

**MTA Doktora Pályázat
Tézisek**

**A csont és lágyrész daganatok genetikai és molekuláris
szerveződésének feltérképezése és alkalmazása a patológiai
diagnosztikában**

Sápi Zoltán

Budapest, 2010.

Tartalomjegyzék

Bevezetés	3
Módszer	4
Eredmények, megbeszélés	6
1. A molekuláris módszerek alkalmazhatósága és haszna a preoperatív (aspirációs cytológiai) diagnosztikában	6
2. A molekuláris diagnosztika szükségessége, prognosztikai és prediktív értéke a mindennapi rutin szövettani diagnosztikában	9
3. Az óriássejtes csont tumor genetikai eltéréseinek vizsgálata	11
4. A synoviális sarcoma genetikai eltéréseinek és jelút-rendszereinek vizsgálata	16
5. A perifériás idegtumorkok genetikai instabilitásának vizsgálata	20
6. A Gastrointestinális Stromális Tumor (GIST) mTOR jelút-rendszerének vizsgálata a molekuláris eltérések függvényében	24
Válasz a célkitűzésekre, új megállapítások	28
A értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke (jóváhagyott MTMT szerint)	29
Köszönetnyilvánítás	37

Bevezetés

A molekuláris vizsgálati és kutatási módszerek már meglehetősen régóta kulcsfontosságúak az alapkutatás területén, de újabban komoly előrelépés történt ezen a területen a mindennapi diagnosztikában illetve az alkalmazott kutatásban is. A molekuláris biológiai módszerek alkalmazása mindennapos lett a patológián belül is, sőt egyes speciális területeken – különösen a paraffinos metszeteken végzett vizsgálatok esetén – tovább finomodtak „molekuláris patológiai” módszerekké. Legkorábban a limfoproliferatív betegségek diagnosztikája területén vált nélkülözhetetlenné a molekuláris patológiai módszerek alkalmazása, de mostanában ugyanez a helyzet a lágyrész tumorok diagnosztikája esetén is, valamint a lágyrész és csontdaganatok kutatása se képzelhető el molekuláris patológiai módszerek alkalmazása nélkül. Természetesen a patológiai diagnosztikában az alapot ma is a haematoxylin-eosin festés képezi, de ahogy idővel nélkülözhetetlenné vált az immunhisztokémia kiegészítő alkalmazása, ugyanez a helyzet a molekuláris patológiai módszerekkel mint kiegészítő módszerekkel is, különösen a lágyrész tumorok és részben a csont tumorok területén (a limfoproliferatív daganatok után). Az említettek jelentőségét hangsúlyozza, hogy mind a klasszifikációhoz, mind a terápiához nélkülözhetetlenné vált az adott cytogenetikai eltérés és az ehhez tartozó molekuláris történés megadása. A lágyrész és csont tumorok a daganatok mintegy 3-4%-át teszik ki, több mint 250 entitást tartanak számon, számos malignus entitás fiatal korban jelentkezik. A lágyrész és csont tumorok a molekuláris patogenézis tekintetében két nagy csoportra oszthatók. Az egyik csoportot a specifikus genetikai eltérések jellemzik ami sokszor viszonylag egyszerű kariotípussal társul, és ezen daganatok esetén reális illetve potenciális esély van specifikus target-terápiára. A másik csoportban a daganatok komplex kariotípussal rendelkeznek, nincs specifikus genetikai eltérés és ennek

megfelelően nem lehet target-terápiát alkalmazni. Ma már kevés olyan lágyrész és csont daganatot ismerünk, aminek ne tudnánk a genetikai jellemzőit és jó részük - főleg a malignus daganatok esetén - megfelelő, a kereskedelmi forgalomban is kapható molekuláris próbák állnak a rendelkezésünkre. Számos lágyrész sarcoma jellegzetes cytogenetikai eltéréssel rendelkezik, ezek kimutatása molekuláris módszerrel nagy segítséget jelenthet mind a preoperatív, mind a végleges szövettani diagnosztikában. A csontdaganatok esetében jóval szerényebb a paletta, ugyanakkor egyes daganatok bizonytalan, néha kiszámíthatatlan biológiai viselkedésükkel szinte arra „serkentik” a kutatókat, hogy feltárva a genetikai eltéréseket összefüggést tudjanak kimutatni a daganat későbbi viselkedése és a genetikai eltérés között. Mindezek ismeretében **célkitűzéseimet** az alábbiakban adom meg:

- 1, A molekuláris módszerek alkalmazhatósága és haszna a preoperatív (aspirációs cytológiai) diagnosztikában**
- 2, A molekuláris diagnosztika szükségessége, prognosztikai és prediktív értéke a mindennapi rutin szövettani diagnosztikában**
- 3, Az óriássejtes csont tumor genetikai eltéréseinek vizsgálata**
- 4, A synoviális sarcoma genetikai eltéréseinek és jelút-rendszereinek vizsgálata**
- 5, A perifériás idegtumorok genetikai instabilitásának vizsgálata**
- 6, A Gastrointestinális Stromális Tumor (GIST) mTOR jelút-rendszerének vizsgálata a molekuláris eltérések függvényében**

Módszer

Immunhisztokémia

Standard avidin-streptavidin-peroxidase módszert használtunk, a körülmények standar-dizálását pedig Ventana320 illetve Bond Max típusú immunfestő automatával teremtettük meg.

Interfázisú citogenetikai vizsgálat, fluorescens in situ hibridizációs (FISH) technika

Az aspirációs citológiai keneteken és a paraffinba ágyazott metszeteken standard in situ hibridizációt végeztünk kétféle módszerrel: az egyik esetben egy ún. painting próbát valamint egy centromerikus próbát szimultán, a másik esetben break-apart próbákat használtunk. Mindezek mellett specifikus deletios illetve amplifikációs próbákat is alkalmaztunk. Detektálásra Lucia cytogenetikai képanalizáló rendszert valamint Olympus BX-40 epifluorescens mikroszkópot használtunk, az utóbbinál triplet (hármass) szűrővel.

A FISH szignálok automatikus képanalízise

A perifériás idegtumorok interfázisú citogenetikai vizsgálatára a Metafer-4-MetaCite (Metasystem, Germany) használtuk.

DNS tartalom meghatározás képanalizátorral

A magi nuclearis DNS tartalmat adszorpciós cytofotometriás DNS vizsgálattal határoztuk meg. A DNS képanalízist mikroszkóphoz kapcsolódó DNS mérésre alkalmas software rendszerrel végeztük (CYDOK R, Fa., Hilgers, Königswinter, Germany).

A DNS index meghatározása a klasszikus aneuploiditás meghatározása alapján történik, a lemerített sejtek modális DNS tartalmát elosztjuk a normál sejtek lemerített modális DNS tartalmával. Akkor diploid egy daganat, ha ezen hányados $1 \pm 10\%$, és akkor aneuploid egy daganat, ha ezen hányados $1 \pm 10\%$ -nál nagyobb vagy kisebb.

Lágyrésztumorok telomeráz aktivitásának mérése

A szövetminta preparációt és az RNS izolálást követően a telomeráz (hTERT) mRNS mennyiségét és az ezzel korreláló TA-t real-time RT-PCR módszerrel, TeloTAGGG hTERT Kvantifikációs Kittel, LightCycler segítségével végeztük. A tel-kódolt mRNS átírásával keletkezett cDNS fragmentumait specifikus primerekkel amplifikáltuk egylépéses RT-PCR reakcióban. A génexpressziót a

PBGD (porphobilinogen deaminase, a hem bioszintézisben részt vevő citoszolikus enzim) szintjéhez normalizáltuk.

PCR és valós idejű PCR

Pufferelt formalinban fixált és paraffinba ágyazott szövetekből izolált DNS mintákból a PDGFRA gén 10, 12, 14 és 18-as exonját illetve a c-kit gén 9, 11, 13, 14 és 17-es exonját PCR-rel felamplifikáltuk. A lágyrész sarcomák esetében Taq-Man alapú valós idejű PCR-rel vizsgáltuk a SYT-SSX1, SYT-SSX2, EWS-ATF1 (1-es és 2-es típusú) és a FUS-CHOP fúziókat.

Szekvenálás

A PDGFRA és a c-kit gének PCR amplikonjait kétirányú direkt szekvenálással analizáltuk. A kapilláris elektroforézist ABI PRISM 310 Genetic Analyzer-ben végeztük. Az elektroferogramok kiértékeléséhez BioEdit programot használtuk. A vizsgált DNS szekvenciákat az NCBI genetikai adatbankjában megtalálható normál referenciaszekvenciákhoz hasonlítottuk.

FISH immunfestett keneteken – Relokalizáció (óriássejtes csont tumorok)

A CD68-negatív és pozitív sejtek FISH képeinek elkülönítésére a Bioview Duet Automated Scanning System (Bioview, Tel Aviv, Israel) rendszert alkalmaztuk, mely relokalizálva a korábban beszkenelt CD68 immunfestett sejtek helyét a keneten, megtalálta ugyanazon, immár FISH szignálokat mutató sejteket és párosította azok FISH képét az immunhisztokémiai képpel. A vizsgált kromoszómák egyedi centromerikus szignáljai és az összesített szignálszám alapján határoztuk meg a kromoszóma nyérések illetve a veszteségek számát.

FISH immunfestett keneteken (I-FISH) (óriássejtes csont tumorok)

I-FISH vizsgálattal a normál centroszóma-tartalmú aneuszómias sejtek, valamint a centroszóma amplifikációt mutató aneuszómias sejtek arányát tanulmányoztuk.

RFLP - Restriction fragment length polymorphism

A béta-katenin gén pontmutációinak kimutatásához PCR-RFLP módszert alkalmaztunk. Mutagenikus polimeráz láncreakcióval felamplifikáltuk a célgén

vizsgálendő exonjait, majd mutáció-specifikus restrikciós enzimkezelést végeztünk, s az így keletkezett DNS fragmenteket nagy felbontású mikropilláris elektroforézis segítségével futtattuk.

HR-CGH (nagy felbontású komparatív genomikus hibridizáció)

Fagyasztott tumor részletből kinyert, ekvivalens mennyiségű referencia és tumor DNS-t jelöltünk meg fluorochrommal a CGH Nick Translatiós procedúra szerint. A CGH hybridisatio során, az összekevert jelölt referencia és tumor DNS-t ráhibridizáltuk a már korábban tárgylemezre szélesztett (normál) metafázisokra. A detektálás Lucia citogenetikai elemző software-rel történt.

Statisztika

A statisztikai kiértékelésekhez Student t-tesztet, Khi-négyzet próbát, Fisher egzakt tesztet és lineáris regressziós analízist végeztünk $p < 0.05$ szignifikanciaszint mellett.

Eredmények, megbeszélés

1. A molekuláris módszerek alkalmazhatósága és haszna a preoperatív (aspirációs citológiai) diagnosztikában

94 tumor aspirációs citológiai vizsgálata során komplex kiegészítő vizsgálatokat végeztünk, melyek immuncitokémia, DNS-tartalom meghatározás és FISH technika voltak. Ezen eredmények együttes értékelése alapján a preoperatív diagnosztikában négy fő csoportot tudtunk elkülöníteni, megfelelő terápiás javaslattal.

A 94 lágyrésztumor aspirációs citológiai vizsgálata során interfázisú sejteken 16 esetben tudtunk specifikus transzlokációt kimutatni, melynek segítségével szövettani értékű definitív diagnózis volt adható még a műtét előtt. A 16 eset a következő módon oszlott meg: myxoid liposarcoma 5 eset, t(12;16); synovialis sarcoma 6 eset, t(X;18); clear cell sarcoma 2 eset, t(12;22); Ewing/PNET tumor 2

eset, t(11;22); desmoplasticus kis kereksejtes tumor 1 eset, t(11;22). A csoportra a következők voltak jellemzőek:

a) tumorok pontos hisztogenetikai eredettel (szövettani értékű diagnózis) – 16 eset

- karakterisztikus citomorfológia
- karakterisztikus citogenetikai eltérés (transzlokációk, stb.)
- karakterisztikus immuncitokémia
- Proliferációs Index-nek (PI) és DNS Index-nek (DI) csak kiegészítő szerepe van.

Javasolt terápia: bármilyen sebészi beavatkozás és bármilyen preoperatív terápia megengedett.

