

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

PhD értekezés

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

Tartalomjegyzék

A légysz tumorok

I. Neuroblastos tumorok

- II/1 Bevezetés
- II/2 Célkitűzések
- II/3 Hisztológiai típusok
- II/4 Anyag és módszerek
- II/5 Eredmények
- II/6 Megbeszélés
- II/7 Következtetések
- II/8 Irodalom

II. Gastrointestinalis stromális tumorok

- III/1 Bevezetés
- III/2 Nevezéktan
- III/3 Molekuláris patológia
- III/4 Hisztogenezis, immunohisztokémia
- III/5 Grading és dignitás
- III/6 Prognosztikus faktorok
- III/7 Célkitűzések
- III/8 Anyag és módszerek
- III/9 Eredmények
- III/10 Megbeszélés
- III/11 Következtetések
- III/12 Irodalom

III. Alveoláris légysz sarcoma

- IV/1 Bevezetés
- IV/2 Célkitűzések
- IV/3 Anyag és módszerek
- IV/4 Eredmények
- IV/5 Megbeszélés
- IV/6 Következtetések
- IV/8 Irodalom

IV. Rövidítések

V. Saját közlemények, előadások és absztraktok jegyzéke

VI. Köszönetnyilvánítások

A lágyrész tumorok

A lágyrész daganatok a hisztopatológia egyik legheterogénebb tumorcsoportját képviselik. Több mint 170, morfológiailag és/vagy genetikailag különféle entitás sorolható a csoportba. Leggyakrabban gyermek- és fiatal felnőttkorban fordulnak elő, de több daganatféleség kifejezetten az idős korra jellemző. A benignus/malignus tumorok becült aránya 100:1, ami annyit jelent, hogy a daganatok nagy része jóindulatú, egyszerű sebészi rezekcióval gyógyítható, további terápiát nem igényel. A malignus vátozatok, a lágyrész sarcomák azonban sokkal nagyobb onkológiai kihívást jelentenek. Ugyan előfordulásuk az összes malignus daganat kevesebb, mint 1%-ára tehető, azonban az a „relatíván kevés eset”, amellyel találkozunk igen nagy diagnosztikus-terápiás dilemmát okozhat mind a daganatsebésznek, mind az onkológusnak, mind az onkoradiológusnak, mind pedig a diagnózist felállító hisztopatológusnak. A nehézségek csak egy része magyarázható azonban a „keves-eset-keves-tapasztalat” okkal. Sokszor a daganatok változó biológiai viselkedése okozza a legnagyobb gondot, melynek prognosztikája, és így a beavatkozás radikalitásának eldöntése, meglehetősen nehéz. Számos lágyrész sarcoma patogenezisééről, keletkezésükben szerepet játszó kromoszómális transzlokációkról, tumor szuppresszor gén deléciókról már ismertek adatok, de sokkal nagyobb azon típusok száma, melyekről jóval kevesebbet tudunk.

Az alábbiakban három különféle, valamilyen szempontból különleges daganat, illetve daganatcsoport részletes jellemzését végeztem el. Céлом részint egy ismert prognosztikus értékkel rendelkező, molekuláris marker új módszerrel történő mérése, részint egy újonnan körvonalazódó, meglehetősen heterogén daganatcsoport teljes körű patológiai jellemzése, részben pedig egy ismeretlen eredetű daganat patogenezisében szerepet játszó immunfenotípusos és molekuláris genetikai jellegzetességek vizsgálata volt.

Szélsőséges biológiai viselkedéséről nevezetes daganat például a csecsemő és gyermekkor egyik leggyakoribb malignus, solid tumora a neuroblastoma, illetve a neuroblastos tumorok családja. A várható viselkedés csak részben jósolható meg a hagyományos klinikopatológiai prognosztikus faktorokkal. A daganattípus növekedését nagy valószínűséggel inkább a daganatsejtekben rejlő molekuláris patológiai változások szabják meg. A téma részletesebb kifejtését kíséreltem meg jelen bevezető után a dolgozat egyik nagyobb fejezetében (**az I.-ben**), amely a neuroblastos tumorok hisztopatológiájával, illetve részletes molekuláris patológiájával foglalkozik a fluoreszcens *in situ* hibridizáció és a polimeráz láncreakció módszerének felhasználásával.

Habár a lágyrész daganatok definíciójának szó szerinti értelmezése kapcsán a gastrointestinalis stromalis tumorok nem tartoznak ebbe a csoportba, hiszen a gastrointestinalis mesenchymalis elemeiből indulnak ki, citológiai, hisztológiai, immunmorfológiai illetve biológiai viselkedésbeli tulajdonságaik számos közös vonást mutatnak a lágyrészekből kiinduló rokonaikkal. Mindemellett viselkedésük igen változó lehet, annak predikciója hasonlóan nehéz. A téma aktualitását csak növeli egyik nagy csoportjuk Cajal-sejtes eredetének 1998-as felfedezése. Ezzel a daganatcsoporttal egy másik fejezet (**a II. fejezet**) foglalkozik.

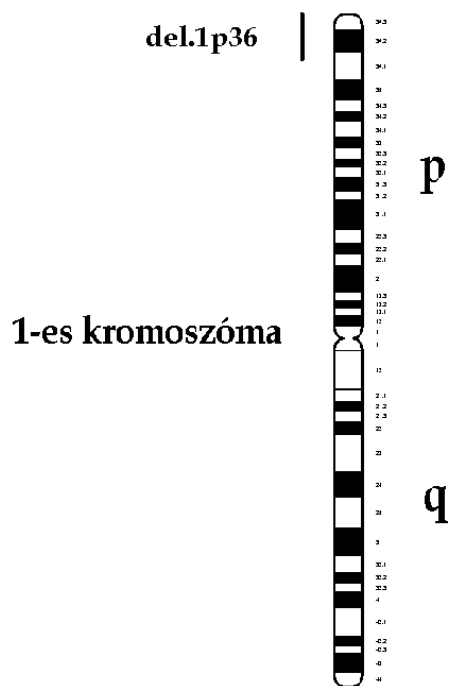
A ritka malignus lágyrész tumorok egyik legrejtélyesebb variánsa az alveoláris lágyrész sarcoma. Felfedezése óta állandó, és eddig megválaszolatlan kérdés a daganat eredete. Újabban, pont a daganat osztályozhatatlansága miatt, a modernebb molekuláris patológiai módszerek is bevetésre kerültek a tumor eredetének kiderítése reményében. A részletes morfológiai és immunmorfológiai jellemzés mellett egy újabb fejezetben (**III. fejezet**) a daganat fluoreszcens *in situ* hibridizációs vizsgálatát is elvégeztük centromerikus és telomerikus kromoszómális próbák felhasználásával.

