jelezni, kik azok a korai stádiumú betegek, akiknél később nagy valószínűséggel áttét jelenik meg. Amennyiben lehetséges lenne ilyen beteg szelekció, a válogatott betegek esetén mód nyílna szorosabb utánkövetésre, illetve agresszívebb adjuváns kezelés is mérlegelhető. Nem mellékesen, azon betegekben, akiknél az áttétképzés valószínűsége csekély, időt, költséget, számos sokszor kellemetlen vizsgálatot lehetne megtakarítani. A kérdés hatalmas jelentősége miatt kiterjedt vizsgálatok folynak ezirányban. Számos hisztopatológiai faktor mellett igen sok molekuláris markert is vizsgáltak e szempontból. Az áttétképződés soklépcsős mechanizmusának feltárása további potenciális, „metastasis prediktor” molekulára hívta fel a figyelmet. A DNS chip array vizsgálatok során sok tucatnyi gén expressziós mintázata és a prognózis, metastasis képzés között tártak fel kapcsolatot [201]. Azonban ezen DNS chip vizsgálatok jelenleg még költségesek, és a kellő standardizáció is hiányzik, melyek a mindennapi rutin alkalmazást gátolják. Ismert azonban olyan, a mindennapok számára kifejlesztett teszt, mely 7 gén mRNS expressziós státuszát vizsgálja, referencia gének mellett- Oncotype DX [202]. Több munkacsoport próbált még ennél is egyszerűbb, és megbízhatóan használható molekuláris marker vizsgálati algoritmust kifejleszteni a metastasis kialakulás előrejelzésére. Egy munkacsoport az általunk is vizsgált, β -catenin nukleáris expresszió mellett a CD133 IHC és mikroszatellita státusz vizsgálata, valamint MLH1, MSH2, MSH6 vizsgálat és BRAF mutációs státusz meghatározás kombinációjára épülő vizsgálati protokollt dolgozott ki. Figyelemre

méltó, hogy eredményeik is hangsúlyozzák az általunk is megfigyelt, β -catenin expressziós mintázatbeli változások jelentőségét a metastasis predikcióban [203,204].

Konklúzióként megállapíthatjuk, hogy jelen vizsgálatunk, az irodalmi adatokhoz hasonlóan a β -catenin- E-cadherin colorectalis carcinogenesisben betöltött fontos szerepét támasztja alá. Dukas B2 stádiumú tumorok esetében- főképp rectumtumorok esetén a β -catenin membrán expressziójának elvesztése a későbbi metastasis képződés prediktora. További, nagy esetszámú, klinopatológiailag homogén betegcsoporton végzett tanulmányok szükségesek még, hogy a β -catenin- E-cadherin prognosztikai és prediktív szerepét meghatározzuk colorectalis carcinoma esetén.

Prognosztikai vizsgálat

Ezen vizsgálatunkban a klasszikus klinikopatológiai paraméterek mellett a tumor invázió és progresszió folyamatában kulcsszerepet betöltő molekulák jelentőségét vizsgáltuk a betegség klinikai kimenetelében. A vizsgált betegcsoportunk ugyanazon kezelésben részesült, és valamennyi beteg T3N0 stádiumban volt, ennek megfelelően ezt a betegcsoportot is klinikai szempontból homogénnek tartjuk.

Az Egyesült Államok Nemzeti Rákregiszterében 35787 T3N0 stádiumú colon carcinomás beteg vizsgálatában a vizsgálatra került nyirokcsomók száma alapján csoportosították a betegeket. Az 5 éves OS arány 1-7 vizsgált nyirokcsomó esetén 49,8%, 8-12 nyirokcsomónál 56,2%, míg több mint 13 nyirokcsomónál 63,4 % volt [112]. Ezt az adatot európai munkacsoport is megerősítette [113]. A mi adataink is azt mutatják, hogy 5-12 vizsgált nyirokcsomó esetén jobb a prognózis, mint 1-4 nyirokcsomó esetén. Ennek a markáns különbségnek a háttérében az áll, hogy kevés számú nyirokcsomó vizsgálatával meghatározott pN0 stádium esetén nagy a valószínűsége, hogy nem-vizsgált nyirokcsomóban áttét legyen, és így tévesen kerül a beteg nyirokcsomó-negatív csoportba. A colorectalis carcinoma nyirokcsomó áttéteinek mintegy 30%-a 5 mm-nél kisebb nyirokcsomóban fordul elő, mely tény úgyszintén aláhúzza a gondos nyirokcsomó preparálás jelentőségét. Az adjuváns kezelésben részesítendő II. stádiumú colorectalis carcinomás páciensek kiválasztásának szempontjai között is szerepel az inadequat nyirokcsomó vizsgálat. Az amerikai ajánlásokon alapulva, kevesebb mint 13 vizsgált nyirokcsomó esetén az adjuváns kezelés szükséges [205]. A mi eseteinket tekintve ez azt jelenti, hogy valamennyiüket kezelni kell, mivel a nagy rizikójú csoportba tartoznak. Saját eseteinket tekintve, az általunk kapott adatok alapján is alátámasztható a fenti irodalmi észlelés: minél több nyirokcsomót távolítanak el, és

vizsgálják meg, annál jobb a túlélési arány. Az általunk látott alacsony vizsgált nyirokcsomó szám részben sebészeti műtéttechnikai okokra vezethető vissza, az operatőr insufficiens nyirokcsomó dissectiot végez, különösen rectum tumor műtét során. Emellett a hisztopatológiai feldolgozás, a műtéti preparatum insufficiens nyirokcsomó preparatioja is hozzájárult a kis észlelt nyirokcsomó számhoz. Ezen megfigyeléseket már figyelembe vesszük a mindennapi hisztopatológiai diagnosztikában, és a preparatum gondos dissectiojával, illetve a pericolicus- mesocolicus zsírszövet vegyszeres oldásával ma már a korábban észlelnél lényegesen nagyobb számban kerül nyirokcsomó vizsgálatra.

A colorectalis carcinomák kb. 70%-a 17p és/vagy 18q deléciót mutat [62,206]. A 17p kromoszóma tartalmazza a p53 gént, mely jelentős tumor szupresszor gén és a colorectalis rákok 40-60%-ában mutáns [63]. A p53 funkcióját tekintve a genotoxicus hatások univerzális szenzora, valamint a sejtciklus progresszió gátlója és apoptosis induktor. A p53 fő funkciója a kijavíthatlan génhibák sejtciklus során történő átadódásának meggátlása. Emiatt génkárosodás esetén a p53 a p21 aktivációja révén blokkolja a sejtciklust a G1 fázisban, hogy a sejt ki tudja javítani a károsodott DNS-t. Ha a károsodást nem sikerül kijavítani, a p53 apoptosist indukál. Ezen funkciója miatt nevezik a p53-at genom őrzőjének [64,67]. A p53 mutáció a leggyakoribb molekuláris abnormitás a malignus tumorokban. A sporadikus tumorok 50%-ában a p53 nem működik jól mutációja miatt, mely a sejtciklus reguláció elvesztését eredményezi és rossz prognózist eredményez. A p53 vizsgálható DNS szekvenálással és immunhisztokémiai módszerrel [207]. A p53 mutáció fokozott proliferációt eredményez és az apoptosis funkció gátlásához, valamint kromoszomális instabilitáshoz vezet [208]. Több tanulmány igazolta, hogy a p53 a II. stádiumú colorectalis carcinomában rossz prognosztikai faktor [209]. Más tanulmányok azonban ellenkező összefüggést tártak fel [68]. Vasatgbél tumor esetében a p53 jelentősége a tumor lokalizációtól is függ. Ez a tény különböző genetikai mechanizmusokat tükröz. A p53 mutációk többnyire a distalis tumorokban fordulnak elő, és rossz prognózissal, gyakori allél veszteséssel, p53 akkumulációval és aneuploidiával járnak. A proximális tumorok között gyakoribb az MSI jelleg és ezek diploid tumorok [69]. 4416 beteg adatait vizsgáló 28 tanulmány meta-analízise szerint sem a p53 overexpresszió, sem a p53 mutációk nem bizonyultak hatékony prognosztikus faktornak [70]. Vizsgálatunkban ezen korai stádiumú (T3N0) tumorokban mi sem tudtuk a p53 prognosztikai értékét igazolni. A p53-al foglalkozó számos tanulmány eredménye ellentmondásos, valószínűleg azért, mert az alkalmazott immunhisztokémiai technika nem kellően standardizált, illetve különböző antitesteket használtak [63].

A CDK inhibitorok 2 családja ismert, a p21 family (p21, p27, p57) és az INK family (p15, p16, p18, p19). Ap21-waf protein egy cyclin dependens kináz inhibitor. A p21-et a p53 aktiválja és meggátolja a sejt belépését a sejtciklus S fázisába. A p21 prognosztikai szerepe ellentmondásos. Számos szerző nem talált kapcsolatot a p21 expresszió és túlélés között, míg mások kedvező prognosztikai jelnek tartják. A legtöbb tanulmány a p21 overexpresszióját p53 expresszióval vagy anélkül rossz prognosztikai jelnek tartják [210,211]. Mi az eseteink 4%-ában láttunk p53 és p21 egyidejű pozitivitást és ebben a csoportban a túlélés szignifikánsan rosszabb volt mint a p53 és p21 negatív esetekben ($p=0,041$). Az esetek kis száma miatt ez az eredmény csak kellő elővigyázatossággal értékelhető.

A daganatok egyik jellemzője a kontrollálatlan sejt proliferáció. A sejtciklus szabályozás utolsó lépcsőfokai a ciklinek, ciklin dependens kinázok és a ciklin dependens kináz inhibitorok. Humán tumorokban szokványos a p16 ciklin útvonal károsodása. A p16 tumor szuppresszor gén az INK family tagja, és a 9-es kromoszómán helyezkedik el. A p16 egy ciklin dependens kináz inhibitor mely a CDK4 –et és a CDK6-ot gátolja. A sejtciklus kontrollban vesz részt. A sejtek az S fázisba az aktivált CDK-ok segítségével lépnek be, míg a p16 a CDK gátlással eredményez sejtciklus stopot. Colorectalis carcinomában gyakran kimutatható a p16 gen inaktiválódás [206]. Egy tanulmányban a p16 expresszió összefüggést mutatott a tumor gradussal, stádiummal és a tumor distalis lokalizációjával [212]. A mi adataink nem igazolták a p16 prognosztikus szerepét colorectalis rákban.

Az EGFR aktiváció jelentős esemény, mely sejtosztódást, proliferációt, differenciációt és angiogenezist eredményező események láncolatát indítja el. Az EGFR expresszió számos tumorban prognosztikus értékű [78], azonban colorectalis carcinomában a prognosztikai szerepe nem egyértelmű [213]. Egy munkacsoport az általunk is alkalmazott TMA metodikát használta EGFR expressziós vizsgálatához [140]. Az elmúlt évek tanulmányai szerint az EGFR expresszió nem befolyásolja az anti-EGFR terápia hatékonyságát [84,85,86]. Ez a kezelés azon betegek körében lehet eredményes, akik tumora vad típusú KRAS-t expresszál [93,94].