A magas malignitású csoport jellemzői közül kiemelendő az aneuploid többnyire két subpopulációs DNS tartalom és a magas proliferációs arány. 22 esetet vizsgáltunk és az alábbi jellemzőket találtuk:

b) magas malignitású sarcomák – 22 eset

- DI: aneuploid
- PI: több mint 15%
- anaplasztikus vagy pleomorph citomorfológiai kép
- nincs karakterisztikus citogenetikai eltérés és immuncitokémiai eredmény.

Javasolt terápia: ugyanaz, mint az a) csoportban, kivéve, hogy preoperatív génterápia nem megengedett!

A benignus csoportban 29 esetet vizsgáltunk, természetesen nem minden esetben tudtunk pontos diagnózist mondani, csupán abban voltunk biztosak, hogy az alábbi kritériumok alapján biztosan jóindulatú lágyrész tumorral állunk szemben. Viszont azokban az esetekben amikor a cytológiai jellegzetességek is megvoltak, törekedtünk a pontos diagnózisra illetve néha immuncitokémiai kiegészítést is végeztünk.

c) benignus lágyrésztumorok – 29 eset

- monomorph citológiai kép, moderált cellularitás
- DI: diploid
- PI: kevesebb, mint 5%

Javasolt terápia: egyszerű kimetszés, a lokalizációt figyelembe véve néha csak a tumor „kigördítése” is megengedett.

A kérdéses biológiai viselkedésű csoport összesen 20 daganat tartozott, és ahogy a név alapján várható ezekben az esetekben se hisztogenetikai diagnózist nem tudtunk mondani, valamint azt se tudtuk eldönteni, hogy vajon a daganat benignus vagy malignus. Kiemelendő az, hogy némely esetben bár komoly gyanú volt konkrét diagnózisra, de mivel nem tudtuk igazolni molekuláris vagy egyéb módszerekkel a feltevésünket, biztonsági okokból inkább ebbe a csoportba tettük a megfelelő következményekkel.

d) lágyrésztumorok kérdéses biológiai viselkedéssel – 20 eset

- monomorph citomorfológiai kép, kifejezett cellularitás
- DI: diploid vagy peridiploid
- PI: nagyobb, mint 5% és kisebb, mint 15%
- nincs jellegzetes citogenetikai vagy immuncitokémiai eredmény

Javasolt terápia: széles épből történő kimetszés az első lépés és várni kell a végső hisztológiai diagnózisra. Nem ajánlott az excisionális biopszia, a preoperatív kezelés vagy amputáció! Ha a széles épből történő kimetszés a lokalizáció miatt nem lehetséges, intraoperatív fagyasztás javasolt.

Megbeszélés

Négy csoportot képeztünk megfelelő terápiás javaslatokkal. A magas malignitású csoport, valamint a tumorok pontos hisztogenetikai eredettel csoport esetén (az esetek mintegy fele), lehetőség van szinte tetszés szerinti praeoperatív kezelésre, és lényegében bármilyen radikalitású műtetre. Mindez természetesen azért lehetséges, mert lényegében szövettani értékű diagnózist tudunk ezekben az

esetekben mondani. A benignus csoport esetén (az esetek mintegy negyede) a teendő egyszerű: a daganat eltávolítható, sőt adott kritikus lokalizációban mintegy kigördíthető, és nem kell ügyelni feltétlenül az épben történő eltávolításra. A negyedik csoport - lágyszöveti tumorok kérdéses biológiai viselkedéssel - meglehetősen nagy (szintén mintegy negyede az eseteknek) de a teendő itt is egyértelmű: a daganatot szélesen az épben kell eltávolítani, meg kell várni a pontos szövettani diagnózist, és minden további teendő csak ez után lehetséges. Különösen fontos ez a beteg számára, hiszen ezen csoportban többnyire alacsony malignitású sarcomák vannak, melyek esetében a primer sebészeti kezelés perdöntő a beteg további sorsát illetően. A kiegészítő technikákat illetően a FISH alkalmazása forradalmi volt, hiszen így nagy számban lehet interfázisú sejteket vizsgálni. Az aspirációs cytológiai anyag ideális erre a célra, hiszen friss anyagról és nem elvágott magokról van szó. Szintén fontos, hogy aspirációval egy nagy tumor esetén több helyről is könnyedén tudunk anyagot nyerni, ami előny az intratumorális heterogenitás miatt (szemben pl. a core vagy excisional biopsziával). A különböző specifikus break apart próbákat ma már rutin szerűen tudjuk alkalmazni, így a synovialis sarcoma, Ewing sarcoma, myxoid liposarcoma, low grade fibromyxoid sarcoma, alveolaris lágyszöveti sarcoma biztonsággal diagnosztizálható. Mivel a Ewing gén számos más lágyszöveti daganatban is partner géneként szerepel, további daganatok diagnosztizálhatók (pl. clear cell sarcoma, kis kereksejtes desmoplasticus tumor, extrasceletalis myxoid chondrosarcoma stb.), figyelembe véve a citomorphológiát és a többi kiegészítő vizsgálatot. 16 esetben a FISH technika segítségével definítív diagnózist tudtunk adni. A cytológiai definítív diagnózis koncepciója (molekuláris alapon) ma már széles körben a nemzetközi irodalom alapján is elfogadott. A DNS próbák számának szaporodásával remény van arra is, hogy újabb daganatokat lehessen diagnosztizálni, pl. atypusos lipomatózus tumor, rhabdoid tumor stb. Eseteinkben a magas malignitású csoportban volt a legnagyobb jelentősége a ploiditásnak. A sokszor két aneuploid subpopuláció nagyon jellegzetes erre a csoportban, magas

proliferációs index is megfigyelhető, ugyanakkor a cytogenetikai eltérések nem specifikusak. Nem ismert egyetlen olyan benignus lágyszöveti daganat se, mely aneuploid lenne, a proliferációs index több mint 15% és cytomorphologiai megjelenésében pleiomorph vagy anaplasticus lenne. Természetesen, ha bármi kétség merül fel, és valamelyik kritérium nincs meg, akkor a daganat a bizonytalan malignitású csoportba kerül. Valójában azonban többségben vannak azok a cikkek, melyek a ploiditás meghatározásának hasznát hangsúlyozzák, és ha a DNS tartalom meghatározást kiegészítjük kromoszómális szintű vizsgálattal is (FISH) akkor még további információkhoz juthatunk és még precízebb betekintésünk lesz a genetikai eltéréseket illetően. Az immuncitokémiának döntő szerepe van a differenciáldiagnosztikában, különösen a tumorok pontos hisztogenetikai eredettel csoportban, és abban az esetben ha az a kérdés, hogy egyáltalán primer lágyszöveti sarcomáról van-e szó. Nagyon fontos elkülöníteni a metasztatikus carcinomákat valamint a lymphomákat a primer lágyszöveti tumoroktól, minthogy nem ritkán utánozhatják (főleg klinikai megjelenésükben) ezeket. A Ki-67 index meghatározásának is igen fontos szerepe van. Az általunk meghatározott százalékok az egyes csoportokat illetően megbízhatónak bizonyultak, és lényegében egyeznek is az irodalmi adatokkal különösen a magas malignitású csoportot illetően. A magas malignitású, pleiomorph sarcomák esetén nem törekszünk pontos hisztogenetikai meghatározásra, hiszen ez immuncitokémiával meglehetősen nehézkes lenne, valamint nem sok jelentősége van a praeeoperatív kezelés tervezését illetően. Összefoglalva: a lágyszöveti tumorok preoperatív diagnosztikájában a molekuláris módszerek segítségével olyan diagnosztikai algoritmust sikerült kidolgozni, mely támpontot ad a neoadjuváns kezeléshez és nagy segítséget jelent a végtagmegtartó műtétek tervezésében.

2. A molekuláris diagnosztika szükségessége, prognosztikai és prediktív értéke a mindennapi rutin szövettani diagnosztikában

A GIST-ek differenciáldiagnosztikája és prediktív faktorai

A gastrointestinalis traktus leggyakoribb mesenchymális tumora a GIST, mégis számos differenciáldiagnosztikai probléma merülhet fel, részben a morfológiai hasonlóság részben az immunreakciók átfedése miatt. Bár a CD117 (c-kit) immunhisztokémiai vizsgálat forradalmat jelentett a GIST-ek diagnosztikájában, de nem elég szenzitív, valamint a meglehetősen karakterisztikus CD34 pozitivitás pedig nem elég specifikus. Korábbiakban, még a CD117 vizsgálat lehetősége előtt számos GIST entitást más tumorként diagnosztizáltunk, ennek felmérése, revidálása országos szinten is megtörtént a maga tanulságaival. Ugyanezen munkákban tudtuk elemezni azokat a leggyakoribb tumor féleségeket is melyek valóban differenciáldiagnosztikai problémát jelentenek. A problémákat lényegében két csoportra lehet osztani: a, nem típusos morfológia vagy lokalizáció esetén bizonyítani kell, hogy valóban GIST-ről van szó b, a GIST-et utánzó és mind morfológiai mind immunhisztokémiai átfedést mutató daganatok esetén ezen daganatokat el kell különíteni a GIST-től. A lista meglehetősen hosszú: soliter fibrosus tumor, inflammatoricus fibroid polyp, folliculáris dendriticus reticulum sejtes sarcoma, sarcomatoid carcinoma áttéte, mesenterialis fibromatosis, calcifikálódó fibrosus pseudotumor, synoviális sarcoma, valamint a „klasszikus” gyakoribb differenciál diagnosztikai problémák, mint a benignus és malignus myogén illetve neurogén daganatok. Bár kulcsszerepe van az immunreakcióknak a differenciáldiagnosztikai megoldás-ban, mégis a mutációk vizsgálata nélkülözhetetlen, elsősorban a helyes kezelés megválasztása érdekében, de részben adott esetben a pontos diagnosztika miatt is. Rutinszerűen, minden közepes és magas rizikójú csoportba tartozó GIST esetén mutáció analízist végzünk, melyet adatbázisban tárolunk (országos GIST munkacsoport), így a klinikusok részére az adatok bármikor hozzáférhetőek. A metastatikus

GIST-ek esetén ez azonnali lehetőséget jelent, de az esetleg évek múlva bekövetkező metastasis esetén is az adatok könnyen visszakereshetőek. A terápia szempontjából igen lényeges, hogy egy c-kit immun pozitív GIST esetén 11-es vagy 9-es exon mutációt találunk, hiszen az első esetben standard 400 mg Glivec kezeléssel, míg az utóbbi estén emelt (800 mg) dózisú kezeléssel kezdenek. Továbbá szintén fontos, hogy a c-kit pozitív tumorok esetén, ha nincs mutáció a 9-es illetve a 11-es exonban akkor a többi exonban található-e egyáltalán mutáció, vagy a daganat un. vad típusnak bizonyul. Ezen adatok alapvetően befolyásolhatják a kezdő terápia milyenségét, illetve a terápiás váltás (Sutent) lehetőségét. Amennyiben a daganat c-kit immun negatív, akkor un. kit negatív GIST-ről beszélünk, ha igazolni tudjuk egyébként a GIST diagnózist. Ebben segít a morfológia, a CD34 immunpozitivitás és a PDGFRA mutáció kimutatása. A PDGFRA egyik leggyakoribb mutáció félesége a 18-as exon D82V pontmutációja, ami megerősíti ugyan a GIST diagnózist, de egyben kontraindikációt is jelent a Glivec kezelést illetően (ugyanakkor más szerek mint pl. Sutent szóba jöhetnek). A disszertáció benyújtásának idejéig **195** esetben készült mutációs analízis szekvenálással, az alábbi megoszlásban:

c-kit immun pozitív GIST, c-kit gén

exon 11 83

exon 9 12

exon13 2

exon 17 1

exon14 0

vad típus 77

c-kit immun negatív GIST, PDGFRA gén

exon 18 15

exon 10 5

exon 12 0

exon 14 0

Új mutációt is találtunk, melyeket publikáltunk, így egyben a nemzetközi adatbázis részévé is vált. Érdemes megjegyezni, hogy új mutáció esetén fontos az arról való meggyőződés, hogy valóban funkcionyerő mutációról van-e szó, ami a következőképpen történik: hosszabb deléciók insertiók stb. esetén nincs szükség külön vizsgálatra, annak valószínűsége, hogy ez egy úgynevezett SNP (normál variáció a populáció kis egyedszámában) legyen, gyakorlatilag nulla. Ugyanakkor, ha pontmutációról van szó minden esetben megszekvenáljuk a tumor melletti normál szövetet is, és ha abban ugyanazt az eltérést találjuk, akkor SNP-ről van szó, míg ha a mutáció csak a tumorszövetben mutatkozik, akkor valódi funkcionyerő mutációt sikerült igazolni.

