

1/48/2001

Zárójelentés: 2001. május 15.-2004. december 31.

RP.3. Molekuláris patológiai vizsgálatok fejlesztése.

Dr. Szentirmay Zoltán
Országos Onkológiai Intézet

RP3. Molekuláris pathológiai diagnosztika fejlesztése a különböző fekvenciájú daganatos megbetegedések esetében

Témavezető: dr. Szentirmay Zoltán, Országos Onkológiai Intézet

A. Morfológiai jellegzetességek és a molekuláris biológiai markerek összefüggése a lymphomák kialakulása során.

B. A HPV daganatkeltő hatásának vizsgálata.

C.. Lágyrész daganatok molekuláris pathológiai diagnosztikája, hisztogenezise és prognosztikája.

D./ Tüdőrákok molekuláris pathológiája

D./ Sentinel nyirokcsomók szerepe a női genitáliák tumorainak stádium-meghatározásában

A. Lymphoma diagnosztika

1. Molekuláris markerek meghatározása

A lymphomák jelenlegi osztályozása az immunfenotípuson illetve a jellegzetes génelváltozások kimutatásán alapul. A betegek a lymphomák szövettani típustól függő specifikus terápiában részesülnek. Így a pontos és megbízható szövettani diagnózis elengedhetetlen, mivel e betegek túlélési esélyeit alapvetően az első, megfelelő kezelés határozza meg. A retrospektív vizsgálat során szerzett tapasztalataink hozzájárulnak az újabb esetek minél megbízhatóbb diagnosztizálásához.

Betegek mintái és módszerek

Jelenleg 1980-95 között follicularis vagy centrocytás, centroblastos lymphomaként diagnosztizált 52 esetet szövettani szempontból újraértékeltek. A súlyossági fokozat meghatározása az új WHO ajánlás szerint és a daganatsejtek proliferációs aktivitásának figyelembe vételével történt.

Immunhisztokémia

Minden esetben elvégeztük a CD10, CD5, CD35, cyclin D1, bcl-2, bcl-6, Ki-67, p53, illetve a szövettani képtől függően CD23, kappa, lambda könnyűlánc immunhisztokémiai reakciókat.

Génátrendeződés vizsgálatok

A daganatok paraffinba ágyazott szövettani anyagából DNS izolálás történt. PCR módszerrel vizsgáltuk a bcl-2 és az immunoglobulin nehézlánc (IgH) génátrendeződését (lásd előző fejezetet is).

Eredmények és következtetések

Az 52 eset szövettani revíziója után a vizsgálatok eredményét az 1. táblázatban foglaltuk össze.

Szövettani típus	Bcl-2	CD10	Bcl-6	P53
FL grade 1 (14)	12 (85%)	13 (93%)	10 (71%)	0
FL grade 2 (10)	9 (90%)	10 (100%)	7 (70%)	0
FL grade 3a (9)	8 (88%)	7 (77%)	7 (77%)	1 (11%)
FL grade 3b (4)	2 (50%)	1 (25%)	3 (75%)	1 (25%)
Összes FL (37)	31 (84%)	31 (84%)	27 (73%)	2 (5%)
DLBCL (11)	9 (81%)	2 (18%)	7 (63%)	4 (36%)

1. táblázat: Az immunhisztokémiai reakciók eredménye. A számok a pozitív eseteket, illetve ezek százalékos arányát mutatják. (FL= follicularis lymphoma; DLBCL= diffúz nagy B-sejtes lymphoma).

A bcl-2 fehérje expresszióját az esetek döntő többségében, 80-90%-ban megfigyeltük. A CD10 a grade 1-2 esetekben általában kimutatható volt, de a grade 3 follicularis lymphomákban

csökkent az expressziója. A bcl-6 antigén az összes típusban 60-70%-ban volt kimutatható. A kóros p53 fehérje csak a grade 3 FL-ákban és néhány diffúz nagy B-sejtes lymphomában jelent meg.

A grade I-II follicularis lymphomák 70%-ában, a grade III lymphomák 30%-ában tudtunk bcl-2 génátrendeződést kimutatni. Az összes grade III bcl-2 génátrendeződést mutató FL grade IIIa típusú volt. Ezek a vizsgálatok egy része még nem az előző fejezetben tárgyalt újonnan kidolgozott nagyon szenzitív valósídejű PCR módszerrel, hanem hagyományos PCR eljárással történt. A follicularis lymphomák 48%-a monoklonális jellegű IgH génátrendeződést mutatott. Ez 44-53%-os arányban oszlott meg a grade I-II illetve grade III esetek között.

Konkluziók

1) A szövettani revízió során a lymphomák szinte a teljes differenciál diagnosztikai problémája megjelent. A differenciál diagnosztikát a reaktív follicularis hyperplasia, a follicularis kolonizációt mutató alacsony malignitású B-sejtes lymphomák (CLL, köpenysejtes, marginális zóna lymphoma), a paraganuloma és bizonyos esetekben a diffúz nagy B-sejtes lymphomák képezik.

2) A bcl-2 expresszió a „reaktív vagy daganatos” kérdés megválaszolásában segíthet.

3) A proliferációs aktivitás vizsgálata, például a Ki-67 pozitív sejtek aránya jól korrelál a centroblastok számával. 10% alatti aktivitás jellemző a grade I, 10-30% közötti a grade II és 30% fölötti a grade III elváltozásokra.

3) A bcl-2 génátrendeződést rutin szövettani anyagból nem mindig lehet kimutatni, mert a fixálás során a DNS degradálódik. A pozitív esetek 80%-ában a „major breakpoint regio”-ra esik a génátrendeződés.

4) Az 52 eset áttekintése után azt mondhatjuk, hogy az esetek közel 90%-ában a morfológia és az immunfenotípus vizsgálata elegendő volt a diagnózishoz, a maradék 10%-ban a bcl-2 vagy az immunoglobulin nehézlánc génátrendeződés vizsgálata viszont döntő jelentőségű.

2) Minimális residualis betegség és a relapsus molekuláris patológiai előrejelzése follicularis lymphomákban

Saját adataink szerint Magyarországon a follicularis lymphomák előfordulása – a világstatisztikákhoz hasonlóan – nálunk is emelkedő tendenciát mutat. A follicularis lymphomák 80%-ában a daganatos klón hordozza a (14;18) transzlokációt, mikor is a 18-as kromoszómán lévő bcl-2 proto-onkogén transzlokálódik a 14-es kromoszómán lévő immunoglobulin nehéz lánc (IgH) régiójához, kialakítva egy hibrid bcl-2/IgH gént. E génátrendeződés kimutatása nem csak a szövettani diagnosztikát segíti, de alkalmas a minimális reziduális betegség illetve az esetleges relapsus és ezen keresztül a terápiás szenzitivitás meghatározására.

Vizsgálati anyag és módszerek

Betegek mintái:

Összesen 44 tüsző eredetű illetve egyéb Non-Hodgkin lymphomás nyirokcsomót, e mellett kezelt follicularis lymphomás betegekből származó 135 vérmintát és 4 csontvelő aspirátumot dolgoztunk fel. A módszer beállításához DoHH2 sejtvonalat használtunk ((DSMZ, Germany), ami a bcl-2-MBR/JH transzlokációt tartalmazta.

Módszerek

DNS izolálás

Lymphomás betegek fixálatlan vagy paraffinba ágyazott nyirokcsomóiból, illetve vérmintáiból DNS-t izoláltunk „High pure PCR template Preparation Kit” (Roche) segítségével. A DNS minta koncentrációját és tisztaságát spektrofotométerrel ellenőriztük.

Valósídejű kvantitatív PCR

A PCR reakcióhoz az alábbi saját tervezésű primereket és próbákat használtuk:

IGJH2: ACC TGA GGA GAC GGT GAC

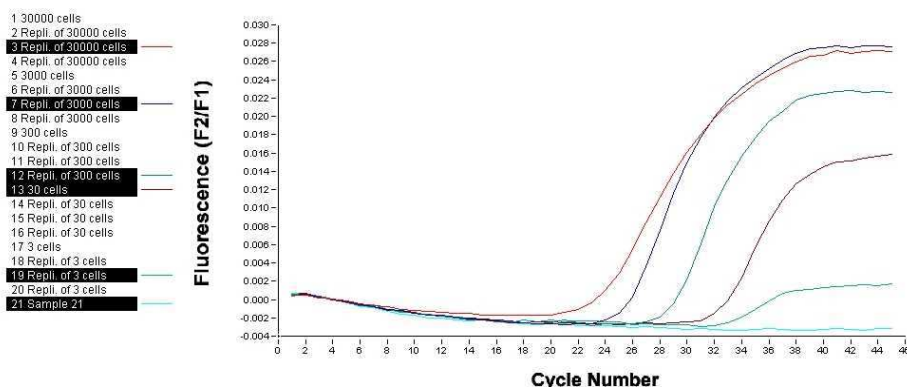
MBR2L: TTT GAC CTT TAG AGA GTxT GC (x=LC705 fluorescens festék)