I. Neuroblastos tumorok

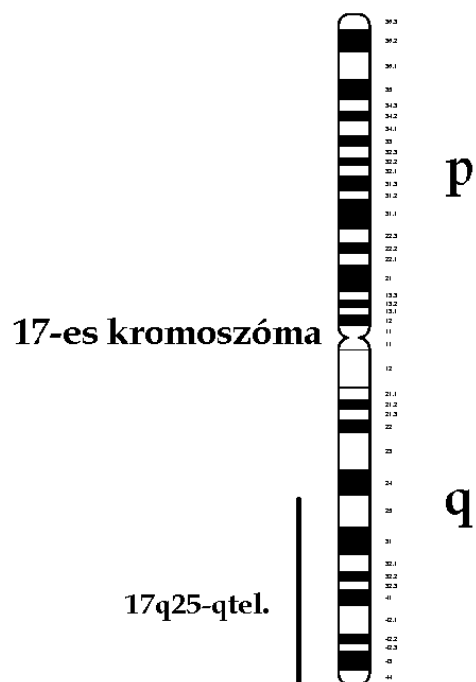
I/1 Bevezetés

A neuroblastos tumorok a primitív neuroektodermális neoplasmák családjába tartozó, egyik leggyakoribb gyermekkori daganatcsoport. Típusos kiindulási helyeik a szimpatikus ganglionok illetve a mellékvese velőállománya, ezért a leggyakrabban a hasüregben, mellüregben, a nyakon illetve a retroperitoneumban láthatjuk (22). 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 kiero-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) (6, 9), illetve kromoszómális elváltozásokhoz (deléció, génamplifikáció) köthetők. Tapasztalati tény, hogy az 1 év alatt előforduló, a nem mellékvese eredetű, illetve a korai stádiumú tumorok jobb prognózisúak (6). Az eltérő viselkedés eredendő okai a daganat molekuláris patológiai tulajdonságaiban keresendők. Ismert, hogy a diploid tumorok, az 1p deléciót, 17q abnormalitást (17q „gain”, ez kromoszómális anyag többlet pl. transzlokáció által) (1.-2. ábra), illetve az *N-myc* amplifikációt mutató neuroblastomák agresszívebb biológiai viselkedést mutatnak, intenzívebb kezelést igényelnek, míg a közel triploid, *N-myc* amplifikációt és 1p deléciót nem mutató esetek, illetve a *trk-A* receptort (tirozin kináz receptor A) expresszáló tumorok esetén kedvezőbb a prognózis (1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 13, 15, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28). Az *N-myc* és *c-myc* onkogén rokonsága, illetve az előbbi amplifikációjának az előrehaladott betegségekhez történő társulása régen leírt jelenségek (10, 11, 12).

1. ábra Az 1-es kromoszóma rövid karjának megjelölt területe az 1p deléció helye.



2. ábra A 17-es kromoszóma hosszú karján megjelölt területen fordul elő az egyik leggyakoribb genetikai aberráció, a 17q többlet („gain”).



A fentebb említett kromoszómális elváltozások közül a kórlefolyásra nézve a legerősebb kórjósító értékkel, illetve terápiás jelentőséggel az *N-myc* amplifikáció, annak mértéke rendelkezik (9). 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, homogénean festődő régió) de csak korlátozott számú sejtről ad információt, és az amplifikáció mértékének megadása bizonyos értékek felett nehéz (14, 16, 17). 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 (3, 14, 17). A DNS alapú, kompetitív *N-myc* polimeráz láncreakció (*N-myc* PCR) lehetőséget ad a génamplifikáció mértékének gyors meghatározására 100 nanogramnyi tumor DNS-ből.

I/2 Célkitűzések

Az első 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 deléció, *N-myc* amplifikáció, és a 17 q többlet) FISH technikával történő vizsgálata, ezáltal a betegek kezelését befolyásoló prognosztikus faktorok prezentálása a klinikai gyermekonkológus számára. Mindemellet a fő cél egy rutinszerűen használható, megbízható, reprodukálható kompetitív polimeráz láncreakció beállítása az *N-myc* gén amplifikációjának mérésére (*N-myc* PCR), amely a FISH mellett kvantitatív eredményt ad az amplifikáció mértékéről.

I/3 Hisztológiai típusok

1999 nyarán egy a neuroblastos daganatcsoportot egységes családként kezelő, új hisztológiai klasszifikáció jelent meg az INPC (International Neuroblastoma Pathology Committee) jóvoltából (29, 30). Az új osztályozás a daganatos (neuroblastos) és a stromális (Schwann sejtes) komponensek arányát és a daganatos komponens érettségét tekinti a klasszifikáció alapjának. Ezek alapján három főcsoportot, ezeken belül altípusokat különíthetünk el, melyet az **1. táblázat** mutat. A differenciálatlan neuroblastomára a kis és közepes nagyságú, kerek, jellegzetes neuroendocrin, ún. "salt and pepper" maggal, vékony, nem jól elkülönülő citoplazmával rendelkező differenciálatlan neuroblastok a jellemzőek. Neuropil nem látható, nincs vagy minimális a Schwann-sejtes stroma, nincs lobuláltság a tumoron belül, és néha ancilláris technikák kellenek a diagnózis felállításához (**1. kép**). A rosszul differenciált forma a leggyakoribb neuroblastoma típus. Jellemző rá a differenciálatlan neuroblastok és 5% alatti mennyiségben a differenciálódó neuroblastok jelenléte. A differenciálódó neuroblastok olyan, az érési folyamatba belépett daganatsejtek, melyek sejt átmérője minimum kétszerese az excentrikusan elhelyezkedő mag átmérőjének, a mag prominens nukleoluszokat mutat, és jól kivehető a neuropil háttér a sejtmagok között. A Schwann-sejtes stroma kevés, de jellegzetes lobulusokra tagolja a tumort (**2. kép**). A differenciálódó forma egyre kevesebb differenciálatlan neuroblastot tartalmaz, a differenciálódó neuroblastok 5% feletti mennyiségben vannak jelen, bőséges neuropil veszi körbe a magokat, és a Schwann-sejtes stroma is egyre több, de a tumor mennyiségéhez viszonyítva 50% alatt marad (**3. kép**). A kevert ganglioneuroblastoma átmenetet képez a neuroblastomából a ganglioneurinoma irányába, de az érési folyamat nem teljes. Ez a daganattípus mikroszkópos neuroblastomás fókuszok és ganglioneuromás területek keverékéből áll, de a ganglioneurinomás területek 50% feletti arányt képviselnek. A daganat fészkek különböző differenciáltsági fokú neuroblastok és érő ganglion sejtek keverékéből

állnak, bőséges neuropillel körülszőve (**4. kép**). A noduláris típusú ganglioneuroblastoma egy különleges, viszonylag ritka neuroblastos tumor. Jellegzetes a makroszkópos megjelenése is. Egy, vagy több vérzéses neuroblastos tumornodulusból (Schwann-sejtes, stroma-szegény komponens) és kevert típusú ganglioneuroblastomából (stroma-gazdag komponens) vagy ganglioneurinomából (stroma domináns komponens) áll. A neuroblastos komponens egy pszeudokapszulával élesen demarkálódott a többi komponenstől (**5. kép**). Az elfogadott elképzelések szerint ez a daganat vagy egy/több perzisztens, ki nem érő neuroblastos gócból, vagy új genetikai aberráció folytán képződött neuroblastos fókuszról és a körülötte érő elemekből áll (31). A két stroma-domináns tumor, a kiérő és kiérett ganglioneurinoma közül az előbbi bőséges, domináns stromaállomány mellett elszórtan, differenciálódó sejtalakokat, és érő, vagy érett ganglion sejteket egyaránt tartalmaz. Az érett ganglioneuroma, a domináns stromaállomány mellett csak kiérett ganglion sejteket tartalmaz (**6.-7. kép**).

1 táblázat. A neuroblastos tumorok típusai az INPC ajánlása szerint

A daganat INPC ajánlás szerinti típusa		Rövidítés	
Stroma-szegény tumorok	Neuroblastoma, differenciálatlan	NB-UD	
	Neuroblastoma, rosszul differenciált	NB-PD	
	Neuroblastoma, differenciálódó	NB-DF	
Stroma-gazdag tumor	Ganglioneuroblastoma, kevert	GNB-M	
Kompozit tumor: stroma-szegény és stroma-gazdag/domináns keverék	Ganglioneuroblastoma, noduláris	GNB-N	
Stroma-domináns tumorok	Ganglioneurinoma	kiérő	GN-MG
	Ganglioneurinoma	kiérett	GN-M

I/4 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 (biopszia 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) szubtípusnak bizonyult. 2 esetünk a klasszifikáció értelmében ganglioneuroblastoma volt, ezen belül 1 kevert (GNB-M) és 1 noduláris (GNB-N) szubtípusnak 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 (4). A vizsgált eseteket illetve a diagnózisokat a **2. táblázatban** tüntettük fel.