3. Az óriássejtes csont tumor genetikai eltéréseinek vizsgálata

Klinikopatológiai háttér

Az osteolítikus, potenciálisan agresszív óriássejtes csont tumor (osteoclastoma, GCTB) az esetek 80%-ában benignus lefolyású, de lokális recidívák és malignus átalakulás előfordulhat komoly kockázatot jelentve a beteg számára. A daganatra jellemző, hogy változó arányban osteoclast típusú óriássejteket tartalmaz, melyek egyenletes eloszlást mutatnak a mononukleáris kerek, valamint orsó jellegű sejtek háttérében. Az orsó alakú sejteket tarthatók a neoplasztikus komponensnek, melynek karakterisztikus fenotípusa azonban még nem ismert. A kiújulások száma növeli az óriássejtes csonttumor malignus transzformációjának esélyét, bár metasztázist már az első megjelenésnél is adhat a daganat a benignus szövettani kép ellenére is. Mind ez idáig ugyanakkor jelenleg nem ismert olyan klinikai, radiológiai, biológiai vagy szövettani marker, mely előre jelezné a tumor klinikai viselkedését.

Cytogenetikai jellemzők

Az osteoclastomákra általában nem jellemző valamely speciális kromoszóma eltérés a telomerikus asszociációk (TAS) vagy telomerikus fúziók kivételével, melyekről az esetek 85%-ában számolnak be. Az eddig leírt TAS által leggyakrabban érintett telomerek a 11p, 15p, 19q, 21p, 18p, 13p, és 20q. A telomerfúziók és visszatérő telomerikus eltérések nagy száma óriássejtes csonttumorokban azt a feltételezést támasztja alá, hogy ezen telomerikus események nem csupán mellékletet jelentenek, hanem köztes lépésként szolgálnának vagy prekursor eltérések lennének további strukturális aberrációk felé. A hTERT expresszója ugyan valóban tetten érhető osteoclastomákban, nem korrelál azonban sem a telomer hosszal, sem a TAS gyakoriságával, mely az előbbi elméletet cáfolni látszik. A teljes DNS tartalom meghatározást illetően részben ellentmondásos adatok jelentek meg a prognózist illetve a benignitás malignitás kérdését illetően, hangsúlyozva, hogy az aneuploid jelleg egyértelműen malignus transzformációra utal.

A kromoszómális instabilitás lehetséges oka: a centroszómák szerepe

Egyre több tapasztalat utal arra, hogy az aneuploiditás kialakulását abnormális centroszóma, tehát mikrotubulus organizáló centrum konfiguráció okozza multipoláris sejtszétválások révén. A centroszóma amplifikáció és az aneuploiditás foka között erős korrelációról számoltak be solid tumorokban, leukaemiákban és lymphomákban. A centroszóma kettőződés és számbeli integritás fontos sejtciklus-szabályozó fehérjék, mint ciklin-dependens kinázok, polo-like kinázok, Aurora kinázok, p53, BRCA1 és cyclin B1 által kontrolált, melyekről kimutatták, hogy a centroszómához lokalizálódnak. A tapasztalatok azt mutatják, hogy a centroszóma eltérés gyakori jelenség malignus mesenchymális tumorokban, mint pl. osteosarcomában, amelyre nagy arányú aneuploiditás jellemző. Mindezek ellenére eltérőek a vélemények a centroszóma aberrációk közvetlen szerepéről a kromoszómális instabilitás létrehozásában.

Mindezek figyelembevételével *célul tűztük ki* az óriássejtes csonttumor kialakulásának vizsgálatát, s ennek révén olyan használható prognosztikai faktor keresését, mely előre jelezhetné a klinikai viselkedést. A legtöbb eddig megjelent beszámoló az osteoclastoma kevert sejtpopulációját elemezte, mely befolyásolhatta az eredményeket. Vizsgálatainkban ezért relokalizációs technikát állítottunk be, mely lehetővé tette a genetikai instabilitásnak csupán a neoplasztikus sejtekben történő tanulmányozását. Szeparált CD68-negatív sejteket használtunk a 3-as, 4-es, 6-os, 11-es és X kromoszómák számbeli eltéréseinek, és a 11p telomerikus régió eltéréseinek vizsgálatára multikolor fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) technika alkalmazásával, valamint a lehetséges gén veszteségek és nyerések detektálására array alapú komparatív genomikus hibridizáció (array-CGH) segítségével. A citofotometriás ploiditásmérést szintén a mononukleáris sejtpopuláción végeztük. A centroszómális eltérések szerepét az aneuszómia kialakulásában ezidáig nem vizsgálták óriássejtes csonttumorban. Hogy betekintést nyerjünk a kromoszómális instabilitás kialakulásának lehetséges mechanizmusába ebben a tumorban, meghatároztuk a centroszóma mintázatot recidív és malignus osteoclastomákban és azt a kiújulást nem mutató esetekéhez viszonyítottuk. A centroszóma amplifikáció és a kromoszómális aneuszómia között talált összefüggést elemelve arra kerestük a választ, hogy a centroszómális eltérések hozzájárulhatnak-e a kromoszómális aneuszómia kialakulásához óriássejtes csonttumorban.

Eredmények, megbeszélés

A ploiditás és kromoszómális instabilitás vizsgálatához azon 52 fagyasztott szövetmintát választottunk a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikájának (44 eset), valamint az Istituti Ortopedici Rizzoli Laboratory of Oncologic Research (8 eset) tumorbankjából, amelyeknél a teljes, sebészi és radiológiai adatokat is magában foglaló klinikai utánkövetési adatok elérhetőek voltak. A betegek közül

25 férfit és 27 nőt vizsgáltunk, az átlagéletkor 28.5 év (15-67 év), az átlag utánkövetési idő pedig 48 hónap volt.

A centroszóma abnormalitások vizsgálatához 100 óriássejtes csonttumoros esetet (57 primer nem recidív, 35 recidív, 8 malignus) elemeztünk a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikájának (n=87), az Istituti Ortopedici Rizzoli (n=3) és a Nuffield Orthopaedic Centre Oxford (n=10) archív anyagából. A malignus esetek közül kettő metasztatizált, 3 primeren malignus volt (high grade sarcoma keletkezett az óriássejtes csonttumorban), 3 esetben pedig sarcoma lépett fel a korábban dokumentált osteoclastoma helyén.

A ploiditás és klinikai jellemzők alapján felállított alcsoportok

A talált DNS index értékek és klinikai viselkedés alapján öt csoportot különítettünk el kizárólag a CD68-negatív sejtpopulációt vizsgálva: a diploid nem-recidív (n=20; DNRC), tetraploid nem-recidív (n=6; TNRC), diploid recidív (n=5; DRC), tetraploid és/vagy aneuploid recidív (n=14; TRC), valamint malignus esetek (n=7) csoportját.

A random egyedi-sejtes aneuszómia szignifikánsan gyakoribbnak bizonyult ($p < 0.001$) a recidív csoportokban ($36.01 \pm 11.94\%$) a benignus nem-recidív esetekhez ($10.65 \pm 3.66\%$) képest. A diploid recidív csoport szignifikánsan emelkedett ($p < 0.001$) kiegyensúlyozott aneuszómiát mutatott a diploid nem-recidív csoporthoz képest, míg a tetraploid nem-recidív csoport euszómiás poliszómiát mutatott. Az array-CGH és FISH vizsgálatok csak a malignus csoportban mutattak klonális kromoszóma eltéréseket. Nem találtunk szignifikáns különbséget a CD68-pozitív és normál kontrol sejtek C-ANEU értékei ($p = 0.27 - 0.91$) között, ahogy 11p telomerikus eltéréseik gyakorisága között sem. Az I-ANEU érték magasabbnak bizonyult a CD68-negatív neoplasztikus sejtpopulációban ($25.76 \pm 2.79\%$) mind a kontrol, mind a CD68-pozitív sejtpopulációhoz képest. Összehasonlítva a C-ANEU értékeket nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni a gyakoriságok között, mely random

aneuszómia jelenlétére utal mind a négy csoportban (DNRC, DRC, TNRC, TRC) Összességében a kromoszóma nyeréseket és veszteségeket körülbelül egyenlőnek találtuk a nem-recidív és recidív csoportokban, míg a malignus esetekben a kromoszóma nyerések domináltak. A poliszómia gyakoriságok (I-POLY átlagértékek) növekvő tendenciát mutattak a különböző csoportokat összehasonlítva (DNRC: 1.13%, DRC: 3.19%, TNRC: 9.71%, TRC: 11.86%, MAL: 11.16%). Emelkedő I-ANEU értékeket találtunk a különböző osteoclastoma-csoportokban, szignifikáns különbségeket találva a DRC ($26.06 \pm 3.30\%$) vs DNRC ($9.45 \pm 0.77\%$), TRC ($39.55 \pm 4.29\%$) vs DRC és TNRC ($14.63 \pm 3.62\%$), valamint a MAL ($54.02 \pm 7.24\%$) vs TRC csoportok között. A MAL csoportban az aneuszómia gyakorisága magasnak bizonyult FISH analízissel (I-ANEU: $54.02 \pm 7.24\%$) (7-8. táblázat és 37,38. ábra)).

Összehasonlítva a diploid nem-recidív és recidív, valamint a tetraploid nem-recidív és recidív csoportokat, az egyedi-sejtes aneuszómia gyakrabban volt tetten érhető a recidívokban a kiújulást nem mutató esetekhez képest. A TNRC csoport ún. euszómiás poliszómiával jellemezhető, vagyis a sejtmagokban csupán 4x vagy 8x többszöröseit láttuk mind a négy vizsgált kromoszómának, de ezt nagy százalékban (I-POLY: $9.71 \pm 3.38\%$). Mind az I-ANEU, mind pedig a totál C-ANEU értékek magasabbnak bizonyultak a malignus óriássejtes csonttumorokban a nem-recidív és recidív tumorokhoz képest. Nem találtunk klonális eltérést a DNRC és TNRC csoportokban, csupán néhány recidív eset, valamint a malignus tumorok többsége bizonyult klonálisnak.

A TAS-ra esetlegesen utaló 11p deléción minden tumorban detektálható volt, a ploiditás-értéktől és a kiújulási tendenciától függetlenül. Kissé, de nem szignifikánsan ($p=0.15$) gyakoribb volt a malignus esetekben ($16.19 \pm 2.8\%$) a benignusakhoz ($12.80 \pm 2.17\%$) képest.

A centroszóma profil és a klinikai viselkedés

Centroszóma amplifikációt nem csak a malignus, hanem benignus óriássejtes csonttumoros esetek mononukleáris stromasejtjeiben is igazolni tudtunk. A centroszóma sokszorozódás szignifikánsan magasabb volt a kiújulást mutató és malignus esetekben a nem kiújuló esetekhez képest. Hasonló összefüggést találtunk I-FISH analízissel, ahol a centroszóma amplifikáció aránya magasabb volt a malignus esetekben (36.5%) a recidív (16.6%) és nem-recidív (5%) esetekkel összehasonlítva.

Kromoszóma számbeli- és centroszóma abnormalitások

Statisztikailag szignifikáns korreláció mutatkozott a centroszóma számbeli eltérések és a kromoszómális instabilitás között mononukleáris osteoclastoma sejtekben. Egyedi-sejt szinten I-FISH analízissel vizsgálva azonban a normál centroszóma-tartalmú aneuszómiás sejtek gyakoriságát a centroszóma amplifikációt mutató aneuszómiás sejtekéhez képest, nem jött ki szignifikáns összefüggés a kromoszóma számbeli eltérések és a centroszóma aberrációk között ($p=0.31$). A 23 I-FISH analizált esetből a sejtek $4.69 \pm 2.84\%$ -a mutatott aneuszómiát normál centroszóma tartalommal, míg a sejtek $6.47 \pm 5.36\%$ -a volt aneuszómiás amplifikált centroszóma számmal.