MRP: TGT GTT GAA ACA GGC CAC GTA AF (F= fluorescein)

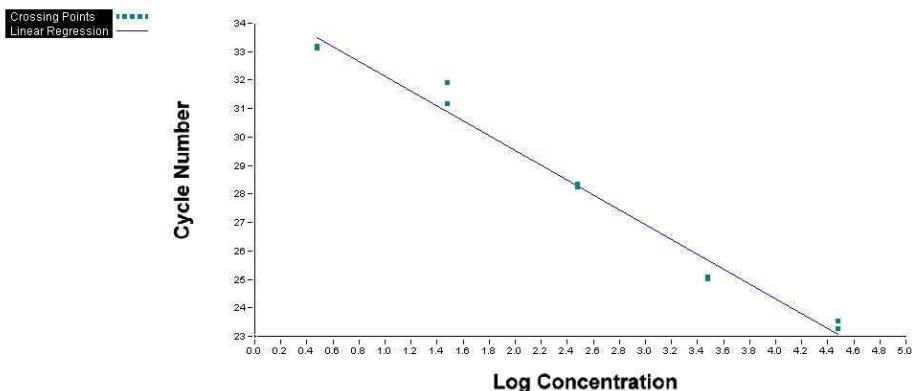
Egyenként 10 µl reakció elegyet használtunk, ami LightCycler Fast Start DNA Master Mix-et tartalmazott. Az DNS amplifikáció LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) készüléssel történt és 45 ciklusból állt. A fluorescens jelet az F3-as csatornán, 60°C-on detektáltuk.

Kvantitatív analízis

A DoHH2 sejtvonalból izolált DNS minta kiindulási koncentrációja 300 ng/µl volt, ami megfelel 30000 tumor sejtnek. Ebből az alábbi hígítási sort készítettük: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000. A hígítási sorból olyan standard referencia görbét állítottunk össze, amelynek segítségével az ismeretlen mintában lévő daganatsejtek száma meghatározható.



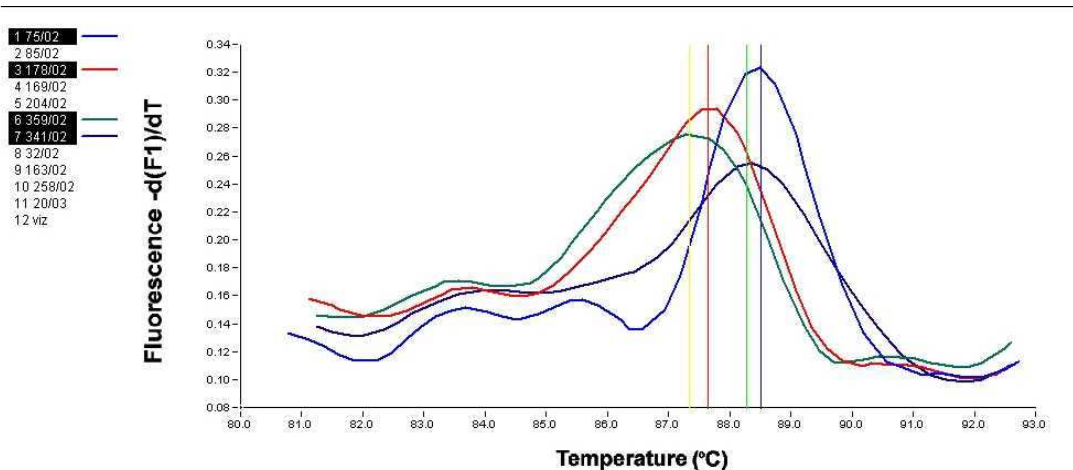
1. ábra: A DoHH2 sejtvonal hígítási sorának amplifikációs profilja a detekciós küszöb és a standard referencia görbe meghatározása céljából. A görbék emelkedésének kezdete az áttörési pontnak felel meg.



2. ábra: A hígítási sor alapján meghatározott standard referencia görbe. A vizsgálandó minta áttörési pontjának ismeretében (az a ciklusszám, ahol a fluorescens szignál magasabb lesz mint az alap-fluoreszcencia szint) a referencia görbe segítségével a mintában lévő daganatsejtek száma meghatározható.

Olvasáspont analízis

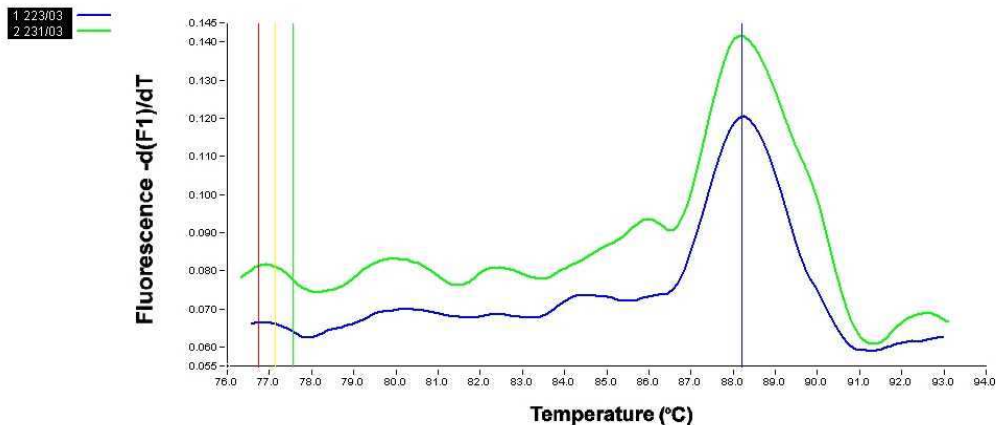
A kvantitatív PCR analízis után minden mintához SYBR Green-I (BioWittaker, USA) festéket adtunk és elvégeztük az olvasáspont analízist a DNS fragmentumok azonosítása céljából. Minden tüsző eredetű lymphomában a bcl-2 génátrendeződés egyedi sajátosságokat mutat, ami a transzlokáció helyének kisfokú variabilitásában mutatkozik meg. Ez az egyedi különbség a transzlokáció régiójának PCR amplifikációt követő olvasáspont analízis segítségével kimutatható, mert minden egyes mintának jellemző olvasáspont értéke van. Ez a daganat monoklonális eredetéből következik és az adott PCR termék egyedi hosszától és nucleotid összetételétől függ. Így a különböző bcl-2 klónok elkülöníthetők egymástól (3. ábra).



3. ábra: PCR termékek azonosítása olvadáspont analízissel négy beteg follicularis lymphomájában. Az egyes minták olvadáspont értéke egymástól jól elkülöníthető (lásd a függőleges vonalakat, amelyek a görbék csúcspontját jelzik). Mindez azt jelenti, hogy a négy szövettanilag azonos daganat entitásban a *bcl-2* génátrendeződés régiója finom egyedi különbségeket mutat.

Eredmények és következtetések

A fent részletezett technikával a modellkísérlet kiindulási DNS mennyiségéhez képest 10^{-4} DNS mennyiségnyi detekciós küszöb érhető el, ami lehetővé teszi mindössze 3 daganatsejt kimutatását egy mintában. Ugyanannál a betegnél a nyirokcsomó tumorban észlelet és a periférián keringő daganatsejtek olvadáspont értékét mindig azonosnak találtuk, vagyis egy lymphomában többféle *bcl-2* pozitív daganatsejt csoport nem, hanem csak azonos daganatos klónhoz tartozó sejtek fordultak elő (4. ábra). Ez lehetővé teszi, hogy kezelés után visszamaradt daganatsejteket, vagy a vérben újra megjelenő daganatsejteket azonosítsuk, illetve más eredetű *bcl-2* génátrendeződéstől elkülönítsük. Ez a betegkövetés és a további megfelelő kezelés meghatározása szempontjából alapvető fontosságú.



4. ábra: Ugyanannak a betegnek a lymphomás nyirokcsomójában (felső görbe) és a vérben keringő daganatsejtekben (alsó görbe) ugyanolyan típusú *bcl-2* génátrendeződés (azonos olvadáspontú PCR termék) található, vagyis ugyanolyan daganatos klónhoz tartozó sejt van a periférián és a nyirokcsomóban. Ez lehetővé teszi a kezelés után esetleg újra kiújuló daganat még klinikai tüneteket nem okozó korai felismerését.

A vizsgált 135 vérmintából 6 esetben (4.4%) tudtunk daganatsejteket kimutatni, ami klinikai tüneteket még nem okozó molekuláris relapsus korai jelének felelt meg. Az átlagos relapsus idő 14 hónap volt. További 4 csontvelő mintából 1 esetben minimális reziduális betegséget mutattunk ki, ami a további betegkövetést és kezelést megszabta. A többi esetben a vérvizsgálat alapján

meghatározott molekuláris relapsus mentes túlélés 23.8 ± 13.2 hónap volt. Eredményeink azt mutatják, hogy az általunk kidolgozott eljárás olcsó, gyors és alkalmas módszer a bcl-2 génátrendeződés mennyiségi és minőségi analizisére, valamint a molekuláris relapsus előrejelzésére és a minimális reziduális betegség kimutatására csontvelőben és nyirokcsomóban.