2. táblázat. A neuroblastos tumorok klinikopatológiai adatai

eset	kód	No.	hely	kor	stádium	típus	klinikum
1.	95. 12. 13	3199/00	RPT , j. o.	4 év 3 hó	IV. csv.+	<u>NB-DF</u>	él, tumormentes
1.	95. 12. 13	14616/00	RPT	5 év	IV.	<u>NB-DF</u>	él, tumormentes
2.	92. 03. 18	8980/99	MV, b. o.	7 év 4 hó	II.	<u>NB-UD</u>	él, lokál recidíva
2.	92. 03. 18	11688/00	MV, b. o.	8 év 4 hó	II.	<u>NB-UD</u>	él, lokál recidíva
3.	92. 08. 29	14523-33/95	RPT	3 év 2 hó	IV.	<u>NB-UD</u>	meghalt
4.	98. 04. 22	9728/98	MV, b. o.	4 hó	II. b	<u>NB-PD</u>	él, tumormentes
5.	96. 07. 21	8124/98	MV, j. o.	2 év	IV. csv.+ nycs.+	<u>NB-PD</u>	meghalt (csv. trans.)
6.	96. 02. 01	1288/99	MV, b. o.	3 év	III.	<u>NB-UD</u>	meghalt
7.	94. 04. 20	13979-82/94	MV, b. o.	6 hó	I.	<u>NB-PD</u>	él, tumormentes
8.	93. 04. 01	85-86/96	RPT	2 év 9 hó	IV.	<u>NB-PD</u>	meghalt (csv. trans.)
8.	93. 04. 01	5963-73/97	csv., nycs	4 év	IV. csv.+ nycs.+	<u>NB-PD</u>	meghalt (csv. trans.)
9.	95. 09. 15	7763-66/96	RPT	7 hónap	II. b.	<u>NB-PD</u>	él, tumormentes
10.	93. 06. 22	12016-18/94	NY, b. o.	1 év 3 hó	II. b.	<u>NB-PD</u>	él, tumormentes
11.	94. 11. 07	15551-55/94	MV, j. o.	1 hét	I.	<u>NB-UD</u>	él, tumormentes
12.	94. 03. 06	3207/97	RPT	3 év	IV. máj, mell- és hasüreg +	<u>NB-PD</u>	meghalt (csv. trans.)
13.	91. 01. 02	9838-42/97	PM	6 év 5 hó	-	<u>GN-M</u>	él, tumormentes
14.	80. 09. 01	6119-20/95	M	14 év 8 hó	-	<u>GN-M</u>	él, tumormentes

15.	92. 07. 16	7275/96	MV, j. o.	4 év 9 hó	-	<u>GN-MG</u>	él, tumormentes
16.	94. 08. 04	15171/97	RPT	3 év 1 hó	III.	<u>GNB-M</u>	él, tumoros, tünetmentes
16.	94. 08. 04	1162/98)	RPT	3 év 6 hó	III.	<u>GNB-M</u>	él, tumoros, tünetmentes
17.	79. 05. 22	460/ 99	PM	19 év 8 hó	-	<u>GN-M</u>	él
18.	87. 02. 20	585/99	RPT	11 év 11 hó	-	<u>GN-M</u>	él
19.	93. 11. 08	14262/00	RPT	7 év	-	<u>GN-M</u>	él
20.	90. 08. 15	144/01	RPT, H	10 év 4 hó	IV. csv.+, nycs.+	<u>GNB-N</u>	él
21.	00. 12. 10	1442/01	MV, j. o.	7 hét	I.	<u>NB-PD</u>	él
22.	97. 07. 05	1918/01	MV, j. o.	3 év 7 hó	III.	<u>NB-UD</u>	él
23.	95. 06. 19	3547/01	MV, b. o.	5 év 9 hó	IV. csv+ nycs+	<u>NB-UD</u>	él
24.	96. 07. 17.	4080/01	MV, j.o.	4 év 8 hó	IV. csv+	<u>NB-UD</u>	él

RPT: retroperitoneum, H: hasüreg, PM: kismedence, M: mediastinum, **GNB-M**: kevert ganglioneuroblastoma, **NB-UD**: differenciálatlan neuroblastoma, **NB-PD**: rosszul differenciált neuroblastoma, **GNB-N**: noduláris ganglioneuroblastoma, **NB-DF**: differenciálódó neuroblastoma, **GN-M**: érett ganglioneurinoma, **GN-MG**: érő ganglioneurinoma, MV: mellékvese, NY: nyak, nycs.: nyirokcsomó, csv: csontvelő, csv. trans.: csontvelő transzplantáció.

A DNS izolálása natív tumorszövet mintából

A DNS izolálás során a szövetmintát proteináz-K-t (Serva), SDS-t (Sigma) és mag lízis puffert tartalmazó oldattal, egy éjszakán át, 37 °C-on emésztettük, majd centrifugálás után a felülúszót 6M-os, telített NaCl (Reanal) oldattal (kisózásos módszer), illetve 2 térfogatnyi etilalkohollal (Fluka) kezeltük (8). A kicsapódott DNS-t steril desztillált vízben oldottuk. Minden esetben 3-4 db, 50 µm vastagságú fagyasztott metszetből indultunk ki. A minták DNS koncentrációját Spectronic 21D (Milton Roy) spektrofotométerrel, 260 nm-es

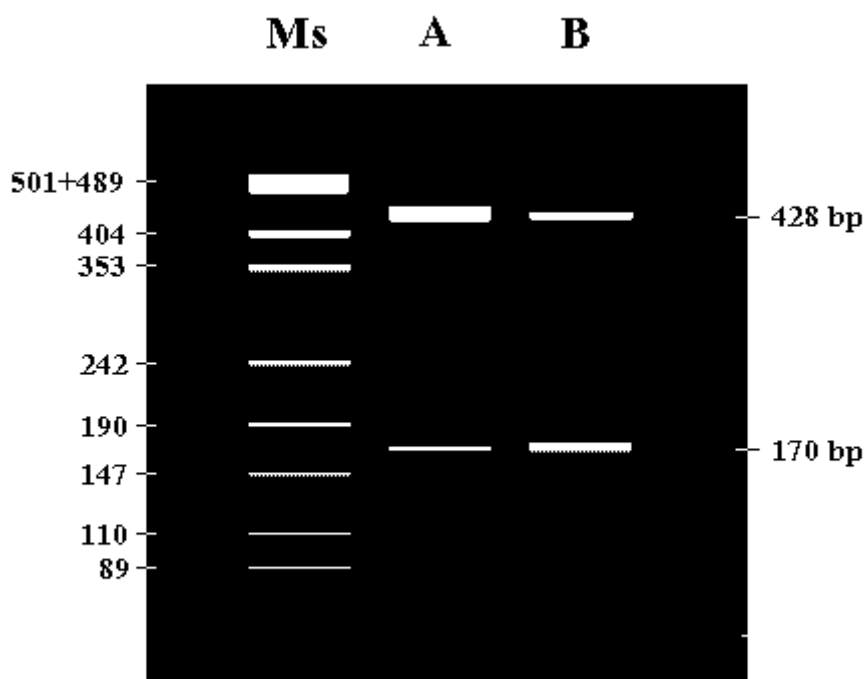
hullámhosszon mértük és egységesen 0.1 µg/µl munkaoldatot készítettünk. A mintákat fagyasztva tároltuk.