A mi betegcsoportunkban a betegek 54%-ában volt EGFR expresszió, azonban ez nem befolyásolta a prognózist.

Több tanulmány igazolt összefüggést colorectalis carcinomában a MSI jelenléte és a jó prognózis között. Az MSI pozitív betegekben hosszabb az OS és kevesebb a tumor recidiva, mint MSS betegeknél [214,215]. Egy retrospektív tanulmány szerint csak az MSS betegek számára hasznos az 5FU chemoterápia [124,216]. A mi MLH1 negatív eseteinkben sem metastasis, sem tumor recidiva, vagy elhalálozás nem történt, azonban a kis esetszám miatt

nem történt e tekintetben statisztikai feldolgozás. Ha az MLH1 és MSH2 expressziót együtt vizsgáltuk, nem találtunk prognosztikai jelentőséget.

A TS intenzíven kutatott marker a colorectalis carcinomában. A TS kulcsszerepet játszik a pirimidin nukleotid szintézisben, és az intranukleáris timidilát képződés egyetlen forrását jelenti. A TS szerepet játszik a DNS szintézisben és az 5-FU képes gátolni, mely a colorectalis carcinoma adjuváns kezelésének alapvető gyógyszere évtizedek óta [121]. Több munkacsoport vizsgálta a TS expresszió prognosztikai szerepét. Számos tanulmány igazolta, hogy a fokozott TS protein expresszió a rosszabb túlélés és a tumor recidíva markere. [217,218,219]. Más közlemények szerint nem csak prognosztikai jelentősége van a TS expressziónak. Az intratumoralis TS expresszió mértéke colorectalis carcinomában az 5-FU terápia rezisztencia prediktív markere. Fokott TS expresszió 5-FU rezisztenciát eredményez. [125,126,221,222]. A timidilát szintáz expresszió immunhisztokémiailag is vizsgálható, a protein kimutatható a konvencionális, paraffinba ágyazott mintákon [223,224]. Bár fenti közlemények a TS protein kimutathatóságát is alkalmasnak tartják prognosztikai, illetve prediktív szempontból, a legtöbb tanulmány inkább a TS gén expresszió vizsgálatát tartja megbízhatónak. Ugyan van kapcsolat a génexpresszió és az immunhisztokémiai expressziós mintázat között, de az immunhisztokémiai metodika nehezebben standardizálható [225]. Vizsgált tumor mintáink 29%-a volt TS pozitív. Tanulmányunkban a TS expresszió nem mutatott prognosztikai értéket, az 5-FU kezelés eredményességére kifejtett hatását nem vizsgáltuk.

A vizsgált klasszikus klinikopatológiai faktorok és molekuláris események közül Cox regressziós teszttel 3 independens prognosztikus markert azonosítottunk: membranosus β -catenin expresszió, feldolgozott nyirokcsomók száma és az életkor. Úgy véljük, az E-cadherin- β -catenin rendszer vizsgálata használható a klasszikus klinikopatológiai faktorok mellett II stádiumú colorectalis carcinomában prognózis meghatározásra és a metastasis fellépés előrejelzésére.

ERCC1 expresszió immunhisztokémiai kimutatása és prognosztikai faktorok vizsgálata metastaticus colorectalis carcinomában

Ebben a vizsgálatunkban a korábbi vizsgálatainkban már tanulmányozott, 10, a daganat kialakulásában szerepet játszó protein expresszióját vizsgáltuk TMA metodikát és IHC reakciókat alkalmazva. A vizsgált betegek oxaliplatin kezelésben részesülő, metastatizáló colorectalis carcinomás betegek közül kerültek ki.

Az eredményeinket tekintve elmondhatjuk, hogy a β -catenin membránexpressziója esetében jobb volt a metastaticus túlélés, mint a negatív esetekben. Így ezen előrehaladott stádiumú betegcsoportunkban is igazolódott összefüggés a β -catenin expressziós mintázata és a prognózis között.

Az ERCC1 fokozott festődése mellett rosszabb OS, metastaticus túlélés, és a progressziómentes túlélési idő volt észlelhető. Az eredmények nem voltak statisztikailag szignifikánsak. Az ERCC1 a NER rendszer tagja, és az UV-fény és a kemoterapeutikumok okozta DNS károsodás kijavításában vesz részt. Az oxaliplatin egy harmadik generációs platina származék, cytotoxikus hatást kifejtve a DNS transzkripciót és a replikációt is gátolja, ezáltal vezet sejthalálhoz, és az apoptózis indukciójához [127]. Még azon daganatsejtekre is kifejti a hatását, melyekre a cisplatin, vagy a carboplatin nem hatott. Az oxaliplatin rezisztencia fő okai a csökkent akkumuláció, a megnövekedett detoxifikáció, és a DNS-repair. A platina származékok által okozott DNS károsodás kijavítását intracellulárisan a NER rendszer végzi [129,130]. Az ERCC1 gén expressziója, az intratumoralis mRNS az oxaliplatinra adott terápiás válasz markere. Az ERCC1 mRNS szintje korrelál legjobban a terápiára adott válasszal, az alacsonyabb expressziós szinttel jobb válaszkészség jár [131,132,226]. A gén expresszió mértéke mellett a 4. exon 118-as kodonjában észlelt SNP is ismert jelenség. Számos közlemény jelent meg az elmúlt években, melyek szerint az ERCC1 génben lévő mutációk- köztük a 118 SNP- korrelálnak a platinaterápiára adott terápiás válasszal [132]. Ebben a kodonban észlelt variációk közül a C/C genotípus esetén a legkisebb a klinikai válasz aránya. Az ERCC1 protein IHC reakcióval is kimutatható, mely szintén prognosztikus értékű [227,228,229]. Ezen munkacsoportok az általunk észlelthez hasonlóan, jobbkébb csak tendenciát észlelt, szignifikáns összefüggés az IHC eredmények és a túlélési adatok között nem igazolódott. Figyelemreméltó, hogy az ERCC1 immunhisztokémiai kimutatásában is alkalmazták már a TMA metodikát [228]. Az ERCC1 mRNS szintje szintén hasonló prognosztikus értékű az ovárium, nyelőcső, nem kissejtes tüdőrák, húgyhólyag- és gyomorrák vonatkozásában is.

Az eredményeink matematikailag nem bizonyultak szignifikánsnak, aminek egyik oka a kis (28) mintaszám. A másik probléma az IHC metodikából adódik, ami egy soklépcsős, időigényes folyamat, és számos hibalehetőséggel bír: a minták nem megfelelő fixálása, nem megfelelő antigénfeltárás, az antitestek nem specifikus kötődése, a meglévő endogén peroxidáz aktivitás, nem megfelelő pH, hőmérséklet, illetve az értékelés szubjektivitása. De mindezek ellenére egy viszonylag egyszerű metodika, mely igen széles körben elterjedt.

Mindezek ellenére is mutatták azt a tendenciát, amit nagyobb volumenű vizsgálatok adatai is alátámasztanak.

Összességében mind a TS, mind az ERCC1 immunhisztokémiai kimutatásával szerzett tapasztalataink alapján elmondhatjuk, hogy retrospektív vizsgálatban, nagy esetszámok mellett jól értékelhető eredményt ad. Azonban az egyénre szabott terápia megtervezéséhez nem szolgál kellő diagnosztikus pontossággal és megbízhatósággal.

EGFR amplifikáció kimutatása FISH reakcióval

Az elmúlt években sokan vizsgálták az EGFR expressziót vastagbél carcinomában. Különösen nagy figyelmet kapott az EGFR célpontú monoklonális antitestes terápia- a cetuximab és a pamitumumab megjelenése óta [83]. Intenzív kutatás tárgya, hogyan lehet előrejelezni a célzott terápia hatékonyságát. Ebben az összefüggésben is ismét napirendre került az EGFR gén amplifikáció kérdése. Mint ismert, kezdetben az EGFR expresszió immunhisztokémiai kimutathatóságát próbálták a célzott terápia prediktív markereként használni [84]. Az EGFR overexpressziót mutató esetek aránya, immunhisztokémiai meghatározást alkalmazva, 50-70%. Az általunk észlelt 54%-os, illetve 55,7% előfordulási arány megfelel az irodalomban olvashatónak. Azonban bebizonyosodott, hogy az EGFR IHC nem rendelkezik a célzott terápiák tekintetében prediktív értékkel. Az utóbbi években az EGFR gén kópiaszám prediktív értékét kezdték el vizsgálni. Korábban már kimutatták, hogy a colorectalis carcinomában az EGFR aktiváció egyik lehetséges mechanizmusa a gén amplifikációja. Az EGFR amplifikációt vizsgáló legtöbb munkacsoport az amplifikációt mutató tumorok arányát 5-17% közöttinek találta [72,230]. Az általunk észlelt 9.4%-os amplifikáció arány megfelel ezen irodalmi eredményeknek. Az EGFR gén kópiaszámának növekedését eredményezheti a 7-es kromoszóma poliszómiája is. Összességében az EGFR gén kópiaszám eltérések arányát 6,9-88,9% közöttinek találták az egyes közleményekben. Az igen jelentős eltérések hátterében nagyrészt a gén kópiaszám eltérések egyes tanulmányokban alkalmazott kritériumainak különbözősége felelős. Az EGFR gén kópiaszám tekintetében a colorectalis carcinoma heterogenitással jellemezhető [79,87]. Ugyanakkor megállapítást nyert, hogy a primer tumor és áttétének EGFR kópiaszáma nagyfokú konkordanciát mutat [231]. Az amplifikáció prediktív értékét vizsgálva, több közlemény is azt mutatta, hogy nagyobb válaszarány észlelhető a célzott terápiára, ha a gén kópiaszám 3-nál nagyobb [87]. Vastagbél carcinomában nincs olyan közvetlen kapcsolat a gén amplifikáció és az EGFR IHC

státusz között, mint az emlőcarcinomában a HER2 esetén sokszorosán bizonyított. [79]. A mi betegcsoportunkban észlelt EGFR IHC és amplifikációs adatok tendenciát jeleznek, azaz a mi eseteinkben a score 2-3+ IHC státusz gyakoribb az amplifikációval járó esetekben. Azonban mi is észleltünk több esetet, ahol score 2-3+ IHC reakció mellett nem tudtunk amplifikációt kimutatni. Mivel a mi vizsgálatainkban az utánkövetési időszakban egy beteg sem részesült EGFR támadáspontú célzott terápiában, így nem tudtuk vizsgálni az EGFR amplifikáció terápia hatás prediktív értékét. Az EGFR kópiaszám prediktív szerepe mellett prognosztikai hatással is rendelkezik. Magasabb kópiaszám mellett rosszabb prognózis várható. A mi betegcsoportunkban ez nem igazolódott, sőt, az amplifikáció mellett ritkábban alakult ki metastaticus betegség, mint az amplifikációt nem mutató esetekben (14,3% vs. 29,6%). A kis esetszám miatt itt statisztikai vizsgálat nem történt. Az észlelt eltérés hátterében a fentebb említett, inkonzisztens scoring rendszer állhat. Az EGFR FISH vizsgálatainkkal teszteltük a TMA metodikánkat, génszintű vizsgálatok elvégzése céljából. A TMA metodikát több munkacsoport is validálta, FISH vizsgálatok kivitelezhetősége szempontjából [136]. További terveink között szerepel az EGFR amplifikáció vizsgálata a többi jól dokumentált betegcsoportunk mintáin is, és az eredmények publikálása.