Megbeszélés

Tanulmányunkban az óriássejtes csonttumorok DNS tartalmát citofotometriával vizsgálva azt találtuk, hogy bár a nem-recidív tumorok többsége diploid, mégis mutatkozik egy tetraploid szubpopulációt tartalmazó csoport közöttük, ahogy a recidív, tendenciájukban tetraploid vagy aneuploid tumorok között is előfordulnak normál diploid esetek. Így a ploiditás önmagában nem elegendő az óriássejtes csonttumor klinikai viselkedésének előrejelzéséhez. Mivel gyanítható volt ezek alapján, hogy mind az öt csoport random egyedi-sejtes aneuszómiát tartalmaz, vagyis nem lehet szignifikáns különbség a különböző kromoszómák

aneuszómia gyakorisága között, vizsgálatainkat kromoszómális szinten folytattuk. Szignifikánsan magasabb random egyedi-sejtes aneuszómiát találtunk a recidív tumorokban a nem-recidívekhez képest mind a diploid, mind a tetraploid csoportban, míg klonális kromoszóma eltéréseket egyedül a malignus tumorokban voltak. Euszómiás poliszómia mutatkozott néhány tetraploid nem-recidív esetben és gyakrabban volt látható kiegyensúlyozott aneuszómia (a kromoszóma nyérések és vesztések egyenlőek) a diploid recidív esetekben a diploid nem-recidív esetekhez képest. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a jellemző telomerikus asszociációkon felül a számbeli kromoszómális eltérések lehetnek felelősek az óriássejtes csonttumor agresszív klinikai lefolyásáért. Klonális kromoszómális eltéréseket a 7 malignus esetből 5-ben találtunk FISH analízissel és 2-ben array komparatív genomikus hibridizációval, így összesen 6 malignus eset mutatott klonális eltérést a 7-ből. A malignus viselkedés ezek alapján nagyon valószínű, ha eltérések mutatkoznak array-CGH vizsgálattal, vagy az aneuszómia gyakoriság magasabb, mint 20% FISH-sel. 3 recidív eset mutatott klonális eltéréseket FISH-, egy pedig array-CGH vizsgálattal (a FISH analízissel egybehangzóan). A nem-recidív esetekben nem volt klonális eltérés. Az aneuszómia tendenciája és a klonális eltérések arra utalnak, hogy az óriássejtes csonttumor genetikai instabilitásában biológiai kontinuitás lehet. A különféle eddig vizsgált molekuláris mechanizmusok között óriássejtes csont tumorban ezidáig még nem tanulmányozták az aberráns centroszómaszám szerepét a kromoszómális instabilitás kialakulásában egyedi sejt szinten. Tudásunk szerint ez az első beszámoló a számfeletti centroszómák direkt szerepének vizsgálatáról a kromoszómális instabilitás kialakulásában nagyobb óriássejtes csonttumoros anyagon, olyan tumoron, mely változó mértékben mutat agresszív viselkedést és ritkán metasztatizálhat is. A centroszóma aberrációk direkt szerepéről szóló vélemények a kromoszómális instabilitás kialakulásában eltérőek. A centroszómaszám és aneuszómia-arány statisztikai korrelációjáról szóló néhány tanulmány kimutatta, hogy a számfeletti centroszómák okozta

mitotikus multipolaritás a felelős az aneuszómia kialakulásáért epitheliális tumorokban, mint pl. az emlőrákok vagy kolorektális rákok esetén. Hasonlóan azonban az általunk óriássejtes csonttumorban találtakkal, más malignus epitheliális, valamint benignus és malignus mesenchymális tumorok sem mutattak korrelációt a centroszómaszám és az aneuszómia-frekvencia között. Eredményeink szerint a centroszóma amplifikáció tetten érhető a benignus óriássejtes csonttumoros esetekben, mely arra utal, hogy önmagában nem karakterisztikus a malignus osteoclastomákra. A tumor viselkedésével talált korreláció felveti, hogy a centroszómaszám meghatározás hasznos eszköz lehet a tumor klinikai lefolyásának előrejelzésében. A kromoszómális instabilitás és a centroszóma eltérések egyedi sejt szinten talált függetlensége arra utalhat, hogy a centroszóma amplifikáció egymagában nem tehető felelőssé a mitotikus abnormalitások kialakulásáért óriássejtes csonttumorban.

4. A synoviális sarcoma genetikai eltéréseinek és jelút-rendszereinek vizsgálata

A synovialis sarcoma a harmadik leggyakoribb felnőttkori malignus lágyrész tumor féleség. Leggyakrabban adolescens korban és fiatal felnőtt korban fordul elő 15 és 40 év között. A tumor kialakulásának ideje az esetek legnagyobb részében 2-4 év, de néhány esetben a tumor helyén kialakuló fájdalom, a tumor lassú növekedése miatt, az operációt megelőzően 20 évvel korábban is megjelenhet. A synoviális sarcoma jellegzetes, bár egyáltalán nem specifikus immunfenotípust mutat, amennyiben koexpresszió jelentkezik vimentin keratin és EMA reakciókkal. Az esetek egy részében S100 pozitívítás is jelentkezhet, ami többnyire csak inkább differenciáldiagnosztikai problémákat okoz. Molekuláris szinten viszont igen jellemző a specifikus translocatio, leggyakrabban a kiegyensúlyozott reciprok translocatio (X;18) (p11.2;q11.2), mely a synovialis sarcomák több mint 90 %-ában jelentkezik. A synoviális sarcoma prognózisa

jobb mint az egyéb magas malignitású lágyrész daganatoké, az 5 éves túlélés 50-80%-ra tehető, mely függ alapvetően a beteg korától, a tumor nagyságától, a gyengén differenciált területek arányától és a rezekabilitástól. Mindezek mellett számos más prognosztikai faktornak is jelentősége lehet, így a DNS tartalom (ploiditás) valamint a Her-2 státusz már a korábbiakban is vizsgált de ellentmondásos eredményeket mutató prognosztikai faktornak tartható. Ez vezetett bennünket, hogy 20 synovialis sarcoma esetén DNS tartalom és Her-2 státusz meghatározást végezzünk az esetleges prognosztikai összefüggések felderítésére.

HER2 protein expressziója synovialis sarcomában immunhisztokémiai vizsgálattal

20 esetből 4 esetben volt gyenge fokális cytoplasma pozitivitás (1+), 20 esetből 3 esetben figyeltünk meg erős pozitivitást mind a plasmamembránban és mind a cytoplasmában (2+) (49. ábra). Erős pozitivitást (3+) nem figyeltünk meg. Nem volt látható különbség a festés minőségét illetően az epitheloid és az orsósejtes régió között. Egészében véve a 7 pozitív eset a synovialis sarcomák 35 %-át representálta.

HER2 génamplifikáció vizsgálata synovialis sarcomában fluorescens in situ hibridizációval.

FISH analízist végezve a HER2 gén amplifikációját 3 esetben találtuk (15%). Az amplifikációs ráta 2-3-szoros volt minden esetben, a kiértékelt sejtek több mint 10 %-ában. Masszív amplifikációt nem figyeltünk meg. A HER-2 oncogén amplifikált esetek ugyanazok voltak, mint amelyeknél immunhisztokémiával 2+ pozitivitást találtunk. Az 1+ pozitivitású esetekben amplifikáció nem volt megfigyelhető. Egy esetben a 17-es kromoszóma triszómiáját figyeltük meg, míg egy másik esetben a 17-es kromoszóma poliszómiáját találtuk, de ezek a tények nem befolyásolták a HER-2 protein expressziójának státuszát.

DNS cytometria

A 20 synovialis sarcoma közül 6 aneuploid esetet találtunk (30%), két bifázisos és négy monofázisos esetet. Az aneuploid esetek közül egy hypodiploid volt, ebben az esetben a DNS index 0.89 volt. Továbbá 11 monofázisos és 3 bifázisos eset volt diploid. A 3 HER-2 gén amplifikációt mutató esetből egy aneuploid volt, míg a másik kettő diploidnak bizonyult. Az aneuploid esetek közül egy hypodiploid volt, ebben az esetben a DNS index 0.89 volt. Továbbá 11 monofázisos és 3 bifázisos eset volt diploid. A 3 HER-2 gén amplifikációt mutató esetből egy aneuploid volt, míg a másik kettő diploidnak bizonyult.

Korreláció a HER-2 status, a DNS ploiditás és a prognózis között

A HER-2 oncogén amplifikációja szignifikáns összefüggést mutatott az alacsonyabb metasztázis képzés rizikójával ($p < 0.05$). A három amplifikált eset közül egyik sem adott metasztázist, ez szignifikáns összefüggést jelentett, viszont nem találtunk szignifikáns összefüggést a recidiva képzés és az amplifikációt illetően. Nem találtunk továbbá összefüggést a HER2 gén amplifikációs statusa és a ploiditás között. Ugyancsak nem találtunk összefüggést a ploiditási status, a metasztázis képzés vagy a recidiva kialakulása között.

Megbeszélés

A saját 20 synovialis sarcomáink esetén a tumor mérete 5 cm-nél nagyobb volt, a betegek átlag életkora 39.8 év volt, és hiányoztak a gyengén differenciált területek minden esetben. Úgy tűnik, hogy ez a csoport ideális annak tesztelésére, hogy a Her-2 oncogén amplifikáció mint prognosztikai faktor használható-e. Emlőrákos betegeknél a chemoterápiára és endocrin terápiára adott választ, a kezelést, és a betegség kimenetelét meghatározza a Her-2 gén amplifikációja, és a protein overexpressziója, mint prognosztikai faktor. Saját eredményeink lényegében megegyeznek mások eredményével, mivel a Her2 oncogén

amplifikáció szignifikáns összefüggést mutatott az alacsonyabb metasztázis képzés rizikójával, amely összességében jobb prognózist jelent. Másrészt azonban mi nem találtunk összefüggést a recidiva képzést illetően. Saját eredményeink hangsúlyozzák és megerősítik a már eddig részben megfigyelt eredményeket, hogy egy mérsékelt szintű Her-2 génamplifikáció valóban megtalálható egyes synovialis sarcomák esetében és ezen génamplifikáció és protein overexpresszió prognosztikai faktorként tekinthető. Mi voltunk az elsők, akik FISH technika alkalmazásával igazoltuk a Her2 génamplifikációt synovialis sarcomáknál. Eseteinkben nem volt összefüggés a ploiditási státusz és a metasztázis képződés vagy a recidiva képződés között, és nem volt szignifikáns összefüggés a Her-2 génamplifikációja és a ploiditás között. A ploiditást illetően feltételezhető, hogy saját eseteink, nem elég nagy számúak ahhoz, hogy szignifikáns összefüggést találjunk, és valószínű, hogy szignifikancia esetén is a ploiditási státusz nem lesz valódi independens prognosztikai faktor. Összefoglalva, eredményeink hangsúlyozzák és megerősítik azt, hogy a HER-2 onkogén amplifikációja ritkán fordul elő a synovialis sarcomáknál, de a synovialis sarcomák azon kis csoportjánál, ahol ez megfigyelhető, ott kedvezőbb prognózist jelent. Ugyanezen célcsoportnál a Her2 amplifikáció igazolása lehetőséget ad egy újabb kezelésre nevezetesen Herceptinre (Trastuzumab), ami igen nagy jelentőségű, hiszen általában a lágyrész sarcomák kezelése beleértve a synovialis sarcomát is meglehetősen szegényes és problematikus.