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 (**3. ábra**). 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 hoztuk létre. Az egyik minta egy reaktív nyirokcsomóból származott (2n *N-myc* kópia), míg a másik egy ismert *N-myc* amplifikációjú neuroblastoma sejtvonalból (NGP, ~130x 2n kópia, azaz 130x-os endogén amplifikáció) extrahált DNS volt. Az így 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 neuroblastomás esetek vonalerősség arányait a kapott kontroll grafikonba illesztve megadható volt az amplifikáció mértéke (**4. ábra**). A PCR elegy összetétele minden esetben a következő volt: 30 µl ösztérfogatban 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ (Boehringer), 20 mM dNTP mix (Gibco) és 1U Taq polimeráz (Gibco). Az *N-myc* primerek (MB-4, 3. exon, 5046) 5'-GATGAAGATGATGAAG AGGAA-3' és (MB-5 3. exon, 5474) 5'-TGGTCCCTGAGCGTCAGAAA-3' 60 ng és 65.7 ng mennyiségben voltak a reakcióelegyben, míg a CF primereket, (CF-1) 5'- TGCAAC

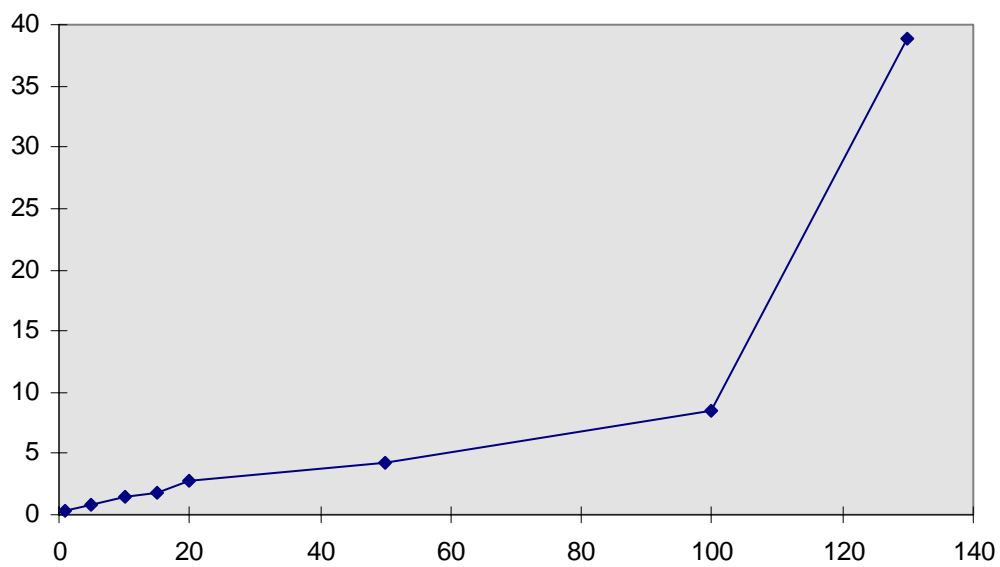
TTATTGGTCCCACT-3' és (CF-2) 5'-ATGAATGTACAAATGAGATCCT-3', mind 60 ng mennyiségben adtuk az elegyhez csövenként. Minden esetben 100 ng DNS-t mértünk a 30 µl ösztérfogathoz. A polimeráz láncreakciót Perkin-Elmer GeneAmp 2400 típusú "thermocycleren" végeztük, a következő kondíciók mellett: 5 perc 94 °C 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 30 µl-jéhez 5 µl brómfenolkéket (Reanal) mértünk, majd az elegy 10 µl-jét 0.5 µg/ml etidium bromidot (Sigma) tartalmazó 2%-os agaróz gélen futtattuk. Az UV transzilluminátor (WestTeam) és a Polaroid GelCam kamera segítségével készített gélfotót Escom V2.6E típusú "scanner"-rel digitalizáltuk, majd image analysis szoftverrel elemeztük és a kontroll sorban kapott értékeket táblázatkezelő szoftverrel ábrázoltuk.

3. ábra A kompetitív *N-myc* polimeráz láncreakció elve.



A két sávban a két PCR termék, a 428 bázispár hosszú *N-myc* illetve a 170 bázispár hosszú CF vonal, különböző erősségű aszerint, hogy mennyi *N-myc* kópia volt a kiinduláskor a tumor DNS mintánkban. Az A-sáv egy erősen *N-myc* amplifikált tumor gél elektroforézis képe (erős *N-myc* vonal, gyenge CF vonal), míg a B-sáv egy normál kópiaszámú tumor hasonló képe (közel azonos erősségű, jelentős különbséget nem mutató *N-myc* és CF vonalak). Ms.: mólsúly standard

4. ábra Az ismert *N-myc* amplifikációjú DNS oldat kontrollsor grafikonja.



Az x-tengelyen az *N-myc* amplifikációs értékek, az y-tengelyen a vonalerősség hányados látható. A vizsgált tumor DNS minta vonalerősség hányadosa alapján az *N-myc* amplifikáció értéke leolvasható (interpolált érték).

Próbakészítés. Fluoreszcens in situ hibridizáció (N-myc FISH, 1p FISH, 17q FISH)

A centromerikus próbákat a legszélesebb spektrumban a III. fejezet kísérletei során használtuk, így a próbakészítés módját (1-es és 17-es centromerikus próbák) ennek a fejezetnek az anyag és módszerek részében ismertetjük. A frissen készített lenyomati preparátumokat, vagy keneteket 70%-os alkoholban rögzítettük 10 percig, majd 70%-os ecetsavas, illetve metanolos öblítés után felszálló alkoholsoron dehidráltuk. A mintát 70% formamidot (Baker) /2xSSC/50mM foszfát puffert tartalmazó oldatban 68°C-on 3 percig denaturáltuk, majd a tárgylemezeket hideg etanol soron dehidráltuk, levegőn szárítottuk. Az *N-myc* gén hibridizációjához digoxigeninnel jelölt *N-myc* (Oncor) és biotinnal jelölt 3-as centromerikus (p α 3.5) próbák elegyét használtuk esetenként 3-3 μ l-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 μ l-es mennyiségben), míg a 17-es kromoszóma hosszú karján a kromoszómális anyag nyerését 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-es, 45 °C-os oldatban, 10 percig történt. Az előhívás anti-digoxigenin-rhodamin (Boehringer, vörös fluoreszcencia) illetve avidin-FITC (Vector, zöld fluoreszcencia) complexxel történt 37 °C-on, nedves kamrában, 30 percig. A magfestést és lefedést DAPI-Vectashield 20 ng/ml oldattal (Vector), a fluoreszcens analízist pedig Zeiss Axioskop fluoreszcens mikroszkóppal végeztük. Minden vizsgált esetünkről digitális felvételeket készítettünk. Amplifikált *N-myc* státusz esetén két normál *N-myc* allél mellett több, vörös fluoreszcenciájú jel volt megfigyelhető. Csak a biztosan 10x-es kópiaszám feletti eseteket nyilvánítottuk amplifikáltként (**8. kép**). Az 1p deléció meglétét 2/1, 4/2, 3/1 vagy 4/1 centromerikus/telomerikus jel arány esetén mondtuk ki (**9. kép**), míg a jelek közötti számbeli arányváltozást („*imbalance*”) a centromerikus jel

kevesebb, mint 2x-es többlete esetén (3/2, 4/3, 5/3) mondtunk. 17q többlet a telomerikus jelek jelentős többsége esetén (legalább 1.5x-es) került megállapításra (**10. kép**).

