

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Hisztopatológiai és molekuláris patológiai prognosztikai faktorok vizsgálata bél tumorokban

Dr. Tóth László

Témavezető: Dr. András Csilla



DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2013

Hisztopatológiai és molekuláris patológiai prognosztikai faktorok vizsgálata bél tumorokban

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Tóth László

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája
(klinikai és experimentális onkológia programja) keretében

Témavezető: Dr. András Csilla, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Ádány Róza, az MTA doktora
tagok: Dr. Balázs Margit, az MTA doktora
Dr. Tóth József, az MTA doktora

doktori szigorlat időpontja: 2013. október 9.

Az értekezés bírálói:

Dr. Hernádi Zoltán, az MTA doktora
Dr. Torday László, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Ádány Róza, az MTA doktora
tagok: Dr. Balázs Margit, az MTA doktora
Dr. Tóth József, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2013. október 9.

1.Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1.Epidemiológiai adatok

A rosszindulatú daganatos megbetegedések között a vastagbélrák a nyugati világban és hazánkban is az egyik leggyakoribb. Magyarországon a daganatos betegségek között a colorectalis rák előfordulási gyakorisága mind férfiakban, mind nőkben a második helyen áll, és a daganatos halálozási sorrendben is a második helyet foglalja el. A Nemzeti Rákregiszter, illetve a KSH adatai alapján Magyarországon 2003-ban 8658, míg 2005-ben 9062 újonnan felfedezett colorectalis carcinomát jelentettek be. Ugyanezen években a colorectalis rák okozta halálozás 2003-ban férfiaknál 2787, nőknél 2311 eset, 2005-ben férfiaknál 2462, nőknél 2095 eset volt. 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.

1.2. A colorectalis rák kialakulása, molekuláris biológiája

A colorectalis carcinoma kialakulása soklépcsős folyamat, mely során különféle, többnyire már jól definiált és jellemzett genetikai változások következnek be. A genomot érintő változások mellett az epigenetikai változások jelentősége is ismert. A colorectalis carcinoma genetikai szempontból több csoportba sorolható a jelen lévő főbb molekuláris jellegzetességek alapján. Az egyes molekuláris útvonalakon eltérő genetikai háttérű daganatok alakulnak ki, melyek többnyire hasonló morfológiát mutatnak. A vastagbél carcinomában észlelt genomikus és epigenetikai eltérések négy fő csoportba sorolhatók:

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

Több specifikus génhiba is leírásra került, illetve ismertté vált a colorectalis carcinogenesisben több szignálút vonal szerepe.

A β -catenin és az E-cadherin szerepe ismert a sejt-sejt adhézióban. Az E-cadherin 120 kDa molsúlyú transzmembrán glikoprotein, a 16q22 kromoszómán lévő CDH1 gén kódolja. Az extracelluláris domén kalcium függő módon kapcsolódik a szomszédos sejt cadherin molekulájához. Intracellulárisan az α -catenin, β -catenin és γ -catenin az E-cadherinnel képez komplexet és biztosítja az actin cytoszeletális proteinhez való kapcsolódást. A β -catenin a Wnt szignalizációban is szerepel. Normális Wnt szignalizáció esetén nem stimulált sejtben az APC/GSK3b axin destrukciós komplex megköti a β -catenint, és így lehetővé válik a degradációja. A receptor-ligand kapcsolódás esetén a GSK3 gátlása után a β -catenin kiszabadul a destrukciós komplexből és a szabad β -catenin bejut a magba, ahol kötődik a TCF/LEF transzkripció faktorhoz. A képződő komplex aktiválja a c-myc és ciklin D1, matrix metalloproteinase7, CD44 transzkripcióját. Funkcionáló APC protein hiányában a β -catenin szabályozatlan intracelluláris akkumulációja és a c-myc és ciklin D1 gének konstitutív expressziója történik. A vastagbél nyálkahártyában a Wnt szignálút vonal a crypta hám folyamatos megújulásában játszik szerepet. A sporadikus colorectalis rák 70%-ában észlelhető APC mutáció, mely korai esemény, már az adenoma stádiumban kimutatható. Ritkábban a β -catenin CTNNB1 mutációja is előfordul.