8. Összefoglalás

A rosszindulatú daganatos megbetegedések között a vastagbélrák a nyugati világban és hazánkban is az egyik leggyakoribb rosszindulatú daganat, és a második leggyakoribb daganatos halálok a fejlett országokban. A colorectalis carcinoma kialakulása soklépcsős folyamat, mely során különféle, többnyire már jól definiált és jellemzett genetikai változások következnek be a colorectalis mucosa hámsejtjeiben, míg a malignus sejtklón megjelenik. Munkánkban a colorectalis carcinogenesisben főszerepet játszó molekuláris események közül vizsgáltunk néhányat, többnyire proteomikai szinten, TMA metodikával. A vizsgálataink fő iránya a β -catenin-E-cadherin rendszert célozta. Megállapítottuk, hogy a β -catenin expresszió és részben az E-cadherin membrán expressziójának csökkenése rövidebb OS és DFS-t eredményez. Ugyanakkor- főképp a β -catenin membrán expresszió- elvesztése esetén nagyobb a valószínűsége a metastaticus betegség kialakulásának. Ezek az összefüggések főképp a rectum tumorokban mutatkoznak meg. p16, EGFR, és a mismatch repair proteinek expressziója és a betegség kimenetele között nem találtunk összefüggést. A p53 és p21 együttesen pozitív esetek rosszabb túléléssel járnak mint a negatív esetek. P21 pozitivitás mellett gyakoribb a lokális recidiva. További eredményeink szerint II. stádiumú colorectalis rákban a klasszikus hisztopatológiai faktorok közül kiemelkedő jelentősége van a vizsgált nyirokcsomók számának. A biológiailag célzott antitestes terápia megjelenése óta napirenden lévő kérdés a terápiás hatás előrejelzése. E tekintetben sok adat gyűlt össze a colorectalis tumorokban az EGFR expresszióról és az EGFR gén amplifikációról. Az általunk észlelt eredmények megfeleltek az irodalmi adatoknak, mind az expresszió fokozódás, mind az amplifikáció gyakoriság tekintetében. Prognosztikai összefüggést nem észleltünk, prediktív szerepét nem értékelhettük, specifikus kezelés hiányában. Mind az EGFR immunhisztokémiai vizsgálat, mind az EGFR amplifikáció kimutatás kivitelezhető a TMA blokkokon. A biológiailag célzott kezelések mellett igény mutatkozik a kemoterápia genetikus szelekciójára is. Ezirányban az 5-FU hatást előrejelző TS és az oxaliplatin terápia prediktor ERCC1 proteinek immunhisztokémiai kimutatásával próbálkoztunk, retrospektív módon, TMA blokkokon. Eredményeink is alátámasztják, hogy a két protein immunhisztokémiai kimutatása csak korlátozott értékű, és nem nyújt megbízható segítséget a terápiás döntés meghozásában.

A tumorbiológiai alap kutatás eredményeinek mindennapi klinikai gyakorlatba történő átültetése révén várható olyan prognosztikai faktorok azonosítása, melyek segítségével előrevetíthető, hogy a korai stádiumú betegek közül kinél fog a betegség kiújulni, illetve áttét fellépni. Másrészt további prediktív faktorok értéke is igazolódhat, melyek a jelenleginél eredményesebb beteg szelekciót biztosíthatnak, és így a colorectalis carcinoma terápiaja individualizálhatóvá válik.

9. Summary

Carcinoma of the large bowel has become one of the most frequent malignancies both in the Western World and in Hungary. Currently colorectal cancer (CRC) represents the second most common malignancy-related cause of death in the developed countries. Development of CRC is a multistep event comprising well characterized genetic alterations which occur often in already established sequences within the epithelial cells of colorectal mucosa preceding the actual appearance of a *sui generis* malignant cell. Our work sums up the results of studies mostly utilizing TMA methods which aimed at the clarification of molecular carcinogenetic events in CRC, mainly at the proteomic level. The work has been focused on the β -catenin-E-cadherin axis. We have shown that diminished β -catenin expression and to certain degree decreased E-cadherin membranous expression is followed by shorter OS and DFS. At the same time – particularly loss of β -catenin membranous expression – an increased metastatic potential characterizes these cases and these relations are primarily hold true for rectal tumors. We failed to show any significant correlations between the disease outcome and p16, EGFR and mismatch proteins' expression. In p53 and p21 positive cases the survival was significantly lower compared to p53 and p21 negative cases. It was strong positive correlation p21 expression and tumor recurrence. Our results also show that within the group canonical histopathological characteristics the number of analyzed regional lymph nodes has profound importance is stage II. CRC. Ever since the introduction of biologically tailored antibody therapies prediction of their efficacy has been in the forefront of oncology. The predictive factors in this regard have mostly been represented by expression of EGFR and also by amplification of the EGFR gene. Our results are in total agreement with the literature, not only with regard to EGFR expression but also concerning gene amplification. We have not been able to establish any prognostic value and predictive evaluation has not been possible due to lack of specific therapy. However, our results provide ample proof for the adequacy of TMA blocks both for immunohistochemical (IHC) analysis of EGFR expression and EGFR gene amplification. In addition to tailored biological therapies the need for genetically based treatment selection is also prevalent. Hence we attempted to utilize TMA blocks in retrospective studies which using immunohistochemistry aimed at the evaluation of detecting TS (a protein assumed to be predictive for 5-FU therapy) and ERCC1 protein (a predictor of oxaliplatin therapy). Our results show that IHC of the two latter proteins has a rather limited value and does not help in determining therapeutical protocols. Direct translation of findings of basic oncological research into clinical practice holds real promises of identification dependable prognostic factors which will allow screening for candidates of recurrence and/or metastatic disease in early stage patients. By the same token there is hope for identifying further predictive factors which will render personalized (tailored) therapy of CRC achievable.

10. Új eredmények

1. Megállapítottuk, hogy a laborunkban használt TMA metodika megbízhatóan alkalmazható a vizsgálni kívánt molekuláris prognosztikai faktorok immunhisztokémiai kimutatására.

2. Rectum carcinomában β -catenin membrán expressziót nem mutató esetekben gyakoribb a metastasis megjelenése. β -catenin nukleáris expressziója esetén szintén gyakoribb a rectum tumorok áttétképzése. β -catenin membrán expressziót nem mutató esetekben az áttét hamarabb jelenik meg. A colon tumoros csoportban nem észleltünk összefüggést a β -catenin-E-cadherin expressziós mintázata és a betegség kimenetele között.

Ezen új eredményeink is alátámasztják, hogy a colorectalis carcinoma genetikailag heterogén kórkép, jelentős különbségek vannak a colon és rectum tumorok kialakulásában.

3. Prognosztikai vizsgálatunkban nagyobb betegcsoportban megerősítettük a β -catenin-E-cadherin expressziós mintázata és a betegség kimenetele között fenti vizsgálatban észlelteket, és ezen betegcsoportban tapasztaltak alapján a β -catenin membrán expresszió független prognosztikai faktornak bizonyult. Ezen utóbbi eredményeink alátámasztják az irodalmi adatokat.

A vizsgált nyirokcsomók száma a beteganyagunkban jelentősen elmaradt a nemzetközi adatoktól. Stage II betegségben a vizsgált nyirokcsomó szám prognosztikus értéke egyértelműen bebizonyosodott, még az alacsony átlagos nyirokcsomó szám mellett is.

Nem tudtunk p16, MSH2, MLH1 expresszió vonatkozásában prognosztikus értéket kimutatni. Az együttes p53 és p21 pozitivitás rossz prognosztikai jel, míg p21 pozitivitás mellett gyakoribb a lokális recidiva.

4. A TS és ERCC1 protein immunhisztokémiai kimutatása nem ad megbízható segítséget az egyénre szabott terápiás döntés meghozásában, csak populáció-szinten szolgáltat megbízható adatokat. Az ERCC1 expresszió rossz prognózissal társul, azonban az összefüggés nem bizonyult szignifikánsnak.

5. Az EGFR amplifikáció FISH metodikával vizsgálható TMA blokkon is. Az irodalmi adatoknak megfelelő gyakoriságban észleltünk EGFR amplifikációt, és a mi betegeinkben is csak laza kapcsolat volt az EGFR immunhisztokémiai kimutathatósága és a gén amplifikáció között.

6. A gastrointestinalis tumorokban észlelt rhabdoid fenotípus különösen rossz prognosztikai jel. Az irodalmi áttekintés azt mutatja, hogy a gastrointestinalis rhabdoid tumorok időskori rossz prognózisú alcsoportot képeznek.

11. Irodalomjegyzék

1. Siegel R, Naisdhadham D, Jemal A: Cancer statistics 2013. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63: 11-30.
2. Kásler M, Ottó Sz: A hazai és nemzetközi daganatos halálozási és megbetegedési mutatók alakulása. *Magyar Onkológia*, 2005, 49: 99-107.
3. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990, 61: 759-767.
4. Goel A, Boland CR: Epigenetics of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 2012, 143: 1442-1460.
5. Ogino S, Goel A: Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Molec Diagn*, 2008, 10: 13-27.
6. Markowitz SD, Bertagnolli MM: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2009, 361: 2449-2460.
7. Buyse M, Piedbois P: Should Dukes' B patients receive adjuvant therapy? A statistical perspective. *Semin Oncol*, 2001, 28: 20-24.
8. Andre T, de Gramont A: Study Group of Clinical Research in Radiotherapies Oncology, Oncology Multidisciplinary Research Group. An overview of adjuvant systemic chemotherapy for colon cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 2004, 4: S22-28.
9. Van Cutsem E, Dicato M, Wils J et al: Adjuvant treatment of colorectal cancer (current expert opinion derived from the Third International Conference: Perspectives in Colorectal Cancer, Dublin, 2001). *Eur.J.Cancer*, 2002, 38: 1429-36.
10. Di Fiore F, Sesboüe R, Michel P et al: Molecular determinants of anti EGFR sensitivity and resistance in metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 2010, 103: 1765-1772.
11. Siena S, Sartore- Bianchi A, Nicolantonio FD et al: Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor- targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009, 101: 1308-1324.
12. Herszényi L, Tulassay Z: Epidemiology of gastrointestinal and liver tumors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2010, 14: 249-258.
13. Parkin DM, Bray F, Ferlay J et al: Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin*, 2002, 55:74-108.