Humán papillomavírus (HPV) PCR vizsgálatok

Vizsgálati anyag és módszerek

Betegek mintái:

Összes PCR-rel vizsgált cervix cytologiai minta:	740
HPV+ nők férfi partnerei (penis):	42
Szájüreg, laphámrák:	66
Gége, laphámrák:	70
Nyelőcső, laphámrák:	89
Cardia Barrett carcinoma:	27
Tüdő laphámrák:	50
<u>Összesen:</u>	1084 PCR vizsgálat

Módszerek:

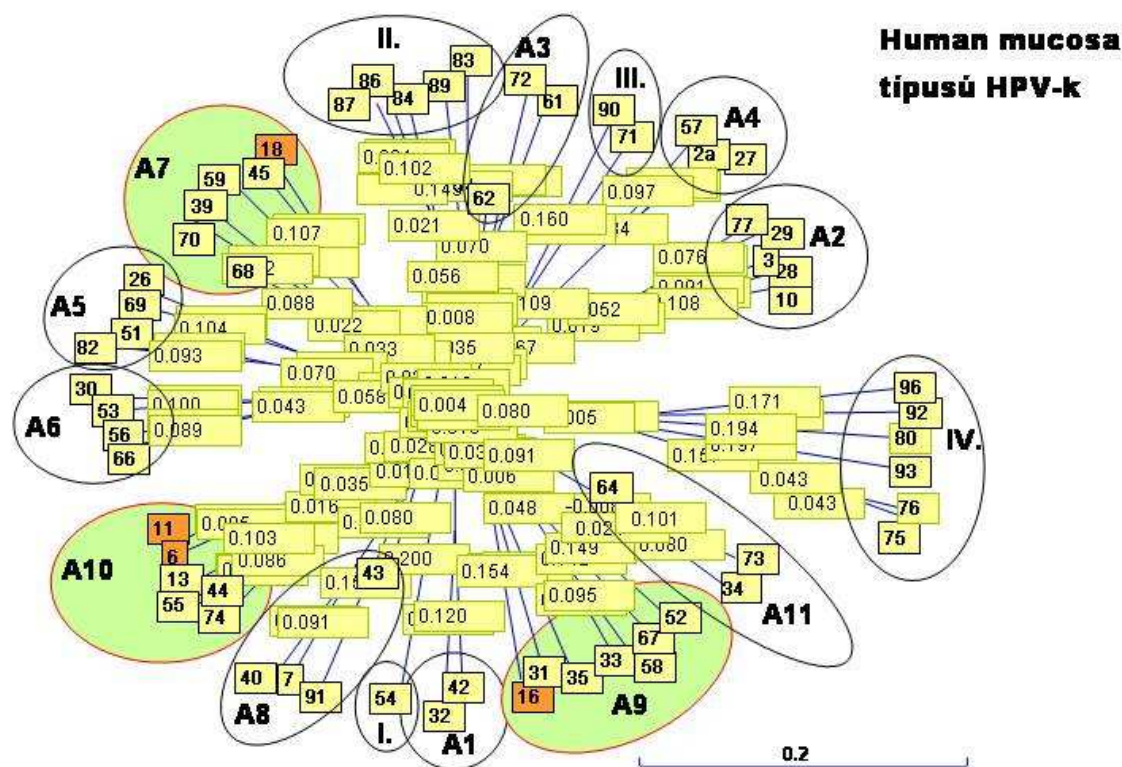
A szokásos módon cervix cytologiai kenet és egyidejűleg az anyagvételi eszközön maradt, esetleg még egyszer levett sejtekből PBS-ben sejtszuszpenzió készült, amit PCR vizsgálatokhoz használtunk fel. Mindegyik cytologiai kenetet a szokásos Papanicolaou eljárással festettük és Bethesda leletező rendszer szerint értékeltük.

A fixálatlan és fixált szövetmintából valamint a sejtszuszpenzióban lévő cytologiai anyagból DNS izolálás, majd a vírusok egyedi azonosítása folyadék-alapú PCR módszerrel történik. A nyálkahártyát megbetegítő 48 különböző HPV típus azonosítására 31 nagyobbrészt saját tervezésű consensus primer pár állt rendelkezésre. Az amplifikáció primer páronként külön reakció tubusban történt. Mindegyik kimutatott olyan vírusokat, amelyeket más consensus primer pár is felismer és olyanokat is, amelyeket más PCR primerekkel nem lehetett kimutatni. Az L1 gén DNS szekvenciája ugyanis a filogenetikailag rokon HPV törzsekben egymáshoz nagyon hasonló, ezért olyan gén szakaszokat lehet találni, amelyek egymástól legfeljebb 1-2 bázisban különböznek. Ha a PCR primerek ezekhez a szakaszokhoz kötődnek, akkor egy primer párral egyszerre többféle HPV jelenléte is igazolható a mintában. Egy vizsgálathoz 10 primer párt használva az egyedi HPV típusok és a kettős vírusfertőzések is kimutathatók. A tipizálás végső megerősítésére további 15-féle E6 gén-specifikus primer illetve DNS szekvencia analízis szolgált. A HPV16 fizikai státusának (episomalis vagy a genomba integrált forma) meghatározására E1 és E2- specifikus primereket használtunk. A vírusok genomba történő integrációjának kimutatására in situ PCR vizsgálatokat is végeztünk.

A betegek életkorát, az elváltozások lokalizációját és szövettani típusait, a HPV pozitivitást vagy negativitást, illetve a kimutatott HPV típusokat adatbázisban kódolva tároltuk. BMDP90 statisztikai software segítségével, a tárolt adatok egymásközi összefüggését és ezek szignifikanciáját a következő módszerekkel vizsgáltuk: az adatok gyakorisági eloszlása (BMDP 2D), „two-way” és „multiway” gyakorisági táblázatok (BMDP 4F), diszkriminancia analízis (BMDP 7M).

Eredmények és következtetések

A különböző HPV típusok genetikai tulajdonságaik alapján három nagy csoportba oszthatók amelyek közül a genitális vagy mucosa típusú vírusok az „A” szupercsoportba tartoznak. Az „A” szupercsoporton belül a vírusok további genetikai és biológiai hasonlósága alapján további 11 csoportot (A1-A11) különítették el. Saját adatok és HPV-DNS adatbázis felhasználásával mi további 4 csoportot (I-IV) tudunk elkülöníteni (5. ábra), amelyekhez tartozó vírusok Magyarországon is megtalálhatóak voltak



5. ábra: Az „A” szupercsoportba tartozó HPV-típusok filogenetikai csoportosítása. A HPV típusok nevei az egyes vonalak végén láthatók. A graph számértékei az evolúciós távolságot jelzik. A vonalak hossza arányos ezzel a távolsággal. A bekarikázott részek tartalmazzák a különböző csoportokhoz tartozó, egymáshoz nagyon hasonló szerkezetű vírusokat.