A synoviális sarcomák jelút rendszereinek vizsgálata

A synoviális sarcomákra ahogy már említettük is jellemző a specifikus t(X;18)(p11.2;q11.2) transzlokáció. Ennek gyakorisága az egyes tumorokban a publikációs adatok szerint egyre növekedett, hiszen kezdetben 70-80% körüli gyakoriságról beszéltek, de a legújabb WHO „több mint 90%-ot mond. Saját megfigyeléseink szerint is ez az arány 80% körül mozog, különösen ha figyelembe vesszük a konzultációs anyagok viszonylag nagy számát, melyekben

a transzlokáció negatív esetek gyakoribbak. A SYT-SSX chimericus fehérje tartalmazza feltehetően a SYT területen a transkripció aktivációs régiót, és a repressziós domaint az SSX részben. A chimericus fehérje transzkripció onkogén szabályzó szerepe transzkripció alulszabályozásban nyilvánul meg. Számos tanulmány foglalkozott ezzel az effektussal és azt találták, hogy alul szabályozza a sejt proliferációt szabályzó COM1-t, beta-catenin akkumulációt hoz létre a magban, elősegíti a p53 ubiquitinációt és lebontást, újrarendezzi a cytoskeletont az ephrin jelút rendszeren keresztül, és stabilizálja a cyclin D1-et. A tanulmányok többnyire sejt vonalakat használtak, de kevés vizsgálat történt nagyobb paraffinos anyagon a chimericus fehérje és a jelútrendszerek összefüggéseit vizsgálva. Tanulmányunkban 50 synovialis sarcomát vizsgáltunk TMA-val (tissue micro array), hogy van-e vajon olyan kitüntetett jelút rendszer, mely lényegében felelős lehet a tumor progresszióért. A synovialis sarcomák többsége a receptor tyrosin kinázok (EGFR, VEGFR, PDGFR de nem az IGFR) overexpresszióját mutatta, tovább aktiválva a RAS-AKT-mTOR jelút rendszert. Mindezekről függetlenül, a WNT-beta-catenin jelút rendszer szintén aktív volt (csak β -catenin magi pozitívitást vettük figyelembe). Az apoptózis szabályozók mint a NFkB és MDM2 szintén aktívak voltak. A p21 kivételével minden vizsgált sejt ciklus szabályzó aktív volt. Ugyanakkor érdekes az előbb említett szabályzók aktivitása tekintetében nem volt különbség a transzlokáció negatív és transzlokációt tartalmazó csoport között, kivéve a p4EBP1-t, a PTEN-t és a beta-catenint. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a synovialis sarcomák proliferációjában számos jelút rendszernek szerepe van, de úgy tűnik, mégis a legfontosabbak egyike lehet az AKT-mTOR jelút rendszer. Minthogy a transzlokáció negatív és pozitív esetekben igen hasonló volt a jelút rendszerek aktivitása, ez arra enged következtetni, hogy a transzlokációnak igen fontos szerepe van magának a daganatnak a kialakulásában, de valószínű, hogy a további tumor progresszióban már kevésbé lényeges, sőt néha el is „veszhet”. Eredményeink fényesen igazolták és erősítették meg a korábban

szövettenyészetekben talált eredményt, miszerint a fúziós fehérje béta katenin magi accumulációt eredményez (függetlenül a kanonikus Wnt jelút rendszertől), ami a transzlokáció pozitív és negatív esetek különbsége (az előzőek javára) alapján demonstrálható volt.

5. A perifériás idegtumorok genetikai instabilitásának vizsgálata

A perifériás idegtumorok (PNST) meglehetősen heterogén csoportot képeznek, több mint 20 entitással. Bár a leggyakoribbak a konvencionális Schwannomák és neurofibromák, melyek nem okoznak differenciáldiagnosztikai problémát, azonban számos altípust már jóval nehezebb malignus lágyrésztumoroktól (elsősorban MPNST-től) elkülöníteni, ilyenek pl. az anciant, celluláris, neuroblastoma like és a multiplex Schwannoma. Mindezt figyelembe véve kerestük azokat az objektív kapaszkodókat, melyek segítenek az elkülönítésben. Ilyen objektív kapaszkodó lehet a ploiditás és a kromoszomális instabilitás vizsgálata. Mind a mai napig az irodalmi adatok ellentmondásosak abban a tekintetben, hogy a benignus Schwannomák vajon euploidak vagy aneuploid benignus daganatok is léteznek. Meglehetősen sok cytogenetikai adat ismert a PNST-k tekintetében, de ezek többnyire a jól ismert 17q és 22q eltérésekre koncentrálnak (NF1 és NF2), mint a neurofibromák és a Schwannomák kezdő patogenetikai történéseire. Sokkal kevesebb vizsgálat történt a számbeli kromoszóma eltérések feltérképezésére (FISH vizsgálat), különösen nem megfelelő számú interfázisos sejtet analizálva. Három kromoszómát választottunk ki – 7-es, 17-es, és 18-as – FISH vizsgálatra, minthogy ezen kromoszómák veszteségei és többletei már korábbi munkákban szerepeltek. A 22-es kromoszóma értelemszerűen szintén szerepelhetne, de a keresztreakciót adó 14/22-es centromerikus próba miatt ezt kihagytuk a vizsgálatból. Célkitűzésünk volt annak vizsgálata, hogy a benignus Schwannomák euploid-poliploid tulajdonságot mutatnak-e, illetve finomabb elemzéssel, FISH analízissel az

euszómiás-poliszómiás jellemvonás megfigyelhető-e, továbbá betekintést nyerhessünk ezen tumorok esetén a malignus transzformáció mechanizmusának mikéntjébe. Vizsgáltuk azt is, hogy ezen jellemzők segítséget jelentenek-e a helyes diagnózis felállításában.

A 44 perifériás ideghüvely tumort, ezen belül 27 benignus Schwannomát választottunk ki, amelyek között 5 anciant, 2 cellularis (pseudosarcomatosus), 2 neuroblastoma like, és 1 multiplex variáns volt (55,56. ábra). A kiválasztott 9 neurofibroma egy atípusos-cellularis szubtípust foglalt magában. A 8 malignus perifériás ideghüvely tumorból 2 malignus epithelioid tumor volt. A nyomonkövetési idő legalább 5 év volt.

Adszorpció cytotometriás DNS vizsgálat

44 perifériás ideghüvely tumor ploiditás vizsgálatát végeztük el. Az összes benignus Schwannoma, beleértve a differenciáldiagnosztikai szempontból problémás eseteket is, diploid volt. 27-ből 25 karakterisztikusan euploid-poliploidizációt mutatott (92.5 %). A 10 %-nál nagyobb 4c csúcsérték 27-ből 20 esetben volt megfigyelhető. (74%). Az összes neurofibroma (9 eset) magában foglalva az atípusos szubtípust is, diploidnak bizonyult, és 2 eset ezek közül euploid-poliploidizációt mutatott (22.9 %), de a 4c csúcsérték nem volt több mint 10 % (10. táblázat). A 8 malignus perifériás ideghüvely tumorból 3 diploidnak bizonyult, de az 5 másik aneuploid volt. Ezek a tumorok nem mutattak euploid – poliploidizációt.

8 esetből 1 esetben volt megfigyelhető 10 %-nál nagyobb 4c csúcsérték, de ezen sejtek 4c régióját valójában G2 fázisú sejtek alkotják, minthogy ezen sejtek nem valódi tetraploid- tetraszómiás sejtek, amit a FISH analízis is igazolt.

Interfázisos cytogenetika, FISH analízis

A megszámlolt jeleket, szignálokat két csoportra oszthatjuk, euszómiás-poliszómiás jelek, a jelek száma: 2, 4, 8, 16, és az aneuszómiás jelek, a jelek száma: 1, 3, 5, 6, 7.

Azokat a sejteket, amelyekben a jel kiértékelés a relokalizáció után is lehetetlen volt, kihagytuk az értékelésből. A nem megfelelő sejtek átlaga 4.1% volt, az intervallum 1.3-7% volt. Poliszómiát figyeltünk meg a benignus Schwannomáknál, az átlag 13.9% volt. Ez az eredmény harmonizál az adszorpció cytofotometriás DNS vizsgálatnál nyert eredményekkel.

A poliszómia szignifikánsan nagyobb volt az ancient Schwannoma esetében (30.1 %), amely összhangban van azzal, hogy a tumorsejtek nagy számú megnagyobbodott, hyperchromatikus, multilobulált magokat tartalmaznak, a Schwannomák ezen típusánál. A poliszómia megfigyelhető volt az atípusos neurofibrómánál (4.3%), de nem találtunk poliszómiát a malignus perifériás ideghüvely tumor esetén. Tetraszómiát találtunk a 44-es eset számú malignus perifériás ideghüvely tumor esetén, de igen alacsony számban (0.7%). Ugyanebben a tumorban a 4c csúcsérték több mint 10% volt. A 4c csúcsértéket mutató sejtek valójában G2 fázisú sejtek, (dupla DNS mennyiséget tartalmaznak), és nem igazi tetraszómiás sejtek. Ezen G2 fázisú sejtek kromoszóma páriainak centromerikus régiója összefügg, mert a mitózis alatt a kromoszómák nem válnak szét, és mi centromerikus DNS próbákat alkalmaztunk, amelyek normálisan minden kromoszómára 2 jelet adtak. Valódi tetraszómia esetén a kromoszómák 4 jelet adnának. Nagyon érdekes az a megfigyelés, hogy néhány benignus Schwannoma kis százalékban aneuszómiát mutatott, az aneuszómiás sejtek az összes sejtnél a 2.58%-a, az intervallum 1.33-3.44 volt. Ezzel ellentétben az atípusos neurofibroma, markáns aneuszómiát mutatott, (18.44 %), de a neurofibromák 4.3%-ban poliszómiát is prezentáltak. Fontos, hogy ha a monoszómia és a triszómia azonos számú, akkor az aneuszómiát „balanced”, kiegyensúlyozott aneuszómiának nevezzük, amely a teljes DNS tartalomra

vonatkozik, és ebben az esetben a DNS index diploid. Két diploid MPNST mutatott egyértelmű aneuszómiát, az egyik a 17-es kromoszóma volt (89.6%, 44-es eset, triszómia), másik pedig a 18-as kromoszóma (91.6%, 40-es eset, monoszómia). Azokat az eseteket, amikor nem tudtunk lemérni megfelelő 300 sejtet (technikai okok miatt), kihagytuk az értékelésből, (összesen 5 benignus eset), bár ezek a tumorok teljesen hasonló eredményt mutattak, mint a másik lemerő 6 benignus Schwannoma.

Megbeszélés

Munkánk során adszorpció cytofotometriás DNS tartalom meghatározást alkalmaztunk FISH analízissel kiegészítve. A DNS citometria áttekintő képet ad, míg a FISH technika még több részlet információt szolgáltat. Mindkét technika alkalmazása elősegíti, hogy megismerjük és megértsük a különböző tumor típusok oncogenesise során bekövetkező kromoszómális változásokat. Célunk az volt, hogy feltérképezzük a perifériás ideghüvely tumorok ploeditását, és a kromoszómális ploeditást, melyeknek ismerete segítségünkre lehet a differenciál diagnózis során, másrészt tisztázzuk azokat az irodalomban megjelenő ellentmondó adatokat, amelyek a perifériás ideghüvely tumorok DNS ploeditására vonatkoznak. Saját vizsgálataink eredménye megerősítette, hogy a benignus Schwannomák euploid tumorok poliploidi-zációval, a szubtypustól függetlenül. Ez a tény nagy segítséget nyújt, hogy ezen tumorokat megkülönböztessük a malignus lágyrésztumoroktól, aspirációs cytologiai és/vagy histológiai vizsgálat körülményei között. A Schwannomák esetén a 4c csúcsérték több mint 10 % volt, de ezt a karakterisztikus jellemvonást a neurofibrómák, és a malignus Schwannomák nem mutatták. Ez a karakterisztikus tulajdonság segít megkülönböztetni a Schwannomákat a neurofibrómáktól, segít differenciálni a Schwannomák speciális eseteit, mint például a multiplex Schwannoma, Antoni B Schwannoma, plexiform Schwannoma, orrűregi Schwannoma, amely utóbbi nem rendelkezik tokkal.

Saját DNS ploeditás vizsgálatunk eredményeire alapozva, tekintetbe véve az irodalmi adatokat is, úgy tűnik, hogy a benignus perifériás ideghüvely tumorok messze döntő többsége diploid, (a benignus Schwannomák euploid-poliploidizációs tulajdonságot mutatnak), de nagyon kis arányban aneuploid daganatok is előfordulhatnak, legalább is régebbi irodalmi adatok szerint. Azok a nagyon kis számú valódi aneuploid Schwannomák feltehetően magasabb arányban kell, hogy tartalmazzanak aneuszómiát, és ezen aneusomának feltétlenül kiegyensúlyozatlannak kell lennie, hogy valódi aneuploid értéket kapjunk. Saját eseteinkben csupán kis százalékban találtunk aneuszómiát és az is kiegyensúlyozott volt. Viszont az atípusos neurofibrománál magas százalékban találtunk kiegyensúlyozott aneuszómiát mely felveti a kérdést, hogy a nagy százalékban aneuszómiás benignus perifériás ideghüvely tumorok valóban igazán benignus tumorok-e? Természetesen a morfológiai kép alapján benignus tumoroknak tekinthetők, de a genetikai kép alapján a lágyrész tumorok között „dysplasiásnak” minősíthetők. Természetes, hogy ez a dysplasia nem eredményez se recidivát, se metasztázist, mint ahogy ez hám eredetű dysplasiák esetén se figyelhető meg.

A kérdés különösen érdekes, ugyanis azonos problémát vetnek fel mások is, akik leírtak Schwannomákban epitheloid malignus átalakulást, és egyben ezt az epitheloid malignus ideghüvely tumorok precursor laesiójaként tekintették. Bár ez csupán morfológiai megfigyelés volt, úgy tűnik, hogy a precursor dysplasiás sejtek mind morfológiai, mind genetikai szinten kifejeződnek.