A p53 (TP53) tumor szuppresszor gén, melynek mutációja a colorectalis rákok több mint felében kimutatható. 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. Mint az APC, kulcsszerepet tölt be a carcinogenesisben, és bár kiterjedt kutatások folytak ezirányban, nem igazolódott sem prognosztikus, sem prediktív szerepe.

Az EGFR a humán epidermális növekedési faktor család (HER-erB) tagja. Aktiválódása kulcsesemény a tumor növekedésben és progresszióban, beleértve az angiogenesis, inváziót és metastasis képzést. A receptor- ligand kapcsolódás mitogén szignalizációs kaszkádot indít el, többek között a RAS-MAPK, PI3K-Akt és foszfolipáz C útvonalakon. Az EGFR overexpressziója számos tumortípusban kimutatható és általában rossz prognózist jelez. Az EGFR receptor több biológiai célzott terápiás szer célpontja. A receptor intracelluláris szignál útvonalai szoros interakciókat mutatnak, mely a tumorsejteknek escape mechanizmusokat- menekülési útvonalakat kínálhatnak a farmakológiailag blokkolt szignálút „megkerülésére”, mely a terápia rezisztencia oka lehet. A terápia rezisztens esetek miatt igen fontos olyan biomarkerek azonosítása, melyek előjelzik a terápiás hatást, és így kijelölhetik azon betegeket, akik a célzott terápiából profitálhatnak.

1.3. A colorectalis carcinoma családi halmozódása

A vastagbél carcinomák túlnyomó része, mintegy 70% sporadikus. Familiáris halmozottságról akkor beszélünk, ha legalább egy elsőfokú rokonnál ismert colorectalis carcinoma, de nem bizonyított az örökletesség (10-30%). Az öröklődő colorectalis carcinoma szindrómák mendeli szabályok alapján recesszív vagy domináns módon öröklődnek.

Az örökletes colorectalis carcinoma szindrómák közül leggyakoribb a HNPCC, más néven Lynch-szindróma, melyben valamelyik MMR gén germline mutációja mutatható ki. Ez a csoport teszi ki az összes colorectalis carcinoma 2-4%-át. A prognózis többnyire jobb, mint a sporadikus vastagbél carcinomákra jellemző.

További örökletes colorectalis carcinoma szindrómák is ismertek: Li-Fraumeni-szindróma: autoszomális domináns öröklésmenettel jellemezhető kórkép, melyben a p53 germline mutációja igazolható. Familiáris adenomatosus polyposis coli szindróma, FAP: Az APC gén germline mutációja mutatható ki,

(5q21-22), autoszomális domináns öröklésmenet jellemzi. Variánsai a Gardner-szindróma és Turcot-szindróma. Juvenilis polyposis, autosomális domináns öröklésmenet jellemzi. Legtöbbször a SMAD4/DPC4 tumor szuppresszor génben van mutáció. A Cowden-szindróma autoszomális domináns öröklésmenetű kórkép, PTEN mutáció mutatható ki. Peutz- Jeghers-szindróma autoszomális domináns öröklésmenetű kórkép, STK11 (LKB1) mutáció jellemző (19p13).

1.4. Prognosztikai faktorer, prediktív faktorer

A colorectalis carcinoma klasszikus prognosztikai faktorer: 1. A tumor stádium. 2. Negatív nyirokcsomó státusz esetén a vizsgált nyirokcsomók száma. 3. Az életkor- rosszabb a prognózis a fiatal és időskori tumorok esetén. 4. Nemek tekintetében a nők kilátásai szignifikánsan jobbak. 5. Lokalizációt elemelve 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. A perforatio vagy az obstructio is rossz prognosztikai jel.

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.

Prognosztikus értékű molekuláris markerek: Mikroszatellita instabilitás (kedvező), kromoszóma instabilitás (kedvezőtlen), 18q deléció (kedvezőtlen), BRAF V600E mutáció (kedvezőtlen), KRAS mutáció, PIK3CA mutáció- mindkettő kedvezőtlen.

A colorectalis carcinoma adjuváns kezelésében alkalmazott standard gyógyszer, az 5-FU esetén már ismert a MSI negatív prediktív szerepe.