14. Ottó Sz, Kásler M: A rosszindulatú daganatok morbiditási és mortalitási helyzete. MOTESZ Magazin, 2007, 14-21.
15. Gaudi I, Kásler M: A rosszindulatú daganatos halálozás változása 1975 és 2001 között Magyarországon. Magyar Onkológia, 2002, 46: 291-295.
16. Ottó Sz, Kásler M: Rákmortalitás és incidencia hazánkban az európai adatok tükrében. Magyar Onkológia, 2002, 46: 111-117.
17. Alexander J, Watanabe T, Wu TT et al: Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. Am J Pathol, 2001, 158: 527-535.
18. Abdel-Rahman WM, Katsura K, Rens W et al: Spectral karyotyping suggest additional subsets of colorectal cancers characterized by chromosome rearrangement. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 2538-2543.
19. Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C et al: Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. Nat Cell Biol, 2001, 3: 433-438.
20. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science, 1993, 260: 816-819.
21. Grady WM, Carethers JM: Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. Gastroenterology, 2008, 135: 1079-1099.
22. Kane MF, Loda M, Gaida GM et al: Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. Cancer Res, 1997, 57: 808-811.
23. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P et al: Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. N Engl J Med, 1998, 338: 1481-1487.
24. Robinson KL, Liu T, Vandrovcova J et al: Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. J Natl Cancer Inst, 2007, 99: 291-299.
25. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR et al: A national cancer institut workshop on microsatellite instability for cancer detection and familiar praedisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res, 1998, 58: 5248-5257.
26. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M et al: BRAF screening as a low cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. J Med Genet, 2004, 41: 664-668.
27. Wang L, Cunningham JM, Winters JL et al: BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. Cancer Res, 2003, 63: 5209-5212.
28. Issa JP: CpG island methylator phenotype in cancer. Nat Rev Cancer, 2004, 4: 988-993.

29. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M et al: CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 8681-8686.
30. Weisenberg DJ, Siegmund KD, Campan M et al: CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet*, 2006, 38: 787-793.
31. Kambara T, Simms LA, Whitehall VLJ et al: BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut*, 2004, 53: 1137-1144.
32. Tsanou E, Peschos D, Batistatou A et al: The E-cadherin Adhaesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. *Anticancer Res*, 2008, 28: 3815-3826.
33. Shiozaki H, Oka H, Inoue M et al: E-cadherin mediated adhaesion system in cancer cells. *Cancer*, 1996, 77: 1605-1613.
34. van Roy E, Berx G: The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 3756-3788.
35. Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD et al: Structural basis of cell-cell adhaesion by cadherins. *Nature*, 1995, 374: 327-337.
36. Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD et al: Identification of a new catenin: the tyrosin kinase substrate p120cas associated with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol*, 1994, 14: 8333-8342.
37. White BD, Chien AJ, Dawson DW: Dysregulations of Wnt/ β -catenin signalling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology*, 2012, 142: 219-232.
38. Burgess AW, Faux MC, Layton MJ et al: Wnt signaling and colon tumorigenesis- A view from the periphery. *Experimental Cell research*, 2011, 317: 2748-2758.
39. D. Horst: Plastizitat der Wnt- Signalwegaktivitat in Kolonkarzinom. *Pathologe*, 2012, 33: 194-197.
40. Kikuchi A: Regulation of β -catenin signalling in the Wnt pathway. *Biochem Bioph Res Co*, 2000, 268: 243-248.
41. Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H et al: Axin, a negative regulator of the Wnt signalling pathway, forms a complex with GSK- 3 beta and β -catenin and promotes GSK3 beta dependent phosphorylation of β -catenin. *EMBO J*, 1998, 17: 1371-1384.
42. Tetsu O, McCormick F: β -catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 1999, 398: 422-426.

43. Barker N, Van ES JH, Kuipers J et al: Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 2007, 449: 1003-1007.
44. Gregorieff A, Pinto D, Beghtel H et al: Expression pattern of Wnt signalling components in the adult intestine. *Gastroenterology*, 2005, 129: 626-638.
45. Snippert HJ, Van Der Flier LG, Sato T et al: Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell*, 2010, 143: 134-144.
46. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B et al: Mutational analysis of the APC/beta catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res*, 1998, 58: 1130-1134.
47. Samowitz WS, Powers MD, Spirio LN et al: Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. *Cancer res*, 1999, 59: 1442-1444.
48. Hanson CA, Miller JR: Non-traditional roles for the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor protein. *Gene*, 2005, 361: 1-12.
49. Johnson V, Volikos E, Halford SE et al: Exon 3 beta catenin mutations are specifically associated with colorectal carcinomas in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Gut*, 2005, 54: 264-267.
50. Huang SM, Mishina YM, Liu S et al: Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*, 2009, 461: 614-620.
51. Emami KH, Nguyen C, Ma H et al: A small molecule inhibitor of beta catenin/CREB binding protein transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 12682-12687.
52. Bertagnolli MM, Eagle CJ, Zauber AG et al: Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. *N Eng J Med*, 2006, 355: 873-884.
53. Chen S, Liu J, Li G et al: Altered distribution of β -catenin and prognostic roles in colorectal carcinogenesis. *Scand J Gastroenterol*, 2008, 43: 456-464.
54. Han SA, Chun H, Park CM et al: Prognostic significance of β -catenin in colorectal cancer with liver metastasis. *Clin Oncol*, 2006, 18: 761-767.
55. Horst D, Reu S, Kriegl L et al: The intratumoral distribution of nuclear β -catenin is a prognostic marker in colon cancer. *Cancer*, 2009, 115: 2063-2070.

56. Chittenden TW, Howe EA, Culhane AC et al: Functional classification analysis of somatically mutated genes in human breast and colorectal cancers. *Genomics*, 2008, 91: 508-511.
57. Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE et al: Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res*, 1999, 59: 320-324.
58. Markowitz S, Wang J, Myeroff L: Inactivation of type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, 1995, 268: 1336-1338.
59. Takaku, K, Oshima M, Miyoshi H et al: Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (SMAD4) and Apc genes. *Cell*, 1998, 92: 645-656.
60. Tanaka T, Watanabe T, Kazama Y et al: Loss of Smad4 protein expression and 18qLOH as molecular markers indicating lymph node metastasis in colorectal cancer- a study matched for tumor depth and pathology. *J Surg Oncol*, 2008, 97: 69-73.
61. Alhopuro P, Alazzouzi H, Sammalkorpi H et al: SMAD4 levels and response to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 6311-6316.
62. Carethers JM, Hawn MT, Greenon JK et al: Prognostic significance of allelic loss at chromosome 18q21 for stage II colorectal cancer. *Gastroenterology*, 1998, 114: 1188-1195.
63. Iacopetta B: TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat*, 2003, 21: 271-276.
64. Levine AJ: p53 a cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 1997, 88: 323-331.
65. Somasundaram K, Zhang H, Zheng Y-X et al: Arrest of the cell cycle by the tumour suppressor BRCA-1 requires the CDK inhibitor p21. *Nature*, 1997, 389: 187-190.
66. Lin S-CJ, Skapek SX, Lee EY: Genes in the Rb pathway and their knockout in mice. *Semin Cancer Biol*, 1996, 7: 279-289.
67. Sperka T, Wang J, Rudolph KL: DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13: 579-590.
68. Garrity MM, Burgart LJ, Mahoney MR et al.: Prognostic value of proliferation, apoptosis, defective DNA mismatch repair, and p53 overexpression in patients with resected Dukes' B2 or C colon cancer: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol*, 2004, 22: 1572-82.

69. Goh HS, Elnatan J, Low CH et al: p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients: effect of disease dissemination and tumour location. *Int J Oncol*, 1999, 15: 491-8.
70. Petersen S, Thames HD, Nieder C et al: The results of colorectal cancer treatment by p53 status: treatment-specific overview. *Dis Colon Rectum*, 2001, 44: 322-33.
71. Kim ES, Khuri FR, Herbst RS: Epidermal growth factor receptor biology. *Curr Opin Oncol*, 2001, 13: 506-513.
72. Goh LK, Huang F, Kim W et al: Multiple mechanisms collectively regulate clathrin mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol*, 2010, 189: 871-883.
73. Haglund K, Dikic I: The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *J Cell Sci*, 2012, 125: 265-275.
74. Olayioye MA, Neve RM: The ErbB signaling network: receptor heterodimerisation in development and cancer. *EMBO Journal*, 2000, 19: 3159-3167.
75. Han W, Lo HW: Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. *Cancer letters* 2012, 318: 124-134.
76. Ciardiello F, Tortora G: EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*, 2008, 358: 1160-1174.
77. Jorissen RN, Walker F: Epidermal growth factor receptor: mechanism of activation and signalling. *Exp Cell Res*, 2003, 284: 31-53.
78. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME: EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*, 2001, 37: S9-S15.
79. Ooi A, Takehana T, Li X et al: Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study. *Mod Pathol*, 2004, 17: 895-904.
80. Taron M, Ichinose Y, Rosell R et al: Activation mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor are associated with improved survival in gefitinib-treated chemorefractory lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 5878-5885.
81. Moroni M, Sartori-Bianchi A, Benvenuti S et al: Somatic mutation of EGFR catalytic domain and treatment with gefitinib in colorectal cancer. *Ann Oncol*, 2005, 16: 1848-1849.
82. Kobayashi S, Boggon TJ: EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 2005, 352: 786-792.
83. Pritchard CC, Grady WM: Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*, 2011, 60: 116-129.

84. Chung KY, Sia J, Kemeny NE: Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumours that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol*, 2005, 23: 1803-1810.
85. Scartozzi M, Bearzi I, Berardi R et al: Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumours does not correlated with EGFR expression in related metastatic sites: implications for treatment with EGFR-targeted monoclonal antibodies. *J Clin Oncol*, 2004, 22: 4772-4778.
86. Francoual M, Etienne-Grimaldi MC, Formento JL et al: EGFR in colorectal cancer: more than a simple receptor. *Ann Oncol*, 2006, 17: 962-967.
87. Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S: Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol*, 2007, 25: 3238-3245.
88. Bos JL: ras oncogens in human cancer: review. *Cancer Res*, 1989, 49: 4682-4689.
89. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL et al: Roles of the RAF/MEK/ERRK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzym Regul*, 2006, 46:249-279,
90. Barault L, Veyrie N, Jooste V et al: Mutations in the RAS-MAPK, PI3K(phosphatidil inositol-3-OH kinase) signalling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancer. *Int J Cancer*, 2008, 122: 2255-2259.
91. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D et al: Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the „RASCAL II” study. *Br J Cancer*, 2001, 85: 692-696.
92. Artale S, Sartore-Bianchi A, Veronese S et al: Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 4217-4219.
93. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A et al: Fluorouracil leucovorin and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 2009, 27: 663-671.
94. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E et al: Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer: *N Engl j Med*, 2009, 360: 1408-1417.
95. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C et al: KRAS codon 61, and BRAF mutations predict restinace to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*, 2009, 101: 715-721.
96. Grossmann AH, Samowitz WS: Epidermal growth factor receptor pathway mutations and colorectal cancer therapy. *Arch Pathol Lab Med*, 2011, 135: 1278-1282.

