

**Proliferációs és molekuláris patológiai vizsgálatok
lágyrész daganatokban.**

**PhD értekezés
tézisei**

**Dr. Tornóczy Tamás
PTE, ÁOK Patológiai Intézete
2001**

Neuroblastos tumorok

A neuroblastos tumorok a primitív neuroektodermális neoplasmák családjába tartozó, egyik leggyakoribb gyermekkori daganatcsoport. Biológiai viselkedésük az egyes esetekben egymástól igen eltérő, mely nagy mértékben befolyásolja a betegség lefolyását illetve az alkalmazandó terápiás beavatkozást. Vannak spontán regrediáló, és vannak kiérő-differenciálódó formák (ganglioneuroblastoma, ganglioneurinoma irányú transzformáció), de gyakran előfordulnak igen agresszív növekedést mutató daganatok is, ahol gyors lokális terjedést és metasztázisokat találunk. Az eltérő biológiai viselkedés okai csak részben ismertek és bizonyos tulajdonságokhoz (citológiai-hisztológiai érettség, a gyermek kora, a daganat stádiuma, lokalizációja), illetve kromoszómális elváltozásokhoz (delécio, génamplifikáció) köthetők.

A genetikai elváltozások közül a kórlefoyasra nézve a legerősebb kórjósló értékkel, illetve terápiás jelentőséggel az *N-myc* amplifikáció, annak mértéke rendelkezik. Az amplifikáció mértékének meghatározására többféle módszer áll rendelkezésre. Az *N-myc* fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) gyors, megbízható módszer, segítségével a tumor heterogenitása is jól vizsgálható, valamint megmutatja az amplifikáció formáját (kettős parányok, homogéne festődő régió) de csak korlátozott számú sejtről ad információt, és az amplifikáció mértékének megadása bizonyos értékek felett nehéz. Széles körben elterjedt módszer az *N-myc* kópiaszám meghatározására a "Southern-blot" analízis, mely az amplifikáció mértékének pontos meghatározására alkalmas, de relatíve nagy mennyiségű, intakt DNS-t (mikrogrammnyi mennyiség) valamint radioaktív próbát igényel, és csak 2-3 hét alatt ad eredményt. A DNS alapú, kompetitív *N-myc* polimeráz láncreakció (*N-myc* PCR) lehetőséget ad a génamplifikáció mértékének gyors meghatározására 100 nanogramnyi DNS-ből.

Célkitűzések

E fejezet egyik célja az 1994 és 2001 között diagnosztizált neuroblastos tumorok legújabb hisztológiai klasszifikáció szerinti besorolása, hisztológiai jellemzése, másfelől az ismert kromoszómális eltérések (1p36.3 delécio, *N-myc* amplifikáció, és a

17 q többlet) FISH technikával történő vizsgálata voltak. Mindemellett a fő cél egy rutinszerűen használható, reprodukálható, kvantitatív eredményt adó, kompetitív polimeráz láncreakció beállítása volt az *N-myc* gén amplifikációjának mérésére (*N-myc* PCR).

Anyag és módszer

Betegek, hisztológia

A vizsgálatsorozat kapcsán a PTE ÁOK Patológiai Intézetében és Gyermekklinikáján (Onkohematológiai Osztály) 1994 és 2001 márciusa között diagnosztizált, 24 neuroblastos primer tumor teljes hisztopatológiai vizsgálatát végeztük el. 3 esetben két mintavétel (biopsia és rezekció) is történt a betegeknél. A betegek életkora a diagnóziskor változó volt, az 1 hetes kortól a 19.5 évig terjedt (átlag: 5 év). A NB-ás és GNB-ás betegek (18 beteg) esetén a spektrum szűkebb volt: az 1 hetes kortól a 10 év 4 hónapos korig terjedt. A lokalizációt tekintve 11 daganat mellékvese (5 bal és 6 jobb oldal), 9 retroperitoneális (egy ebből egyúttal hasüregi folyamat is volt), 1 nyaki, 2 kismedencei, és 1 mediasztinális lokalizációjú volt. A NB-ás és GNB-ás betegek klinikai stádium megoszlását tekintve 3 I-es, 4 II-es, 3 III-as és 8 IV-es stádiumú daganatot észleltünk. A 24 esetből 16 neuroblastomának, ebből 7 differenciálatlan (NB-UD), 8 rosszul differenciált (NB-PD), 1 pedig differenciálódó (NB-DF) szubtypusnak bizonyult. 2 esetünk a klasszifikáció értelmében ganglioneuroblastoma volt, ezen belül 1 kevert (GNB-M) és 1 noduláris (GNB-N) szubtypusnak felelt meg. A további 6 eset típusos ganglioneurinoma, azon belül 1 kiérő, és 5 kiérett típus volt. Számos esetben a rezekcióval egy ülésben vett csontvelő biopsziás mintát is elemeztük, és több esetben regionális lymphadenomegália miatt a nyirokcsomókat is megvizsgáltuk. Összesen 6 esetben találtunk csontvelői érintettséget, melyhez 4 esetben nyirokcsomó metasztázis is társult. Minden esetben natív tumorminta állt rendelkezésre, így a NB-k és GNB-k lenyomati készítményein, 10 esetben, *in situ* hibridizációs vizsgálatokat (*N-myc* FISH, 1p FISH és 17q FISH), a natív tumorszövetből pedig mind a 18 esetben DNS izolálás után *N-myc* PCR-t végeztünk. A klinikai stádium meghatározása az 1993-ban módosított International Neuroblastoma Staging System (INSS, 1993) alkalmazásával történt.

A DNS izolálása natív tumorszövet mintából

A DNS izolálás során a 3-4 db, 50 µm vastagságú fagyasztott szövetmintát proteináz-K-t, SDS-t és mag lízis puffert tartalmazó oldattal, egy éjszakán át, 37 °C-on emésztettük, majd centrifugálás után a felülúszót telített NaCl oldattal, illetve 2 térfogatnyi etilalkohollal kezeltük. A kicsapódott DNS-t steril desztillált vízben oldottuk. A minták DNS koncentrációját Spectronic 21D spektrofotométerrel, 260 nm-es hullámhosszon mértük és egységesen 0.1 µg/µl munkaoldatot készítettünk.

Kompetitív polimeráz láncreakció

A kompetitív *N-myc* PCR az *N-myc* gén 3. exonjának egy 428 bázispár hosszúságú szakasza felerősítésén alapszik. Az endogén kontrollként alkalmazott kompetitor génszakasz a cystas fibrosis génjének 3. exonjából származó, 170 bázispár hosszúságú részlet. Miután mindkét polimeráz láncreakció egy csőben történik (kompetitív reakció), minél több *N-myc* kópia van a kiinduláskor a tumor DNS mintánkban, annál erősebb vonalat kapunk az *N-myc* helyén és ezzel párhuzamosan annál gyengébb vonal mutatkozik a CF sávban. A két vonal (*N-myc* és CF) erősségének hányadosa (*N-myc*/CF) az adott reakcióban, az adott tumor DNS-re (neuroblastos tumor esetre) vonatkoztatva jellemzőnek bizonyult. A hányados pontos jellemzéséhez egy DNS kontroll hígítási sort használtunk, melyet mesterségesen, két ismert *N-myc* kópiaszámú DNS minta megfelelő arányban történt keverésével hoztunk létre. Az egyik minta egy reaktív nyirokcsomóból származott (2n *N-myc* kópia), míg a másik egy ismert *N-myc* amplifikációjú neuroblastoma sejtvonalból (NGP, 130x) extrahált DNS volt. Az ily módon előállított DNS keverékek 1x-es, 5x-ös, 10x-es, 15x-ös, 20x-os, 50x-es, 100x-os illetve 130x-os amplifikációjúak voltak. Az *N-myc*/CF vonalerősség-arányt minden esetben meghatároztuk, majd koordináta rendszerben az *N-myc* függvényében ábrázoltuk. A mérendő neuroblastomas esetek vonalerősség arányait a kapott kontroll grafikonba illesztve megadható volt az amplifikáció mértéke. A PCR elegy összetétele a következő volt: 30 µl össztérfogatban 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 20 mM dNTP mix és 1U Taq polimeráz. Az *N-myc* primerek (MB-4, 3. exon, 5046) 5'-GATGAAGATGATG AAGAGGAA-3' és (MB-5 3. exon, 5474) 5'-TGGTCCCTGAGCG TCAGAAA-3' 60 ng és 65.7 ng mennyiségben voltak a reakcióelegyben, míg a CF primereket, (CF-1) 5'-TGCAAC TTAT

TGGTCCCCT-3' és (CF-2) 5'-ATGAATGTACAAATGAGATCC T-3', mind 60 ng mennyiségben adtuk az elegyhez csövenként. Minden esetben 100 ng DNS-t mértünk a 30 µl össztérfogathoz. A reakciót Perkin-Elmer GeneAmp 2400 típusú "thermocycleren" végeztük, a következő kondíciók mellett: 5 perc 94 °C denaturáció, majd 30 cikluson keresztül: 1.5 perc 94 °C denaturáció, 1.5 perc 55 °C "annealing", 1.5 perc 72 °C elongáció. Az utolsó ciklus végén egy 10 perces végső elongáció következett. A kapott PCR termék 10 µl-jét 0.5 µg/ml etidium bromidot tartalmazó 2%-os agaróz gélen futtattuk. A gélfotót digitalizáltuk, majd image analysis szoftverrel elemeztük.

Próbakészítés. FISH (N-myc FISH, 1p FISH, 17q FISH)

A próbakészítés módját (1-es és 17-es centromerikus próbák) az alveoláris légycsoma sarcoma fejezet anyag és módszerek részében ismertetjük. A frissen készített lenyomati preparátumokat, vagy keneteket 70%-os alkohol fixálóban rögzítettük 10 percig, majd 70%-os ecetsavas, illetve metanolos öblítés után felszálló alkoholsoron dehidráltuk. A mintát denaturáltuk (70% FA/2xSSC /50mM foszfát puffer, 68°C, 3 perc), majd a tárgylemezeket hideg etanol soron dehidráltuk, szárítottuk. Az *N-myc* FISH-hez digoxigeninnel jelölt *N-myc* és biotinnal jelölt 3-as centromerikus (pα3.5) próbák elegyét használtuk 3-3 µl-es mennyiségben. Az 1-es kromoszóma rövid karjának delécióját digoxigeninnel jelölt 1-es centromerikus (PUC1.77) és biotinnal jelölt 1-es telomerikus (1p36.3, Oncor) próbák elegyével (3-3 µl), míg a 17-es kromoszóma hosszú karján a kromoszómális anyag nyelését biotinilált 17-es centromerikus (p17H8) illetve digoxigeninnel jelölt telomerikus (17q25-qtel, Oncor) próbák elegyével végeztük. Lefedés után nedves kamrában, 37 °C-on, egy éjszakán át inkubáltuk a mintákat. A hibridizáció utáni mosás 50% formamid/2xSSC, pH 7.0-n, 45 °C-on 10 percig történt. Az előhívás anti-digoxigenin-rhodamin (vörös fluoreszcencia) illetve avidin-FITC (zöld fluoreszcencia) komplexel történt 37 °C-on, nedves kamrában, 30 percig. A magfestést és lefedést DAPI-Vectashield 20 ng/ml oldattal, a fluorescens analízist pedig Zeiss Axioskop fluorescens mikroszkóppal végeztük.