Emellett további, az 5-FU hatást előrejelző, potenciális prediktív markerek is ismertek. A legfontosabbak a timidilát-szintáz (TS), a timidilát-foszforiláz, dihidropirimidin-dehidrogenáz és a metilén-tetrahidrofolát-reduktáz (MTHFR). A fokozott TS expresszió II. stádiumú tumorokban rossz prognózissal társul. A magas TS expresszió esetén kisebb az 5-FU kezelés hatása. A legpontosabb eredmények a TS mRNS szint RT-PCR reakcióval történő meghatározásából származtak.

A metastaticus colorectalis carcinoma kezelésében a platina vegyületek közül az oxaliplatin az egyik standard gyógyszer. Az excision repair cross complementation group 1 (ERCC1) a nukleotid excíziós repair (NER) rendszer tagja, a 2-30 nukleotid hosszúságú szakaszok helyreállítását végzi. Az ERCC1 expressziójának mértéke arányban áll az oxaliplatinra adott válasszal. Magas ERCC1 expresszió esetén valószínű az oxaliplatinnal szembeni rezisztencia.

1.5. Szöveti multiblokk- tissue microarray (TMA) módszer

Az elmúlt években számos nagy tanulmány vizsgálta és igazolta a módszer használhatóságát a daganat proteomikai kutatásokban.

A TMA metodika lényege nagyszámú paraffinba ágyazott szövetmintából származó szövethengerek egy recipiens blokkba összeépítése, mely után a kész multiblokkokon elvégezhetőek a szokásos hisztológiai technikák, immunhisztokémiai reakciók és FISH reakciók. Egy TMA blokkba akár több száz külön-külön blokkból származó szövethengerek- core-ok építhetők egybe, ennek következtében a technika kiemelkedően kedvező költség-haszon aránnyal rendelkezik. A TMA metodika 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.

2. 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.

1. Vizsgálni kívántuk 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. A β -catenin és E-cadherin expresszió immunhisztokémiai kimutatása használható-e prognosztikai faktorként Dukes B2- II. stádiumú colorectalis carcinomában.

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.

3. Betegek, anyagok és módszerek

3.1 TMA validáció

A DE OEC-en vizsgált HNPCC-es vastagbél carcinomás betegcsoport mintáin végeztük el a TMA validációs vizsgálatunkat.

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. A 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 protein kimutatását végeztük. A következő lépésben ugyanezen betegek műtéti anyagából szöveti multiblokkot építettünk. Minden mintából 3-3 db 1 mm átmérőjű core került kiemelésre és 5x10-es elosztású recipiens blokkba helyeztük a szövethengereket. (TMA Master, 3DHistech) Végül ezeken a blokkokon is elvégeztük az immunhisztokémiai reakciókat. Majd a két metodikával kapott eredményeket összevetettük a TMA validáció céljából.

3.2. Rhabdoid szövettani fenotípus vizsgálata

Esetismertetés:

81 éves férfi esetében subileus, véres széklet miatti belgyógyászati kivizsgálás kezdődött: hasi CT és ultrahangvizsgálat a colon descendens környezetében jelzett tumorra gyanús elváltozást. Ileus miatti exploratio történt, műtét során elzáródást okozó tumort találtak a vékonybélben. Ekkor eltávolították a tumoros vékonybélszakaszt és hasfali, valamint cseplesz resectiot végeztek. A következő 6 hónapon belül recidiva miatt kétszer történt ismételt resectio. A beteg állapota hanyatlott, a további radikális sebészi és/vagy onkológiai kezeléstől elzárkózott. A daganat felismerését követően 7 hónappal meghalt.

Irodalom kutatás:

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

3.3. E-Cadherin- β -catenin vizsgálat

Vizsgálatunkban a DE OEC Sebészeti Klinikáin 1996-2001 között operált 79 Dukes B2 stádiumú vastagbél carcinomás beteg műtéti anyagait használtuk. 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 részesült kemoterápiában, 5-FU adjuváns kezelést kapott, a rectum tumoros betegek pedig emellett irradiációban is részesültek. Metastasis megjelenése esetén további kemoterápia történt.