97. Jhaweer M, Goel S, Wilson AJ et al: PIK3CA mutation/PTEN expression status predict response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res*, 2008, 68: 1953-1961.
98. Sartore-Bianchi A, Martini M, Malinari F et al: PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoklonal antibodies. *Cancer Res*, 2009, 69: 1851-1857.
99. Bianco R, Garofalo S, Rosa R et al: Inhibition of mTOR pathway by everolimus cooperates with EGFR inhibitor in human tumours sensitive and resistant to anti-EGFR drugs. *Br J Cancer*, 2008, 98: 923-930.
100. Papadopoulos N, Lindblom A: Molecular basis of HNPCC: Mutations MMR genes. *Hum Mut*, 1997, 10: 89.
101. Potter JD: Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91: 916-932.
102. Malkin D, Li FP, Strong LC et al: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. *Science*, 1990, 250: 1233-1238.
103. Bisgaard ML, Fenger K, Bulow S et al: Familial adenomatous polyposis coli (FAP): frequency, penetrance and mutation rate. *Hum Mutat*, 1994, 3: 121-125.
104. Bulow S, Helm NV, Hauge M: The incidence and prevalence of familial polyposis coli in Denmark. *Scand J Soc Med*, 1986, 14:67-74.
105. Howe JR, Roth S, Ringold JC et al: Mutations in the SMAD4/PC4 gene in juvenile polyposis. *Science*, 1998, 280: 1086-1088.
106. Liaw D, Marsh DJ, Li J et al: Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet*, 1997, 16: 64-67.
107. Mehenni H, Gehrig C, Nezu J et al: Loss of LKB1 kinase activity in Peutz Jeghers syndrome, and evidence for allelic and locus heterogeneity. *Am J Hum Genet*, 1998, 63: 1641-1650.
108. Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR et al: Increased risk of cancer in the Peutz Jeghers syndrome. *N Engl J Med*, 1987, 316: 1511-1514.
109. André T, Boni C, Navarro M et al: Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncology*, 2009, 27: 3109-3116.

110. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY: Colon Cancer Survival Rates With the New American Joint Committee on Cancer Sixth Edition Staging. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96: 1420-1425.
111. Morris M, Platell C, de Boer B et al: Population-based study of prognostic factors in stage II colonic cancer. *Br J Surg*, 2006, 93: 866-71.
112. Swanson RS, Compton CC, Stewart AK et al: The prognosis of T3N0 colon cancer is dependent on the number of lymph nodes examined. *Ann Surg Oncol*, 2003, 10: 65-71.
113. Sarli L, Bader G, Iusco D et al: Number of lymph nodes examined and prognosis of TNM stage II colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 2005, 41: 272-279.
114. Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS et al: Prognostic indicators of colon tumours. The gastrointestinal study group experience. *Cancer*, 1986, 57: 1866-1870.
115. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ et al: Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*, 2000, 124: 979-994.
116. Bilimoria KY, Palis B, Stewart AK et al: Impact of tumour location on nodal evaluation for colon cancer. *Dis Colon Rectum*, 2008, 51: 154-161.
117. Beckwith JB, Palmer NF: Histopathology and prognosis of Wilms tumor: results from the first national Wilms tumor study. *Cancer*, 1978, 41: 1937-1948.
118. QUASAR Collaborative G, Gray R, Barnwell J et al: Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomized study. *Lancet*, 2007, 370: 2020-2029.
119. Kelley RK, Venook AP: Prognostic and predictive markers in stage II colon cancer: Is there a role for gene expression profiling?, *Clinical Colorectal Cancer*, 2011, 10: 73-80.
120. Graziano F, Cascinu S: Prognostic molecular markers for planning adjuvant chemotherapy trials in Dukes B colorectal cancer patients: how much evidence is enough? *Ann Oncol*, 2003, 14: 1026-1038.
121. Heidelberg C, Chaudhuri NK, Danneberg P et al: Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour inhibitory compounds. *Nature*, 1957, 179: 663-666.
122. Meta-Analysis group in cancer. Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer: effect of administration schedule and prognostic factors. *Cancer J Clin Oncol*, 1998, 16: 3537-3541.

123. Goldberg SM, Sargent DJ, Morton RF et al: A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 2004, 22: 23-30.
124. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ et al: Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*, 2003, 349: 247–257.
125. Iqbal S, Stoehmacher J, Lenz HJ: Tailored chemotherapy for colorectal cancer: A new approach to therapy. *Cancer Invest*, 2004, 22: 762-773.
126. Kralovanszky J, Adleff V, Hitre E et al: Farmakogenetikai vizsgálatok a fluoropirimidint tartalmazó adjuváns kezelés hatékonyságának előrejelzésére colorectalis daganatokban. *Magyar Onkológia*, 2007, 51: 113-125.
127. Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM et al: Oxaliplatin mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol*, 1998, 25: 4-12.
128. Bohanes P, LaBonte MJ, Lenz H-J: A review of excision repair cross complementation group 1 in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 2011, 10: 157-164.
129. Huang JC, Svodoba DL, Reardon JT et al: Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers. *Proc Natl Acad Sci*, 1992: 89, 3664-3668.
130. Lehmann AR: Nucleotide excision repair and the link with transcription. *Trends Biochem. Sci*, 1995, 20: 402-405.
131. Shirota Y; Stoehmacher J; Brabender. J et al: ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J. Clin. Oncol*, 2001, 19: 4298- 4304.
132. Pare L, Marcuello E , Altés A et al: Pharmacogenetic prediction of clinical outcome in advanced colorectal cancer patients receiving oxaliplatin/5-fluorouracil as first-line chemotherapy. *British Journal of Cancer*, 2008, 99: 1050-055.
133. Battifora H: The multitumor (sausage) tissue block: Novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest*, 1986, 55: 244-248.
134. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J et al: Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*, 2001, 10: 657-662.
135. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A et al: Tissue microarrays for high- throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 1998, 4: 844-847.

136. Egervari K, Szollosi Z, Nemes Z: Tissue microarray technology in breast cancer HER2 diagnostics. *Pathol Res Pract*, 2007, 203: 169-177.
137. Sapino A, Marchio C, Senetta R et al: Routine assesment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray procedure. *Virchows Arch*, 2006, 449: 288-296.
138. Krenács T, Stelkovic É, Molnár B et al: Proteomika a daganatkutatásban: biomarkerek diagnosztikai és klinikai validálása szöveti multiblokk („tissue microarray”) módszerrel: *Orvostudományok*, 2006, 3: 210-222.
139. Fernebro E, Dictor M, Bendhal P et al: Evaluation of the tissue microarray technique for immunohistochemical analysis in rectal cancer. *Arch Pathol Lab Med*, 2002, 126: 702-705.
140. Resnick MB, Routhier J, Konkin T et al: Epidermal growth factor receptor, c-met, β -catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 3069-3075.
141. Hoos A, Nissan A, Stojadinovic A et al.: Tissue microarray molecular profiling of early, node –negative adenocarcinoma of the rectum: a comprehensive analysis. *Clin Cancer Res*, 2002, 8: 3841-3849.
142. Fernebro E, Bendhal P, Dictor M et al: Immunohistochemical patterns in rectal cancer: applications of tissue microarray with prognostic correlations. *Int J Cancer*, 2004, 111: 921-928.
143. Xie D, Sham JST, Zeng WF et al: Heterogenous expression and assiciation of β -catenin, p16, and c-myc in multistage colorectal tumorigenesis and progression detected by tissue microarray. *Int J Cancer*, 2003, 107: 896-902.
144. Su Y, Shrubsole MJ, Ness RM et al: Immunohistochemical expression of Ki-67, Cyclin D1, β -catenin, cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor in human colorectal adenoma: A validation study of tissue microarray. *Cancer Epidem Biomar*, 2006, 15: 1719-1726.
145. Tanyi M, Olasz J, Lukacs G et al: Pedigree and genetic analysis of a novel mutation carrier patient suffering from hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *World J. Gastroenterol*, 2006, 12: 1192-7.
146. Kámory E, Tanyi M, Kolacsek O et al: Two germline alterations in mismatch repair genes found in a HNPCC patient with poor family history. *Pathol Oncol Res*, 2006, 12: 228-233

147. Tanyi M, Kanyári Z, Juhász B et al: A hereditær nonpoliposis kolorektális karcinoma fenotípusának sokszínúsége. Két igazolt mutációt hordozó beteg családja analízise. *Magyar Sebészet*, 2006, 59: 411-421.
148. Tanyi M, Olasz J, Lukács G et al: A new mutation in Muir-Torre syndrome associated with familiar transmission of different gastrointestinal adenocarcinomas. *Eur J. Surgical Oncol*, 2009, 35: 1128-30.
149. Tanyi M, Olasz J, Tanyi JL et al: Q48P mutation in hMLH1 gene associated with Lynch syndrome in three hungarian families. *Fam Cancer*, 2012, 11: 519-524.
150. Buckowitz A, Knaebel H-P, Benner A et al: Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocytic infiltration and low frequency of distant metastases. *Br J Cancer*, 2005, 92: 1746-1752.
151. Ward RL, Turner J, Williams R et al: Routine testing for mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer is justified. *J Pathol*, 2005, 207: 377-388.
152. Hendriks Y, Franken P, Dierssen JW et al: Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumours. *Am J Pathol*, 2003, 162: 469-477.
153. Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E et al: Microsatellite instability analysis and/pr immunostaining for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer? *Virchows Arch*, 2004, 444: 135-141.
154. Spaulding D, Spaulding BO: Epidermal growth factor receptor expression and measurement in solid tumors. *Seminars in Oncology*, 2002, 29 Suppl 14: 45-54.
155. Parham DM, Weeks DA, Beckwith JB: The clinicopathologic spectrum of putative extrarenal rhabdoid tumor. *Am J Surg Pathol*, 1994, 18: 1010-1029.
156. Burger PC, Yu IT, Tihan T et al: Atypical teratoid/rhabdoid tumor of the central nervous system: a highly malignant tumor of infancy and childhood frequently mistaken for medulloblastoma- a pediatric oncology group study. *Am J Surg Pathol*, 1998, 22: 1083-109.
157. Versteeg I, Sevenet N, Lange J et al: Truncating mutation of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature*, 1998, 394: 203-206.
158. Haberler C, Lagner U, Slavec I et al: Immunohistochemical analysis of INI1 protein in malignant pediatric CNS tumors: Lack of INI1 in atypical teratoid/rhabdoid tumors and in a fraction of primitive neuroectodermal tumors without rhabdoid phenotype. *Am J Surg Pathol*, 2006, 30: 1462-1468.