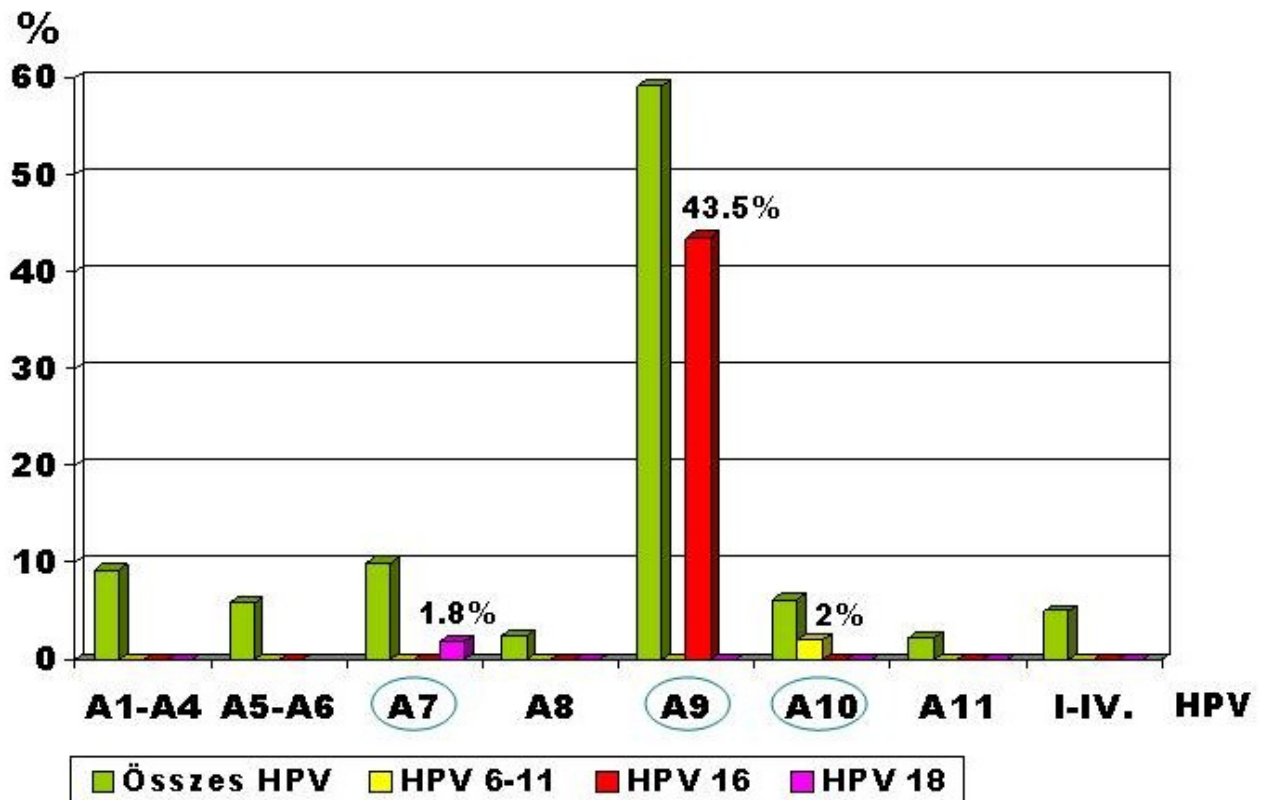
A HPV fertőzés előfordulási gyakorisága 1084 PCR-rel vizsgált mintában lokalizációnként (2. táblázat). A cervix cytologiai mintákban ép hám, LSIL vagy HSIL, a penisről származó anyagban csak ép hám volt. A szájüregből, gégeből, nyelöcsőből és tüdőből származó minták laphám papillomának és ráknak, a cardiából származó szövetminták adenocarcinomának feleltek meg.

Lokalizáció	HPV előfordulási gyakoriság (%)
Méhnyak	64.5
Penis	52.4
Szájüreg	48.5
Gége	35.7
Nyelöcső	33.3
Cardia	37.0
Tüdő	16.0

2. táblázat: A HPV fertőzés előfordulási gyakorisága 1084 cytologiai vagy szövettani mintában.

A méhnyak hámjának HPV-fertőzöttsége

A cervix cytologiai anyagban kimutatható HPV-típusok előfordulási gyakoriságát a 6. ábra mutatja.



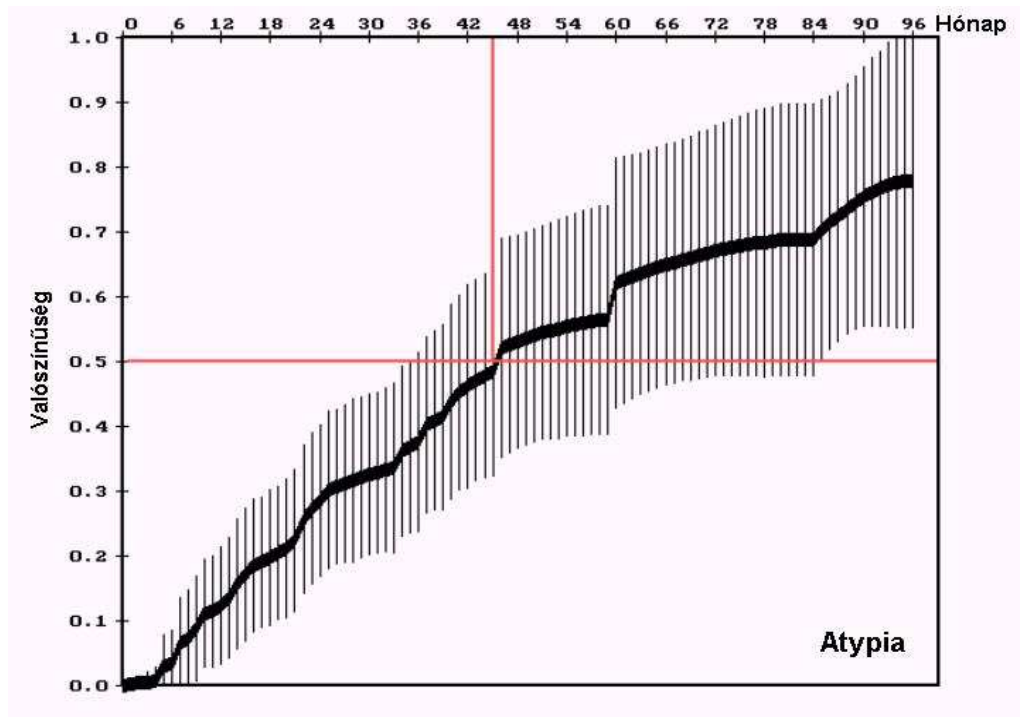
6. ábra: HPV típusok magyarországi előfordulása méhnyak cytologiai mintákban, filogenetikai hasonlóság alapján csoportosítva. 450 beteg, 497 vírus. A HPV 6-11, HPV 16 és HPV 18 típusokazért vannak külön kiemelve, mert a bevezetendő preventív védőoltás ezek ellen a vírusok ellenkészült.

A magyar HPV epidemiológiai adatok legjobban az európai adatokhoz hasonlítanak, de bizonyos eltérések megfigyelhetők, mert 5 vírus előfordulása jelentős geográfiai különbségeket mutat. A HPV18 nálunk ritkábban fordul elő, hasonlóan alacsony előfordulási arányt csak Japánban találtak. A HPV58 magyarországi közel 10 %-os előfordulási aránya sokkal magasabb, mint amit az európai és amerikai összehasonlító adatokban látni, Nagano városban viszont ezt a vírust hasonlóan magas arányban mutatták ki. A HPV59 előfordulási gyakorisága nálunk relatíve szintén magas, hasonló arány Közép- és Dél-Amerikában található. A HPV33 és a HPV66 előfordulása nálunk szignifikánsan gyakoribb, a kettős vírusfertőzés azonos gyakoriságú, mint az összehasonlításnál figyelembe vett más országokban. Az összes HPV 85.5 %-a magas, 11,1 %-a átmeneti, 3,4 %-a alacsony rizikó csoportba tartozó vírus volt. A HPV pozitív betegek életkora 16 és 74 év között változott, a legtöbb fertőzést 25 éves korban találtuk, ami alátámasztja azt a tapasztalatot, hogy a HPV fertőzés és a következményes cervikális hámelváltozások egyre fiatalabb korban jelentkeznek.

A HPV negatív mintákra adott a különböző cytologiai diagnózisok között csak néhány esetben fordult elő enyhe cytologiai atypia. A betegkövetés során ezeknél az eseteknél a kontroll vizsgálat nem igazolta a valódi hám dysplasiát, vagyis az elváltozások atypusos hámgyógyulási és nem neoplasticus folyamatnak feleltek meg. A HPV pozitív egyéneknél viszont 68%-ban találunk mikroszkóposan is látható hámelváltozásokat.

Az összes HPV-re jellemzőnek tartott cytomorfológiai jelnek a fertőzés felismerésében való együttes diagnosztikus értékét diszkriminancia analízis segítségével határoztuk meg. A vírusfertőzésre vonatkozó korrekt cytologiai diagnózis felállításának lehetőségét HPV negatív és pozitív esetekben egyaránt 86 %-nak találtuk. A kóros hámelváltozások miatt végzett conisatio után

vett 114 cytologiai minta 67 %-a továbbra is HPV pozitívnak bizonyult. A cytodiagnosticszika találati pontossága ilyen esetekben rosszabb volt, a műtét után a visszamaradt vírusfertőzést mintegy 30 %-ban a cytomorfológiai képből nem lehetett felismerni. A conisation átesett betegek utánkövetése az mutatta, hogy a hámváltozások nélkül visszamaradt HPV fertőzés nagy valószínűséggel újra hám dysplasiát okoz, ami azonban legtöbbször csak több év után jelentkezik (7. ábra).



7. ábra. A conisation átesett betegeknél a hámváltozások nélkül visszamaradt HPV fertőzés által kiváltott újabb hám dysplasia kialakulásának valószínűsége. Az atypia itt a dyskeratosis, éretlen atypusos metaplasia és a macrocyta dysplasiával fogalmakat jelöli.

A HPV fertőzés kórlefolyása az életkortól is függ. Ha a HPV fertőzés 30 éves kor alatt jön létre – ez az esetek nagyobbik hányada – a betegek jelentős részében lényegében típusától függetlenül spontán vírusmentességre lehet számítani, a vírusmentessé nem váló esetekben viszont dysplasia alakul ki. Azt is megfigyeltük, hogy a filogenetikailag átmeneti rizikó csoportba sorolt vírusok (HPV 54, 61, 62, 64, 72, 73, 87) főleg LSIL-ben, a magas rizikó csoport vírusai (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 66, 68, 70) nem kizárólag de gyakrabban HSIL-ben találhatók meg. Lehet tehát arra gondolni, hogy bizonyos hasonló szekvenciájú vírusok egyes klinikopatológiai elváltozásokkal korrelálnak.