Valamennyi tumormintából 3-3 db 1 mm vastag core-ból szöveti multiblokkot készítettünk.(3DHistech TMA Master) Ebből a TMA blokkból 5 mikron 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.

3.4. 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 fixált, 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 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, 5-FU+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.

3.5. ERCC1 expresszió immunhisztokémiai kimutatása és prognosztikai faktorok vizsgálata metastaticus colorectalis carcinómában

28, a DE OEC Onkológiai Tanszéken oxaliplatin kemoterápiában részesült, metastaticus vastagbél carcinomás beteg formalinban fixált, paraffinba ágyazott primer tumorának immunhisztokémiai vizsgálatát végeztük el. A betegek a primer tumor eltávolítását követően 5-FU alapú adjuváns kemoterápiát kaptak, majd a metastasis megjelenését követően oxaliplatin terápiában részesültek. A ciklusok száma átlagosan 7 (2-20) volt. Valamennyi tumor paraffin blokkjából a fenti módon TMA blokkot építettünk. 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.

3.6. Immunhisztokémiai reakciók

Az immunhisztokémiai reakciókhoz mind a teljes metszetek, mind a TMA blokkok esetén 5 mikron 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 fokon egy órán át. 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 hematoxilint használtunk, majd víztelenítés és lefedés történt.

Immunreakciók értékelése

A normál colon mucosa epithelsejtjei erős E-cadherin és β -catenin membrán pozitivitást mutatnak. 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. MLH1, MSH2, MSH6 pozitív, ha nukleáris festődés volt a tumorsejtekben.

p53 értékelése: 0-25%-festődés 1+, 26-50% 2+, 51-75% 3+ és 76-100% festődés 4+.

P21 pozitív, ha a tumorsejtekben nukleáris festődés volt.

EGFR score – A DAKO Pharmdx EGFR kit scoring rendszerét használtuk, az irodalmi adatoknak megfelelően. 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 67-100%-3. A két érték szorzatából kapott értéket tekintettük a TS expresszió mértékének.

ERCC1 protein 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.

3.7. EGFR amplifikáció kimutatása FISH reakcióval

Az E-cadherin- β -catenin vizsgálat 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 fokon. DNS hibridizáció 37 C fokon 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 centrosoma 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, ezen TMA blokkokon EGFR immunhisztokémiai reakciót is végeztünk. A felhasznált antitest és a reakció értékelése a fentebb említett módon történt.

3.8. Statisztikai elemzés

Mind az E-cadherin- β -catenin, mind a prognosztikai vizsgálatban valamint ERCC1 vizsgálatban 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-Spearmann korreláció analízist használtunk. A túlélési adatokat Kaplan- Meier függvényekkel elemeztük. Egyes eredményeinket multivariáns

analízisben Cox-regressziós teszttel 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 összehasonlításához 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 null hipotézis (a két módszer vagy értékelő között nincs különbség) z-próbával is tesztelhető.

4. Eredmények

4.1. TMA validációs vizsgálat

MLH1 vizsgálata során a két módszer 66 esetben egyezést, 5 esetben eltérést mutatott, valamint további 4 esetben valamelyik eljárás nem volt értékelhető. $Kappa = 0,758$.

Az MSH2 vizsgálatokor 72 eset volt értékelhető, ezek közül 64 egyezést és 8 különbséget találtunk. A TMA módszer 3 esetben nem mutatta ki a hagyományos vizsgálat alapján pozitív eseteket, valamint 5 alkalommal pozitivitás helyett negativitást mutatott. A kappa értéke 0,368.

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 kappa értéke 0,741.

MLH1 és MSH6 esetén a kapott kappa 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.

4.2. Rhabdoid szövettani fenotípus vizsgálata

Mindhárom műteti anyagban ugyanazon szöveti felépítésű tumor látható. A daganat solid sejtműzökből áll, mirigyképződés nincs, számos gócbn necrosis és vérzések láthatók. Az egyes tumorsejtek széles, egynemű, eosinophil cytoplasmával rendelkeznek, a cytoplasmában hyalin inclusiok láthatók, a változatos méretű magokban a nucleolus sokszor prominens. Az osztási frekvencia magas, a mitosisok többsége patológiás. Bár a resecált bélszakaszokban lévő tumorok exulceráltak, a környező vékonybél mucosában nem volt dysplasia.