Eredmények

Az ismert *N-myc* kópiaszámú sejtvonalakból (IMR-32, Kelly), illetve a biztosan nem *N-myc* amplifikált humán placentalis szövetből

származó DNS mintákat külső kontrollként felhasználva az irodalomban közölt eredményeket (IMR-32: kb. 30-40x-es amplifikáció, Kelly: kb. 110-120x-es amplifikáció) kaptuk, míg a humán placenta DNS esetében nem észleltünk endogén amplifikációt ($2n$ *N-myc* kópia). Az összes vizsgált minta esetében a reakció két jól értékelhető vonalat (428 bázispár, 170 bázispár) eredményezett. 9 esetben figyeltünk meg 10x amplifikáció feletti, és hasonló módon 9 esetben ez alatti *N-myc* kópiaszámot. A 10x amplifikáció feletti esetek közül 3-ban észleltünk 100x-os, vagy azt meghaladó kópiaszámot, melyek közül az egyik egy I. stádiumú mellékvese neuroblastoma, a másik kettő pedig III. illetve IV. klinikai stádiumú eset volt. A III-as és IV-es stádiumú tumorok (11 eset) 55%-a (6/11 eset), míg az I-es és II-es stádiumú tumorok (7 eset) közül három (43%) mutatott 10x feletti amplifikációt. 10 esetben (1, 2, 4, 5, 6, 20, 21, 22, 23 és 24) a PCR előtt *N-myc* FISH-t is végeztünk. 6 esetben az *N-myc* gén nem mutatott amplifikációt, míg 4 esetben erős, diffúz, egyértelműen amplifikációra utaló jelet kaptunk. A két módszerrel kapott adatokat összehasonlítottuk, melynek kapcsán teljes egyezést észleltünk, tehát az összes FISH-el „amplifikáltak” bizonyult eset PCR-rel is megfelelő endogén amplifikációt mutatott. Részletesebben az 1-es, 2-es, 4-es, 5-ös, 20-as és 21-es esetekben a PCR 1-5x-ös, a FISH sorrendben kb. 1x-es, 1x-es, 6x-os, 3x-os, 1x-es és 1x-es kópiaszámot mutatott. A 6-os, 22-es, 23-as és 24-es esetekben a PCR kb. 100x-os, 65x-ös, 114x-es és 68x-os, míg a FISH erős, diffúz, jóval 10x-es feletti amplifikációt mutatott. 10 esetben vizsgáltuk meg mindhárom, a NB-ra jellegzetes molekuláris patológiai eltérést. Figyelemre méltó volt az *N-myc* amplifikált státusza és az 1p deléció, valamint a nem amplifikált *N-myc* és az ép (nem deletált) 1p együttes előfordulása. A négy (4/10) FISH-el amplifikáltak bizonyult eset (6-os, 22-es, 23-as és 24-es esetek) egyértelműen 1p deléciót is mutatott (4/10), míg a 6 *N-myc* amplifikációt nem mutató esetből ötben ép 1p-t találtunk. Mindemellett egy esetben (1-es eset) az 1-es kromoszóma centromerikus és telomerikus jelei közötti számbeli arányváltozást („imbalance”) észleltünk. 17q többletet összesen 3/10 esetben észleltünk. Ez utóbbi genetikai eltérés 2 esetben *N-myc* amplifikációval és 1p delécióval társult, egy esetben pedig nem amplifikált *N-myc* státusszal és 1p „imbalance”-al járt együtt. A két módszerrel mért *N-myc* amplifikáció és a hisztológiai típus közötti

összefüggést is megvizsgáltuk. A 7 differenciálatlan tumorból 6-ban (86%) 10x feletti *N-myc* amplifikációt észleltünk (40x-es, 100x-os, 25x-ös, 65x-ös, 114x-es és 68x-os értékekkel a 3-as, 6-os, 11-es, 22-es, 23-as, és 24-es esetekben), míg a 8 rosszul differenciált tumorból csak 3 (38%) 10x feletti *N-myc* amplifikáció mutatkozott (100x-os, 17.5x-es, illetve 30x-os értékekben a 7-es, 10-es és 12-es esetekben). A két GNB és a NB-DF nem mutatott *N-myc* amplifikációt. Az 1p státuszt tekintve az 5 vizsgált differenciálatlan tumorból 4 eset (80%, 6-os, 22-es, 23-as, és 24-es esetek) mutatott deléció, amíg a rosszul differenciált csoportból (3 vizsgált eset) egy sem mutatta az elváltozást. A 17q többletet 5 differenciálatlan tumorból 2-ben (40%), a 3 rosszul differenciált tumorból egyben sem észleltük. A NB-DF 17q többlet pozitív, míg a GNB-N negatív volt.

Megbeszélés

Az *N-myc* amplifikáció meghatározása mára már a diagnosztikus protokollok részévé vált. A kor, stádium, és hisztológiai típus mellett a kórlefolysást, és ezzel a kezelést befolyásoló marker. 10 kópia feletti amplifikáció aggresszív lefolyású, előrehaladottabb stádiumú daganatra utal.

A széles körben elterjedt mérési módszerek közül a legújabb a kompetitív PCR-ral történő kópiaszám meghatározás. Vizsgálataink alapján a fentebb összeállított *N-myc* PCR jól reprodukálható, gyors, kevés DNS-t, de izotópot nem igénylő módszernek bizonyult, így jó kiegészítője lehet az általában alkalmazott, legegyszerűbben kivitelezhető *N-myc* FISH-nek. Azon 10 esetben, amelyben az *N-myc* státuszt mindkét módszerrel meghatároztuk, az összehasonlító vizsgálat azt mutatta, hogy a két módszerrel kapott eredmények jól korreláltak. A 6-os, 22-es, 23-as és 24-es esetekben csak a PCR tudott részletesebb kvantitatív eredményt adni. A külső kontrollként használt sejtvonalakkal (IMR-32, Kelly), illetve a humán placentalis DNS-sel végzett kontrollvizsgálatok igazolták a módszer alkalmazhatóságát. A PCR-rel kapott eredmények a magasabb klinikai (III.-IV.) stádiumot mutató esetekben (6/11, 55% 10x amplifikáció feletti érték) megfelelnek az irodalomban közölt adatoknak (kb. 50%), míg a korai stádiumú (I-II stádiumú) daganatoknál kapott eredmények (3/7, 43%) a közölt adatokhoz (10-15% 10x amplifikáció feletti érték) képest magasabb értékeket mutattak. Ennek oka a kis korai stádiumú esetszámmal

magyarázható. A bemutatott két módszer (*N-myc* FISH, *N-myc* PCR) együttes alkalmazása több előnnyel jár: az *in situ* hibridizáció a részletesebb morfológiai információ (tumor heterogenitás, kettős parányok, homogéneen festődő régiók) lehetőségét nyújtja, míg a PCR nagyobb számú sejtről ad kvantitatív információt. Ezen kívül a PCR előnye a többi kvantitatív módszerhez képest, hogy kis mennyiségű mintát igényel. Ismert, hogy a medicina egyre inkább a nem invazív, vagy minimál-invazív eljárások irányába tolódik, így a tübiopsziák alkalmazásának előtérbe kerülésével, és a “kevés anyagból sok információ” szemlélet terjedésével a PCR létjogosultsága várhatóan erősödni fog.

A fent említett 10 esetben a daganat lenyomati készítményein elvégeztük az 1p és 17q FISH reakciókat is. Figyelemre méltó volt a molekuláris patológiai értelemben vett rossz prognosztikus faktorok akkumulációja a vizsgált esetekben. Négy esetben az amplifikált *N-myc* státusz (jóval 10x feletti amplifikáció) 1p delécióval társult, és ebből 2 esetben még 17q többletet is mutattak a daganatsejtek. A megfigyelés fordítva is igaznak bizonyult: 5 esetben a nem amplifikált *N-myc* státuszhoz (10x alatti amplifikáció) intakt 1p kar társult. Ez a véletlen egybeesés mellett felvetheti a két aberráció közötti esetleges strukturális összefüggés lehetőségét is, azonban erre eddig bizonyíték nincs. A hisztológiai szubtípus illetve az *N-myc*, 1p és 17q státusz összevetésekor a legrosszabb prognózisú csoportban (NB-UD) fordult elő a leggyakrabban az *N-myc* amplifikáció (86%), illetve az 1p deléció (80%). A rosszul differenciált tumorokban az előbbi csak 38%-ban, az utóbbi pedig 0%-ban fordult elő. Ez a hisztológiai és a molekuláris patológiai rossz kórlefolyást jelző markerek együttes előfordulását mutatja. A differenciálatlan tumorokban viszonylag alacsony százalékban (40%), míg a rosszul differenciált tumorokban egyáltalán nem tapasztaltunk 17q többletet, ami szokatlan, és leginkább a kis esetszámmal magyarázható.

Következtetések

1. A fentebb ismertetett *N-myc* PCR jól reprodukálható, gyors, kevés DNS-t igénylő kvantitatív módszernek bizonyult.

2. Az *N-myc* PCR jó kiegészítője lehet a gyakran alkalmazott, legegyszerűbben kivitelezhető és morfológiai információt szolgáltatató *N-myc* FISH-nek.
3. A két *N-myc* státuszt meghatározó módszerrel (FISH és PCR) kapott eredmények egymással jól korreláltak.
4. Figyelemre méltó adat az *N-myc* gén amplifikált státusza és az 1p deléción, valamint a nem amplifikált *N-myc* és az ép 1p együttes előfordulása.
5. A neuroblastoma differenciálatlan jellege és az *N-myc* gén amplifikált, valamint az 1p régió deletált állapota közötti összefüggés jól demonstrálható. A rosszul differenciált tumorok esetében ez az összefüggés kevésbé szoros.