Érdekes megjegyezni, hogy a HPV-pozitív nők férfi partnereinél a tünetmentes glans penis hámjában 52.4%-ban volt HPV fertőzés kimutatható olyan típus-megoszlásban, mint amit a méhnyak hámjában is megfigyeltünk.

Ha a HPV fertőzéssel kapcsolatos fent elmondott tényeket összegezzük, az alábbi következtetések vonhatók le:

- 1) A méhnyakrák szűrését nem a PCR-re alapozott HPV tipizálásra kell alapítani. HPV DNS teszt elvégzése az alábbi esetekben javasolt, (a) HPV fertőzés cytologiai gyanúja. (b) HPV-vel összefüggő jelentős cervicalis elváltozások fennállta. (c) Partnerkapcsolattal összefüggő kérdések miatt, (d) „loop” conisatio után a további daganatos rizikó felmérése céljából.
- 2) Ha a cytologiai vizsgálat és a HPV-DNS teszt is negatív (kettős negativitás) nincs rák kockázat még akkor sem, ha előzőleg HSIL-t vagy mikroinvazív carcinomát távolítottak el. A jelenlegi

szűrési stratégia szerint újabb szűrővizsgálatot elég 4-5 év múlva végezni. Irodalmi adatok azt támasztják alá, hogy ilyen esetekben 5-8 év alatt sem nő az intervallum carcinomák száma.

- 3) Ha conisatio után a HPV teszt pozitív és a cytologiai kenet negatív továbbá nincs klinikailag kimutatható elváltozás, akkor is legalább 75% a dysplasia kialakulásának veszélye, ami több év múlva is jelentkezhet. Ilyen esetekben betegkövetés szükséges.

Oki összefüggés a humán papillomavírus fertőzés és a fej-nyaki régió, nyelőcső és tüdő laphámrákjainak egyes típusai valamint az oesophago-gastricus junctio adnenocarinomái között.

A betegek verrucosus hyperplasia vagy papilloma, illetve carcinoma gyanúja miatt kerültek műtétre. Az elváltozásokat az alábbi csoportokba osztottuk be: (a) laphám papilloma és verrucosus hyperplasia, (b) típusos laphám carcinoma, (c) basaloid laphám carcinoma, (d) verrucosus carcinoma, (e) adenocarcinoma.

Alacsony rizikójú HPV fertőzést csak a szájüregben és gégében találtunk. Az átmeneti rizikójú vírusok minden régióban, de leggyakrabban a szájüregben fordultak elő. A magas rizikójú vírusok viszont a gégében, nyelőcsőben és a nyelőcső-gyomor junctióban domináltak. A tüdő laphámrákban csak alacsony rizikójú HPV jelenlétét tudtuk kimutatni.

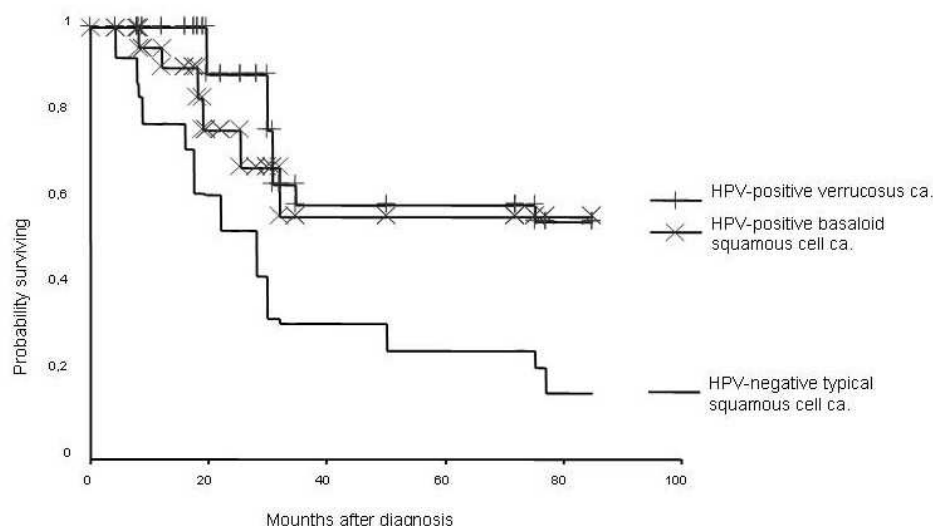
Az összes laphámrák 80%-ban a férfiakban, 20%-ban a nőkben alakult ki. A férfiakban az összes tumor 71%-a HPV negatív elszarusodó vagy el nem szarusodó laphámráknak bizonyult és ezek kóros p53 fehérjét expresszáltak. Az ilyen daganatok rendszerint környezeti carcinogén (dohányzás, alkohol) hatására alakulnak ki. Nőkben a HPV pozitív tumorok szignifikánsan gyakoribbak mint férfiakban ($P=0.0346$), ezek inkább verrucosus vagy basaloid laphámrákok, de gyakoribb a laphám papilloma is. Érdekes további két megfigyelést kiemelni: (a) Általános vélemény, hogy bármilyen lokalizációjú papilloma HPV eredetű, és alacsony rizikójú vírusok, mint a pl. HPV 6, 11, stb. okozzák. Mi azt találtuk, hogy a papillomák több mint felében HPV nem volt kimutatható, a HPV pozitív papillomák háromnegyed részében pedig magas rizikójú vírusok, elsősorban HPV 16, továbbá HPV 35 és 58 volt megtalálható.

Szignifikáns összefüggés mutatkozott a szájüreg, gége, nyelőcső és cardia daganatok szövettani típusa és a HPV jelenléte között. Említettük, hogy a típusos laphámrákok döntő többsége HPV negatív, a basaloid laphámrákok 80 %-a HPV pozitív és bennük leggyakrabban HPV 16 mutatható ki. A verrucosus carcinomák 100%-ban HPV pozitívak és bennük különféle HPV-féleségek, de többször HPV 70, 72 vagy 73 fordult elő. A HPV 73 kifejezett filogenetikai rokonságot mutat az alacsony rizikójú HPV 34-gyel és HPV 64-gyel, mégis jelenlétét nyelőcső in situ laphámrákban mások is megtalálták.

A HPV negatív és pozitív fej-nyaki laphámrákok elkülönítése prognosztikai jelentőségű. A HPV pozitív verrucosus és basaloid laphámrákok kedvezőbb túlélési arányt mutatnak, mint a HPV negatív típusos laphám carcinomák (8. ábra).

Az oesophagus-gyomor átmenetből kiinduló cardia adenocarcinomák HPV fertőzéssel való összefüggése nem ismert. Mi az ilyen tumoroknál 27-ből 10-ben PCR-rel HPV jelenlétét mutattuk ki és ezek között 5 esetben HPV 16 fordult elő. Azt hogy a HPV genom valóban a mirigrák komponensben található in situ PCR-rel igazoltuk.

Összefoglalva: A HPV pozitív tumorok gyakoribbak nőkben, nemdohányzóknak és alkoholt nem fogyasztókban, 54 éves kor alatt. Az alacsony és átmeneti rizikójú vírusok gyakoribbak a szájüregben és a tüdőben, a magas rizikójúak a gégében, nyelőcsőben és a cardialis régióban. A verrucosus rákok mindig HPV pozitívak és bennük nagyon gyakran HPV 73 mutatható ki. Laphámrákok közül a basaloid altípus mutat szignifikáns összefüggést a HPV fertőzéssel. Az elszarusodó laphámrákok legtöbbször HPV negatívak és p53 pozitívak, ami környezeti carcinogen eredetre utal. A szájüreg, gége és nyelőcső elváltozásokból történő HPV kimutatás és tipizálás segítheti a patológiai diagnózist, a második primer tumor megkülönböztetését az áttétől, segít megérteni a daganatok egy jól meghatározott csoportjának kialakulását és elősegíti terápiájuk legkedvezőbb megválasztását, végül prognosztikai jelentőséggel bír.



8. ábra: Kaplan-Meier túlélési modell HPV pozitív és negatív fej-nyaki laphámrákokra.

Humán tumorok molekuláris diagnosztikája

1) Neuroblastomák molekuláris diagnosztikája és prognosztikája

Vizsgálati anyag és módszerek

Összesen 95 daganatszövet mintát kaptuk meg az alábbi intézetekből és a betegkövetési adatok is rendelkezésre álltak:

- Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Kórház I. Gyermekhaematologiai- és Csontvelő-tanszpantációs Osztály, Miskolc, Dr. Nagy Kálmán;
- Fővárosi Heim Pál Gyermekkórház – Rendelőintézet Haematologiai és Onkológiai Osztály, Budapest, Dr. Magyarossy Edina;
- Madarász Utcai Gyermekkórház – Rendelőintézet Belosztálya, Budapest, Dr. Galántai Ilona.
- SOTE I. és II. számú Gyermekklinika, Budapest, Dr. Benyó Gábor és Dr. Garami Miklós.