159. Weeks DA, Beckwith JB, Mierau GW: Rhabdoid tumor. An entity or a phenotype. *Arch Pathol Lab Med*, 1989, 113: 113-114.
160. Amrikachi M, Ro JY, Ordonez NG et al: Adenocarcinomas of the gastrointestinal tract with prominent rhabdoid features. *Ann Diag Pathol*, 2002, 6: 357-363.
161. Douglass EC, Valentine M, Rowe ST et al: Malignant rhabdoid tumor: a highly malignant childhood tumor with minimal karyotypic changes. *Genes Chromosomes Cancer*, 1990, 2: 210-216.
162. Perry A, Fuller CE, Judkins AR et al: INI1 expression is retained in composite rhabdoid tumors, including rhabdoid meningiomas. *Modern Pathology*, 2005, 18: 951-958.
163. Medjkane S, Novikov E, Versteeg I et al: The tumor suppressor hSNF5/INI1 modulates cell growth and actin cytoskeleton organisation. *Cancer Res*, 2004, 64: 3406-3413.
164. Shiratsuchi H, Oshiro Y, Saito T et al: Cytokeratin subunits of inclusion bodies in rhabdoid cell, immunohistochemical and clinicopathological study of malignant rhabdoid tumor and epitheloid sarcoma. *Int J Surg Pathol*, 2001, 9: 37-48.
165. Shiratsuchi H, Saito T, Sakamoto A et al: Mutation analysis of human cytokeratin 8 gene in malignant rhabdoid tumor: a possible association with intracytoplasmic inclusion body formation. *Mod Pathol*, 2002, 15: 146-153.
166. Chen Y, Jung SM, Chao TC: Malignant rhabdoid tumor of the small intestine in an adult. *Dig Dis Sci*, 1998, 43: 975-979.
167. Al-nafussi A, O Donnell M: Poorly differentiated adenocarcinoma with extensive rhabdoid differentiation: Clinicopathological features of two cases arising in the gastrointestinal tract. *Pathol Int*, 1999, 49: 160-163.
168. Lee JR, Chamberlin CR, Gerrity RG et al: Malignant rhabdoid tumor of the duodenum. *Ann Diagn Pathol*, 1998, 21: 25-30.
169. Abdulkader I, Suarez-Penaranda JM, Antunez J et al: Resena de dos casos de tumor rhabdoide originados en el intestino delgado. *Rev Esp Enferm Dig*, 2002, 94: 367-373.
170. Kunze E, Heidrich G, Brück W et al: Malignant rhabdoid tumours of the jejunum chest wall and adrenal glands. *Histopathology*, 2007, 50: 659-663.
171. Ng WC, Leong HT, Ma KF et al: Malignant rhabdoid tumour of the oesophagus: a case report. *J.Clin Pathol*, 2004, 56: 713-714.
172. Read HS, Webb JN, Macintyre IMC: Malignant rhabdoid tumor of stomach. *Histopathology*, 1996, 29: 474-477.

173. Pinto JA, Gonzalez Alfonso JE, Gonzalez L et al: Well differentiated gastric adenocarcinoma with rhabdoid areas: A case report with immunohistochemical analysis. *Pathol Res Pract*, 1997, 193: 801-808.
174. Ueyama T, Nagai E, Takashi Y et al: Vimentin positive gastric carcinomas with rhabdoid features: A clinicopathological and immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol*, 1993, 17: 813-819.
175. Chetty RP, Bhathal S: Caecal adenocarcinoma with rhabdoid phenotype: an immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Virchows Arch A*, 1993, 422: 179-182.
176. Marcus VA, Vilorio J, Owen D et al: Malignant rhabdoid tumor of the colon. *Dis Colon Rectum*, 1996, 39: 1322-1326.
177. Yang AH, Chen WYK, Chiang H: Malignant rhabdoid tumour of colon. *Histopathology*, 1994, 24: 89-91.
178. Nakamura K, Nakano K, Nakayama Y et al: Malignant rhabdoid tumor of the colon: Report of a case. *Surg Today*, 1999, 29: 1083-1087.
179. Ohgaki M, Higuchi A, Chou H et al: An extrarenal malignant rhabdoid tumor suspected to originate from the mesentery in an adult: report of a case. *Surg Today*, 2003, 33: 556-559.
180. Takeuchi S, Bartram CR, Ludwig R et al: Mutations of p53 in Wilms tumours. *Mod Pathol*, 1995, 8: 483-487.
181. Buhmeida A, Elzagheid A, Algars A et al: Expression of the cell-cell adhesion molecule β -catenin in colorectal carcinomas and their metastasis. *APMIS*, 2008, 116: 1-9.
182. Hugh TJ, Dillon SA, Taylor BA et al: Cadherin-catenin expression in primary colorectal cancer: a survival analysis. *Br J Cancer*, 1999, 80: 1046-1051.
183. Pancione M, Forte N, Sabatino L et al: Reduced β -catenin and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression levels are associated with colorectal cancer metastatic progression: correlation with tumor associated macrophages, cyclooxygenase 2 and patient outcome. *Hum Pathol*, 2009, 40: 714-725.
184. Wong SCC, Lo ESF, Chan AKC et al: Nuclear β -catenin as a potential prognostic and diagnostic marker in patients with colorectal cancer from Hong Kong. *J Clin Pathol Mol Pathol*, 2003, 56: 347-352.
185. Wong SCC, Lo ESF, Chan AKC et al: Prognostic and diagnostic significance of β -catenin nuclear immunostaining in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 1401-1408.

186. Tatsuguchi A, Kishida T, Fujimori S et al: Differential expression of cyclo-oxygenase-2 and nuclear β -catenin in colorectal cancer tissue. *Aliment Pharm Therap*, 2006, 24: 153-159.
187. Horst D, Kriegl L, Engel J et al: CD133 and nuclear β -catenin: the marker combination to detect high risk cases of low stage colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 2009, 45: 2034-2040.
188. Noshio K, Yamamoto H, Takahashi T et al: Genetic and epigenetic profiling in early colorectal tumors and prediction of invasive potential in pT1 (early invasive) colorectal cancers. *Carcinogenesis*, 2007, 28: 1364-1370.
189. Lugli A, Zlobec I, Minoo P et al: Prognostic significance of the wnt signalling pathway molecules APC, β -catenin and E-cadherin in colorectal cancer- a tissue microarray based analysis. *Histopathology*, 2007, 50: 453-464.
190. Muta H, Noguchi M, Kanai Y et al: E-cadherin gene mutations in signet ring cell carcinoma of stomach. *Jpn J Cancer Res*, 1996, 87: 843-848.
191. Da Silva L, Parry S, Reid L et al: Aberrant expression of E-cadherin in lobular carcinomas of the breast. *Am J Surg Pathol*, 2008, 32: 773-783.
192. Gaya DR, Stuart RC, McKee RF: E-cadherin mutation-associated diffuse gastric adenocarcinoma: penetrance and non-penetrance. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2005, 17: 1425-8.
193. Chow V, Yuen AP, Lam KY et al: A comparative study of the clinicopathological significance of E-cadherin and catenins (alpha, beta, gamma) expression in the surgical management of oral tongue carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001, 127: 59-63.
194. Shimazui T, Schalken JA, Girolodi LA et al: Prognostic value of cadherin-associated molecules (alpha-, beta-, and gamma-catenins and p120cas) in bladder tumors. *Cancer Res*, 1996, 56: 4154-158.
195. Zheng Z, Pan J, Chu B et al: Downregulation and abnormal expression of E-cadherin and beta-catenin in nasopharyngeal carcinoma: close association with advanced disease stage and lymph node metastasis. *Human pathology*, 1999, 30: 458-466.
196. Horvath LG, Henshall SM, Lee CS et al: Lower levels of nuclear beta-catenin predict for a poorer prognosis in localized prostate cancer. *Int.J.Cancer*, 2005, 113: 415-422.
197. Zhou YN, Xu CP, Han B et al: Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World journal of gastroenterology*, 2002, 8: 987-993.

198. Le NH, Franken P, Fodde R: Tumour- stroma interactions in colorectal cancer: converging on b catenin activation and cancer stemness. *Br J Cancer*, 2008, 98: 1886-1893.
199. Chung GG, Provost E, Kielhorn EP et al: Tissue microarray analysis of β -catenin in colorectal cancer shows nuclear phospho- β -catenin is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res*, 2001, 7: 4013-4020.
200. Kapiteijn E, Liefers GJ, Los LC et al: Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer. *J Pathol*, 2001, 195: 171-178.
201. Gray, RG, Quirke, P, Handley K et al: Validation study of a quantitative multigene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for assesment of recurrence risk in patients with stage II colon cancer. *J Clin Oncol*, 2011, 29: 4611-4619.
202. Clark-Langone KM, Sangli S, Krishnakumar J et al: Translating tumor biology into personalized treatment planning: analytical performance characteristics of Oncotype DX Colon Cancer assay. *BMC Cancer*, 2010, 10: 691-702.
203. Neumann J, Horst D, Kriegl L et al: A simple immunohistochemical algorithm predicts the risk of distant metastases in right sided colon cancer. *Histopathology*, 2012, 60: 416-426.
204. Neumann J, Reu S, Kirchner T: Markerprofile für das Fernmetastasierungsrisiko des Dickdarmkarzinoms. *Pathologe*, 2012, 33: 39-43.
205. Benson AB, Schrag D, Somerfield MR et al: American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol*, 2004, 22: 3408-3419.
206. Kern SE, Fearon ER, Tersmette KW et al: Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma [corrected]. *JAMA*, 1989, 261: 3099-103.
207. Carneiro FP, Ramalho LN, Britto-Garcia S et al: Immunohistochemical expression of p16, p53, and p63 in colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Dis Colon Rectum*, 2006, 49: 588-594
208. 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, 436: 224-228.
209. Mottolese M, Buglioli S, Piperno G et al: Bio-pathological factors of prognostic value in colorectal adenocarcinomas. *Exp Clin Cancer Res*, 2003, 22: 163-166.
210. Xu G, Wang HF, He G et al: Expression and significance of P53 and P21 in nasal NK/T-cell lymphoma. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2010, 41: 132-136.
211. Noske A, Lipka S, Budczies J et al: Combination of p53 expression and p21 loss has an independent prognostic impact on sporadic colorectal cancer. *Oncol Rep*, 2009, 22: 3-9.