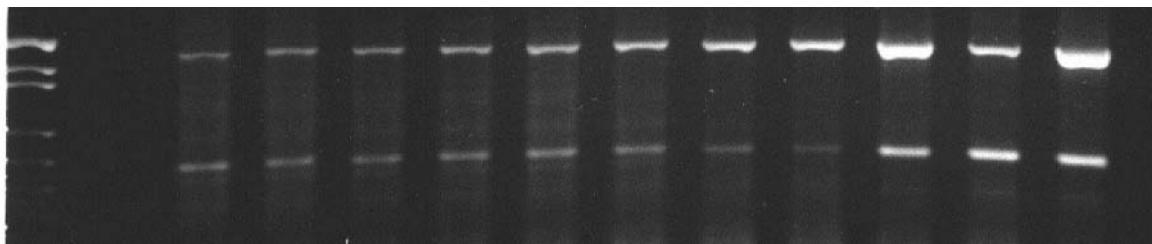
I/5 Eredmények

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, tehát a várt (2n *N-myc* kópia) eredményt kaptuk. Mind a 18 NB és GNB eset PCR vizsgálatát megelőzően klinikai staging (INSS, 1993), illetve hisztopatológiai vizsgálat is történt. Ezek eredményét a **2. táblázatban** foglaltunk össze. Az összes vizsgált minta esetében a reakció két jól értékelhető vonalat (428 bázispár, 170 bázispár) eredményezett (**3. ábra**). 9 esetben figyeltünk meg 10x amplifikáció feletti, és hasonló módon 9 esetben ez alatti *N-myc* kópiaszámot (lásd **3. táblázat**). 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 (**11. kép**). 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 (**4. táblázat**), 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.

11. kép

A gélfotó a kontrollsort és három esetet reprezentál



MS C 1x 5x 10x 15x 20x 50x 100x 130x 3 9 12

A gélfotó három vizsgált esetet (3, 9, 12-es), a kontrollsort, valamint a negatív kontrollt mutatja. A felső vonal az *N-myc*, az alsó a CF. Megfigyelhető az *N-myc* vonal erősödése az 1x-től a 130x-ig, ezzel párhuzamosan pedig a CF gyengülése az *N-myc*-hez viszonyítva. A három tesztelt esetből a 3-as 40x-es, a 9-es 1x-es, míg a 12-es 30x-os *N-myc* amplifikációt mutatott.

3. táblázat. A neuroblasztos tumorok molekuláris patológiai adatai

eset	stádium	típus	N-myc FISH	N-myc PCR	1p FISH	17q FISH
1.	IV. csv.+	<u>NB-DF</u>	NA	NA	IMB	G
2.	II.	<u>NB-UD</u>	NA	NA	ND	NG
3.	IV.	<u>NB-UD</u>	-	A (40x, 20-50x)	-	-
4.	II. b	<u>NB-PD</u>	NA	NA	ND	NG
5.	IV. csv.+ nycs.+	<u>NB-PD</u>	NA	NA	ND	NG
6.	III.	<u>NB-UD</u>	A (jelentős)	A (100x)	D	G
7.	I.	<u>NB-PD</u>	-	A (100x)	-	-
8.	IV. csv.+ nycs.+	<u>NB-PD</u>	-	NA	-	-
9.	II. b.	<u>NB-PD</u>	-	NA	-	-
10.	II. b.	<u>NB-PD</u>	-	A (17.5x, 15-20x)	-	-
11.	I.	<u>NB-UD</u>	-	A (25x, 20-50x)	-	-
12.	IV. máj, mell- és hasüreg +	<u>NB-PD</u>	-	A (30x, 20-50x)	-	-
13.	-	<u>GN-M</u>	-	-	-	-
14.	-	<u>GN-M</u>	-	-	-	-
15.	-	<u>GN-MG</u>	-	-	-	-
16.	III.	<u>GNB-M</u>	-	NA	-	-
17.	-	<u>GN-M</u>	-	-	-	-
18.	-	<u>GN-M</u>	-	-	-	-
19.	-	<u>GN-M</u>	-	-	-	-

20.	IV. csv.+, nycs.+	<u>GNB-N</u>	NA	NA	ND	NG
21.	I.	<u>NB-PD</u>	NA	NA	ND	NG
22.	III.	<u>NB-UD</u>	A (jelentős)	A (65x, 50-100x)	D	G
23.	IV. csv+ nycs+	<u>NB-UD</u>	A (jelentős)	A (114x, 100-130x)	D	NG
24.	IV. csv+	<u>NB-UD</u>	A (jelentős)	A (68x, 50-100x)	D	NG

GNB-M: kevert ganglioneuroblastoma, **NB-UD:** differenciálatlan neuroblastoma, **NB-PD:** rosszul differenciált neuroblastoma, **GNB-N:** noduláris ganglioneuroblastoma, **NB-DF:** differenciálódó neuroblastoma, **GN-M:** érett ganglioneurinoma, **GN-MG:** érő ganglioneurinoma, nycs.: nyirokcsomó, csv: csontvelő, NA: nincs *N-myc* amplifikáció, A: *N-myc* amplifikáció (csak a 10x-es kópiaszámot elérő, vagy azt meghaladó érték releváns a kezelés szempontjából), G: gain, NG: nincs gain, D: deléció, ND: nincs deléció.

4. táblázat 10 eset *N-myc* státusa a két módszerrel.

eset	FISH	PCR
1	NA (1x)	NA
2	NA (1x)	NA
4	NA (6x)	NA
5	NA (3x)	NA
6	A (jelentős)	A (100x)
20	NA (1x)	NA
21	NA (1x)	NA
22	A (jelentős)	A (65x)
23	A (jelentős)	A (114x)
24	A (jelentős)	A (68x)

A két módszerrel kapott endogén *N-myc* amplifikációs eredmények jól korrelálnak egymással. A zárójelben a kópiaszám látható.

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 amplifikáltnak 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. Az adatokat az **5. táblázat** mutatja. A két módszerrel megmért *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 deléciót, 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 differenciálódó neuroblastoma esetünk egyértelműen 17q többlet pozitív, míg a noduláris ganglioneuroblastoma negatív.

5. táblázat Molekuláris patológiai markerek FISH eredményei

eset	típus	N-myc FISH	1p FISH	17q FISH
1.	<u>NB-DF</u>	NA (1x)	IMB (55%)	G (97%)
2.	<u>NB-UD</u>	NA (1x)	ND	NG
4.	<u>NB-PD</u>	NA (6x)	ND	NG
5.	<u>NB-PD</u>	NA (3x)	ND	NG
6.	<u>NB-UD</u>	A (jelentős)	D (90%)	G (81%)
20.	<u>GNB-N</u>	NA (1x)	ND	NG
21.	<u>NB-PD</u>	NA (1x)	ND	NG
22.	<u>NB-UD</u>	A (jelentős)	D (100%)	G (100%)
23.	<u>NB-PD</u>	A (jelentős)	D (100%)	NG
24.	<u>NB-UD</u>	A (jelentős)	D (88%)	NG

NA: nincs *N-myc* amplifikáció, A: *N-myc* amplifikáció (zárójelben a detektált kópiaszám, csak a 10x-es kópiaszámot elérő, vagy azt meghaladó érték releváns a kezelés szempontjából), G: gain, NG: nincs gain, D: deléción, ND: nincs deléción, %: a meghatározott genetikai elváltozást mutató magok száma százalékban.