A tumorsejtek diffúz panCK és vimentin pozitivitása 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. Ki-67 festődési index (MIB-1 antitesttel) magas volt, mely korrelált az észlelt igen magas mitotikus aktivitással. Prognosztikailag kedvezőtlen jelként értékeltük a csaknem diffúz p53 pozitivitást és a számottevő Her2 reaktivitást (score 2+). Ini1 ellenes antitesttel a tumorsejtekben magfestődést észleltünk.

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

A rendelkezésre álló számítógépes adatbázisok áttekintésével 22 korábbi, gastrointestinalis előfordulási rhabdoid carcinomát találtunk, melyek közül 7, volt primer vékonybél eredetű. A további 15 eset közül 3 oesophagus, 7 gyomor, és 4 vastagbél tumor volt. A gastrointestinalis lokalizációjú rhabdoid jellegű carcinomák időskorban jelentkeztek, átlagéletkor 64,4 év (49-84) volt. 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, agresszív viselkedésűek, a prognózis rossz, a betegek többsége (75%) a diagnózist követő 6 hónapon belül meghalt.

Az irodalomban 4 vastagbélben előforduló rhabdoid tumor ismert. Ezen esetek 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.

4.3. E-cadherin β -catenin vizsgálat

79, Dukes B2 stádiumú (pT3N0 stádium) colorectalis carcinomát vizsgáltunk. Az 5-éves OS arány 59%, a 3-éves DFS arány 64% volt.

Membranosus β -catenin expresszió 52 esetben volt, 27 eset negatív volt. Nukleáris β -catenin expresszió 36 esetben volt, míg 43 eset negatív volt. E-cadherin membranosus festődés 46 esetben volt, 33 eset negatív volt.

A teljes betegpopulációban, a membranosus β -catenin expressziót mutató esetek OS jobb volt, mint ahol nem volt β -catenin expresszió, $p=0,280$. 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.

23 betegben alakult ki metastaticus betegség. A metastasis kialakulásnak nagyobb volt a valószínűsége a β -catenin membranosus negatív csoportban, mint a pozitív csoportban ($p=0,062$). Azon esetekben ahol a β -catenin nukleáris expressziót mutatott, a metastasis rizikója nagyobb, $p=0,022$. 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, $p=0,047$.

48 beteg tumora volt a jobb vagy bal colonfélben. A betegség klinikai kimenetele, a prognózis statisztikailag függetlennek bizonyult a β -catenin és E-cadherin expressziós mintázattól. Ebben a csoportban 12 betegben alakult ki metastasis az utánkövetés során. Nem volt különbség a metastasis kialakulásának valószínűségében a különböző protein expressziót mutató betegek esetén.

31 betegben volt rectum carcinoma. Megfigyelhető volt egy trend, miszerint azon betegeknel, ahol membranosus β -catenin expresszió volt, mind a DFS és az OS jobb volt, [$p=0,087$ és $0,085$]. 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. 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.

A metastaticus betegek csoportjában (23 beteg) 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 (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 (24 hónap vs. 16,63 hónap; $p=0,16$).

4.4. 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. 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%). Az 5 éves OS a 70 évesnél idősebb betegek csoportjában volt a legrosszabb (38%, $p=0,002$). 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%. 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 befolyásolta a prognózist.

A grade függvényében nem volt különbség a túlélési adatokban (54,4% vs. 56,6%, $p=0,619$).

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 expresszió az esetek 59%-ában volt jelen. Ezen korai stádiumú betegeink csoportjában nem tudtuk a p53 negatív prognosztikus értékét igazolni (59,5% vs. 52,5%, $p=0,238$). Az esetek 85%-ában láttunk p21 pozitivitást és a túlélési különbség itt sem volt szignifikáns ($p=0,101$). Az egyidejű p53 és p21 pozitív festődési mintázat azonban szignifikánsan rosszabb túléléssel járt ($p=0,041$). Spearman's korrelációs tesztben erős pozitív korreláció volt a p21 festődés és a tumor recidíva között (correlation coefficient 0,331, $p=0,005$).