Gastrointestinalis stromalis tumor (GIST)

A gastrointestinalis mesenchymalis tumorok az epithelialis eredetűekhez képest ritka daganatok. A ma gastrointestinalis stromalis tumornak (GIST) nevezett daganat típus az emésztő traktus leggyakrabban előforduló, nem-lymphoid, mesenchymalis tumora. Ezen daganatok eredete sokáig tisztázatlan volt, és a 80-as évek elejéig minden formáját (függetlenül a myogen hisztogenezis bizonyíthatóságától) simaizom eredetűnek tartották. Miután a daganatcsoport citomorfológiája heterogén képet mutatott és bizonyos fenotípusos vonások (hullámos lefutású, kihegyezett végű magalak, nukleáris paliszád-képződés) inkább neurogén eredetet sejtettek, és miután az immunohisztokémia széleskörű elterjedésével sem volt bizonyítható sok mesenchymális eredetű gastrointestinalis tumor myogen eredete, új kategóriaként egy gyűjtőfogalom, a gastrointestinalis stromalis tumor került bevezetésre. 1984-ben Herrera és mtsi. egy kifejezett neurogén differenciálódást mutató, nem-Schwann sejtés tumort írtak le, melyről -részint immun fenotípusos, részint ultrastrukturális tulajdonságai miatt- annak gastrointestinalis plexus eredetét (plexosarcoma, gastrointestinalis autonom idegrendszeri (nerve) tumor, GANT) feltételezték. 1998-ban mérföldkőnek tekinthető előrelépés történt a daganat patogenezisének megértésében. Hirota, majd Kindblom és mtsi. 49 illetve 78 GIST elemzésével kimutatták, hogy a daganatsejtek sok közös vonást mutatnak a gastrointestinalis Cajal sejtekkel (ICC: Interstitial Cell of Cajal), valamint azt, hogy a daganat intenzíven

expresszálja a *c-kit* (CD-117) antigént. Ez módosította a hisztopatológiai diagnosztikát, egy új, megbízható markert a patológus kezébe adva. A hisztogenezis problematikája mellett fontos és klinikai jelentőségű a tumor dignitásának kérdése. Számos tanulmány foglalkozott ezzel a kérdéssel. Döntő többségük egyetért abban, hogy minél nagyobb a daganat, minél nagyobb a mitotikus aktivitás, annál nagyobb az esélye a daganat agresszív jellegének. A véleményekben megjelenő különbségek a “low grade”-“high grade” kategóriák közötti határban, illetve az egyes prognosztikai faktorok jelentőségében vannak.

Célkitűzések

Célként tűztem ki az 1991 és 2001 januárja között intézetünkben diagnosztizált gastrointestinalis stromalis tumorok reklassifikálását, pathológiai jellemzését. Mindemellett elvégeztem a prognosztikus értékkel rendelkező proliferációs (Ki-67 és mitózis) és flow cytometriás (S-fázis, ploiditás) paraméterek vizsgálatát. A rendelkezésre álló túlélési adatokat is elemeztük és kísérletet tettünk ezek és a prognosztikus faktorok összevetésére. Összesen 15 betegből (10 férfi és 5 nőbeteg) 16 gastrointestinalis stromalis tumort (GIST) gyűjtöttünk össze. A daganatok közül három klasszikus leiomyogen differenciálódású (leiomyosarcoma, LMS), 13 pedig nem myogén, Cajal-sejtes (GIPACT) volt. Egy betegből (2-es, illetve 7-es eset) az első illetve a második primer (több, mint 4 év a két tumor észlelése között) tumort is megvizsgáltam. Cél volt a saját és más, külföldi tanulmányok eredményeinek összehasonlítása is.

Anyag és módszerek

Fénymikroszkópia

A fomalín-fixált szövetblokkok készítése a megszokott módon történt, majd hematoxilin-eozin (HE) festést végeztünk. Az immunprofil meghatározására összesen 12-féle immunhisztokémiai markert (*c-kit*, CD-34, desmin, SMA, vimentin, CK, chromogranin-A, synaptophysin, S-100, NSE, PGP 9.5, NF, Ki-67) használtunk. Minden esetben standard citrát pufferes mikrohullámú előkezelést (700W, 3x5 perc) alkalmaztunk, és az ajánlott hígításokat illetve inkubációs időket használtuk, és a reakciókat, illetve az előhívásokat VENTANA immunautomatán, illetve rendszerrel végeztük.

Áramlási citometria

A tumorszövet paraffinos blokkjaiból 4 db 50 µm vastag metszetet készítettünk, majd a rehidráció után a metszeteket 2ml 0.1% pepsin (pH 1.5) oldatban, 37°C-on, 60-90 percig emésztettük, majd hideg PBS oldattal leállítottuk. A sejtszuszpenziót szűrtük, centrifugáltuk, majd reszuszpendáltuk 200 µl PBS-ben, amelyet 2 µl RNase-zal (10mg/ml) egészítettünk ki. 25 perces emésztés után (37°C), 200 µl PBS-t és 3 µl propidium iodidot (6.64 mg/ml) adtunk az oldathoz. 30 perces inkubáció (sötétkamra, szobahő) után, a mintákat Beckton Dickinson FACSort flow cytométeren mértük (az 1-es esetet PARTEC FCM-en). A primer tumor mellett két esetben (a 7-es és a 14-es esetek) a metasztatikus daganatot is megvizsgáltuk. Minden esetben legalább 10000 sejtet mértünk. A hisztogramokat a mellékelt software csomag felhasználásával elemeztük.

Ki-67 és mitózis index

A Ki-67 indexet 1000 tumorsejt leszámolásával, a pozitív sejtmagok százalékos arányában adtuk meg. Függetlenül a festés intenzitásától minden pozitív sejtet értékeltünk. A mitózisok számát 20 egymást követő, 400x-os nagyítású látótér (HPF) elemzésével adtuk meg (Nikon Labophot 2).

Statisztikai analízis

A statisztikai elemzést (T-próba) a Microsoft Excel-el végeztük. A tumorcsoportok közötti különbséget szignifikánsnak tekintettük, ha $p \leq 0.050$ volt.

Eredmények

Makroszkópia

A vizsgált daganatok nagysága (a legnagyobb átmérő, multiplex daganat esetén a legnagyobb tumornodulus legnagyobb átmérője) 15 és 150 mm között változott, az átlag 73 mm volt. A primer tumor helye 4 esetben gyomor (4/16, 25%), 10 esetben vékonybél (10/16, 63%) (ebből 3 duodenum, 4 jejunum, 1 ileum, 2 definiálatlan vékonybél) egy esetben vastagbél (rectum) (1/15, 7%) voltak. A két pontosabban nem definiálható, vékonybél eset (10-es és 12-es esetek) közül a 10-es a vékonybeleket, illetve a peritoneumot infiltráló, lokálisan terjedő daganat volt, míg a 12-es eset kismedencei (feltehetőleg eredetileg ileum) lokalizációjú tumornak bizonyult. A maradék egy esetben (6-os eset) multiplex retro- és intraperitoneális- mesenterialis- és cseplesz érintettséget észleltünk.

A gyomor eredetű esetek átlagos nagysága 66 mm-nek, míg a vékonybél csoporté 77 mm-nek adódott ($p=0.726$). Három tumor (3/16, 19%) volt multinoduláris/multiplex, ebből 2 gyomor, 1 a fentebb említett 6-os eset, így a gyomortumorok 50%-a (2/4) volt többgócú. A multinoduláris tumorok átlagos nagysága (1-es, 5-ös, és 6-os esetek) 100 mm-nek, míg a soliter tumoroké (2-es, 3-as, 4-es, 7-es, 8-as, 9-es, 10-es, 11-es, 12-es, 13-as, 14-es, 15-ös és 16-os esetek) 67 mm-nek adódott ($p=0.303$). Mindegyik multinoduláris tumor neurogén differenciálódású volt. A 16 esetből ötben metastasisok fejlődtek ki (5/16, 31%). Hármban máj, egyben mesenterialis nyirokcsomó érintettség volt látható, egy pedig a fentebb említett multiplex, több szervet/régiót érintő daganat (6-os eset) volt. A hármas és a 10-es esetek lokális terjedés egyértelmű jeleit mutatták. A metasztatikus és/vagy lokálisan terjedő (a malignitás egyértelmű makroszkópos jeleit mutató) csoport (3-as, 5-ös, 6-os, 7-es, 10-es és 14-es esetek) átlagos primer tumor nagysága 89 mm-nek adódott, míg a nem metasztatikus/lokális terjedést nem mutató tumor csoporté (1-es, 2-es, 4-es, 8-as, 9-es, 11-es, 12-es, 13-as, 15-ös és 16-os esetek) 64 mm volt ($p=0.345$). Mindemellett a myogen (leiomyosarcoma, 10-es, 11-es, és 12-es esetek) illetve a neurogen differenciálódású (1-es, 2-es, 3-as, 4-es, 5-ös, 6-os, 7-es, 8-as, 9-es, 13-as, 14-es, 15-ös és 16-os esetek) tumorok nagyságát is összevetettük. Így a leiomyosarcomák átlag mérete 130 mm, míg ugyanez a másik csoport esetén 59 mm volt ($p=0.019$).

Mikroszkópia

A fenotípus vizsgálatát a HE alapfestés kapcsán végeztük el. A daganatok hisztológiai megjelenése meglehetősen változatos volt. 12 esetben orsósejtes, két esetben epithelioid sejtes, két esetben kevert fenotípusú volt a daganat. Az orsósejtes és epithelioid variánsokon kívül a daganatsejtek egy része kerek vagy ovoid volt, és némely esetben moderált, néhol masszív pleiomorphia mutatkozott. A daganatok FNCLCC séma szerinti hisztológiai grade-je GI és GIII (4 pont-8 pontig) között mozgott. 9 GI-es (56%), 4 GII-es (25%) és 3 GIII-as (19%) tumort észleltünk, míg benignus daganat (G0, 3 pont) nem volt. A gyomor eredetű tumorok átlag grade-je (1.3) alacsonyabb volt a vékonybél tumorokénál (2.0) ($p=0.116$), ugyanígy az áttétet nem képező és/vagy lokálisan nem terjedő daganatok hasonló paramétere (1.4) a metasztatizáló és/vagy lokálisan terjedőkéhez (2.0) képest ($p=0.156$). A multinoduláris és soliter

esetekben az átlag grade nem tért el jelentősen: 1.4 és 1.6 az előbbi és utóbbi esetben. A Cajal sejtes tumorok és leiomyosarcomák összehasonlításakor 1.4-es és 2.7-es átlag grade adódott ($p=0.007$). A tumorsejtek immunprofilja szintén meglehetősen nagy változatosságot mutatott. CK-nal az összes tumor negatívnak, vimentinnel pedig, változó intenzitással, de mind pozitívnak bizonyult. A 16 daganatból 3 izom eredetű volt (leiomyosarcoma), melyek a vimentin mellett mind SMA-val, egyikük mindemellett desminnel is pozitívnak bizonyult. Mindhárom tumor negatív volt c-kit (CD-117) és CD-34 markerekkel, és csak egyikük (12-es eset) mutatott fokális neurogén marker (NSE, SN) pozitívítást a neurogén tumorok általában diffúz pozitívításával ellentétben. A 13 sGIST-ből 12 volt moderaltan-erősen c-kit pozitív, mely a Cajal sejtes eredetet igazolja. Csak a 3-as eset volt CD-117 negatív, de emellett PGP 9.5-tel, S-100-al, NSE-vel, valamint synaptophysinnel változó mértékű pozitívítást, emellett desmin és SMA negatívítást észleltünk. Ez az immunoprofil a daganat neurogén jellegét (sGIST) igazolja. CD-34-el 6/13 esetben (46%) észleltünk fokális (2/6) vagy diffúz (4/6) pozitívítást. Mind a 12 sGIST esetben legalább 1, maximum 4 neurogen marker pozitívítást észleltünk. Így 13/13 NSE (100%), 9/13 PGP 9.5 (69%), 6/13 S-100 (46%), 4/13 synaptophysin (31%), 2/13 chromogranin (15%) és 0/13 NF (0%) pozitívítást láttunk. Az SMA reakció vizsgálata kapcsán 8/13 esetben (62%) észleltünk diffúz (6/8) vagy fokális reakciót (2/8), ugyanakkor egyik minta sem mutatott desmin pozitívítást.