I/6 Megbeszélés

Az *N-myc* amplifikáció meghatározása mára már a diagnosztikus protokollok részévé vált. A hagyományos prognosztikus faktorok (kor, stádium, hisztológiai típus) mellett a kórlefolysást, és ezzel a kezelést befolyásoló markerré vált. 10 kópia feletti amplifikáció agresszív lefolyású, előrehaladottabb stádiumú daganatra utal, de lokalizált betegségben és 1-1.5 évesnél fiatalabb betegben intenzívebb terápiát tesz szükségessé (9).

A széles körben elterjedt módszerek közül a legújabb a komparatív 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. A bemutatott 10 esetben az összehasonlító vizsgálat (**4. táblázat**) 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 placentális DNS-sel végzett kontrollvizsgálatok igazolták a módszer alkalmazhatóságát.

A PCR-rel kapott eredmények a magasabb klinikai stádiumot (III. és IV. stádium) mutató esetekben (6/11, 55% 10x amplifikáció feletti érték) megfelelnek az irodalomban közölt adatoknak (kb. 50% amplifikált eset), míg a korai stádiumú (I-II stádiumú) daganatoknál kapott eredmények (3/7, 43% amplifikált eset) a közölt adatokhoz (10-15% 10x amplifikáció feletti érték) képest magasabb értékeket mutattak (9, 10, 13). Ennek oka valószínűleg a kis I-II.-es stádiumú esetszámmal magyarázható. 10 esetben volt lehetőségünk az *N-myc* státusz meghatározására két független módszerrel (FISH, PCR). A bemutatott két módszer együttes alkalmazása számos 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 (szövetről) 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 vékonytű, és a „core” biopsziák 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 morfológiai 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 kórlefordulást 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.

I/7 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 szolgáltató *N-myc* FISH-nek.
3. A két *N-myc* státuszt meghatározó módszerrel (FISH és PCR) kapott eredmények egymással jól korreláltak.
4. Figyelemre méltó az *N-myc* gén amplifikált státusza és az 1p deléció, 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.

I/8 **Irodalom**

1. Ambros, I. M., Zellner, A., Roald, B. és mtsai: Role of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* 1996, 334: 1505-1511
2. Ambros, P. F., Ambros, I. M., Strehl, S. és mtsai: Regression and progression in neuroblastoma. Does genetics predict tumour behaviour? *Eur. J. Cancer.* 1995, 31A: 510-515
3. Boerner, S., Squire, J., Thorner, P. és mtsai.: Assessment of MYCN in neuroblastoma by differential polymerase chain reaction. *Ped. Path.* 1994, 14: 823-832
4. Brodeur, G. M., Pritchard, J., Berthold, F. és mtsai.: Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J. Clin. Oncol.* 1993, 11: 1466-1477
5. Caron, H., van Sluis, P., de Kraker, J. és mtsai.: Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* 1996, 334: 225-230
6. Coldman, A. J., Fryer, C. J., Elwood, J. M. és mtsai: Neuroblastoma: Influence of age at diagnosis, stage, tumor site, and sex on prognosis. *Cancer* 1980, 46: 1896-1901
7. Lastowska, M., Cotteril, S., Pearson, A. D. J. és mtsai: Gain of chromosome arm 17q predicts unfavourable outcome in neuroblastoma patients. *Eur. J. Cancer* 1997, 33: 1627-1633
8. Miller, S. A., Dykes, D. D., Poleski, H. F. és mtsai: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.* 1988, 16: 1215
9. Ninane J, Pearson, A. D. J.: Neuroblastoma. In *Pediatric Oncology*, 2nd edition, 1997, 443-483

10. Pelicci, P. G., Lafrancone, L., Brathwaite, M. D. és mtsi.: Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlated with advanced disease stage. *Science*, 1984, 224: 1121-1124
11. Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K. H. és mtsai: Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 1983, 305: 245-248
12. Schwab, M., Varmus, H. E., Bishop J. M. és mtsai.: chromosome localisation in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* 1984, 308: 288-291
13. Seeger, R. C., Brodeur, G. M., Sather, H. és mtsai.: Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N. Engl. J. Med.* 1985, 313: 1111-1116
14. Shapiro, D. N., Valentine, M. B., Rowe S. T. és mtsai: Detection of N-myc gene amplification by fluorescence *in situ* hybridization. *Am. J. Path.* 1993, 142: 1339-1346
15. Tanaka, T., Hiyama E., Sugimoto T. és mtsai: *trk-A* gene expression in neuroblastomas. The clinical significance of an immunohistochemical study. *Cancer*, 1995, 76: 1086-1095
16. Tayler, C. P. F., McGuckin, A. G., Bown, N. P. és mtsai: Rapid detection of prognostic genetic factors in neuroblastoma using fluorescens *in situ* hybridization on tumour imprints and bone marrow. *Br. J. Cancer* 1994, 69: 445-451
17. Thorner, P. S., Squire J. A.: Molecular genetics in the diagnosis and prognosis of solid pediatric tumors. *Ped. Dev. Path.* 1998, 1. 337-365
18. Shimada H, Ambros I.M., Dehner L.P., Hata J., Joshi V.V., Roald B.: Terminology and criteria of neuroblastic tumors. Recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer*, 1999, 86(2): 349-363

19. Shimada H, Ambros I.M., Dehner L.P., Hata J., Joshi V.V., Roald B., Stram D.O., Gerbing R.B., Lukens J.N., Matthay K.K., Castleberry R. P.: The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*, 1999, 86(2): 364-372
20. Bown N, Cotterill M.Sc., Lastowska M, O'Neill S., Pearson A.D.J., Plantaz D., Meddeb M., Danglot G., Brinkschmidt C., Christiansen H., Laureys G., Speleman F.: Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* 1999, 340 (25): 1954-1961
21. Umehara S., Nakagawa A., Matthay K.K., Lukens J.H., Seeger R.C., Stram D.O., Gerbing R.B., Shimada H.: Histopathology defines prognostic subsets ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer*, 2000, 89(5): 1150-1161
22. Enzinger F.M., Weiss S.W., Primitive neuroectodermal tumors: In *Soft tissue tumors.*, Mosby 3rd ed. 1995, 929-964
23. Leong P.K, Thorner P, Yeger H, et al.: Detection of MYCN gene amplification and deletions of chromosome 1p in neuroblastoma by in situ hybridization using routine histologic sections. *Lab. Invest.* Vol.69, No. 1, 43-51, 1993
24. Rosen N., Reynolds C. P., Thiele C. P. et al.: Increased N-myc expression following progressive growth of human neuroblastoma. *Cancer Res.* 46, 4139-4142, 1986
25. Cowell J.K.: Genetics of paediatric solid tumours. *B. Med. Bulletin* Vol.50, No. 3, 600-623, 1994
26. Gehring M, Berthold F., Edler L. et al.: The 1p deletion is not a reliable marker for the prognosis of patients with neuroblastoma. *Cancer Res.* 55: 5366-5369, 1995
27. Lastowska M., Roberts P., Pearson A. D. J., Lewis I., Wolstenholme J., Bown N.: Promiscuous translocations of chromosome arm 17q in human neuroblastomas. *Genes Chromos. Cancer* 19: 143-149, 1997