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

Az esetek 61% mutatott β -catenin membrán expressziót. A β -catenin membrán negativitás esetén 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 %) 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 expresszió 43%-ban volt észlelhető, 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 pozitivitás a vizsgált 90 eset 55%-ában volt, és sem az 5 éves OS-ben 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, $p=0,194$).

Az EGFR pozitív betegek aránya 54% volt és nem befolyásolta a túlélési adatokat ($p=0,992$).

A 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 ($p=0,476$).

Az adatokat multivariáns analízisben Cox-regressios teszttel is értékeltük. 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.

4.5. ERCC1 expresszió immunhisztokémiai kimutatása és prognosztikai faktorok vizsgálatának eredményei metastaticus colorectalis carcinomában

A vizsgált 28 beteg közül 19 férfi, és 9 nő volt, az átlagéletkoruk 61,5 év. 17 colon és 11 rectum 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 találtunk pozitivitást. Az EGFR esetében 28% a membránfestődést adó minták száma. Az MLH1 esetében 42%, az MSH 2 esetében 57%, és az MSH6 esetében 32% a magpozitivitást adó minták száma.

Az E-cadherinnél az esetek 50%-ban találtunk membranosus festődést. A TS esetén 17% a citoplazmatikus festődést mutató esetek aránya. Ezen markerek (p53, p21, MLH-1, MSH-2, MSH-6, EGFR, E-cadherin, timidilát-szintáz) és a klinikai kimenetel között nem találtunk összefüggést.

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

catenin membránexpresszió és metastaticus túlélés összefüggését vizsgálva a membrán pozitív esetekben jobb eredményeket kaptunk ($p=0,132$).

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

Az ERCC1 és az össz túlélés ($p=0,346$) a metastaticus túlélés ($p=0,098$) és a progressziómentes túlélési idő ($p=0,24$) vonatkozásában is látható, hogy az ERCC1 negatív esetekhez jobb prognózis társul.

4.6. EGFR amplifikáció kimutatása FISH reakcióval

79 tumormintából épített TMA blokkokon végeztünk EGFR amplifikáció kimutatásra FISH reakciót. A reakció 74 esetben volt értékelhető. 7 esetben észleltünk amplifikációt (9,4 %). Az észlelt amplifikáció mértéke 2-4 közötti volt.

Az amplifikációt mutató esetek átlagos utánkövetési ideje 94 hónap (72-124 hónap) volt. 6 esetben sem áttét, sem lokális recidíva nem jelentkezett, az utánkövetési idő alatt mind életben voltak. 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 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.

5. Megbeszélés

TMA validáció

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

Rhabdoid szövettani fenotípus vizsgálata

1978-ban írták le a Wilms-tumor ritka, monofázisos solid, vagy rhabdomyosarcomatoid variánsaként a rhabdoid tumort, melyet jelenleg külön entitásként malignus renalis rhabdoid tumorként (MRRT) neveznek. Később hasonló fenotípusú tumorok előfordulásáról számoltak be, számos extrarenalis lokalizációban, többek között lágyrészekben, agyban, pancreasban, májban, húgyhólyagban. Ezeket a daganatokat malignus extrarenalis rhabdoid tumorként említik (MERT). Előfordulhat szekunder fenotípusos megjelenésként rhabdoid komponens számos egyéb, többnyire felnőttkori tumorban, mint adenocarcinoma, különféle sarcoma, melanoma. A rhabdoid vonások itt csak nonspecifikus fenotípust jelentenek. Atypusos teratoid/rhabdoid tumorban kimutatták a 22q11.2 lokalizációjú hSNF5/INI1 tumor szuppresszor gént érintő kromoszóma deléciót, mint karakterisztikus eltérést. Az esetünkben észlelt Ini1 nukleáris festődés összhangban van az eddig közölt adatokkal. A szakirodalomban 22 korábbi, gastrointestinalis előfordulású rhabdoid carcinomát találtunk. Az eddig közölt gastrointestinalis lokalizációjú rhabdoid jellegű carcinomák időskorban jelentkeztek, férfiakban gyakoribb előfordulásúak, agresszív viselkedésűek, a prognózis rossz, a betegek többsége (75%) a diagnózist követő 6 hónapon belül meghalt. 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 összes beteg esetében, a β -catenin membrán negativitás és nukleáris pozitivitás mellett gyakoribb az áttétképződés, és ez a kapcsolat a nukleáris expresszió esetén szignifikáns. A colon tumoros betegeink között gyakorlatilag nem mutatkozott összefüggés a β -catenin- E-cadherin expressziós változások és az OS és DFS között, valamint a metastasis megjelenése között.