Proliferatív aktivitás

A proliferatív aktivitást a mitózisok száma és a Ki-67 index alapján határoztuk meg. Mindkét paraméter nagy számbeli eltérést mutatott. Az előbbi 0/20 HPF és 114/20 HPF értékek (átlag: 16/20 HPF, középérték: 57/20HPF), az utóbbi 0% és 45% értékek között változott (átlag: 14%, középérték: 23%). A gyomor eredetű (1-es, 5-ös, 15-ös és 16-os esetek) illetve a vékonybél eredetű daganatok (2-es, 3-as, 4-es, 7-es, 9-es, 10-es, 11-es, 12-es, 13-as illetve 14-es esetek) mitózis index átlagértékei jelentősen eltértek egymástól. A gyomor tumor csoport mitózis index átlaga 6 mitózis/20HPF, a vékonybél csoporté 19 mitózis/20HPF volt ($p=0.423$). A Ki-67 index átlagok azonban a két csoportban praktikusán hasonló értéket mutattak. A gyomor csoport esetében 16%, a vékonybél csoport esetében 15% átlag Ki-67 index adódott ($p=0.925$). (A 11-es esetben

feltehetőleg prezerválási okok miatt az immunreakció nem működött, így ezt az esetet a Ki-67 proliferációs vizsgálatnál nem vettük figyelembe.) A metasztatikus és/vagy lokálisan terjedő tumorcsoport (3-as, 5-ös, 6-os, 7-es, 10-es és 14-es esetek) mitózis index átlaga 32/20HPF-nek, míg a nem áttétképző, és lokálisan nem terjedő csoport (1-es, 2-es, 4-es, 8-as, 9-es, 11-es, 12-es, 13-as, 15-ös és 16-os esetek) hasonló értéke 6/20HPF-nek bizonyult ($p=0.067$). A két betegcsoport Ki-67 index átlaga az előbbi csoport esetén 23%-nak, míg az utóbbi csoport esetén 9 %-nak adódott ($p=0.093$). A fentiekén kívül a myogen (leiomyosarcoma, 10-es, 11-es, és 12-es esetek) illetve a neurogen differenciálódású (sGIST, 1-es, 2-es, 3-as, 4-es, 5-ös, 6-os, 7-es, 8-as 9-es, 13-as, 14-es, 15-ös és 16-os esetek) tumorok hasonló paramétereit is összevetettük. Így a leiomyosarcomák átlag mitosis indexe 19 mitózis/20 HPF, míg a sGIST-ok megfelelő értéke 15 mitózis/20HPF volt ($p=0.837$). A két tumorcsoport Ki-67 index átlaga 26% és 13% (a leiomyosarcomák és sGIST-ok esetén, $p=0.027$). A proliferatív paramétereket összevetettük a soliter (2-es, 3-as, 4-es, 7-es, 8-as, 9-es, 10-es, 11-es, 12-es, 14-es, 15-ös és 16-os esetek) és a multinodularis (1-es, 5-ös, és 6-os esetek) csoportok esetén is. Ezek 16 mitózis/20HPF-nek és 14 mitózis/20HPF-nek adódtak az előbbi, illetve az utóbbi csoportban ($p=0.899$). Ugyanezen két csoport esetén a Ki-67 index 12% illetve 23% volt ($p=0.293$).

Áramlási citometria

A vizsgálat két, az eddigi tanulmányok alapján prognosztikus értékűnek tartott paraméterre irányult: a ploiditásra illetve az S-fázis frakció mértékére. A vizsgált 13 daganatból minden esetben unimodális eloszlást kaptunk. Aneuploid esetünk nem volt. Az átlagos S-fázis frakció a gyomor eredetű tumoroknál (1-es, 5-ös és 15-ös esetek) 6%, míg a vékonybél eredetűeknél (2-es, 3-as, 4-es, 7-es, 9-es, 10-es, 12-es és 14-es esetek) 8% volt ($p=0.716$). A soliter és a multinodularis tumorokban azonos, 7% átlag S-fázis frakciót találtunk. Ugyanakkor a metasztatikus és/vagy lokális terjedést mutató és az áttétet valamint lokális terjedést nem mutató tumorok összehasonlításakor az előbbieknél átlag S-fázis frakciója 8%-nak az utóbbiaké 6%-nak adódott ($p=0.63$).

Túlélési adatok, klinikai követés

A vizsgált 16 esetből kettő (9-es és 16-os eset) autopsziás melléklet volt, egy beteg pedig három nappal az operáció után a postoperatív

szövődményekben halt meg. A többi 13 eset követési ideje 1-113 hónap volt, az átlagos követési idő 31 hónapnak bizonyult. 5 eset egy éven belül került diagnosztizálásra.

Megbeszélés

Makroszkópia

A stromális tumorok leggyakoribb előfordulási helye a gyomor és vékonybél, de ritkábban a daganat előfordulhat az oesophagusban, a colorectumban, illetve retroperitoneumban is. A daganatok lokalizációs megoszlásával kapcsolatban érdekes különbséget tapasztaltunk. Az ismert tanulmányok 43-59%, néhány 60-70% közé teszi a gyomor GIST-ok előfordulását. A gyomor GIST-ek aránya a vékonybél lokalizációhoz viszonyítva általában 2:1. Tanulmányunkban vizsgált eseteinknél a gyomor lokalizáció lényegesen ritkább volt (4/16, 25%), mint a vékonybél, amely 63%-nak adódott (10/16). Habár jelen tanulmány esetszáma néhány publikált külföldiétől elmarad, egy komparábilis esetszámú nyugati tanulmányban is a 2:1 arány érvényesül a gyomor tumorok javára. A fordított arány oka nem ismert, de lényeges kérdés, hisz a vékonybél eredetű GIST-ok proliferatív paraméterei, biológiai viselkedése lényegesen rosszabb a gyomor tumorokénál. Talán a daganat ritka előfordulása az ok, de hasonló tanulmány magyar populáción még nem készült, így adatainkat összehasonlítani nem tudjuk.

A 19%-nyi (3/16) multinodularitás ennek a makroszkópos megjelenési típusnak a relatív gyakoriságát húzza alá. Ez főleg a gyomor tumorokra (2/4) volt jellemző (minden vékonybél eredetű tumor soliter volt). Mindhárom multinoduláris tumor a Cajal sejtes csoportból került ki.

A multinoduláris daganatok átlagos mérete lényegesen nagyobb volt, mint a solitereké (100mm és 67mm, $p=0.303$). A multinodularitás gyakorisága általában nem ismert. A malignitás egyértelmű kritériumait mutató (lokális terjedés és/vagy áttétképzés) esetek átlagos nagysága lényegesen nagyobb (89 mm) volt a lokális terjedést nem mutató és áttétet nem képező esetekénél (64 mm), bár a különbség nem szignifikáns ($p=0.345$). Ez a tulajdonság megmagyarázható a rapidabb növekedéssel. Szignifikáns volt viszont a myogén (leiomyosarcoma) illetve neurogén eredetű tumorok átlagos tumor nagysága közötti jelentős eltérés az előbbieik javára (130 mm és 59 mm, $p=0.019$). Ez szintén a leiomyosarcomák

rapidabb növekedésével magyarázható, amelyet a proliferatív paraméterek is alátámasztanak.

Mikroszkópia

A gastrointestinalis stromális tumorok relatíve ritka daganatok változó differenciálódással és morfológiával. Eseteink döntő többségében a daganat orsósejtes, kisebb részben epithelioid sejtes vagy kevert fenotípust mutatott. A gradelés kapcsán benignus tumort nem találtunk, amely az összes tumorban, néha csak minimális mértékben, de megtalálható pleomorfiával magyarázható. A gyomor eredetű tumorok átlag grade-je jóval alacsonyabb (1.3) volt, mint a vékonybél tumorok hasonló paramétere (2.0), bár az eltérés statisztikailag nem szignifikáns ($p=0.116$). Ez egyezik a vékonybél esetek irodalomban is leírt agresszívabb viselkedésével. Az áttétet képező és/vagy lokálisan terjedő daganatok hasonló paramétere (2.0), bár nem szignifikánsan, de rosszabb volt a nem metasztatizáló és lokálisan nem terjedőkéhez képest (1.4) ($p=0.156$). A leiomyosarcomák átlag grade-je (2.7) sokkal magasabb volt, mint a másik GIST csoporté (1.4) ($p=0.007$), amely a leiomyosarcomák rosszabb prognózisát vetíti előre. Az eltérés itt szignifikáns. A multinoduláris/soliter csoportnál az eltérés (1.4/1.6) elhanyagolható. A használt gradelési rendszerrel tehát egyértelmű az izom eredetű tumorok szignifikánsan rosszabb értéke. A malignitás jeleit mutató tumorcsoport jóval magasabb átlag grade-je csak visszaigazolja a nagy proliferatív aktivitás és a malignus biológiai viselkedés közötti szoros kapcsolatot.

A GIST-ok meglehetősen változatos immunprofilot mutatnak. Neurogén markerekkel, mint pl. SN, S-100, PGP 9.5 és NSE a daganat változó mértékben pozitív. A két utóbbi antigén esetén a publikációk döntő többsége gyakori pozitivitást ír le. Eseteinkben is jellemző volt az NSE (100%) és a PGP 9.5 (69%) pozitivitás. Az S-100 (46%) és SN (31%) kevésbé, a chromogranin (15%) alig, a NF egyáltalán nem adott reakciót a daganatsejteken. Minden eset élénk vimentin reakciót mutatott, mely mellett CK-nal mind konzekvensen negatív volt. Ezek az irodalmi adatokkal szintén megegyeznek. A daganat egyik legjellegzetesebb markere a CD-34. A közlemények szerint az esetek 45-83%-a expresszálja a markert. Saját sorozatunkban 46% volt a pozitív esetek száma. Habár eseteinkben desmin és CD-34 koexpressziót nem láttunk, az irodalmi adatok szerint myogén tumorok is mutathatnak CD-34 reakciót, amely

megkérdőjelezi az antitest diszkriminatív értékét. Az utóbbi két-három év legfontosabb eredménye a Cajal-sejtes daganattípus jellegzetességeinek és ezzel összefüggésben c-kit pozitivitásának leírása. 13 esetünkben 12-ben észleltünk diffúz c-kit reakciót, amely 92%-os pozitivitást jelent. A 3-as esetben SMA és desmin negativitás mellett a tumorsejtek c-kit-el is negatívnak bizonyultak, azonban PGP 9.5-tel, S-100-al, NSE-vel és SN-el egyaránt változó erősségű, de jól látható pozitivitást kaptunk. Ez a daganat neurogén (Cajal-sejtes) jellege mellett szól. Vannak differenciálatlan, c-kit negatív, csak vimentin expressziót mutató stromális tumorok, amelyek eredete nem tisztázott. Jelen esetünkben azonban egy korábbi, itt nem részletezett elektronmikroszkópos vizsgálat, neurosecretoros granulomok jelenlétét igazolta, amely a daganat neurogén eredetét megerősítette. A c-kit specificitása a GIST-ok esetén igen jó, a CD-34 mellett a c-kit expresszió a legalkalmasabb a myogén és a Cajal-sejtes jelleg elkülönítésére. Ezt igazolja az a tény is, hogy a hátról két myogén daganat is negatív volt desminnel, illetve mindhárom CD-34 és c-kit negatív. Az SMA igen érdekes megoszlást mutatott. Mindhárom izom eredetű daganat erős pozitivitása mellett a Cajal-sejtes eredetűekből 8 mutatott fokális, vagy diffúz pozitivitást, amely ezen daganattípus kevert fenotípusát, részleges izom irányú differenciálódását igazolja. Ez az irodalmi adatokból is ismert jelenség mindenképpen aláhúzza az immunfenotípus óvatos értékelését, illetve a daganat eredetének körültekintő megítélését.