28. Ambros P. F., Ambros I. M., Ladenstein R. et al.: Neuroblastoma: Impact of biological characteristics on treatment strategies. *Onkologie* 18: 548-555, 1995
29. Shimada H., Ambros I. M., Dehner L. P., Hata J., Joshi V. V., Roald B.: Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors. Recommendations by the international Neuroblastoma pathology committee. *Cancer* 86: 349-363. 1999
30. Shimada H., Ambros I. M., Dehner L. P., Hata J., Joshi V. V., Roald B., Stram D. O., Gerbing R. B., Lukens J. N., Matthay K. K., Castleberry R. P.: The international neuroblastoma pathology classification (the Shimada System). *Cancer* 86: 364-372. 1999
31. Umehara S., Nakagawa A., Matthay K. K., Lukens J. N., Seeger R. C., Stram D. O., Gerbing R. B., Shimada H.: Histopathology defines prognostic subsets of ganglioneuroblastoma, nodular. A report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 89: 1150-1161. 2000

II. Gastrointestinalis stromalis tumor (GIST)

II/1 Bevezetés

A gastrointestinalis mesenchymalis tumorok (GIMT) 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 mesenchymalis, nem-lymphoid 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 sejtes tumort írtak le, melyről –részint a daganat immunofenotípusa, részint ultrastruktúrális tulajdonságai miatt- annak gastrointestinalis plexus eredetét (plexosarcoma, gastrointestinalis autonom idegrendszeri (nerve) tumor, GANT) feltételezték. (1)

1998-ban mérföldkőnek tekinthető előrelépés történt a daganat pathogenezisének megértésében. Hirota és mtsi., 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. (42, 48) Ez jelentősen megkönnyítette a hisztopatológiai diagnosztikát, a vimentin és CD-34 (hemopoietikus őssejt és endotél marker) antitestek mellett egy újabb, még megbízhatóbb markert a patológus kezébe adva.

A hisztogenezis problematikája mellett igen fontos és mindenképpen klinikai jelentőségű a tumor dignitásának kérdése. Számos tanulmány foglalkozott ezzel a kérdéssel, de az egyértelműen megnyugtató válasz még késik. A tanulmányok döntő többsége egyetért abban, hogy minél nagyobb a daganat, minél nagyobb a mitotikus aktivitás, annál nagyobb az esélye a daganat "high grade" jellegének. A véleményekben megjelenő különbségek a "low grade"- "high grade" kategóriák közötti határban, illetve az egyes prognosztikai faktorok jelentőségében (a kórlefolyást befolyásoló tulajdonságaikban) vannak.

II/2 Nevezéktan

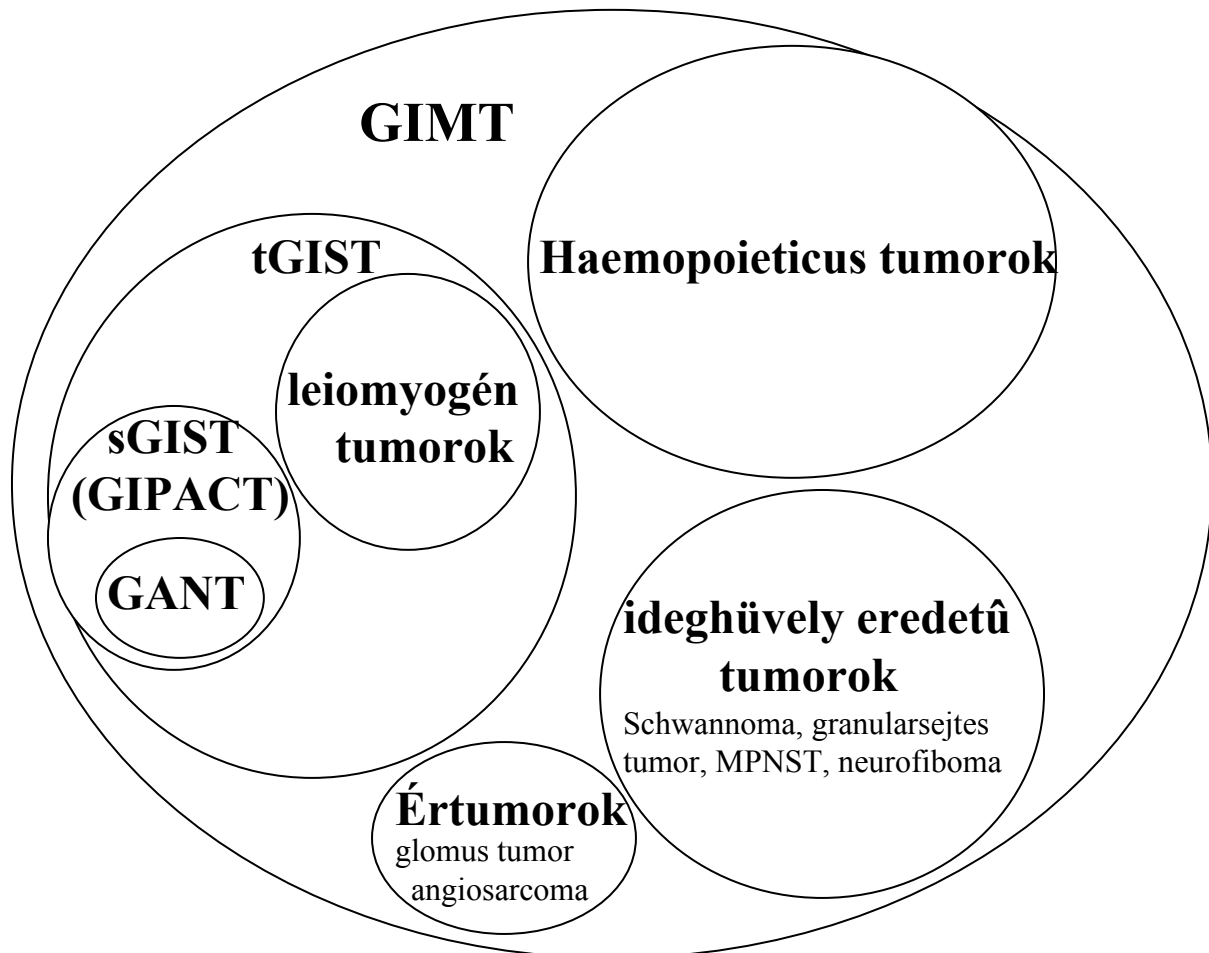
A daganat nevezéktanában kialakult következetlenség jelentős zavart okoz a szóhasználatban és így a diagnosztikában is. Gyakran az sem világos, hogy melyik publikáció melyik daganatcsoportról beszél. Zavart okoz a sok rövidítés bevezetése is, amelyről Chan így ír: "A paradise for acronyms". (43) Számos publikáció áttekintése után a következő megállapítások adódnak: van egy a gastrointestinalis mesenchymális tumorok (GIMT) nagy családjából elkülönülő, tágabb értelemben vett, nem hemopoietikus eredetű mesenchymalis tumor csoport, melyet gastrointestinalis stromalis tumornak (tGIST, t=tágabb értelemben vett) nevezünk. Több publikációban azonban a myogen eredetű daganatokat (leiomyoma, leiomyoblastoma, leiomyosarcoma, epithelioid leiomyosarcoma) már nem sorolják a stromális tumorok közé, talán pont a tisztázott simaizom eredetük, és ezért a mindennapi diagnosztikában megszilárdult elnevezéseik miatt. Így van egy szűkebb értelemben használt gastrointestinalis stromalis tumor (sGIST, s=szűkebb értelemben vett) diagnózis is, mely egyben a daganatcsoport -elnevezésekor még ismeretlen- etiológiájára is utal. Herrera és mtsi. 1984-es dolgozata után ezen a még mindig sok szempontból heterogen csoporton belül (sGIST) egy autonóm idegrendszeri differenciálódást mutató daganatot különítettek el részint a tumor immunohisztokémiai, részint elektronmikroszkópos tulajdonságai alapján. Innen