N-myc amplifikáció meghatározása neuroblastomákban valós idejű kvantitatív PCR eljárással.

A tumor szövet egy részét szövettani vizsgálatra beágyasztuk. Az *N-myc* génamplifikáció kimutatására új, gyors, pontos és megbízható valós idejű kvantitatív PCR alapú eljárást dolgoztunk ki. A valós idejű kvantitatív PCR vizsgálatot LightCycler készülékkel végeztük. Az *N-myc* gént illeszkedő primer párral 120 bp hosszú fragmentet amplifikáltunk, a termék detektálásához LC640-nel fluoreszcensen jelölt próbapárt használtunk. Az *N-myc* kópiaszám pontos meghatározásához szükséges kalibrációs sor felállítására egészséges mellékveséből izolált DNS-t, valamint 25-szörös *N-myc* amplifikációt tartalmazó IMR32 sejtvonalból (DMSZ, Németország) származó DNS mintát, végül ezek hígításait használtunk.

A sejtenkénti DNS tartalom és az N-myc kópiaszám FISH képeken történő meghatározása digitális képanalízissel.

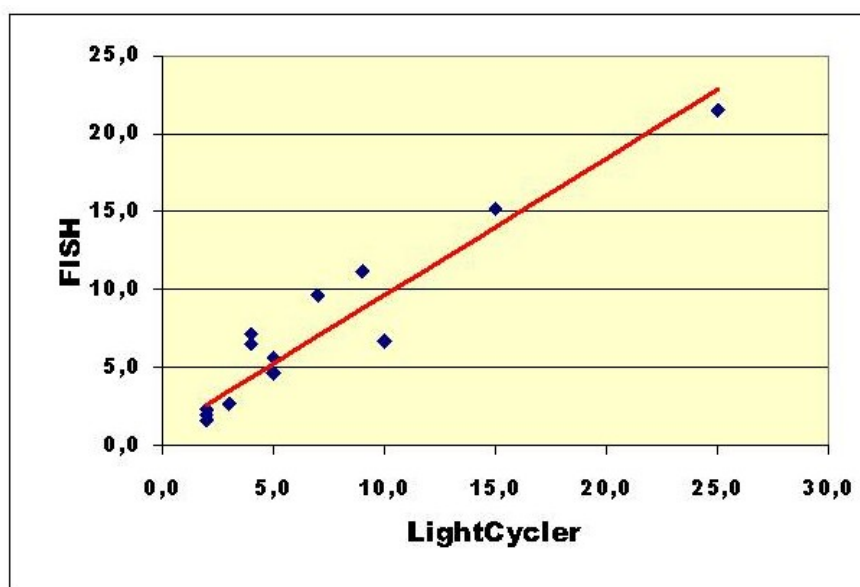
A friss tumorszövet mintából lenyomati kenetet készítettünk és a sejtmagok DNS tartalmát Feulgen reakcióval tüntettük fel. Dual-color FISH vizsgálatot 23 tumor lenyomati kenetén végeztünk *N-myc* kópiaszám meghatározás céljából. (Ugyanezekben a tumorokban az *N-myc* kópiaszámot kvantitatív valós idejű PCR-rel is meghatároztuk.) A kvantitatív kiértékelés digitális képanalízissel történt.

Statistikai analízis

A szövettani grading, a DNS hisztogram paraméterek és az N-myc kópiaszám összefüggését a betegkövetési adatokkal Kaplan-Meier túlélési függvény, Cox proportional hazard regressios model és BMDP statisztikai software programcsomag segítségével végeztük.

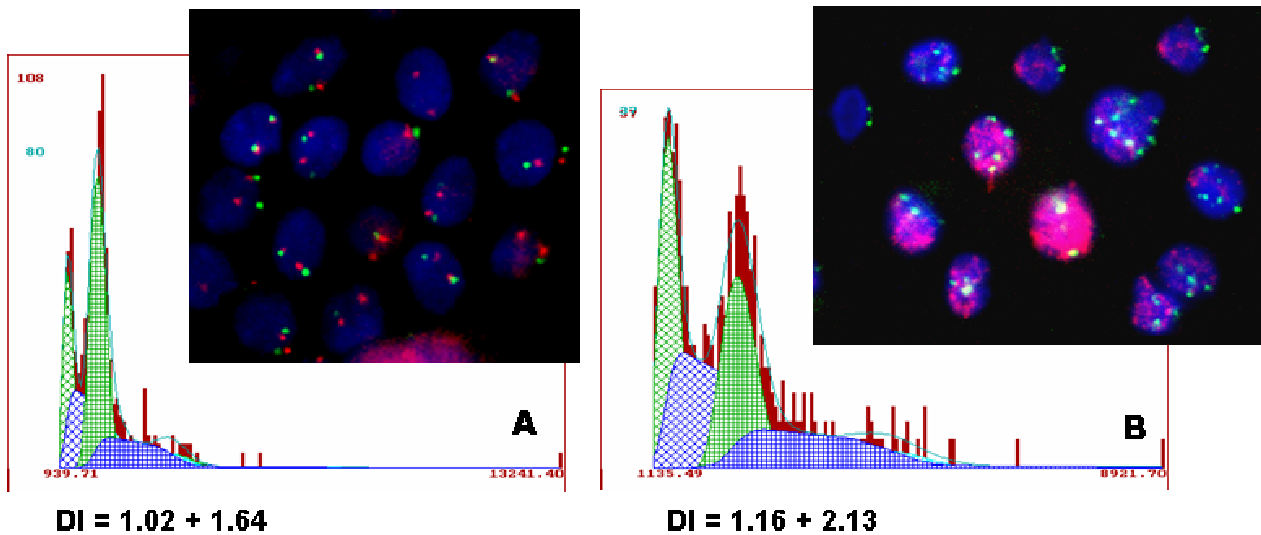
Eredmények és következtetések

Valós idejű kvantitatív PCR eljárással 23 neuroblastoma kevesebb mint négyszeres, 10 neuroblastoma több mint néyszeres N-myc amplifikációt mutat (30%). Ezen belül 4.8%-ban a kópiaszám több mint 300 volt. Minden egyes tumornál az N-myc kópiaszám meghatározása mellett megadtuk a tumor gradinget és DNS cytometria segítségével a DNS indexel kifejezet ploidiát és az S-fázis arányt. A FISH vizsgálatok eredményét összevetettük a DNS-cytometriás és kvantitatív PCR adatokkal. Szoros linearis korrelációt találtunk a kvantitatív PCR és kvantitatív FISH eredmények között, ha az adott tumor 25 vagy kevesebb N-myc kópiaszámot tartalmazott (9. ábra). Ha az N-myc amplifikáció mértéke meghaladta a sejtenkénti 25 kópiát, kvantitatív FISH vizsgálattal a valós kópiaszámot már nem lehetett meghatározni.



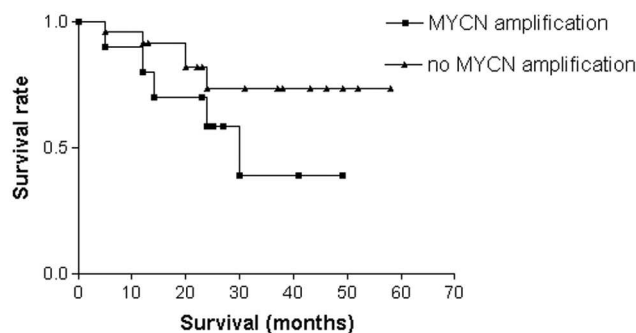
9. ábra: Kvantitatív FISH és kvantitatív valós idejű PCR (LightCycler) vizsgálattal ugyanabban a tumorban meghatározott N-myc kópiaszám összehasonlítása. Az ábrán látható minden egyes sötét kis kocka egy-egy neuroblastoma mintának felel meg.

A sejtenkénti DNS tartalom és FISH - N-myc kópiaszám meghatározás további információkkal szolgál az adott daganat heterogén sejt-összetételéről, a sejtosztódás feltételezhető hibájáról, a globális kromoszómális instabilitásról, illetve a várható kórlefojáról (10. ábra).