212. Lam AK, Ong K, Giv MJ et al: p16 expression in colorectal adenocarcinoma: marker of aggressiveness and morphological types. *Pathology*, 2008, 40: 580-585.
213. Lee JC, Wang ST, Chow NH et al: Investigation of the prognostic value of coexpressed erbB family members for the survival of colorectal cancer patients after curative surgery. *Eur J Cancer*, 2002, 38: 1065-1071.
214. Popat S, Hubner R, Houlston RS: Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*, 2005, 23: 609–618.
215. Parc Y, Gueroult S, Mourra N et al. Prognostic significance of microsatellite instability determined by immunohistochemical staining of MSH2 and MLH1 in sporadic T3N0M0 colon cancer. *Gut*, 2004, 53: 371–375
216. Kim GP, Colangelo LH, Wieand HS et al.: Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *J Clin Oncol*, 2007, 25: 767–772.
217. Broll R, Busch P, Duchrow M et al: Influence of thymidylate synthase and p53 protein expression on clinical outcome in patients with colorectal cancer. *Int J Colorecta Dis*, 2005, 20: 94-102.
218. Lenz HJ, Danenberg KD, Leichman CG et al: p53 and thymidylate synthase expression in untreated stage II colon cancer: associations with recurrence, survival, and site. *Clin Cancer Research*, 1998, 4: 1227-1234.
219. Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W et al: A multivariate analysis of genomic polymorphisms: Prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer*, 2004, 91: 344-354.
220. Aguiar S, Lopes A, Soares FA et al: Prognostic and predictive value of the thymidilate synthase expression in patients with non-metastatic colorectal cancer. *Eu J Surg Oncol*, 2005, 31: 863-868.
221. Kuramochi H, Hayashi K, Uchida K et al: 5-Fluorouracil related gene expression levels in primary colorectal cancer and corresponding liver metastasis. *Int J Cancer*, 2006, 119: 522-526.
222. Trocha SD, Saha SS, Wiese D et al: Differential expression of thymidilate synthase in colorectal tumours and matched lymph nodes: Impact on adjuvant treatment. *Am Surg*, 2003, 69. 918-922.

223. Lindebjerg J., Nielsen NJ., Damkier Hoeffding L et al: Immunohistochemical expression of thymidylate synthase as predictor of response to capecitabine in patients with advanced colorectal adenocarcinoma. *APMIS*, 2005, 113: 600-602.
224. Kamoshida S, Matsuoka H, Shioyama K et al: Immunohistochemical analysis of thymidylate synthase, p16, cyclin dependent kinase 4 and cyclin D1 in colorectal cancers receiving preoperative chemotherapy: significance of p16 mediated cellular arrest as an indicator of chemosensitivity to 5- fluorouracil. *Pathol Int*, 2004, 54: 564-575.
225. Popat S, Wort R, Houlston RS: Relationship between thymidylate synthase genotype and TS expression: a tissue microarray analysis of colorectal cancers. *Int J Surg Pathol*, 2005, 13, 127-133.
226. Martinez-Balibrea E, Abad A, Aranda E et al: Pharmacogenetic approach for capecitabine or 5 Fluorouracil selection to be combined with oxaliplatin as first line chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 2008, 44: 1229-1237.
227. Moldvay J, Pápay J, Puskás R et al: ERCC1 expresszió vizsgálata platinabázisú kezelésben részesülő tüdőrákos betegekben. *Magyar Onkológia*, 2011, 55: 105-109.
228. Lee K-H, Min HS, Han S-W et al: ERCC1 expression by immunohistochemistry and EGFR mutations in resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2008, 60: 401-407.
229. Kwon H-C, Roh MS, Oh SY et al: Prognostic value of expression of ERCC1, thymidylate synthase and glutathion S-transferase P1 for 5-fluorouracil/oxaliplatin chemotherapy in advanced gastric cancer. *Ann Oncol*, 2007, 18: 504-509.
230. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S et al: Gene copy number for epidermal growth factor receptor and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol*, 2005, 6: 279-286.
231. Capuzzo F, Finocchiaro G, Rossi E: EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients. *Ann Oncol*, 2008, 19: 717-723.

12. Saját közlemények jegyzéke

12.1. Hivatalos publikációs lista



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/191/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Tóth László

Neptun kód: CCJU53

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

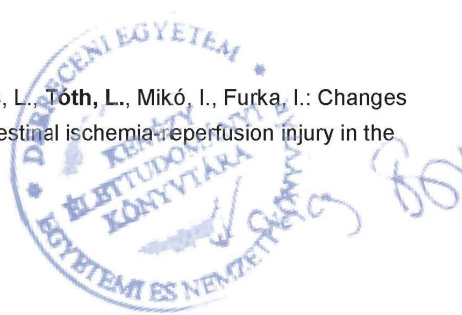
A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. András, C., **Tóth, L.**, Molnár, C., Tanyi, M., Csiki, Z., Dezső, B., Pósn, J., Shemirani, A., Csiki, E., Szántó, J.: Correlations between Clinicopathological Parameters and Molecular Signatures of Primary Tumors for Patients with Stage T3N0 Colorectal Adenocarcinomas: A Single Center Retrospective Study on 100 Cases.
Hepato-Gastroenterol. 59 (116), 1091-1097, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5754/hge12041>
IF:0.658 (2011)
2. **Tóth, L.**, András, C., Molnár, C., Tanyi, M., Csiki, Z., Molnár, P.P., Szántó, J.: Investigation of β -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. 18 (2), 429-437, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-011-9463-y>
IF:1.366 (2011)
3. **Tóth, L.**, Nemes, Z., Gomba, S., Asztalos, L., Molnár, C., András, C., Szentirmay, Z., Molnár, P.: Primary rhabdoid cancer of the ileum: A case report and review of the literature.
Pathol. Res. Pract. 206 (2), 110-115, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2009.02.013>
IF:1.258

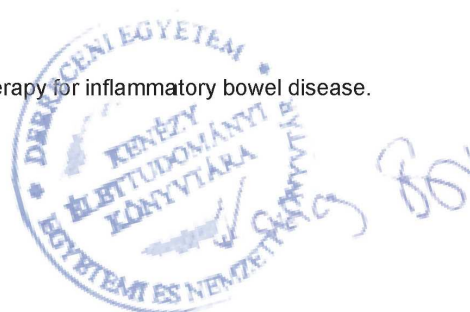


További Közlemények

4. Németh, N., Kiss, F., Klárik, Z., Pető, K., Ványolos, E., **Tóth, L.**, Furka, I., Mikó, I.: Testicular ischemia-reperfusion may alter micro-rheological parameters in laboratory rats.
Clin. Hemorheol. Microcirc. Epub ahead of print (2013)
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-131664>
IF:3.398 (2011)
5. Ilonczai, P., Tóth, J., **Tóth, L.**, Altorjay, I., Boda, Z., Palatka, K.: Catheter-directed thrombolysis in inflammatory bowel diseases: Report of a case.
World J. Gastroenterol. 18 (34), 4791-4793, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v18.i34.4791>
IF:2.471 (2011)
6. Kotán, R., Németh, N., Kiss, F., Pószán, J., Miszti-Blasius, K., **Tóth, L.**, Furka, I., Mikó, I., Sápy, P., Szentkereszty, Z.: Micro-rheological changes during experimental acute pancreatitis in the rat.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 51 (4), 255-264, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2012-1531>
IF:3.398 (2011)
7. Tanyi, M., Olasz, J., Tanyi, J.L., **Tóth, L.**, Antal-Szalmás, P., Bubán, T., András, C., Urbancsek, H., Garami, Z., Csuka, O., Damjanovich, L.: Q48P mutation in the hMLH1 gene associated with Lynch syndrome in three Hungarian families.
Fam. Cancer. 11 (3), 519-524, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10689-012-9515-9>
IF:1.302 (2011)
8. Harangi, M., Kovács, T., Rákóczi, É., Rejtő, L., Mikó, L., **Tóth, L.**, Szűcs, G., Galuska, L., Paragh, G.: Malignancy or inflammation?: A case report of a young man with fever of unknown origin.
Pathol. Oncol. Res. 17 (2), 409-413, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-010-9315-1>
IF:1.366
9. Bráth, E., Németh, N., Kiss, F., Sajtos, E., Hevér, T., Mátyás, L., **Tóth, L.**, Mikó, I., Furka, I.: Changes of local and systemic hemorheological properties in intestinal ischemia-reperfusion injury in the rat model.
Microsurgery. 30 (4), 321-326, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.20707>
IF:1.555



10. Hevér, T., Németh, N., Bráth, E., **Tóth, L.**, Kiss, F., Sajtos, E., Mátyás, L., Szaszgó, J., Drimba, L., Peitl, B., Csiki, Z., Mikó, I., Furka, I.: Morphological, hemodynamical and hemorheological changes of mature artificial saphenous arterio-venous shunts in the rat model.
Microsurgery. 30 (8), 649-656, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.20784>
IF:1.555
11. Marincsák, R., Tóth, I.B., Czifra, G., Márton, I., Redl, P., Tar, I., **Tóth, L.**, Kovács, L., Bíró, T.: Increased expression of TRPV1 in squamous cell carcinoma of the human tongue.
Oral Dis. 15 (5), 328-335, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01526.x>
IF:1.922
12. Tanyi, M., Olasz, J., Lukács, G., Tanyi, J.L., **Tóth, L.**, Antal-Szalmás, P., Rész, Z., Bubán, T., András, C., Damjanovich, L.: A new mutation in Muir-Torre syndrome associated with familial transmission of different gastrointestinal adenocarcinomas.
Eur. J. Surg. Oncol. 35 (10), 1128-1130, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2009.03.011>
IF:2.564
13. Papp, M., Földi, I., Nemes, É., Udvardy, M., Hársfalvi, J., Altorjay, I., Máté, I., Dinya, T., Várvolgyi, C., Barta, Z., Veres, G., Lakatos, P.L., Tumpek, J., **Tóth, L.**, Szathmári, E., Kapitány, A., Gyetvai, Á., Korponay-Szabó, I.: Haptoglobin polymorphism: A novel genetic risk factor for celiac disease development and its clinical manifestations.
Clin. Chem. 54 (4), 697-704, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2007.098780>
IF:5.579
14. Simon, Z., Tarr, T., **Tóth, L.**, Szűcs, G., Illés, Á.: Cutaneous vasculitis as an initiating paraneoplastic symptom in Hodgkin lymphoma.
Rheumatol. Int. 28 (7), 719-723, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-007-0513-4>
IF:1.27
15. Barta, Z., **Tóth, L.**, Zeher, M.: Pulse cyclophosphamide therapy for inflammatory bowel disease.
World J. Gastroenterol. 12 (8), 1278-1280, 2006.