A neurofibromin 2 gén módosulása a kezdeti, első lépés a Schwannoma pathogenesisében, és talán ez lehet felelős az euploid-poliploidizációs folyamat kialakulásáért, és ennek eredményeként az euszómiás-poliszómiás sejtek megjelenéséért is. Ez alatt a folyamat alatt további károsodások keletkezhetnek, pl. kromoszóma veszteségek és többletek alakulhatnak ki, amelyek további euszómiás- poliszómiás, aneuszómiás sejtek kialakulásához vezetnek. Az aneuszómia lehet kiegyensúlyozott vagy kiegyensúlyozatlan, és lehet kis vagy

nagy arányú. Úgy tűnik, hogy addig ameddig az aneuszómia százaléka alacsony és kiegyensúlyozott addig a tumor teljesen benignus, mint az általunk vizsgált Schwannomák eseteiben is. Ha a kiegyensúlyozott aneuszómia aránya emelkedik, a tumor atípusossá válik, mint ahogy a mi atípusos neurofibrománknál is ez megfigyelhető volt. Ez azt jelenti, hogy sokkal nagyobb az esélye így a malignus transzformációnak, a malignus tumor kialakulásának. Természetesen teljesen tudatában vagyunk annak, hogy a malignus perifériás ideghüvely tumor malignus tulajdonságának kialakulása komplex folyamat, (neurofibromin 1, p53 károsodás, INK4A gén deléciója, p27 abnormalitás), de az euszómia-poliszómia megjelenése szerepet játszhat a malignitás kialakulásában. Teóriánkat alátámasztja az a tény, hogy a malignus perifériás ideghüvely tumorok nem mutatnak karakterisztikus cytogenetikai eltéréseket, nincsenek specifikus translokációk és nincsenek specifikus numericus eltérések, hanem valójában komplex karyotípust mutatnak számos strukturális és számbeli eltéréssel, és a számbeli eltérések véletlenszerűen alakulnak ki. Saját eseteinkben 17-es kromoszóma triszómiát és 18-as kromoszóma monoszómiát találtunk, míg mások 7-es triszómiát, és 22-es monoszómiát mutattak ki, mint egyedüli számbeli eltérést.

Összefoglalva, a ploeditás vizsgálat kiegészítve FISH analízissel, nagy segítséget nyújthat a helyes diagnózis felállításában, és betekintést enged a perifériás ideghüvely tumorok malignus transzformációs folyamatába. Lényegében elsőként között számoltunk be arról, hogy a benignus Schwannomák kis százalékban kiegyensúlyozott aneuszómiát mutatnak, valamint arról, hogy az atípusos perifériás ideghüvely tumorokban mindez jóval nagyobb százalékban fordulhat elő, ami alapján a daganat „dysplastikus – precursor” léziónak tekinthető.

6. A Gastrointestinális Stromális Tumor (GIST) mTOR jelútrendszerének vizsgálata a molekuláris eltérések függvényében

A gastrointestinalis stromális tumorok az emésztő rendszer leggyakoribb mesenchymalis tumorai, ugyanakkor igen változatos biológiai viselkedést mutatnak. A daganat patogenezisében a KIT és PDGFRA tirozin kináz receptor fehérjék aktivációs mutációi centrális szerepet játszanak: KIT mutáció igazolható az esetek mintegy 75-80%-ában, PDGFRA mutáció mintegy 5-8%-ban, és nincs mutáció az esetek mintegy 12-15%-ában (vad típus). A tirozin kináz gátlók forradalmi változást hoztak számos tumor kezelésében, nevezetesen az imatinib szelektíven gátolja a BCR-ABL fúziós fehérjét CML-ben és a KIT és PDGFRA kináz aktivitást GIST-ben. Metasztatikus GIST esetén mintegy 80%-os klinikai válasz érhető el. Mindazonáltal mintegy 10-20%-ban a betegek primer rezisztenciát mutatnak az imatinib szemben, és másodlagos rezisztencia pedig jóval nagyobb százlékban is kifejlődhet azokban a betegekben akik priméren jól reagáltak. A mutációs státusz általában jól megadja a terápiás válasz mértékét, viszont a PDGFRA 18-as exon leggyakoribb mutációja (D842V) gyakorlatilag primer rezisztenciát jelez. A kezelés során detektálható új mutációk pedig gyakorlatilag a szekunder rezisztencia kialakulásáért felelősek. Az imatinib rezisztencia problémájának megoldása érdekében új tirozin kináz gátlókat fejlesztettek ki. A SU11248 (szelektíven gátolja az FLT3-at, KIT-et, PDGFRA-t és a VEGFR-t) és a ZD6474 (VEGFR-2, EGFR és RET gátló) egyaránt csökkenti az Akt/mTOR tengely jeleit és gátolja GIST sejtvonalakban a sejtek növekedését. Érdekes, hogy a rapamycin (mTOR gátló) növelni tudta a SU11248 hatását. Minthogy azonban az új gátlók ellenére is kialakulhat rezisztencia, az mTOR gátlók potenciális lehetőségként szerepelnek a kezelési „fegyvertárban”. Bár GIST sejtvonalakon történtek vizsgálatok az mTOR jelútrendszer szerepét illetően, mindezidáig nincs adat nagyobb számú klinikai GIST szöveti elemzését

tekintve, pedig nagyon fontos lenne megtalálni azt a beteg csoportot akik számára hasznos lehet az mTOR gátlók terápiás használata. Munkánkban célul tűztük ki a GIST-es betegek mTOR jelútrendszerének aktivitási fokának vizsgálatát összehasonlítva a KIT és PDGFRA mutációs státusszal.

108 paraffinos blockot vizsgáltunk 108 GIST-es betegből, beleértve a konzultációs anyagokat is. A 2006 és 2009 közötti három éves periódusban a 108 vizsgált beteg klinikai adatai a következők voltak: 63 férfi és 45 nő. Az átlag életkor 60 év volt, a legfiatalabb 27 éves, míg a legidősebb 86 éves volt. A daganat elhelyezkedését illetően 46 gyomor, 33 vékonybél, 12 vastagbél, 4 májajáték, 4 retroperitoneális, 4 mesenterialis, 2 Meckel diverticulum, 1 nyelöcső és két hasi tumort vizsgáltunk. Szövettenileg orsósejtes GIST 69 esetben, epithelialis 12 és kevert orsósejtes-epithelialis GIST pedig 23 esetben volt, valamint 4 bizonyított anaplasztikus jellegűnek. A rizikó csoportot illetően 79 magas rizikójú, 17 intermediér és 12 alacsony rizikójú GIST-et vizsgáltunk. Két független patológus vizsgálta az immunfestett metszeteket (TMA) pontozásos rendszert használva. A pozitivitás intenzívítását (negatív, mérsékelt vagy erős), a pozitív sejtek mennyiségét (elszórt: <5%, fokális: 5%-30%, kiterjedten fokális: 30%-70%, és diffúz: >70%) vettük figyelembe. Ezen kritériumok alapján az egyes antitestek festődését a következőképpen értékeltük: erős pozitivitás (kiterjedten fokális vagy diffúz erős pozitivitás vagy diffúz mérsékelt pozitivitás; ++), részben pozitív (elszórt vagy fokális erős festődés vagy kiterjedten fokális mérsékelt festődés; +), és negatív (-). A három antitest komplex kiértékelése után az mTOR jelút aktivitásának mértékét az alábbiak szerint határoztuk meg: *aktív* (mind a három immunreakció erősen pozitív, vagy 2 erősen pozitív és 1 fokálisan), *inaktív* (mind a 3 festés negatív vagy 2 negatív és egy fokálisan pozitív) vagy *részlegesen aktív* (minden további kombináció).

A DNS szekvenálás részben diagnosztikus célból történt, többségben azonban (magas rizikójú csoport) a terápiás kezelés miatt. KIT mutációt találtunk 73 esetben (exon 11, 62; exon 9, 8; exon 13, 2 és exon 17,1). 12 PDGFRA mutációt

találtunk, melyek közül 9 esetben a leggyakoribb 18-as exont érintő D842V mutációt igazoltuk, továbbá 3 esetben 18-as exon delétiót mutattunk ki (12 bázispár vesztese a 843-846 aminosav régióban). Összesen 23 vad típusú esetet találtunk egyértelmű CD117 pozitivitás mellett. Ebből 21 esetben nem volt mutáció, míg 2 esetben un. single nukleotide polymorphism” volt megfigyelhető (SNP) a PDGFRA 10-es exonjában mely S478P tranzicót eredményezett. A TMA metszeteket foszfo-4EBP1, foszfo-p70S6K és foszfo-S6 ellenes antitestekkel festettük melyek „downstream” célfehérjéi az mTOR kináznak. Mind a 3 antitest számos, (de nem mindegyik) GIST esetben mutatott pozitivitást. Ha egyenként vizsgáljuk az antitesteket a p4EBP1 esetén (mérsékelt és erős pozitivitás) 73 KIT mutáltból 27 esetben, 12 PDGFRA mutáltból 8 esetben és a 23 vad típusból 12 esetben találtunk pozitivitást (65. ábra). A pp70S6K tekintetében 73 KIT mutáltból 29 eset, 12 PDGFRA mutáltból 10 eset és a 23 vad típusból 13 eset volt pozitív (66. ábra). Pozitív pS6-ot találtunk a 73 KIT mutáltból 26, 12 PDGFRA mutáltból 11 és a 23 vad típusból 10 esetben (67. ábra). Az mTOR jelút aktivitásának komplexebb vizsgálatához a 3 antitest együttes analízisét végeztük a korábban leírtak szerint. Mindezen igen részletes eredmény alapján azt találtuk, hogy a 73 KIT mutáltból 45 esetben volt az mTOR jelút *inaktív* és csupán 28 esetben mutatott funkcionális aktivitást (részlegesen aktív és aktív). Ezzel szemben a PDGFRA mutált esetekben funkcionálisan 10 eset volt *aktív* a 12-ből és csak 2 inaktív valamint a vad típusú eseteknél is 17 *aktív* és 6 inaktív eset mutatkozott a 23-ból. Szignifikáns különbséget találtunk az egyes csoportok (KIT mutált 38.4%, vad típus 73.9% és PDGFRA mutált 83.3%) között az aktivitás mértékét illetően: $P=0.000621$. A statisztikai adatokat kombinálva az általunk talált eredményekkel erős fordított összefüggést tudtunk kimutatni az imatinibre adott terápiás válasz és az egyes csoportok mTOR jelút aktivitásai között: $r = -0.962$. Az exon 11 mutáltak esetén a terápiás válasz 65-67% míg az mTOR aktivitás 38.4%, a vad típus esetén a terápiás válasz 23-40%, míg az mTOR

aktivitás 73.9% és a PDGFRA mutáltak esetén a terápiás válasz minimális (5-8%) viszont az mTOR aktivitás 83.3%.

Megbeszélés

Napjainkban az imatinib mesylate kezelés standard formának számít az előrehaladott GIST-ek kezelésében. A magas terápiás válasz ellenére (75-90%) vannak olyan GIST-es alcsoportok melyek primer rezisztenciát mutatnak, és bár a másodlagos rezisztencia kialakulásának mechanizmusa ma már ismert, az elsődleges rezisztencia kérdését még ezidáig nem nagyon vizsgálták. Ugyanakkor szinte mindegy, hogy a rezisztencia primer vagy szekunder abból a szempontból, hogy hatékony kezelés csak akkor képzelhető el, ha ismerjük a tirozin kináz receptorok jelútrendszerét, azokat a centrális lépéseket melyekkel hatékony gátlás képzelhető el. A szignálutak komplexitása, a részben paralell futó és részben egymásba kapcsolódó jelutak azonban nem mindig adnak egyértelmű választ a mechanizmusra, illetve így érthető, hogy a túlélő, terápia rezisztens sejtek számára megkerülő, „menekülő” útvonalak is léteznek. Korábbi publikációk szerint a PI3K-Akt-mTOR jelút fontos lehet a GIST-ben és egy igen fontos túlélési jelút az imatinib rezisztens GIST-ek esetén. Ugyanakkor ebben a tekintetben ezidáig csupán szövet tenyészeti adatok álltak rendelkezésre (összesen 6 KIT mutált sejtvonal, de nincs vizsgálható vad típusú és PDGFRA mutált sejtvonal) (164,166). Nagyobb szériájú klinikai mintákat illetve paraffinos anyagot mindeztidáig nem vizsgáltak és különösen nem a 3 foszforilált mTOR célfehérjéit illetően (pp70S6K, p4EBP1 és pS6). Munkánkban 73 KIT mutált, 12 PDGFRA mutált és 23 vad típusú esetet vizsgáltunk, melyek elégségesek egy részletes elemzéshez.