Proliferatív aktivitás

A daganatok proliferációjának vizsgálatokor érdekes, részben meglepő eredményeket kaptunk. Mind a mitózis, mind pedig a Ki-67 index igen széles határok között változott. Ez jelentősen variábilis proliferatív aktivitású illetve biológiai viselkedésű tumortípusra utal, ahol a proliferatív paraméterek pontos megadásának, illetve a gradelésnek igen nagy szerepe van a progresszió predikciójában. Az irodalmi adatokból ismert, hogy a vékonybél eredetű daganatok rosszabb prognózisúak, mint a gyomor eredetűek. A proliferációs adatok közül a vékonybél tumorok nagyobb mitózis index átlaga (19/20HPF kontra 6/20HPF, $p=0.423$) egy általában aktívabban proliferáló, gyorsabban növekvő daganat csoportra, így vélhetően rosszabb prognózisra utal. A Ki-67 index esetében praktikusán eltérést nem tapasztaltunk, pedig a mitotikus aktivitás ilyen mértékű

eltérése kapcsán ez várható lett volna. Miután az antigénfeltáró és immunfestő rendszer standard, ha az eltérésnek technikai okai vannak, akkor az a fixálásban, annak időzítésében, illetve a minták eltérő méretéből fakadó eltérő formalin penetrációban keresendők. A mitózis és ezen belül a metafázis a Ki-67 expressziós spektrumához (G1 vége-S-G2-M) viszonyítva időben lényegesen rövidebb szakasz. Elképzelhető, hogy mindkét esetben hasonló mennyiségű sejt van ciklusban (Ki-67+ sejtek aránya), de a vékonybél tumorok daganatsejtjei gyorsabban forognak a ciklusban, így gyakrabban észlelhetünk mitózisokat is. A metasztatikus és/vagy lokálisan terjedő csoport proliferációs paraméterei (32/20 HPF, 23%) lényegesen magasabbak, mint a metasztázist nem képező és lokálisan nem terjedő daganatok hasonló paraméterei (6/20 HPF, 9%). Ez nem váratlan eredmény, és aláhúzza a makroszkópos megfigyelés illetve leírás fontosságát, prediktív értékét. Érdekes, hogy a myogén eredetű GIST-ok (leiomyosarcomák) proliferációs aktivitása (19/20HPF, 26%) -ha nem is akkora különbséggel, mint az előbbi esetben- de nagyobb volt a neurogén daganatok hasonló értékeinél (15/20HPF, 13%). Ez a leiomyosarcomák progresszívebb növekedését emeli ki. A myogén daganatok rosszabb prognózisáról meggyőző adatokat nem találtunk az irodalomban. A soliter és multinoduláris tumorok összehasonlításával 16 és 14 mitózis/20HPF adódott, amely nem jelentős különbség a soliter csoport javára, ugyanakkor a Ki-67 index (12% és 23%) majdnem kétszeres különbség a multiplex csoport javára. A mitózis és Ki-67 index diszkordáns változásának magyarázata nagy valószínűséggel az előbb már említett okokra (fixálás, esetleg eltérő sejtkinetika) vezethető vissza.

Áramlási citometria

Paraffinos blokkokból történő magizolálás és áramlási citometriás vizsgálat kapcsán számos technikai nehézség adódhat. Ezt bizonyítja az a három eset (11-es, 13-as és 16-os esetek), ahol ismételtelen sem lehetett analízisre alkalmas görbét kapnunk. A paraffinos izolátumok alapjelensége a viszonylag nagy mennyiségű sejttermelés, amely a görbe szélességét, és ezáltal egy esetleges közel diploid aneuploid „peak” elvesztésének esélyét növeli. A jelenség kiemelt fontosságúvá válik akkor, ha figyelembe vesszük azt, hogy az aneuploid tumorok között sok a hypodiploid. Ez összefüggést mutat az ismert kromoszómális deléciókkal (del. 1p, del. 14q22), amelyek

gyakori események ebben a daganatban. Mindezen jelenségeket figyelembe véve nem volt aneuploid esetünk. Az aneuploid tumorok az irodalmi adatok szerint rossz prognózisúak. Ezt sok tanulmány bizonyítja. A ploiditás mellett fontos paraméter az S-fázis frakció mértéke. A gyomor csoport esetén az átlag S-fázis frakció 6%, a vékonybél csoporté 8%. A különbség nem jelentős, de egybevégt a mitózis indexnél tapasztaltakkal. A multinoduláris/soliter tumorok átlag S-fázis frakciója között nem volt különbség (7% mindkettő), így ennek a tulajdonságnak valószínűleg nincs hatása az S-fázis frakció alakulására. A metasztázis és/vagy lokális terjedést mutató illetve az áttétet nem képező és lokálisan nem terjedő tumorok közötti átlag S-fázis frakció eltérés (8% illetve 6%, $p=0.63$) az előbbi csoport javára nem váratlan adat, és habár az eltérés nem jelentős, a trend egyezik a mitózis index és Ki-67 index kapcsán észleltekkkel.

Túlélési adatok, klinikai követés

A két autopsziás melléklet (9-es és 16-os eset), illetve a posztoperatív harmadik napon meghalt beteg (12-es eset) a követhető betegek számát redukálja. Az egy éven belül diagnosztizált betegek nagy száma (5 eset: 4-es, 8-as, 10-es, 13-as és 15-ös esetek) az átlagos követési időt szignifikánsan redukálta (31 hónap). Ily módon a minta statisztikailag egyenlőre nem alkalmas megbízható túlélési adatok nyeresére. Mindazonáltal mindkét, daganat miatt elhunyt betegünk a „high grade” (GII-GIII-as) csoportba, magas mitotikus és Ki-67 indexet mutató tumorok közé, illetve a metasztatikus és/vagy lokálisan terjedő csoportba volt sorolható.

Következtetések

1. A lokálisan terjedő és/vagy metasztatizáló GIST-ok átlagos nagysága a lokálisan nem terjedő és nem metasztatizáló variánsokéhoz képest lényegesen, de nem szignifikáns mértékben nagyobb.
2. A lokálisan terjedő és/vagy metasztatizáló GIST-ok átlagos hisztológiai grade-je, átlagos mitózis indexe, és átlagos Ki-67 indexe a lokálisan nem terjedő és nem metasztatizáló variánsok hasonló paraméteréhez képest nem szignifikánsan, de lényegesen nagyobb ($p=0.156$, $p=0.067$ és $p=0.093$). Ezek alapján feltételezhető, hogy a patológiai diagnosztika során észlelt magas proliferatív aktivitású és gradusú tumorok nagyobb eséllyel mutatnak lokális terjedést és/vagy metasztázis készséget.

3. A lokálisan terjedő és/vagy metasztatizáló GIST-ok átlagos S-fázis frakciója a lokálisan nem terjedő és nem metasztatizáló variánsokéhoz képest nem szignifikáns mértékben, de nagyobb.
4. A GIST-ok két nagy csoportja közül a myogén (LMS) csoportban az átlagos nagyság és az átlag hisztológiai grade szignifikánsan nagyobb a Cajal sejtes csoport hasonló paraméterénél ($p=0.019$ és $p=0.007$).
5. A gyomor és vékonybél eredetű GIST-ek átlagos nagysága nem tér el szignifikáns mértékben egymástól.
6. A vékonybél eredetű GIST-ok átlag grade-je, átlag mitózis indexe, és átlag S-fázis frakciója jelentősen, de nem szignifikánsan nagyobb a gyomor eredetű daganatok hasonló paraméterénél.
7. A vékonybél lokalizáció jelen tanulmányban lényegesen gyakoribb, mint a gyomor lokalizáció, amely lényegesen eltér az eddigi tanulmányokban leírt gyomor dominanciától. Figyelembe véve a vékonybél tumorok nem szignifikánsan, de kimutathatóan magasabb sejtkinetikai paramétereit a következményes gyakoribb rapid tumorprogresszió rövidebb átlagos túlélést eredményezhet a hazai GIST betegcsoportban.
8. A multinoduláris és soliter GIST-ek mérete, habár jelentősebb eltérést mutat az előbbi csoport javára, nem szignifikáns.
9. A vizsgált daganatok 19%-a multinoduláris volt. Az összes a Cajal-sejtes hisztológiai csoportból, kétharmaduk a gyomor tumorok közül került ki, így ez utóbbi csoportnak az 50%-a volt multinodularis. Összehasonlító statisztika nem áll rendelkezésre, de a viszonylag gyakori multinodularitás, illetve a multinoduláris tumorok átlagosan nagyobb mérete kiterjedtebb, illetve radikálisabb sebészi beavatkozást feltételez.
10. A simaizom eredetű és a Cajal-sejtes eredetű daganatok differenciáldiagnosztikájában több immunhisztokémiai marker együttes alkalmazásának van diagnosztikus értéke. A *c-kit*/CD-117 marker ebben döntő fontosságú.
11. A Cajal-sejtes tumor immunoprofilja: *c-kit* +, vimentin +, CD-34 +/-, SMA +/-, desmin -, gyakori, de változó neurogén expresszió: NSE +/-, PGP 9,5 +/-, SN +/-, S-100 +/-, NF -, chromogranin A +/-
12. A LMS immunoprofilja: vimentin +, SMA +, desmin +/-, *c-kit* -, változó erősségű, ritkábban előforduló neurogén expresszió.
13. Az SMA pozitivitás nem jelent automatikusan myogén eredetet (leiomyosarcoma).

14. A CD-34 a Cajal-sejtes tumorokra jellegzetes marker, de csak az esetek egy részében expresszálódik. Tapasztalataink szerint myogén tumorokban nem észlelhető CD-34 reakció.

15. A három májmetasztázist adó esetből kettő GI-es, egy pedig GII-es tumor volt, tehát a hematogén metasztázis adásának készsége és a hisztológiai grade nem mutat szoros összefüggést. Kulcsfontosságú tehát a low-grade (GI-es) tumoros betegek követése, ellenőrzése is.