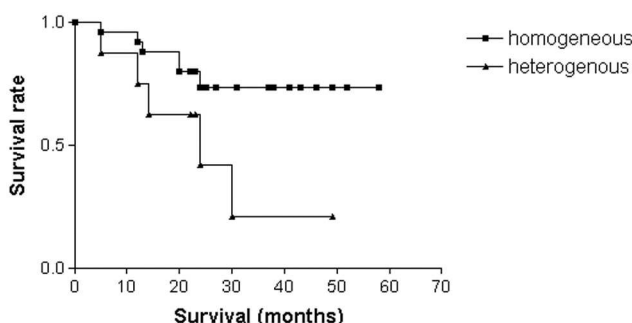
10. ábra: **A:** Fél éves lány, neuroblastoma, 4S stádium. Átlagos N-myc kópiaszám FISH=2.3 (vörös szignál), PCR=2. Kettes kromoszóma szám = 2 (zöld szignál). A DNS hisztogram egy diploid és egy közel triploid daganatsejt szubpopulációt mutat. Ez a jelenség a mitotikus rekombináció zavarára és teljes kromoszóma-nyerésre utal, ami a 2. kromoszómát nem érinti. Jó prognózis, a gyermek 2 éve él, tumormentes. **B:** 2 éves fiú, neuroblastoma, 3. stádium. Átlagos N-myc kópiaszám FISH=több, mint 25, nem meghatározható (vörös szignál), PCR=300. Kettes kromoszóma szám = 3, 4 és 8 kópia (zöld szignál). A DNS hisztogram két aneuploid sejtpopuláció meglétét jelzi. A felsorolt jelenségek generalizált genomiális instabilitásra és strukturális kromoszómális elváltozásokra utalnak. Rossz várható kórlefolyás a diagnózis időpontjában agresszív kemoterápiás kezelés ellenére is. A kisfiú a diagnózist követő másfél év múlva meghalt daganatos betegség következtében.

Ha az egyes genetikai eltérések prognosztikai értékét egyváltozós statisztikai analízissel külön vizsgáljuk, az N-myc génamplifikációt mutató tumoros betegek túlélése valamivel kedvezőtlenebb volt mint azoké a betegeké, amelyek tumorában az N-myc nem volt amplifikált, de a különbség nem volt szignifikáns (11. ábra). Mindez azzal magyarázható, hogy Magyarországon jelenleg a neuroblastoma választandó kezelése már molekuláris patológiai diagnózison és a várható kórlefolyás predikcióján alapul. A tumor ellenes kezelés megválasztásakor az N-myc kópiaszám adatot mindig figyelembe veszik és az agresszívebb tumorokat is hatásosan kezelik.



11. ábra: Az N-myc amplifikáció és a túlélés összefüggése ($P=0.1$)

Az N-myc amplifikáció általában a két vagy több sejtpopulációból felépülő tumorokban fordult elő (P=0.001), de nem mutatott összefüggést az életkorral és a stádiummal. Szoros pozitív összefüggés mutatkozott a sejtenkénti DNS tartalom (közvetve a genomialis instabilitás) és a kórlefordulás között (P=0.001). Azoknak a betegek a túlélése sokkal kedvezőbb volt, amelyek tumora egy sejtpopulációból épült fel mint azoké a betegeké, amelyeknek tumora két vagy több aneuploid sejtpopulációt tartalmazott, vagyis globális genomialis instabilitás állott fenn (12. ábra).



12. ábra: Összefüggés a heterogenitása és a túlélés között. A homogén jelzésű tumorok egy, a heterogén jelzésű tumorok kettő vagy több sejtpopulációból épültek fel.

A neuroblastoma gyermekkorban a leggyakrabban előforduló szolid tumor, a daganatos halálesetek mintegy 15%-áért felelős. 80-95%-ban 5 évesnél fiatalabb életkorban jelentkezik. A magas rizikójú neuroblastoma csoportba azokat az 1 évesnél idősebb betegeket sorolják, akik IV stádiumban vannak, valamint azokat a II. illetve III. stádiumú betegeket, akiknél N-myc amplifikációt észlelnek. Az adott tumorra legmegfelelőbb daganatellenes terápia megválasztása az N-myc amplifikáció mértékétől függ. Itt mi adatokat szolgáltatunk arra, hogy a DNS cytometria és a kvantitatív FISH is nagyon erős prognosztikai prediktor és a daganatok heterogén sejtpopulációja mindig N-myc amplifikációval jár együtt.

2) Fúziós gének kimutatása lágyrész tumorokban

Vizsgálati anyag és módszerek

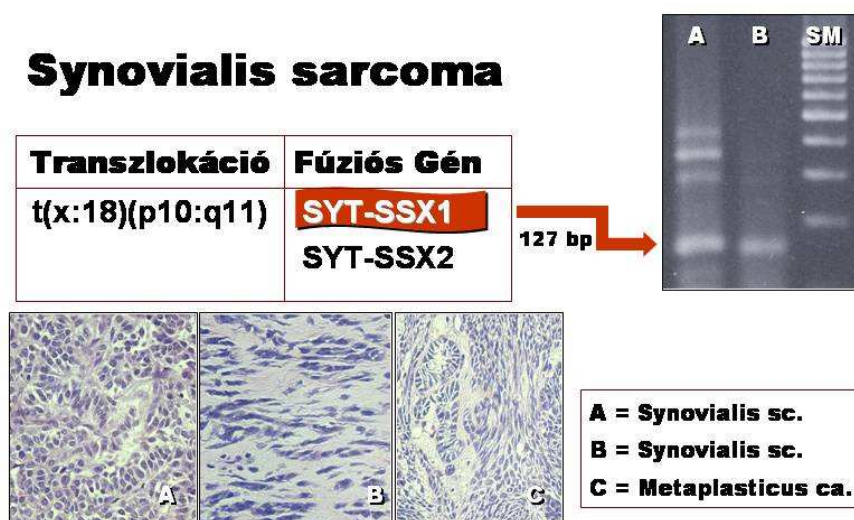
Összesen 30 lágyrész tumort vizsgáltunk. Közvetlenül a műtét után a kioperált daganatszövetet a patológiai feldolgozás protokollját betartva felvágtuk, kis szövetmintát -70°C-on tároltuk. A Szövetekből standard eljárással RNS-t izoláltunk és az mRNS frakciót RT-PCR-rel cDNSre átírtuk és 36 PCR primer segítségével az alábbi tumor-specifikus fúziós géneket vizsgáltuk diagnosztikus célból (3. táblázat). A PCR primereket részben az irodalomból választottuk ki, részben magunk terveztük.

Tumor-specifikus hybrid gének	Tumor típusok
FUS – CHOP	Jól differenciált és myxoid liposarcoma
EWS – Fli1	Ewing sc./ PNET / Askin tu. / Esthesioneuroblastoma
EWS – AFT1	Világossejtes sarcoma
EWS – WT1	Desmoplasticus kis kereksejtes tumor
EWS – CHN	Extraseletalis myxoid chondrosarcoma
SYT – SSXT	Synoviális sarcoma
FKHR – PAX3	Alveoláris rhabdomyosarcoma
NTRK3 – ETV6	Congenitalis fibrosarcoma
COL1A1 – PDGFB	Dermatofibrosarcoma protuberans

3. táblázat: Daganat-specifikus fúziós gének lágyrész tumorokban.

Eredmények és következtetések

Öt retroperitonealis elhelyezkedésű kis kereksejtes differenciálatlan tumor szövetben EWS-Fli1 fúziós gén jelenlétét mutattuk ki, ami primitív neuroectodermális tumorra (PNET) jellemző. További 25 tumort is vizsgáltunk, közöttük synovialis sarcomákat myxoid liposarcomákat, desmoplasticus kis kereksejtes tumort, extraskeletalis myxoid chondrosarcomát, myxoid/kereksejtes liposarcomát. Három diagnosztikus problémát okozó orsósejtes daganat immunhisztokémiai vizsgálattal hám és simaizom fenotípust mutatott (cytokeratin, desmin és α -simaizom-akin fehérjét expresszált) egyik daganatban pedig fokozott c-erb-B2 onkoprotein kifejeződés is kimutatható volt. Ezek közül kettőben (az egyik c-erb-B2 pozitív volt) SYT-SSX1 fúziós gént találtunk, ami magas malignitású synoviális sarcomára jellemző. A harmadik tumor igen ritka alacsony malignitású metaplasticus carcinomának bizonyult (13. ábra).



13. ábra: Három szövettanilag hasonló daganat. A tumorok immun-hisztokémiával pan-cytokeratin, desmin és α -simaizom-akin pozitívak voltak. Az „A” jelzésű daganat c-erb-B2 pozitív is volt. Az „A” és „B” tumorban SYT-SSX1 fúziós gént mutattunk ki, ennek alapján a daganatok synoviális sarcomának feleltek meg.

EWS-Fli1 fúziós gént találtunk egy típusos extrasceletalis mesenchymalis chondrosarcomában, illetve myxoid liposarcomára jellemző FUS-CHOP fúziós gén mutattunk ki lipoma-szerű liposarcomában. Az említett génelváltozások az adott tumorokban nem voltak ismertek. (Az esetek közlésre elő vannak készítve.)