A 3 antitest kombinált kiértékelése egy sokkal szélesebb áttekintésre adott lehetőséget a reális mTOR aktivitást illetően mint a korábbi tanulmányok, ahol vagy csak a p70S6K-t (225), vagy a pp70S6K és/vagy a p4EBP1-et vizsgálták. Eredményeink világosan mutatják, hogy az mTOR jelút aktivitás nem általánosan

jellemző a KIT mutált GIST-ekre, bár körülbelül egyharmadukban megjelenik. Az is nyilvánvaló, hogy szignifikáns különbség van az mTOR aktivitást illetően a különböző csoportokban ($P < 0.005$). Ha figyelembe vesszük, hogy irodalmi adatok szerint az Akt-mTOR jelút kritikusan fontos túlélési jelút a GIST-ben és felelős lehet a primer rezisztenciáért, akkor igen érdekes, hogy eredményeink igen csak alátámasztják ezen elképzelést. Ahogy már az eredményekben is mutattuk, meglehetősen szoros negatív korrelációt ($r = -0.96$) találtunk az imatinibre adott terápiás válasz és az mTOR aktivitás között, figyelembe véve a mutációs státuszokat. Mindezen eredmények alapján feltételezhetjük, hogy azok a KIT mutált esetek amelyekben aktív az mTOR jelút, nagyobb valószínűséggel válnak rezistenssé, bár nyilvánvalóan ez a feltételezés klinikai megerősítést igényel. Az individuális onkológiai kezelés nagy kihívás napjainkban az onkológia számára és ennek tervezésében nagy segítséget jelent az egyes daganatok jelútrendszereinek feltérképezése, megismerése. A molekuláris alapokon történő klasszifikáció, a kináz gátlók rezisztencia mechanizmusának és azoknak a jelútrendszereknek az ismerete melyek elősegítik a primer rezisztenciát mind-mind nagyfokban megkönnyítik az individuális kezelés tervezését. Munkánkban feltártuk az mTOR jelútrendszer előfordulását és gyakoriságát a különböző KIT és PDGFRA mutált GIST-ekben, és további információkkal szolgáltunk egy esetleges mTOR gátló racionális használatához.

Válasz a célkitűzésekre, új megállapítások

1, A lágyrész tumorok preoperatív diagnosztikájában a molekuláris módszerek segítségével olyan diagnosztikus algoritmust sikerült kidolgozni, mely támpontot ad a neoadjuváns kezeléshez és nagy segítséget jelent a végtagmegtartó műtétek tervezésében.

2, Bevezettük Magyarországon elsőként a GIST tumorok mutációjának rutinszerű analízisét, ami lényegében nélkülözhetetlen a GIST-ek kezelésében. A molekuláris technikák széles körű alkalmazásával megteremtettük azt a molekuláris alapokon nyugvó diagnosztikus biztonságot, mely nélkülözhetetlen mind a pontos diagnózis mind a kezelés érdekében.

3, Elsők között dolgoztuk ki az óriássejtes csont tumorok biológiai viselkedésének előrejelzési lehetőségét, feltárva ezen tumorok genetikai instabilitásának alapjait mind kromoszómális mind centroszómális szinten. A DNS tartalom mérésének, a kromoszómális aneuszómia mértékének, valamint a centroszóma amplifikációk meghatározásának kombinált használatával lehetőség van individuális esetekben is a kiújulási hajlam vagy az esetleges malignus átalakulás megítélésére óriássejtes csont tumoroknál.

4, Szintén elsőként mutattunk rá a perifériás idegtumorok genetikai instabilitásának mechanizmusára, igazolva, hogy a benignus Schwannomák kis százalékban kiegyensúlyozott aneusomiát mutatnak, míg az atípusos perifériás ideghüvely tumorokban mindez jóval nagyobb százalékban fordulhat elő, ami alapján a daganat „dysplastikus – precursor” léziónak tekinthető.

5, Elsőként mutattunk rá arra, hogy az aktív mTOR jelútrendszer kevésbé jellemző a KIT mutált GIST-ekre viszont karakterisztikus a PDGFRA mutált és vad típusú GIST-ek estén, bővítve ezzel a vad típusú és a PDGFRA mutált GIST-ek kezelési lehetőségét.

6, Feltártuk a synovialis sarcomák esetén, hogy a specifikus t(X;18)(p11;q11) transzlokáció csak iniciális történés, számos jelútrendszer ettől függetlenül aktív, rámutattunk a Her-2 amplifikáció jelentőségére, mindezekkel jelezve a synoviális sarcomák kezelési lehetőségeinek problematikáját.

A értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke (jóváhagyott MTMT szerint)

Idegen nyelvű közlemények jegyzéke

1. **Sápi Z**, Füle T, Hajdu M, Matolcsy A, Moskovszky L, Mark A, Sebestyen A, Bodoky G
The activated targets of mTOR signaling pathway are characteristic for PDGFRA mutant and wild-type rather than KIT mutant GISTs.
DIAGNOSTIC MOLECULAR PATHOLOGY Paper DMP10-495R1.
(2010)
In press
IF: [1.579*]
2. Moskovszky L, Dezső K, Athanasou N, Szendrői M, Kopper L, Kliskey, Picci P, **Sápi Z**
Centrosome abnormalities in giant cell tumour of bone: Possible association with chromosomal instability.
MODERN PATHOLOGY 23:(3) pp. 359-366. (2010)
IF: 4.406*
3. Balla P, Moskovszky L, **Sápi Z**, Forsyth R, Knowles H, Athanasou Szendroi M, Kopper L, Rajnai H, Pinter F, Petak I, Benassi MS, Pizzi P, Krenacs T
Receptor tyrosine kinases in giant cell tumor of bone: Epidermal growth factor receptor signaling contributes to osteoclastogenesis, osteoblastic stromal cell proliferation and disease progression.
HISTOPATHOLOGY Paper HISTOP-01-10-0012.R3. (2010)
In press
IF: [3.855*]

4. Moskovszky L, Szuhai K, Krenács T, Hogendoorn P C W, Szendroi M, Benassi M S, Kopper L, Füle T, **Sápi Z**
Genomic instability in giant cell tumor of bone. A study of 52 cases using DNA ploidy, relocalization FISH, and array-CGH analysis.
GENES CHROMOSOMES & CANCER 48:(6) pp. 468-479. (2009)
IF: 3.858
5. Lippai N, Füle T, Németh T, Benedek G, Mályi I, Pádi É, **Sápi Z**
Keratin-positive gastrointestinal stromal tumor of the stomach mimicking gastric carcinoma: Diagnosis confirmed by c-kit mutation analysis.
DIAGNOSTIC MOLECULAR PATHOLOGY 17:(4) pp. 241-244. (2008)
IF: 1.770
6. Kóbori L, Nagy P, Máthé Z, Hartmann E, Doros A, Paku S, Dezső K, **Sápi Z**
Malignant peripheral nerve sheath tumor of the liver: A case report.
PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 14:(3) pp. 329-332. (2008)
IF: 1.260
7. Balogh Z, Deák L, **Sápi Z**
Malignant myoepithelioma of soft tissue: a case report with cytogenetic findings.
CANCER GENETICS AND CYTOGENETICS 183:(2) pp. 121-124. (2008)
IF: 1.482
8. Mentzel T, Dei Tos A P, **Sápi Z**, Kutzner H
Myopericytoma of skin and soft tissues: Clinicopathologic and immunohistochemical study of 54 cases.
AMERICAN JOURNAL OF SURGICAL PATHOLOGY 30:(1) pp. 104-113. (2006)
IF: 4.144
9. László Á, Ivaskevics K, **Sápi Z**
Malignant epithelioid ovarian schwannoma: A case report.
INTERNATIONAL JOURNAL OF GYNECOLOGICAL CANCER 16:(SUPPL. 1) pp. 360-362. (2006)
IF: 1.469
10. Kovács R B, Sattar H A, Krausz T, Kas J, Berta M, **Sápi Z**
Primary follicular dendritic cell sarcoma of the lung.
HISTOPATHOLOGY 49:(4) pp. 431-433. (2006)
IF: 3.216

11. **Sápi Z**, Pápai Z, Hruska A, Antal I, Bodó M, Orosz Z
Her-2 oncogene amplification, chromosome 17 and DNA ploidy status in synovial sarcoma.
PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 11:(3) pp. 133-138. (2005)
IF: 1.162
12. Orosz Z, Tornóczy T, **Sápi Z**
Gastrointestinal stromal tumors: A clinicopathologic and immunohistochemical study of 136 cases.
PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 11:(1) pp. 11-21. (2005)
IF: 1.162
13. Kovács R B, Bollmann M, Speich N, Bollmann R, Bodó M, **Sápi Z**
Measuring telomerase activity in various human tumors in routine histology and cytology.
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE 13:(2) pp. 303-309. (2004)
IF: 3.190
14. Hruska A, Bollmann R, Kovács R B, Bollmann M, Bodó M, **Sápi Z**
DNA ploidy and chromosome (FISH) pattern analysis of peripheral nerve sheath tumors.
CELLULAR ONCOLOGY 26:(5-6) pp. 335-345. (2004)
IF: 3.053
15. **Sápi Z**, Antal I, Pápai Z, Szendrői M, Mayer Á, Jakab K, Pajor L, Bodó M
Diagnosis of soft tissue tumors by fine-needle aspiration with combined cytopathology and ancillary techniques.
DIAGNOSTIC CYTOPATHOLOGY 26:(4) pp. 232-242. (2002)
IF: 0.911
16. Tornóczy T, Kálmán E, **Sápi Z**, Orosz Z, Pajor L
Cytogenetic abnormalities of alveolar soft-part sarcomas using interphase fluorescent in situ hybridization: Trisomy for chromosome 7 and monosomy for chromosomes 8 and 18 seem to be characteristic of the tumor.
VIRCHOWS ARCHIV-AN INTERNATIONAL JOURNAL OF PATHOLOGY 438:(2) pp. 173-180. (2001)
IF: 1.709

17. Antal I, **Sápi Z**, Szendrői M
Malignant transformation of a giant-cell tumor in the distal radius. The prognostic value of the DNA-cytophotometry.: Die maligne entartung eines riesenzelltumors am distalen radiusende. Wertigkeit der DNS-zytophotometrie.
ORTHOPAED 29:(7) pp. 677-683. (2000)
IF: 0.364
18. Tornóczy T, Kálmán E, Hegedűs G, Horváth O P, **Sápi Z**, Antal L, Jáksó P, Pajor L
High mitotic index associated with poor prognosis in gastrointestinal autonomic nerve tumour.
HISTOPATHOLOGY 35:(2) pp. 121-128. (1999)
IF: 1.900
19. **Sápi Z**, Szentirmay Z, Orosz Z
Desmoplastic small round cell tumour of the pleura: A case report with further cytogenetic and ultrastructural evidence of 'mesothelioblastic' origin.
EJSO-EUROPEAN JOURNAL OF SURGICAL ONCOLOGY 25:(6) pp. 633-634.(1999)
IF: 1.098
20. Antal I, **Sápi Z**, Szendrői M
The prognostic significance of DNA cytophotometry and proliferation index (Ki-67) in giant cell tumors of bone.
INTERNATIONAL ORTHOPAEDICS 23:(6) pp. 315-319. (1999)
IF: 0.378
21. Gonda G, **Sápi Z**, Köves I, Péter I
Cutaneous meningioma.
ACTA ONCOLOGICA 16: pp. 107-112. (1995)
IF: 0.957
22. Orosz Zs, **Sápi Z**, Szentirmay Z
Unusual benign neurogenic soft tissue tumour: Epithelioid schwannoma or an ossifying fibromyxoid tumour?
PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE 189:(5) pp. 601-607. (1993)
IF: 0.731