Alveoláris lágyrész sarcoma

Az alveolaris lágyrész sarcoma (ASPS) egy ritka, ismeretlen eredetű, malignus lágyrész daganat, amely főleg gyermekekben illetve fiatal felnőttekben fordul elő. Számos kísérletet történt a daganat sejteredetének tisztázására, azonban az eredmények ellentmondásosak. Az elvégzett ultrastrukturális analízisek egy a daganattípusra jellegzetes, specifikusan elrendezett, aktin filamentekből álló krisztalloid struktúrát fedtek fel, mely vizsgálatokat a sokszor PAS-D készítményekben fénymikroszkóppal látható krisztalloid indokolta. Az aktin filamentek jelenléte felvetette a sarcoma izom eredetének lehetőségét. Mindemellett néhány szerző neurogénnek tartotta a daganatot annak a paragangliomákhoz, vagy éppen a granularsejtes tumorokhoz hasonló fenotípusa miatt. Később a daganat immunohisztokémiai analízise szintén ellentmondásos eredményekhez vezetett. A publikációk döntő többsége az izom eredetet támogatja, azonban néhány másik rámutat az izom markerek ritka expressziójára, vagy annak teljes hiányára a daganatban. Egyes szerzők még a desmin pozitivitást sem tekintették az izom eredet/differenciálódás biztos jelének.

A daganatban bekövetkező kromoszómális változásokkal kapcsolatban keveset tudunk. A közlemények egy része jellegzetesnek tűnő kromoszómális defektusokat igazolt, azonban ezidáig a tumor kialakulásában definitive szerepet játszó gén vagy gének nem találtak. Néhány szerző arra a következtetésre jutott, hogy a 17-es kromoszóma vesztese, vagy ugyanezen kromoszóma hosszú karjának változásai kulcsszerepet játszhatnak a daganat kialakulásában. Emellett komplex kromoszómális abnormalitásokat is leírtak, amely jelentősen bonyolíthatja a kérdést, és megnöveli azon gének illetve kromoszómális régiók számát, amelyek részt vehetnek a daganat keletkezésében. A közlemények többségében a

szerzők a kariotipizálás során a konvencionális “G-banding-et” használták, de a vizsgált metafázisok száma általában kevés volt. Kérdéses az, hogy vajon néhány metafázis sejt reprezentálhat-e egy alacsony proliferációs frakciójú tumorpopulációt, ahol a dagan sejtek döntő többsége interfázisban van.

Célkitűzések

Az alveolaris lágyrész sarcomával foglalkozó fejezetben céloom az összegyűjtött négy eset széles körű patológiai vizsgálata volt. Ez magában foglalta az alapfestésekkel történő mikroszkópos jellemzést és az immunfenotípus meghatározását is, melyet a daganat eredetének jobb megértése indokolt. A munka fő célja azonban a patogenezisben szerepet játszó esetleges kromoszómális eltérések feltárása, illetve újak definiálása voltak. Ezért az esetekből nyert interfázis magokon kromoszómális FISH-t végeztünk.

Anyag és módszerek

Fénymikroszkópia, immunohisztokémia

A fixált és kimetszett szövetblokkok processzálása az előbbiekhöz hasonló módon, automatizálva történt. A standard hematoxinil-eozin (HE) mellett PAS és a PAS-D (D: 30 perc diasztáz előemésztés) festéseket végeztünk. Az immunprofil meghatározására összesen 11-féle monoklonális és poliklonális antitestet (vimentin, desmin, myoglobin, SRCA, SMA, MyoD1, NSE, S100, KL1, PGP9.5, Ki67) használtunk. A MyoD1 kivételével, standard citrát pufferes mikrohullámú előkezelést (700W, 3x5 perc) alkalmaztunk. A MyoD1 esetén hasonló citrát oldatban kuktában történt az antigén feltárása. Mindenütt az ajánlott hígításokat illetve inkubációs időket használtuk. Az előhívó rendszer és szubsztrát a Vectastain Universal ABC kit, illetve 3-amino-9-ethylcarbazole voltak. A Ki-67 indexet az előzőekhez hasonlóan 1000 sejt leszámolásával, a festés intenzitásától függetlenül, a pozitív sejtmagok százalékos arányában adtuk meg.

Próbakészítés és interfázis citogenetika

Az interfázis cytogenetikai analízist (IPC) a daganatok formol-paraffinos blokkjaiból izolált magokon végeztük el. A magszuspenziót a már korábban ismertetett módon készítettük, majd mikrohullámú sütőben kezeltük (700W, 5 perc). Az aliquotokból citocentrifugával citopreparátumokat készítettünk.

Tizenkét (peri)centromerikus (1, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 15, 17, 18 és X) valamint egy telomerikus (a 17q25-qtel. régióra specifikus, digoxigenin-jelölt) ISH próbát használtunk a vizsgálatokhoz. A nem megfelelő szignálintenzitást (9, 11, 16, 20, Y), vagy a kereszreakciókat (5/19, 13/21, 14/22) adó próbákat kizártuk az értékelésből. A DNS próbák biotin- (3, 4, 6, 8, 12, 17, 18 kromoszómák) illetve digoxigenin-konjugációját (1, 7, 10, 15, X kromoszómák) nick transzlációval végeztük. A hasonló jelintenzitást adó próbákat párokba rendeztük, és együtt alkalmaztuk (double target, two colour FISH). A FISH kivitelezésekor 10 ng próba/60% formamid/2xSSC tartalmú, 5 µl hibridizációs oldatot cseppentettünk a sejt preparátumokhoz, majd plasztikkal fedtünk. A mintákat és a próbákat szimultán denaturáltuk 90 C°-on, 10 percig, melyet éjszakán át tartó hibridizáció követett (37°C, nedves kamra). A poszthibridizációs mosás 60% formamid/2xSSC-t tartalmazó (3x5 perc, 37°C), majd 2xSSC (3x5 perc, szobahő) oldattal történt pH 7-en. A biotin-jelölt próbák előhívása avidin-FITC, a digoxigenin jelölt próbáké anti-digoxigenin-rhodamine rendszerrel történt. A preparátumok fedésére 0.02 µg/ml DAPI-t tartalmazó Vectashield mounting mediumot használtunk.

A hibridizációs szignálok értékelése

Lemezenként minimum 100 intakt, egymást át nem fedő sejtmagot vizsgáltunk és értékeltünk. A hibridizációs jelek normál eloszlásának megállapítására négy egészséges felnőtt perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek szolgáltak kontrollként. A fixálás hatásának vizsgálatára egy reaktív nyirokcsomó formol-paraffinos blokkjából izolált lymphoid sejtek szolgáltak, melyek hasonló szignál eloszlást mutattak. A kontroll esetek hibridizációs jeleit a tumor minták vizsgálatakor kapott jelekhez hasonlítottuk. A daganatokban észlelt mono-, tri-, és tetraszómiás értékeket csak akkor fogadtuk el, ha nagyobbak voltak, mint az átlag kontroll + 3xSD. A kromoszómák számbeli változásait a vizsgált magok százalékában adtuk meg, és biológiailag relevánsnak csak akkor tartottuk, ha elérték, vagy meghaladták a 10%-os szintet.

Eredmények

Betegek, klinikai adatok és a makroszkópos leírás

Négy alveoláris légycsész sarcomás beteg anyagát vizsgáltuk a tanulmányban. A négy beteg közül kettő férfi, (25 és 30 év) és két

nőbeteg (14 és 63 év) volt. A tumorok a jobb alkar voláris felszínén, a nyelvbőn, a bal lábszáron, illetve a bal combon helyezkedtek el. Mind a négy daganat szolid, relative jól körülhatárolt, szürkésfehér, halhús-szerű megjelenést mutatott. A tumorok legnagyobb átmérője 55mm, 33mm, 70mm, és 110 mm voltak az 1-es, 2-es, 3-as, illetve 4-es esetekben. Minden esetben a választott terápia a sebészi beavatkozás volt, mely a daganatok ép szövetben történő teljes eltávolítását jelentette. Preoperatív kemoterápia egy betegnél sem történt.

Fénymikroszkópos leletek

A mikroszkópos vizsgálat kapcsán mind a négy eset jellegzetes szolid-alveoláris mintázatot mutatott. A daganatsejteknek centrálisan/excentrikusan elhelyezkedő magjuk volt, melyekben csak egy, prominens nukleolusz volt megfigyelhető. Citoplazmájuk kerek, vagy poligonális volt élénk eozinofiliával. Az alveoláris tereket finom szinuszoid-szerű erek fogták körül. A PAS-D festéssel típusos, diasztáz rezisztens, citoplazmatikus krisztalloid struktúrák és/vagy finom, porszerű granulomok mutatkoztak. Az immunohisztokémiai profil változatos volt. Két esetben (2-es és 3-as esetek) erős, diffúz vimentin és fokális, közepes-erős desmin reakciót észleltünk. Szintén két eset (1-es és 2-es) mutatott moderált myoglobin pozitivitást, de csak egyben észleltünk SMA reakciót. Mind a négy tumor SRCA pozitív volt, mely jellegzetes intracitoplazmális granuláris mintázatot adott. A MyoD1 szintén granuláris, nem-specifikus, citoplazmális reakciót adott mind a négy esetben. A neurogén markerek esetében a reakció változó intenzitású volt. Mind a négy eset moderált, diffúz, részben granuláris NSE, és fokális, néhol granuláris PGP 9.5 reakciót mutatott, míg csak egy eset volt S-100 pozitív. Mind a négy daganat KL-1 negatív volt, és csak két esetben figyeltünk meg korlátozott proliferatív aktivitást a Ki-67 reakcióval a 2-es és 4-es jelű tumorok perifériáján.

Interfázis citogenetika (FISH)

Mind a négy eset szignifikáns numerikus kromoszómális eltéréseket mutatott. Az aneuszómia mono-, tri-, vagy tetraszómia formájában mutatkozott, ami a preparátumokban egy, három, vagy négy szignálként jelentkezett. Mind a négy esetben 1-es kromoszóma triszómiát észleltünk, melyek közül kettőben a triszómiás sejtpopuláció meghaladta a 10%-ot (13% and 19% az 1-es és 2-es esetekben). Az első esetben, a 4-eshez hasonlóan, az 1-es

kromoszóma tetraszómiája elérte a 6%-ot, amely a triszómiás populációval együtt 19%-nak adódott, mely egy jelentős hiperszómiának felel meg. A 2-es és 3-as esetek 13% illetve 9% triszómiát mutattak a 3-as kromoszómára nézve. A 3-as esetben 8% tetraszómiát is megfigyeltünk, amely összességében 17% hiperszómiás sejtpopulációt jelent. Mindemellett a 2-es és 3-as esetek 27% mono- és 12% triszómiát is mutattak a 4-es kromoszómára specifikus centromerikus próbával. Három esetben (1-es, 2-es, és 3-as esetek), 11%, 11%, and 12% 6-os kromoszóma monoszómia is megfigyelhető volt. Mind a négy esetben jellegzetes kromoszómális többletet észleltünk a 7-es kromoszóma vizsgálatokor. Triszómiát találtunk a sejtek 10, 13, 54 és 30%-ában az 1-es, 2-es, 3-as, és 4-es esetekben. A 3-as esetben, az 54% triszómia mellett 9% tetraszómiát is megfigyeltünk, amely a hiperszómiás populáció arányát 63%-ra emeli. Mindemellett 13% 7-es monoszómia is megfigyelhető volt a 4-es esetben. Vesztes és nyereség egyaránt megfigyelhető volt a 8-as kromoszóma vizsgálatokor: monoszómiát az 1-es (18%), 2-es (12%), 3-as (22%), és 4-es (23%) esetekben egyaránt észleltünk, míg kromoszóma többletet, nevezetesen triszómiát csak két esetben, a 2-es (8%) és 3-as (7%) észleltünk. A 22% monoszómia mellett, 7% triszómiát és 7% tetraszómiát is megfigyeltünk a 3-as esetben, mely az aneuszómiás populációt 36 %-ra emelte. A 10-es kromoszóma vizsgálatokor megfigyelt eltérések a következők voltak: 13% monoszómia a 2-es, illetve 8% tetraszómia a 3-as esetben. Az 1-es és 3-as esetekben a daganatsejtek 12% illetve 9%-a mutatott monoszómiát a 12-es kromoszóma vizsgálatokor. A másik két eset diszómiásnak bizonyult. A 15-ös és 17-es centromerikus próbák használata kapcsán a kontroll sejtekhez hasonlóan nem találtunk változást a daganatos populációban. Az előbbi két kromoszómával ellentétben 18-as monoszómiát észleltünk az összes vizsgált tumorban (18%, 11%, 19% és 18% az 1-es, 2-es, 3-as, és 4-es esetekben). Az egyik férfi páciens daganatában 8% diszómiát figyeltünk meg az X kromoszóma vizsgálatokor, amely az egyetlen szex-diszkordáns leletnek bizonyult. A telomerikus 17q (17q25-qtel.) próbával történt hibridizáció kapcsán az 1-es esetben a daganatsejtek 15%-ában volt megfigyelhető az egyik szignál elvesztése, vagyis telomér-vesztés. A másik három daganatban (2-es, 3-as és 4-es esetek) 2 szignál/sejtmag volt megfigyelhető.