A szövettani diagnosztika az egyes elváltozásokban meglévő szöveti mintázaton, jellegzetes sejttípuson, a stroma eltérésein és az immunhisztokémiai fenotípuson alapszik. Lágyrész tumorokban diagnosztikus nehézséget okoznak a következők: (a) Egy-egy jellegzetes növekedési mintázat vagy sejttípus megjelenik többféle eredetű daganatszövetben is. Az is előfordul, hogy a daganat szövettanilag jóindulatúnak látszik, de rosszindulatúként viselkedik vagy éppen fordítva, rosszindulatúnak látszik biológiailag mégis benignus. (b) A szöveti antigének ép differenciált sejtekben rendszerint nagyobb mennyiségben fordulnak elő, mint tumorsejtekben. (c) Lágyrész tumorokban a szöveti antigének aberrans expressioja gyakori. (d) A diagnosztikus problémák rendszerint a szövettani vizsgálat során merülnek fel, amikor már csak formalin-fixált és paraffinba ágyazott szövet áll rendelkezésre és ilyen anyagon sokkal nehezebb molekuláris biológiai vizsgálatokat végezni. A felsorolt nehézségek az egyébként sem gyakori lágyrész tumor diagnosztikában általánosak, ezért egy-egy ritka eset közlése mindig nagyon értékes.

3) Familiáris nem-polyposis vastagbélrák (Lynch szindróma) genetikai vizsgálata.

Herediter rák szindrómás család és vizsgálati módszerek

Először 1992-ben kaptunk szövettani feldolgozásra egy olyan beteg műtéti anyagát, aki többszörös vastagbélrákban szenvedett. Vitéz Ágnes főorvos (Jászberényi Erzsébet Kórház) ismerte fel a vastagbélrák családi halmozódását, összeállította a családfát, ami az Amsterdam kritériumoknak megfelelt és ezen az alapon a kórképet Herediter Nem-Polyposis Colorectalis Carcinoma (HNPCC) szindrómának (Lynch II szindrómának) diagnosztizáltuk. Jelenleg a családnak több mint 100 élő tagját ismerjük. *A vizsgálat célja annak előrejelzése, hogy melyik családtag kerül el, és melyik fogja megkapni a vastagbélrákot.*

Évek alatt a különböző családtagokban megjelenő vastagbélrákok műtéti preparátumát összegyűjtöttük és a tumor szövet kis darabjait és a szomszédos ép nyálkahártya részleteket -70°C -on tároltuk. A család felmenő tagjainál végzett korábbi műtéti anyagok szövettani preparátumainak egy részét szintén beszereztük. Legújabbban az egyes családtagok vér mintáit is megkaptuk.

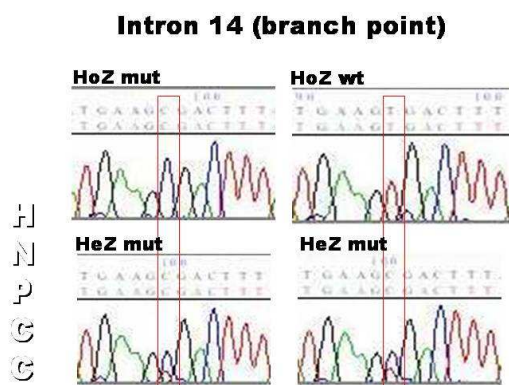
A szövet és vérmintákból DNS és RNS izolálás történt. Ezekből a továbbiakban a következő vizsgálatok történtek:

- Hagyományos PCR és RT-PCR,
- DNS és cDNS (mRNS) szekvencia analízis,
- Microsatellita instabilitás meghatározás valósídejű PCR és olvadáspont analízismódszerrel,
- Komparatív genomialis hybridizáció. (A CGH vizsgálatot Balázs Margit tanárnő, a Debreceni Egyetem Megelőző Orvostani Intézetében végezte.)

A hMLH1 gén exonjainak szekvencia analíziséhez 19, a mRNS szekvencia analíziséhez 18, a microsatellita vizsgálatokhoz 4 PCR primert, végül 4 fluorescens-jelzett LightCycler próbát készítettünk.

Eredmények

A vastagbél daganatok egyes betegeknél soliter, más betegeknél többgócú megjelenést mutattak, néha a jobb colonfélben, máskor a vastagbél teljes hosszában jelentkeztek és rosszul differenciált vagy nyáktermelő adenocarcinómának feleltek meg. A daganatok diploid DNS tartalommal rendelkeztek, komparatív genomialis hybridizációval durva kromoszómális eltérés nem volt kimutatható. A tumorokban az MLH1 14. intronjában ún. „branch point” mutációt találtunk, ami a normális génműködést meggátolta. (14. ábra).



14. ábra: A 14. intronban lévő branch point mutáció elektroferogram képe. A baloldali felső kép homozigóta mutáns, a jobboldali felső kép homozigóta wild type, mindkét alsó kép heterozigóta mutáns szekvenciának felel meg.

Összesen 14 daganatos és nem daganatos családtag vérmintáiban vizsgáltuk a hMLH1 gén „bach site” mutációját és azt találtuk, hogy minden daganatos családtag hordozza az említett mutációt, a nem daganatos családtagok közül háromban a hMLH1 gén teljesen ép volt. Ebből a leletből arra következtethetünk, hogy ezek a családtagok kizárhatók a fokozottan veszélyeztetettek köréből.

A Széchenyi pályázat támogatásával készült közlemények

1. Szentirmay Z, Szántó I, Bálint Ildikó, Pólus K, Remenár É, Tamás L, Szentkúti, Melegh Zs, Nagy P és Kásler M: Oki összefüggés a humán papillomavírus fertőzés és a fej-nyak régió valamint a nyelőcső laphámrákok egyes típusai között. (Causal association between human papillomavirus infection and head and neck and esophageal squamous cell carcinoma) Magyar. Onkol., 46:35-41, 2002
2. Melegh Zs, Bálint I, Nagy K, Magyarosi E, Galántai I. és Szentirmay Z.: N-myc amplifikáció vizsgálata neuroblastomában PCR alapú módszerekkel. (Analysis of N-myc amplification by PCR-based methods in neuroblastoma) Magyar. Onkol., 46:43-48, 2002
3. Szentirmay Z., Ottó Sz és Kásler M.: A Humán papillomavírus (HPV) molekuláris biológiai meghatározásának indikációi. (Indication of the molecular biological determination of human papillomavirus) Magyar Onkol, 46:235-237, 2002
4. Schneider T, Molnár Zs., Deák B, Eid H, Várady E, Tóth E, Matolcsy A, Schneider K és Rosta A: Relabált folliculáris lymphomás betegek Rituximab-kezelése. Magy. Belorv. Arch., 56:121-126, 2003
5. Melegh Zs, Bálint I, Nagy K, Tóth E, Csernák E and Szentirmay Z: Detection of N-myc gene amplification in neuroblastoma by comparative, in situ and real-time polymerase chain reaction. Pediatric Pathol. Molec. Med., 22:1-10, 2003 IF: 0.228
6. Szentirmay Z: A humán genom megismerésének hatása a patológia fejlődésére. Orv. Hetil., 144:3-12, 2003 (az Orvosi Hetilap Markusovszky Lajos Díjával kitüntetett közlemény).
7. Korszerű daganatpatológiai diagnosztika. Házirov. Továbbképző Szle., 9:E15-24, 2004.
8. Schneider T, Tóth E, Molnár Zs, Várady E, Deák B, Horváth A, Horváth Gaudi I, Eid H, Schneider K, Lővey Js és Rosta A: Primer mediasztinális nagy B-sejtes lymphomák kezelése Orv. Hetil., 145:2531-2537, 2004
9. Szentirmay Z és Csuka O: A vastagbélrák molekuláris patológiája. In: A vastagbélrák megelőzése és szűrése. Ed.: Tulassay T. Springer Hungária. pp 19-54, 2004.
10. Szentirmay Z, Pólus K, Tamás L, Szentkúti G, Kurcsics J, Csernák E, Tóth E, and Kásler M: Human papillomavirus in head and neck cancer: clinicopathological correlates. Cancer Metast Rev. 24:17-32, 2005 IF: 1.982²⁰⁰³
11. Melegh Zs, Csernák E, Tóth E, Nagy K and Szentirmay Z: DNA content heterogeneity by image cytometry in neuroblastoma and its potential significance. Virchows Arch. Közlésre elfogadva. IF: 2.357²⁰⁰³
12. Szántó I, Szentirmay Z, Banai J, Nagy P, Gonda G Vörös A, Kiss J és Bajtai A.: A nyelőcső laphámsejtes papillomája. Klinikai és patológiai tapasztalataink 155 beteg 172 papillomája kapcsán. Orv. Hetil., Közlésre elfogadva.
13. Tóth Er, Schneider T, Melegh Zs, Csernák E, Udvarhelyi N, Rosta A, Szentirmay Z: Follicularis lymphomák komplex diagnosztikája. Magyar Onk., Közlésre benyújtva
14. Csernák E, Tóth E, Melegh Zs, Pekár Gy, Szőke J and Szentirmay Z: Detection and quantization of MBR/JH2 t(14;18) bcl-2 gene rearrangement with real time PCR using FRET labeled probe and primer combined with SYBR Green I melting curve analysis: a fast, easy and cost-effective method. Közlésre beküldve