16. Kámory, E., Tanyi, M., Kolacsek, O., Olasz, J., **Tóth, L.**, Damjanovich, L., Csuka, O.: Two germline alterations in mismatch repair genes found in a HNPCC patient with poor family history.
Pathol. Oncol. Res. 12 (4), 228-233, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02893417>
IF:1.241
17. Kapitány, A., **Tóth, L.**, Tumpek, J., Csípő, I., Sipos, E., Wooley, N., Partanen, J., Szegedi, G., Oláh, É., Sipka, S., Korponay-Szabó, I.: Diagnostic significance of HLA-DQ typing in patients with previous coeliac disease diagnosis based on histology alone.
Aliment. Pharmacol. Ther. 24 (9), 1395-1402, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.03133.x>
IF:3.287
18. Tanyi, M., Olasz, J., Lukács, G., Csuka, O., **Tóth, L.**, Szentirmay, Z., Rész, Z., Barta, Z., Tanyi, J.L., Damjanovich, L.: Pedigree and genetic analysis of a novel mutation carrier patient suffering from hereditary nonpolyposis colorectal cancer.
World J. Gastroenterol. 12 (8), 1192-1197, 2006.
19. Barta, Z., Rész, Z., Csiki, Z., Dévényi, K., Buris, L., **Tóth, L.**, Zeher, M.: Infliximab and surgical therapy in a patient with severe crohn's disease: A case report.
Case Rep. Clin. Pract. Rev. 6 (1), 281-284, 2005.
20. Barta, Z., Mekkel, G., Csípő, I., **Tóth, L.**, Szakáll, S., Szabó, G.G., Bakó, G., Szegedi, G., Zeher, M.: Microscopic colitis: A retrospective study of clinical presentation in 53 patients.
World J. Gastroenterol. 11 (9), 1351-1355, 2005.
21. Barta, Z., Miltényi, Z., **Tóth, L.**, Illés, Á.: Hypokalemic myopathy in a patient with gluten-sensitive enteropathy and dermatitis herpetiformis Duhring: A case report.
World J. Gastroenterol. 11 (13), 2039-2040, 2005.
22. Miltényi, Z., Keresztes, K., Garai, I., Édes, I., Galajda, Z., **Tóth, L.**, Illés, Á.: Radiation-induced coronary artery disease in Hodgkin's disease.
Cardiovasc. Radiat. Med. 5 (1), 38-43, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carrad.2004.04.004>
23. Soltész, P., Szekanez, Z., Végh, J., Lakos, G., **Tóth, L.**, Szakáll, S., Veres, K., Szegedi, G.: Catastrophic antiphospholipid syndrome in cancer.
Haematologia (Budap). 30 (4), 303-311, 2000.
IF:0.405

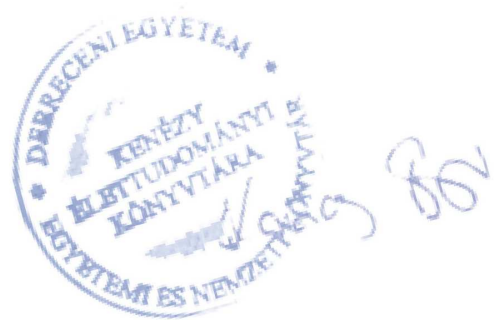


Összesített impakt faktor: 34.595

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 3.282

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.05.17



12.2. Magyar közlemények

1. Szilasi M, Fodor A, Szluha K, Szántó J, **Tóth L**, Szilasi ME, Budai M, Adamecz Zs.: Ismeretlen primer tumor kemo-radioterápiás kezelésének eredményei. *Medicina Thoracalis*, 2012, 65: 102-105.
2. Kovács E, Zeher M, Szántó J, Pásztor É, **Tóth L**, Pfliegler Gy.: Idiopathias retroperitonealis fibrosis (Ormond-kór) társulása súlyos cardiomyopathiával: fiatal férfi betegünk esetbemutatása. *LAM*, 2012, 22: 417-422.
3. Bubán Tamás, **Tóth László**, Tanyi Miklós, Kappelmayer János, Antal-Szalmás Péter: Ki-67- egy régi játékos új arcai. *Orvosi Hetilap*, 2009, 150: 1059-1070.
4. Papp M, Nemes É, Földi I, Udvardy M, Hársfalvi J, Altorjay I, Máté I, Dinya T, Várvölgyi Cs, Barta Z, Veres G, Lakatos PL, Tóth L, Szathmári E, Kapitány A, Gyetvai Á, Korponay-Szabó I: Haptoglobin polimorfizmus: Új genetikai kockázati tényező a coeliakia kialakulásában és klinikai megjelenési formáiban. *Gyermekegyógyászat*, 2008, 59: 264-270.
5. Tarr T., Kiss E., **Tóth L.**, Szűcs G., Illés Á.: Cutan vasculitis, mint bevezető paraneoplasia Hodgkin lymphomában. *Hematologiai és transfuziologia*, 2007, 40: 15-20.
6. Tanyi M., Kanyári Z. Juhász B., Lukács G., Olasz J., Kámory E., Csuka O., **Tóth L.**, Damjanovich L.: A hereditær nonpoliposis kolorektális karcinoma fenotípusának sokszínúsége. Két igazolt mutációt hordozó beteg családfa analízise. *Magyar Sebészet* 2006, 59: 411-421.
7. dr. Mekkel Gabriella, dr. Barta Zsolt, dr. Ress Zsuzsa, dr. Gergely Lajos, dr. Zeher Margit, dr. Kovács Judit, **dr. Tóth László**, dr. Buris László: Coeliakia és splenopulpoma együttes előfordulása anaemia hátterében. *LAM*, 2005, 15: 210-213.
8. Kapitány A, Korponay-Szabó I, **Tóth L**, Tumpek J, Csípő I, Woolley N, Partanen J, Szegedi Gy, Sipka S.: HLA-DQ allélek diagnosztikus jelentősége szuboptimális módon felállított coeliakia diagnózis esetén. *Gyermekegyógyászat*, 2004, 55: 443-448

9. Dr. Miltényi Zsófia, Dr. Garai Ildikó, Dr. Édes István, Dr. Galajda Zoltán, **Dr. Tóth László**, Dr. Keresztes Katalin, Dr. Váróczy László, Dr. Illés Árpád: Korai coronariasclerosis Hodgkin kórban. Magy Belorv Arch, 2003, 56: 157-162

10. **Dr. Tóth László**, Dr. Szakáll Szabolcs, Dr. Káposzta Zoltán, Dr. Udvardy Miklós: Rectum carcinomával társult agyi mélyvénás thrombosis. Orv. Hetilap, 2000, 141: 2493-2496.

11. Dr. Soltész Pál, Dr. Szekanecz Zoltán, Dr. Végh Judit, Dr. Lakos Gabriella, **Dr. Tóth László**, Dr. Szakáll Szabolcs, Dr. Veres Katalin, Dr. Szegedi Gyula: Antifoszfolipid katasztrófa szindróma daganatos betegben. Orv. Hetilap, 1999, 140: 2917-2920.

12.3. Az értekezéshez kapcsolódó kongresszusi előadások, poszterek

1. Dr. Szakáll Szabolcs, Dr. Kozma László, **Dr. Tóth László**, Dr. Gomba Szabolcs: Investigation of the p53 and p21 proteins in colorectal carcinoma. Magyar Gasztroenterológiai Társaság 41. Nagygyűlése, Balatonaliga, 1999. június. 8-12.
2. **Tóth L.**, András Cs, Molnár Cs, Szántó J.: Metastasis képződés és B-catenin, E-cadherin expresszió vizsgálata tissue microarray módszerrel Dukes B2 stádiumú colorectalis carcinomában. MKOT IV. Kongresszusa, Budapest, 2006. november 16-18. Magyar Onkológia 50(3S), 26.
3. **Tóth László**, Nemes Zoltán, Gomba Szabolcs, Asztalos László, Szentirmay Zoltán, Molnár Péter: Az ileum primaer rhabdoid carcinómája: Esetismertetés és irodalmi áttekintés. Magyar Pathologus Társaság 66. kongresszusa, Balatonfüred, 2007.10.04-06.
4. András Cs., **Tóth L.**, Schlachter K., Enyedi A., Pószán J., Szántó J.: Célzott oxaliplatin kemoterápia colorectalis tumorokban. Mi az elmélet és hol tart a gyakorlat? MKOT V. Kongresszusa, Budapest, 2008. november 6-8.
5. **Tóth L.**, András Cs., Schlachter K., Molnár Cs., Szántó J.: Metastaticus colorectalis carcinoma. Pathologiai prognosztikai factorok vizsgálata tissue microarray módszerrel. MKOT V. Kongresszusa, Budapest, 2008. november 6-8.
6. **Tóth László**, András Csilla, Tanyi Miklós, Damjanovich László, Molnár Csaba, Szántó János: TMA metodika használhatóságának vizsgálata vastagbél tumor mikrosatellita statusának vizsgálatánál Amsterdam pozitív betegekben. MKOT VI. Kongresszusa, Budapest, 2010. november 16-18.

13. Tárgyszavak

colorectalis carcinoma, prognosztikai faktorok, TMA, β -catenin, E-cadherin

Keywords:

colorectal cancer, prognostic factors, TMA, β -catenin, E-cadherin

14. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. András Csilla Andjunktusnőnek, a PhD értekezés elkészítéséhez nyújtott valamennyi segítségét, a szakmai irányítást, valamint a közlemények elkészítésében való részvételt.

Hálásan köszönöm Dr. Szántó János Professor Úrnak, korábbi témavezetőmnek, a munka elkezdéséhez nyújtott segítségét, a számtalan ötletet, tanácsot, szakmai irányítást, illetve közreműködését a kísérletes munka anyagi háttérének biztosításában, valamint a tudományos kongresszusokon való részvételem lehetővé tételét.

Köszönöm Dr. Nemes Zoltán Professor Úrnak, a Pathologiai Intézet korábbi igazgatójának, hogy lehetővé tette a PhD tanulmányaim elkezdését és a kísérletes munka elvégzését.

Köszönöm Dr. Méhes Gábor Tanár Úrnak, a Pathologiai Intézet jelenlegi vezetőjének, hogy a PhD értekezésemet elkészíthettem.

Köszönettel tartozom a munkám elkészítéséhez adatokat szolgáltató kollégák segítségét: Dr. Tanyi Miklós Adjunktus Úrnak, Dr. Damjanovich László Professor Úrnak és Dr. Asztalos László Főorvos Úrnak.

Köszönöm Dr. Molnár Péter Professor Úrnak a közlemények és az értekezés elkészítésében nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Molnár Csaba Tanársegéd Úrnak a kísérletes munka adatainak feldolgozásában nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Szakáll Szabolcs Főorvos Úrnak a pathologiai tanulmányaimban nyújtott segítségét és szakmai irányításait.

Köszönet illeti a Pathologiai Intézet asszisztenseit, akik nélkül a számtalan szövettani metszet nem készülhetett volna el: Szeőcs Judit, Tóth Mónika, Rigó Gyuláné, Virágh Judit, Bessenyei Mária, Leiter Csabáné, Porcellánné László Mónika, Farkas Tamásné.

Köszönettel tartozom Hodosi Katalinnak, a munkában lévő statisztikai számításokért.

Köszönetemet fejezem ki a Klinikai Onkológusok Munkacsoportja Alapítványnak, az értekezés elkészítéséhez nyújtott támogatásért.

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

Köszönöm családomnak: szüleimnek és feleségemnek, hogy támogattak a munka elkészítése során, és türelemmel viselték távollételem a kísérletes munka, kongresszusok, illetve közlemények elkészítése alatt.

15. Támogatások

A PhD értekezés alapjául szolgáló tanulmányok a Klinikai Onkológusok Munkacsoportja Alapítvány támogatásával készültek.

Készült a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 sz. „Vaszkuláris és kardiális kutatóhálózat: Az ér- és a kardiovaszkuláris betegségek patomechanizmusai, diagnosztikai, farmakológiai befolyásolhatóságuk az alapkutatás szintjén” című pályázat támogatásával.

The work was supported by a grant offered by the Hungarian Society of Clinical Oncology.

The publication is supported by the TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045. „Research network on vascular biology/medicine” project.