Megbeszélés

Christopherson és munkatársai 1952-ben egy új, jellegzetes, entitást, egy igen ritka lágyrész sarcoma típust írtak le. Az alveoláris lágyrész sarcoma (ASPS), eredete azóta is tisztázatlan. Az ASPS az összes malignus lágyrész daganat kevesebb, mint 1%-át alkotja. Főleg a végtagok, a törzs és a fej-nyak régió lágyrészeiben fordul elő. Jellegzetesen lassan növő tumor, amely a tüdőkből, az agyban, illetve a vesékben képezhet áttéteket, néha a primer tumor megjelenése után évekkel. Ritkábban előfordulhat az uterusban, a mediastinumban illetve, primer tumorként a csontokban is.

Sokan próbáltak bizonyítékot keresni a tumor myogén eredetére. A morfológiai hasonlatosság, illetve az immunoprofil miatt néhány más lehetőség (paraganlioma, granular sejtes tumor, neurogén daganat, illetve angioreninoma), is felmerült. Az eredettel kapcsolatos meggyőző bizonyíték azonban még nincs, ezért ezt a daganatot még ma is az ismeretlen eredetű lágyrész sarcomákhoz soroljuk. Habár immunohisztokémiai leletünk biztonsággal nem tudja igazolni az eredettel kapcsolatos egyik elméletet sem, rámutat a daganat myogén differenciálódásának a lehetőségére, hiszen vizsgált eseteink 75%-a desmin és/vagy myoglobulin pozitív. Néhány izomspecifikus marker expressziója (SRCA, MyoD1) érdekesnek bizonyult. Mindkettő finom granuláris mintázatot mutatott, amely hasonló volt ahhoz, amit néhány neurogén marker (NSE, PGP 9.5) esetén egyes területekben észleltünk. Ez nagy valószínűséggel nem-specifikus immunreakciót jelent. A MyoD1 (korai, intranukleáris myogén regulátor protein) immunreakciója kapcsán, az adatok ellentmondásosak. Rosai és mtsi. leírtak egy esetet, amelyben a MyoD1 a daganatsejtek magjában erősen expresszáldott, azonban ezidáig ezt a jelenséget más szerzők nem tudták reprodukálni. Az ellentmondásos eredmények az alkalmazott eltérő fixálási és/vagy antigen feltárási módszerekkel magyarázhatók. Formol-paraffinos anyagon citrát pufferes kuktás előkezelés után egyik eset sem mutatott intranukleáris pozitivitást ezzel a markerrel. A SRCA, az irodalmi és saját adatok szerint, megbízható markere a harántcsíkolt izom irányú differenciálódásnak. Eseteink mindegyike granuláris, intracitoplazmatikus, a MyoD1-hez és néhány neurogén markerhez hasonló expressziót mutatott. A hasonló mintázatú antigen expresszió mindenképpen felveti a nem-specifikus reakció lehetőségét, melyet igazolni, vagy elvetni csak

újabb vizsgálatokkal (pl.: Western blot analízis) lehetne. A neurogén markerek fokális pozitivitása (NSE, PGP 9.5, S-100) nem bizonyíthatja a neurogén eredetet, hiszen hasonló pozitív reakció más myogén eredetű daganatokban, sőt a normál harántcsikolt, illetve simaizom esetén is várható.

Vizsgálatainkkal kapott adatokat az irodalomban találtakkal összehasonlítva hasonlóságokat és eltéréseket egyaránt találhatunk. Ezidáig 13 ASPS esetet vizsgáltak meg CGH módszerével. Az eredmény ismétlődő genomiális eltérések feltárása, melyek a 1q, 8q, 12q illetve 16p többlet. Hasonló módon a kromoszómális anyag nyérése gyakori volt a mi eseteinkben is, amely ismétlődő triszómiák, néhol tetraszómiák formájában jelentkezett. A CGH-el vizsgáltak mellett 8 újabb, konvencionális kariotipizálással megvizsgált eset is olvasható az irodalomban. Ezek közül egyben FISH-t is végeztek X „painting”, illetve 17-es centromerikus és telomerikus próbákkal. A 8 esetből 6-ban a disztális 17q25 régiót érintő eltéréseket találtak, melyek addíció, duplikáció, illetve Xp11 transzlokáció voltak. Ez azt jelenti, hogy ez a régió olyan gént vagy géneket rejthet, amelyek a daganat patogenezise szempontjából fontosak lehetnek. A régiót érintő finom kromoszómális elváltozások a beszerezhető kommersz próbákkal végzett FISH-val nem minden esetben fedhetők fel, de a kromoszóma vesztés, vagy a disztális szegmens (17q25-qtel.) elvesztése minden bizonnyal kimutatható ezzel a módszerrel. Ez magyarázhatja jelen tanulmány azon eredményét, hogy a 17q25-qtel. vesztést csak egy esetben (1-es eset), találtunk. Ílymódon a kapott eredmények alapján nem zárhatjuk ki az esetleges kisebb eltéréseket ebben a régióban a másik három esetben sem. Éppen ezért eredményeink nem zárják ki azt a lehetőséget sem, hogy az adott szegmensben lévő gének játszanak szerepet az ASPS kifejlődésében/progressziójában, de rámutatnak arra, hogy nagy delécióknak vagy a kromoszóma vesztésének az esélye kicsiny.

Ezen túlmenően egyes szerzők 12-es, 5-ös és 8-as triszómiát (ez utóbbit, mint egyedüli klonális kariotípus abnormalitást) is leírtak három különböző esetben. Csak az utóbbi, a 8-as triszómia volt megfigyelhető egyik esetünkben (2-es eset) az interfázis magok 8%-ában. Ez a változás nem tekinthető specifikusnak, hiszen 8-as triszómia megtalálható más lágyrész tumorokban is (clear cell sarcoma, myxoid liposarcoma, Ewing sarcoma, congenitális fibrosarcoma).

Az interfázis FISH vizsgálataink során talált sokféle kromoszómális változás közül a legjelentősebbnek a 7-es triszómia (4/4 eset), a 8-as monoszómia, és a 18-as monoszómia (4/4 eset) bizonyult. A 6-os monoszómia és 1-es triszómia kevésbé gyakori, de ismétlődő elváltozások voltak. Habár ezek a numerikus eltérések relatíve nagy sejtpopulációt érintettek, és jellemzőnek tekinthetők az ASPS-ra, jelentőségük, illetve a karcinogenezisben betöltött szerepük nem ismert. A talált abnormalitások azt sugallják, hogy fontos gén vagy gének lehetnek az 1-es, 6-os, 7-es, 8-as illetve 18-as kromoszómán, amelyek szerepet játszanak a daganat patogenezisében és/vagy klonális evolúciójában. Ezidáig 7-es, illetve 1-es triszómiát, valamint 6-os, 8-as és 18-as monoszómiát nem találtak ASPS-ban. Jelenleg nincs ismert kapcsolat az egyes numerikus vagy strukturális kromoszómális változások és a betegség klinikai progressziója, vagy a daganat metasztázis képző hajlama között, mivel a molekuláris patológiai módszerekkel vizsgált és publikált esetek száma kevés, illetve nincs releváns adat a vizsgált esetek klinikai követéséről. A tanulmányban feltárt eltérések jellegzetesnek tűnnek az ASPS-ra, de nem specifikusak, hiszen más, eltérő hiszogenezisű tumorok, habár jóval kisebb számban, de mutathatnak, hasonló numerikus kromoszómális elváltozást (7-es és 1-es hiperszómia malignus melanomákban, 7-es és 1-es triszómia gyomor, oesophagus, colon, és prostata adenocarcinómában, illetve a papilláris veserákban). Mindezt a talált kromoszómális eltérések valószínűleg inkább a daganat progressziójában vagy klonális fejlődésében játszanak szerepet. A 18-as kromoszóma monoszómiáját szintén leírták már colorectális daganatokban, de 6-os monoszómia, mint szignifikáns numerikus aberráció daganatban még nem fordult elő. Tekintettel arra, hogy a vizsgált nukleáris populáció kevert (a daganatsejtekhez stromális és endoteliális sejtelemekek is hozzákeverednek), az eredmények bizonyosan alulreprezentálják a genetikai aberrációk valós frekvenciáját. Az irodalomban közölt ASPS esetekben az alkalmazott vizsgálmódszer főleg metafázis magokon végzett konvencionális kariotipizálás volt. Azok a sejtmagok, amelyeket a FISH során alkalmaztunk interfázis magok voltak, melyek a metafázis populációnál jobban reprezentálhatják egy olyan tumor egészét, amelynek proliferatív aktivitása alacsony. Egy daganat interfázis citogenetikai vizsgálata tehát kiegészíti a konvencionális kariotipizálás során nyert adatokat, és újakat tehet

hozzá a meglévőkhez ezzel is bővítve az adott tumor patogenezisére vonatkozó ismereteinket.