A rectum tumoros csoportban β -catenin membrán negativitás esetén rosszabb volt OS. 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.

A metastaticus betegek csoportjában, a β -catenin membrán negativitás esetén szignifikánsan hamarabb jelent meg az áttét, valamint a DFS is rosszabb. E-cadherin membrán negativitás 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. Ez a megfigyelés is alátámasztja, hogy a colorectalis carcinoma genetikailag heterogén betegség. A jobb-, illetve bal colonfél, valamint rectum tumorainak patogenezise eltér egymástól. Az általunk megfigyelték szerint, a rectum tumorok áttétképzésében kiemelkedő jelentőségű szerepet játszik a β -catenin- E-cadherin rendszer.

A prognosztikai vizsgálat idevonatkozó eredményei is alátámasztották az E-cadherin- β -catenin vizsgálatban észlelt megfigyeléseket. Ebben a

betegcsoportban a β -catenin membrán expressziója esetén szignifikánsan jobb volt a túlélés, és a β -catenin membrán expresszió független prognosztikai faktornak bizonyult.

Konklúzióként megállapíthatjuk, hogy jelen vizsgálatunk, az irodalmi adatokhoz hasonlóan a β -catenin- E-cadherin colorectalis carcinogenesisben betöltött fontos szerepét támasztja alá. Dukes B2 stádiumú tumorok esetében főképp rectumtumorok esetén a β -catenin- membrán expressziójának eltűnése a későbbi metastasis képződés prediktora.

Prognosztikai vizsgálat

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. Ezt az adatot európai munkacsoport is megerősítette. 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 hátterében 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 carcinomák kb. 70%-a 17p és/vagy 18q deléciót mutat. A 17p kromoszóma tartalmazza a p53 gént, mely jelentős tumor szuppresszor gén és a colorectalis rákok 40-60%-ában mutáns. A p53 mutáció a leggyakoribb molekuláris abnormitás a malignus tumorokban. Vastagbél tumor esetében a p53 prognosztikai jelentősége a tumor lokalizációtól is függ. 4416 beteg adatait vizsgáló 28 tanulmány meta-analízise szerint sem a p53 overexpresszió, sem a p53 mutációk nem bizonyultak hatékony prognosztikus faktornak.

Vizsgálatunkban ezen korai stádiumú (T3N0) tumorokban mi sem tudtuk a p53 prognosztikai értékét igazolni. A p53-al foglalkozó számos tanulmány ellentmondásos eredménye részben az alkalmazott immunhisztokémiai technika nem kellően standardizált voltával, illetve a használt különböző antitestek és scoring rendszerekkel magyarázható.

A p21 prognosztikai szerepe ellentmondásos. A legtöbb tanulmány a p21 overexpresszióját p53 expresszióval vagy anélkül rossz prognosztikai jelnek tartják. 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 ($p=0,041$). P21 pozitívitas mellett gyakoribb volt a lokális recidíva.

Colorectalis carcinomában egy tanulmányban a p16 expresszió összefüggést mutatott a tumor gradussal, stádiummal és a tumor distalis lokalizációjával. 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 overexpresszió számos tumorban prognosztikus értékű, azonban colorectalis carcinomában a prognosztikai szerepe nem egyértelmű. 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 recidíva, mint MSS betegeknél. Egy retrospektív tanulmány szerint csak az MSS betegek számára hasznos az 5-FU alapú kemoterápia. A mi MLH1 negatív eseteinkben sem metastasis, sem tumor recidíva, 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.