Fokozatszerzés előtti cikkek

23. **Sapi Z**, Papp I, Bodo M
Malignant fibrous histiocytoma of the esophagus: Report of a case with cytologic, immunohistologic and ultrastructural studies.
ACTA CYTOLOGICA 36:(2) pp. 121-125. (1992)
IF: 0.720
24. Sugár J, **Sápi Z**, Péter I
The pathology of malignant fibrous histiocytoma.
ACTA ONCOLOGICA 12: pp. 413-416. (1991)
IF: 0.769
25. **Sápi Z**, Péter I
The significance of immunocytochemistry and image analysis in the histological diagnosis of soft tissue tumours.
ACTA ONCOLOGICA 12: pp. 417-422. (1991)
IF: 0.769
26. **Sápi Z**, Bodó M, Sugár J
Nucleolar organizer regions in soft tissue tumours.
ACTA MORPHOLOGICA HUNGARICA 39:(1) pp. 59-70. (1991)
27. Bodó M, **Sápi Z**, Szerjén E
Cytological differential diagnostic possibilities in soft tissue tumours.
ACTA ONCOLOGICA 12: pp. 433-435. (1991)
IF: 0.769
28. **Sapi Z**, Bodo M, Megyesi J, Rahoty P
Fine needle aspiration cytology of biphasic synovial sarcoma of soft tissue. Report of a case with ultrastructural, immunohistologic and cytophotometric studies.
ACTA CYTOLOGICA 34:(1) pp. 69-73. (1990)
IF: 0.970
29. **Sapi Z**, Megyesi J, Besznyak I, Sugar J
Extraspinal ependymoma in the sacroccygeal region. A case report with ultrastructural, immunohistochemical and cytophotometric studies.
VIRCHOWS ARCHIV A-PATHOLOGICAL ANATOMY AND HISTOLOGY 415:(3) pp. 293-296. (1989)
IF: 2.047

30. **Sapi Z**, Bodo M, Sugar J
DNA cytometry of soft tissue tumours with TV image-analysis system.
PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE 185:(3) pp. 363-367. (1989)
IF: 0.948
31. Sugar J, **Sapi Z**
Alveolar rhabdomyosarcoma. A case report.
ARCHIV FÜR GESCHWULSTFORSCHUNG 58:(6) pp. 445-448. (1988)
32. **Sapi Z**, Sugar J, Szentirmay Z
Nodular fascitis. A case report with cytophotometric study.
ARCHIV FÜR GESCHWULSTFORSCHUNG 58:(6) pp. 449-453. (1988)
33. **Sapi Z**, Sugar J, Koves I
Malignant giant cell tumour of soft tissues. A case report.
ARCHIV FÜR GESCHWULSTFORSCHUNG 58:(6) pp. 455-459. (1988)

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora:

50.638

Fokozatszerzés után a tézisekben szereplő közlemények összesített impakt faktora:

42.915

Összes tudományos közlemény összegzett impakt faktora:

98.362

Fokozatszerzés után szereplő közlemények összesített impakt faktora:

86.345

Első és utolsó szerzős cikkek összegzett impakt faktora:

48.930

Független idézetek száma:

423

Független idézetek száma (első és utolsó szerző):

212

Hirsch index:

10

Magyar nyelvű közlemények jegyzéke

1. Orosz Z, Sapi Z, Szentirmay Z, Timar J, Toth J
Paradigmaváltás a daganatok patológiai diagnosztikájában: molekuláris alapú differenciáldiagnosztika, prognosztikus és prediktív patológia.: [Paradigm shift in surgical pathology of cancer: molecular diagnostics, prognosticators and predictive pathology]
MAGYAR ONKOLÓGIA 51:(2) pp. 103-112. (2007)
2. Orosz Z, Balázs D, Sági Z, Tiszlavicz L, Tornóczky T
Reclassification of gastrointestinal mesenchymal tumors.: Gastrointestinalis mesenchymalis daganatok újraosztályozása.
MAGYAR ONKOLÓGIA 50:(4) pp. 287-292. (2006)
3. Sági Z, Kovács R B, Bodó M
Gastrointestinal tumors. Own observations on the basis of 29 cases.: Gastrointestinalis stromalis tumorok. Saját tapasztalatok 29 eset kapcsán.
ORVOSI HETILAP 146:(18 SUPPL.1) pp. 916-922. (2005)
4. Eckhardt S, Pápai Z, Bodoky G, Horti J, Tamás K, Nagy T, Orosz Z, Sági Z, Gödény M, Jakab K, Esik O, Trón L, Besznyák I
Az imatinibkezelés hatása gastrointestinalis stroma eredetű daganatokban.
ORVOSI HETILAP 144:(45) pp. 2207-2212. (2003)
5. Sági Z, Bodó M
FISH diagnostics.: FISH diagnosztika.
MAGYAR ONKOLÓGIA 46:(1) pp. 25-32. (2002)
6. Sági Z, Kovács R B, Bodó M
Gastrointestinalis stromalis tumorok. Saját tapasztalatok 29 eset kapcsán.
ORVOSI HETILAP 142:(45) pp. 2479-2485. (2001)
7. Sági Z, Antal I, Túri A, Szendrői M, Bodó M
Synovialis sarcoma kettős jelölésű fluorescens in situ hibridizációs vizsgálata.
ORVOSI HETILAP 140:(48) pp. 2691-2694. (1999)
8. Antal I, Sági Z, Szendrői M
Radius distalis végéből kiinduló osteoclastoma malignus transzformációja.
MAGYAR TRAUMATOLÓGIA ORTHOPAEDIA ÉS HELYREÁLLÍTÓ SEBÉSZET 2: pp. 181-188. (1998)

9. Gábor Zs, Sági Z, Szloboda J
Ossificáló fibromyxoid tumor esete.
ORVOSI HETILAP 138:(27) pp. 1755-1757. (1997)
10. Kovacs T, Orosz Z, Sapi Z, Besznyak I
A cseplez multiplex fibrosus pseudotumora.
ORVOSI HETILAP 137:(42) pp. 2317-2319. (1996)
11. Krivacsy G, Bosze P, Krasznai G, Sapi Z, Keller E, Ungar L, Bodo M
Primary rhabdomyosarcoma of the vagina.: A HUVELY ELSODLEGES RHABDOMYOSARCOMAJA
MAGYAR NŐORVOSOK LAPJA 58:(4) pp. 317-319. (1995)
12. Tomcsányi J, Papp L, Karlócai K, Naszlady A, Sági Z
Szokatlan manifesztációjú rhabdomyoma.
ORVOSI HETILAP 133:(36) pp. 2297-2298. (1992)
13. Sági Z, Csanaky Gy, Kálmán A
A gyomor plexosarcomája. Esetismertetés immunhisztokémiai, DNS-tartalom és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal.
MAGYAR ONKOLÓGIA 36: pp. 31-36. (1992)
14. Farkas E, Köves I, Besznyák I, Sági Z, Sulyok Z
Leiomyosarcoma férfi emlőben.
ORVOSI HETILAP 132:(27) pp. 1489-1491. (1991)
15. Sulyok Z, Sági Z, Rahóty P
Malignus fibrosus histiocytoma az emlőben. [Malignant fibrous histiocytoma of the breast].
ORVOSI HETILAP 130:(29) pp. 1557-1559. (1989)
16. Sági Z, Bodó M, Sugár J
69 lágyrésztumor DNS-tartalmának mérése Robotron TV képanalizátorral.
MAGYAR ONKOLÓGIA 33: pp. 61-67. (1989)

Idézhető absztraktok, konferenciakiadványok, könyvfejezetek

1. Zoltán Sági, Zsolt Orosz, Zsuzsa Schaff (szerk.)
Soft Tissue and Bone Pathology.: Technology Transfer In Diagnostic Pathology 4th Central European Regional Meeting.
Eger, Magyarország, 2009.04.19-2009.04.21.
IAP, 2009. 192 p.
2. Sági Zoltán
GIST Patológiai diagnosztika.
In: Bodoky Gy, Kopper L (szerk.)
Gasztroenterológiai onkológia.
Budapest: Semmelweis Kiadó, 2009. pp. 387-391.
(ISBN:978-963-06-7252-8)
3. Krenacs T, Balla P, Moskovszky L, Sapi Z, Ficsor L, Szendroi M, Kopper L, Benassi M, Picci P, Molnar B
Digital microscopy-based TMA system for high-throughput biomarker analysis: EGFR expression in giant cell tumor of bone (GCTB).
HISTOPATHOLOGY 53: p. 976. (2008)
4. Szendrői Miklós , Vízkeleti Tibor, Sági Zoltán (lektor) (szerk.)
Csont-ízületi daganatok és daganatszerű elváltozások.
pp. 1-367.
Lektorok: Rahóty Pál, Sági Zoltán (2007)
5. Moskovszky L, Szendroi M, Sapi Z, Kopper L, Angeli V, Molnar B, Krenacs T
EGFR signaling in giant cell tumor of bone (GCTB): An immunomorphological tissue microarray (TMA) study using digital slides and database management.
VIRCHOWS ARCHIV-AN INTERNATIONAL JOURNAL OF PATHOLOGY 451:(2) p. 152. (2007)
6. Sági Z, Orosz Z
Interdigitáló dendriticus sejtes sarcoma.
In: Matolcsy A, Udvardy M, Kopper L (szerk.)
Hematológiai betegségek atlasza: morfológia, citokémia, áramláscitometria, immunhisztokémia, citogenetika, molekuláris genetika.
Budapest: Medicina, 2006. pp. 354-355.
(ISBN:963 226 026 0)

7. Sági Z
Histiocytás sarcoma.
In: Matolcsy A, Udvardy M, Kopper L (szerk.)
Hematológiai betegségek atlasza: morfológia, citokémia, áramláscitometria, immunhisztokémia, citogenetika, molekuláris genetika.
Budapest: Medicina, 2006. pp. 349-350.
(ISBN:963 226 026 0)
8. Sági Z, Orosz Z
Follicularis dendriticus sejtes sarcoma.
In: Matolcsy A, Udvardy M, Kopper L (szerk.)
Hematológiai betegségek atlasza: morfológia, citokémia, áramláscitometria, immunhisztokémia, citogenetika, molekuláris genetika.
Budapest: Medicina, 2006. pp. 352-354.
(ISBN:963 226 026 0)
9. Cremer C, Sapi Z, Hruska A
DNA ploidy and chromosome (FISH) pattern analysis of peripheral nerve sheath tumors [2] (multiple letters).
CELLULAR ONCOLOGY 27:(5-6) pp. 359-361. (2005)
10. Papai Z, Sapi Z, Antal I, Lang I, Szendroi M
The prognostic role of p53 supressor gene in the treatment of osteosarcomas.
INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER 16: p. 276. (2002)
11. Bodó M, Sági Z, Kopper L
Daganatpathologia.
In: Szende B (szerk.)
Patológia.
Budapest: Medicina Könyvkiadó, 1999. pp. 147-188.
(ISBN:963-242-531-6)

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Prof. Dr. Matolcsy Andrásnak egyetemi tanár úrnak, intézeti vezetőmnek, hogy maximális kutatási háttérrel és meg nem szűnő biztatással segítette munkámat. Tanácsai, észrevételei mindig sodrást, lendületet adtak, emberi hozzáállása ideális feltételt teremtett kutatásaim számára.

Köszönöm Prof. Dr. Kopper László egyetemi tanár úrnak minden segítségét, építő-kritikai tanácsait, és hogy általa kerülhettem az 1. számú Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetbe.

Köszönöm Prof. Dr. Bodó Miklós egyetemi tanár úrnak, volt munkahelyi vezetőmnek, hogy mind az Országos Onkológiai Intézetben, mind a Szent János Kórházban megteremtette és biztosította a kutatáshoz szükséges körülményeket, feltételeket, valamint hogy mindvégig biztatott, segített.

Köszönettel tartozom továbbá Prof. Dr. Szendrői Miklós egyetemi tanár úrnak, aki az Országos Lágyrész Munkacsoport létrehozásával munkámnak és kutatásaimnak igazi gyakorlati értéket adott.

Külön szeretném megköszönni Prof. Dr. Eckhardt Sándor és Prof. Dr. Besznayk István akadémikus uraknak, valamint Prof. Dr. Sugár János† egyetemi tanár úrnak, hogy az Országos Onkológiai Intézetben mindenben támogattak, segítettek.

Köszönöm az 1. számú Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet minden munkatársának azt a sok-sok segítséget mellyel naponta támogattak a rutin feladatok elvégzésében és kutatási körülményeim megteremtésében.

Végül, de nem utolsó sorban, hálás köszönettel tartozom feleségemnek, szüleimnek, családomnak, akik áldozatvállalásukkal nyugodt háttérrel biztosítottak kutatásaimhoz, munkámhoz.