Következtetések

- 1.** A négy esetből háromban észleltük legalább egy myogén marker expresszióját, ami az egyébként ismeretlen hisztogenezisű tumor myogén eredetét támogatja.
- 2.** Az intranukleáris myoD1 marker az eseteinkben (az irodalmi adatokhoz hasonlóan) a sejtmagokban negatív volt, mely jelenség nem támogatja a daganat izom eredetét.
- 3.** Habár az SRCA megbízható myogén markernek számít, eseteinkben kapott citoplazmális reakció mintázata a myoD1 és a neurogén markerekével teljes mértékben megegyező, granuláris, aspecifikus jellegűnek bizonyult. Ennek pontos magyarázata nem ismert.
- 4.** Az 1-es és 7-es triszómia, illetve a 6-os, 8-as és 18-as monoszómia jellemzőnek tűnik a daganatra, hiszen a sejtek nagy százalékában, és a vizsgált esetek legalább $\frac{3}{4}$ -ében megtalálhatók voltak. Ezidáig a fentebb leírt kromoszómális eltéréseket nem találtak ebben a daganatban.
- 5.** Eseteink közül egyben tudtuk a 17-es kromoszóma hosszú karjának delécióját igazolni. Ez kevesebb, mint ahogy azt az irodalmi adatok alapján vártuk. Ennek magyarázata az, hogy az alkalmazott próbával finom kromoszómális elváltozások nem minden esetben vizualizálhatók, azonban a kromoszóma vesztés, vagy a hosszú kar disztális szegmensének (17q25-qtel.) elvesztése minden bizonnyal kimutatható. Ez azt jelenti, hogy a nagy kromoszómális szegmensek érintő deléciónak vagy a kromoszóma vesztésének az esélye kicsiny.
- 6.** A kapott kromoszómális eltérések frekvenciája felveti annak a lehetőségét, hogy az adott szegmensekben lévő gének játszanak szerepet az ASPS kifejlődésében, vagy progressziójában.

Saját közlemények, előadások és absztraktok jegyzéke

Publikációk jegyzéke

1. T. Tornóczky, G. Csanaky, J. Fischer: Lectin histochemical characterization of the mouse, rat and human lymphoid tissues. *Acta Morphologica Hungarica*, 38(2), 85-93, 1990.
2. T. Tornóczky, K. Szuhai: Multiple tumor case: Report and analysis of an autopsy case. *Tumori*, 83: 719-721, 1997
3. T. Tornóczky, G. Kelenyi, L. Pajor: EBER oligonucleotide RNA in situ hybridization in EBV associated neoplasms. *Pathology Oncology Research* 4(3) 201-205, 1998
4. Fathi Khaled dr., Pintér András dr., Tornóczky Támás dr.: Pyeloureteralis obstructiót okozó fibroepithelialis polyp gyermekkorban. *Orvosi Hetilap* 139(50), 3019-3021, 1998
5. T. Tornóczky, E. Kálmán, G. Hegedűs, Ö.P. Horváth, Z. Sági, L. Antal, P. Jáksó, L. Pajor: High mitotic index associated with poor prognosis in gastrointestinal autonomic nerve tumour. *Histopathology* 35,121-128, 1999
6. E. Kövér, T. Tornóczky, I. Zoltán, É. Vereb, Z. Balikó: Endobronchial pulmonary infiltration in T-ALL (Case report of a T-ALL patient with unusual lung involvement). *Journal of Bronchology*, 6, 297-298, 1999.
7. Tornóczky T, Vass JA, Kajtár P, Kardos M, Varga T, Pajor L.: Kompetitív polimeráz láncreakció: új lehetőség az N-myc amplifikáció mértékének meghatározására. *Orvosi Hetilap* 141, 27-30, 2000
8. Olasz L, Németh Á, Nyárádi Z, Tornóczky T, Királyfalvi L. Randomized study of cisplatin-based combination chemotherapy for the treatment of planocellular cancer of the head and neck region. *Orvosi Hetilap* 141(45):2433-2437, 2000
9. T. Tornóczky M.D., E. Kálmán M.D., P. G. Kajtár M.D. Ph.D., S. Davidovics M.D., P. Jáksó, G. Méhes M.D., L. Pajor M.D. Ph.D., I. Battyány M.D., M. Sohail M.Phil. MRCPATH, T. Krausz M.D. FRCPath.: Solid and papillary epithelial neoplasm arising in heterotopic pancreatic tissue of the mesocolon. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 241-246, 2001.

10. T. Tornóczy, E. Kálmán, Z. Sági, Z. Orosz, L. Pajor.: Cytogenetic abnormalities of alveolar soft-part sarcomas using interphase FISH: trisomy for chromosome 7, monosomy for chromosome 8 and 18 seem to be characteristic of the tumour. *Virchows Archiv* 438(2), 173-180, 2001.
11. H. Ábrahám, T. Tornóczy, G. Kosztolányi, L. Seress: Cell formation in the cortical layers of the developing human cerebellum. *International Journal of Developmental Neuroscience* 19(1),53-62, 2001.
12. L. Seress, H. Ábrahám, T. Tornóczy, G. Kosztolányi.: Cell formation in the human hippocampal formation from midgestation to the late postnatal period. *Neuroscience* (in press), 2001.

Absztraktok jegyzéke:

1. T. Tornóczy, K. Szuhai: Multiple tumor case: Report and analysis of an autopsy case. *Cancer Detection and Prevention* 22(Suppl.1) s-118, 1998
2. L. Olasz, B. Tóth, A. Németh, T. Tornóczy: Results and failures of preoperative BVMM chemotherapy and irradiation in advanced oral cancers. *Cancer Detection and Prevention* 22(Suppl.1) s-249, 1998
3. T. Tornóczy, G. Szalai, E. Kálmán, G. Horváth: Decisive role of EBER-RNA-ISH in neck lymph node metastases of nasopharyngeal carcinoma. *Acta Cytologica* 43(4) 713, 1999.
4. L. Olasz, Z. Nyárády, A. Németh, T. Tornóczy: A randomized study of cisplatin-combined chemotherapy protocol. *Cancer Detection and Prevention* 24(Suppl.1) s-248, 2000

Kongressusi előadások és poszterek jegyzéke

1. Tornóczy Tamás, Csanaky György, Fischer János: Nyirokszöveti sejtek jellemzése lectinkötésük alapján. Membrán Konferencia, 1988, Sümeg
2. Tornóczy Tamás: A congenitalis diaphragma hernia patológiája. Klinikopathológiai Konferencia POTE, Gyermekklinika, 1992, Pécs
3. Tornóczy Tamás, Méhes Gábor, Pajor László: Barrett oesophagus térképbiopsias vizsgálata immunhistochemiai és flow cytometriás módszerekkel, MPT Kongresszusa, Székesfehérvár, 1994.
4. Tornóczy Tamás: Candida albicans okozta septicus endocarditis csecsemőben. Klinikopathológiai Konferencia, POTE Tudományos Szakosztálya, Pécs, 1996.

5. Tornóczy Tamás: A fej-nyak régió daganatainak molekuláris pathológiája. Harmadik Tudományos Hétvége, Pécs, 1997.
6. Tornóczy Tamás: A víruskimutatás lehetőségei a gynecológiai pathológiában. Klinikopathológiai Konferencia, POTE Tudományos Szakosztálya, Pécs, 1997
7. Tornóczy Tamás: Nasopharyngealis carcinoma és anaplasias nagysejtes lymphoma. EBER-RNA-ISH EBV-kapcsolt daganatokon. Haematopathológiai Tutorial, Pécs 1997.
8. Tornóczy Tamás: EBV kimutatás oligonucleotid EBER-mRNA-ISH módszerével. Novocastra-Vector Symposium, Budapest, 1997.
9. Olasz L., Tóth B., Németh Á., Kubatov M., Tornóczy T.: Kiterjedt faciális carcinoma komplex ellátása. A MOT Dunántúli Szekciója V. Tudományos Vándorgyűlése, Pécs, 1998
10. Dr. Györke Zsuzsa, Dr. Kollmann Erzsébet, Dr. Tornóczy Tamás, Dr. Kustos Gyula, Dr. Sulyok Endre.: Hormontermelő mellékvesekéreg adenoma. ENDOPED 98. A Magyar Gyermekegyorász Szekció Tudományos Ülése. Dobogókő, 1998
11. Tornóczy Tamás dr., Kálmán Endre dr., Pajor László Dr., Kelényi Gábor Dr.: EBER oligonucleotid in situ hybridizatio EBV-asszociált daganatokban (EBER versus LMP-1). A MPT és az IAP Magyar Divíziójának Kongresszusa, Gyula, 1998
12. T. Tornóczy, K. Szuhai: Multiple tumor case: Report and analysis of an autopsy case. 4th International Symposium on Preventive Oncology and Therapy, Nice, France, 1998
13. L. Olasz, B. Tóth, A. Németh, T. Tornóczy: Results and failures of preoperative BVMM chemotherapy and irradiation in advanced oral cancers. 4th International Symposium on Preventive Oncology and Therapy, Nice, France, 1998
14. Tihanyi M., Battyány I., Tornóczy T.: Lágyrész tumorok diagnosztikai és terápiás problémái. A Magyar Sebész Társaság Dél-Dunántúli Sectiójának Tudományos Ülése. Bonyhád, 1998
15. H. Ábrahám, T. Tamás, G. Kosztolányi, L. Seress: Cell formation in the cortical layers of the human cerebellum. 3rd Conference of the Hungarian Society of Neuropathology, 2nd Joint Meeting of Hungarian-German Neuropathologists. Budapest, 1999
16. Tihanyi M., Tornóczy T., Battyány I.: Duodenalis leiomyosarcoma esete situs inversus totalisban észlelt betegnél. A MST Dél-Dunántúli Sectiója Tudományos Ülése. Mohács, 1999

17. Tornóczy Tamás , Vass János A., Kajtár Pál, Lendvai Gábor, Pajor László: N-myc amplificatio vizsgálata neuroblastomákban és neuroblastoma sejtvonalakon kompetitív N-myc PCR segítségével. Magyar Humán-genetikai Társaság II. Kongresszusa: Pécs, 1999
18. L. Seress, H. Ábrahám, T. Tamás, G. Kosztolányi: Cell proliferaton in human cerebellum and in the hippocampal formation of the normal and aneuploid children. Magyar Humán-genetikai Társaság II. Kongresszusa: Pécs, 1999
19. Tornóczy Tamás: Cellularis typusú foetalis rhabdomyoma. Dunántúli Pathologus Találkozó. Pápa, 1999.
20. T. Tornóczy, G. Szalai, E. Kálmán, G. Horváth: Decisive role of EBER-RNA-ISH in neck lymph node metastases of nasopharyngeal carcinoma. 26th European Congress of Cytology, Budapest, 1999.
21. H. Ábrahám, T. Tamás, G. Kosztolányi, L. Seress: Peri- and postnatal cell formation in the human brain. Society for Neuroscience. Miami Beach, Florida, 1999
22. Tornóczy Tamás: Alveolaris lágyrész-sarcoma. Congenitalis mesoblastos nephroma. Országos Metszetkonzultáció. Budapest, SOTE II. Pathologiai Intézet, 2000 jún. 2.
23. Tornóczy Tamás : A neuroblastos tumorok klasszifikációja és molekuláris patológiája. MPT DPS Tudományos Ülése, Tatabánya, Szent Borbála Kórház, Pathologiai Osztály, 2000 nov. 2.
24. Tornóczy Tamás: A gyermekkori kis kereksejtes tumorok differenciáldiagnosztikája. A Magyar Gyermekonkológiai Munkacsoport Tudományos Ülése. Budapest, 2000 dec. 8.
25. Tornóczy Tamás: A neuroblastoma patológiája. A MGYT Gyermekonkológiai Sectioja XXX. Tudományos Ülése. Visegrád, 2001 jún. 1.