Számos tanulmány igazolta, hogy a fokozott TS protein expresszió a rosszabb túlélés és a tumor recidíva markere. A TS expresszió mértéke colorectalis carcinomában az 5-FU terápia rezisztencia prediktív markere. Fokozott TS expresszió 5-FU rezisztenciát eredményez. A timidilát-szintáz expresszió immunhisztokémiai is vizsgálható, a protein kimutatható a konvencionális, paraffinba ágyazott mintákon. 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.

ERCC1 expresszió immunhisztokémiai kimutatása és prognosztikai faktorok vizsgálata metastaticus colorectalis carcinomában

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 oxaliplatin rezisztencia fő oka a DNS-repair. A platina származékok által okozott DNS károsodás kijavítását intracellulárisan a NER rendszer végzi. 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. Az ERCC1 protein IHC reakcióval is kimutatható, mely szintén prognosztikus értékű. Az eredményeink matematikailag nem bizonyultak szignifikánsnak, aminek egyik oka a kis (28) mintaszám. A másik probléma az IHC metodikából adódik. 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 EGFR overexpressziót mutató esetek aránya, immunhisztokémiai meghatározást alkalmazva, 50-70%. Az általunk észlelt 54%-os, illetve 55,7% előfordulási arány megfelel az irodalomban olvashatónak. Colorectalis carcinomában az EGFR aktiváció egyik lehetséges mechanizmusa a gén amplifikációja. A legtöbb munkacsoport az amplifikációt mutató tumorok arányát 5-17% közöttinek találta. Az általunk észlelt 9,4%-os amplifikáció arány megfelel ezen irodalmi eredményeknek. Vastagbél carcinomában nincs olyan közvetlen kapcsolat a gén amplifikáció és az EGFR IHC státusz között, mint az emlőcarinomában a HER2 esetén sokszorosan bizonyított. 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. 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.

6. 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 biológiaiilag 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 biológiai 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 blokkon. Eredményeink is alátámasztják, hogy a két protein immunhisztokémiai kimutatása csak korlátozott értékű, és nem nyújt megbízható segítséget a terápiás döntés meghozásában.

A tumorbiológiai alapkutatás 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 terápiája individualizálhatóvá válik.

7. 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 kimuathatósága 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.

8. Az értekezés alapjául szolgáló és egyéb közlemények



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/191/2013.

Tételszám:

Tárgy: Ph.D. publikációs lista

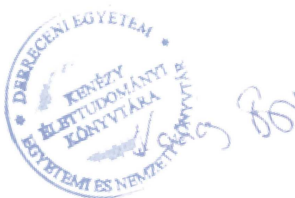
Jelölt: Tóth László

Neptun kód: CCJU53

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

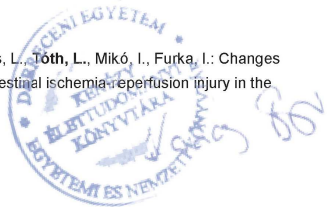
A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

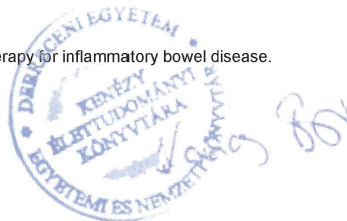


További Közlemények

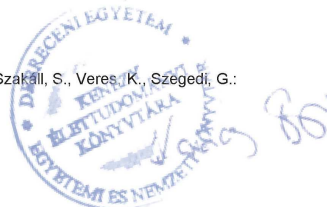
4. Németh, N., Kiss, F., Klárik, Z., Pető, K., Ványolos, E., **Tóth, L.**, Furka, I., Mikó, I.: Testicular ischemia-reperfusion may alter micro-rheological parameters in laboratory rats.
Clin. Hemorheol. Microcirc. Epub ahead of print (2013)
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-131664>
IF:3.398 (2011)
5. Ilonczai, P., Tóth, J., **Tóth, L.**, Altörjay, 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., Pósn, J., Miszt-Biasius, 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., Szaszko, 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., Biró, 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., Ress, 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., Várvölgyi, 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., Ress, 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., Ress, 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.carad.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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.05.17



9. 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.

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszecsenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.