származott a kezdetben plexosarcoma (Auerbach/Meissner plexus eredetre utaló), majd később részben a nem mindig, vagy bizonytalanul megítélhető dignitás illetve a bizonyítottan gastrointestinalis vegetatív idegrendszeri eredet miatt a gastrointestinalis autonom idegrendszeri tumor (GANT, gastrointestinal autonomic nerve tumor) kifejezés. (2-12) 1998-ban azután a fentebb már említett előrelépés történt a daganat pathogenezisének megértésében: Hirota és Kindblom valamint munkatársaik lényegében kimutatták a sGIST ICC eredetét. Mindezek után Kindblom és mtsi. a GIPACT (gastrointestinal pacemaker-cell tumor, gastrointestinalis pacemaker-sejt tumor) kifejezést javasolták bevezetni a nem eléggé konkrét GIST helyett. (42) A terminológiai zavar kiküszöbölésére alkalmas a Rosai által felvázolt rendszer. A szerző javaslatára az összes gastrointestinalis stromalis tumor (tGIST) diagnoszában célszerű megadni a fenotípust, immunfenotípust és a dignitást egyszerre. Így lehet:

1. **GIST, simaizom, benignus** (leiomyoma)
2. **GIST, simaizom, borderline**
3. **GIST, simaizom, malignus** (leiomyosarcoma)
4. **GIST, simaizom, epithelioid, benignus** (epithelioid leiomyoma)
5. **GIST, simaizom, epithelioid, borderline**, (leiomyoblastoma)
6. **GIST, simaizom, epithelioid, malignus** (epithelioid leiomyosarcoma)
7. **GIST, neurogen typus** (GANT)
8. **GIST, kevert** (neurogen+simaizom, potenciálisan malignus variáns)
9. **GIST, elkötelezetlen** (potenciálisan malignus)

A nevezéktan részletei illetve az egyes daganatcsoportok viszonya az **1. ábrán** látható.

1 ábra. A gastrointestinalis mesenchymális tumorok felosztása.



GIMT: gastrointestinalis mesenchymalis tumorok, **sGIST:** gastrointestinalis stromalis tumor (s=szűkebb értelemben vett), **tGIST:** gastrointestinalis stromalis tumor (t=tágabb értelemben vett), **GANT:** gastrointestinal autonomic nerve tumor, **MPNST:** malignant peripheral nerve sheath tumor (Malignus Schwannoma)

II/3 Molekuláris patológia

Az utóbbi néhány évben (1998-2000) a kutatás a *c-kit* receptor gén molekuláris biológiai változásaira összpontosult. A *c-kit* molekula 135kD molekulásúlyú, tirozin kináz aktivitású “growth factor” receptor, melynek három része van: a ligandkötésért felelős extracelluláris (497 aminosav), a transzmembrán (23 aminosav), illetve a tirozin kináz aktivitásért és ATP-kötésért felelős intracelluláris. A *c-kit* kódoló génje a 4q11-q21 régióra lokalizálható. A gén az immunoglobulin szupergén családba, ezen belül pedig a 3-as típusú tyrosin kinase receptor gén csoportba (CSF-1, PDGFR-A, PDGFR-B) sorolható, ligandja az SCF (stem cell factor) és a receptor maga fontos szerepet tölt be a haemopoiesisben, a gametogenesisben, a melanogenesisben illetve az ICC-k éréseben. A *c-kit* gén mutációi így többféle betegséget, néha ezek együttes előfordulását idézhetik elő (familiaris GIST szindróma, hyperpigmentáció, hízósejt betegségek, chronicus myeloproliferatív betegségek, piebaldizmus). (56, 54) Hirota és mtsi. megmutatták hat tumor elemzése kapcsán, hogy ötben un. “gain of function” mutáció következik be a *c-kit* gén juxtamembrán domainjében (transzmembrán és tirozin kináz domain), melyek eredménye a gén konstitucionális (ligand kötés nélküli) aktivációja (48). Az újabb adatok azonban azt igazolták, hogy a pontmutáció illetve deléció a sGIST-ok csak egy részét érinti: Moskaluk és mtsi. a daganatoknak csak 21%-ban (9/46) találtak deléciót/pontmutációt, míg Ernst és mtsi. 35 gyomor GIST-ből csak 10-ben találtak deléciót, és 3-ban pontmutációt a *c-kit* gén 11-es exonjában (37%) (50, 52). Ez utóbbi tanulmány azt is megmutatta, hogy bár az esetek alig több, mint 1/3-áról van szó, a deléciót/pontmutációt mutató betegek túlélése (30% 3 éves túlélés) sokkal rosszabb, mint a *c-kit* deléciót/pontmutációt nem mutató tumorral rendelkező betegeké (65% 3 éves túlélés). Ezen túlmenően Lasota és mtsi. a hisztológiailag “malignusnak” minősített tumorok 50%-ában (12/24), míg a “benignusnak” tartott tumoroknak csak 5%-ában (1/19) észleltek mutációt, ami szintén támogatja a “malignitás”-rossz prognózis-gyakori mutáció/deléció

összefüggést (49). Egyes GIST-ok nem a juxtamembrán domainben, hanem az extracelluláris domain C-terminálisa végén, illetve a kináz domain első részében mutatnak mutációt (53). A *c-kit* gén patogenezisben betöltött szerepét húzza alá a ritka un. hereditár vagy familiáris GIST előfordulása. Ezekben az esetekben a *c-kit* gén transzmembrán illetve tirozin kináz domainjének "germ-line" mutációját találjuk, mely régiók egyébként a leggyakrabban érintettek a sporadikus esetekben is. További, jellemző genetikai változás az igen gyakran előforduló 14q veszteség. CGH és mikroszatellita analízis segítségével a veszteség két centrumát a 14q11.1-q12 és 14q23-q24 régiókra lokalizálta két potenciális tumor szupresszor gén lokuszt feltételezve (47). Egy másik PCR-LOH tanulmány a 14q mellett 14p, 9p, 9q és 22q karokon is leírt kromoszómális deléciókat (46).

II/4 Hisztogenezis, immunohisztokémia

A daganat hisztogenezisével kapcsolatban ma már részint immunohisztokémiai, részint ultrastrukturális adatok bizonyítják azt, hogy a GIST sejtszövet sok rokonságot mutat a normál intestinális Cajal sejtekkel. Vanderwinden és mtsi. a normál bélben a Cajal sejteket *c-kit* pozitívnak, de CD-34 negatívnak találták, míg ezek közelében egy CD-34 pozitív, de *c-kit* negatív, fibroblast-szerű megjelenést mutató sejtszövetet azonosítottak. Tekintettel a GIST sejtszövetek gyakori CD-34 és *c-kit* koexpressziójára, arra a következtetésre jutottak, hogy a daganat nem lehet ICC-eredetű. (45) Ezzel ellentétben Robinson és mtsi. szekvenciális CD-34 és *c-kit* festésekkel olyan ICC populációt azonosítottak, melynek sejtszöveti mindkét markerrel pozitívak, így arra a következtetésre jutottak, hogy az sGIST-ok egy szűkebb, CD-34, vimentin és *c-kit* pozitív ICC populációból alakulnak ki. (44)

Az ismert immunprofilon kívül (vimentin és *c-kit* koexpresszió az esetek közel 100%-ában, CD-34 pozitívitas 45-83%-ban) a daganatsejtek neurogén markereket is expresszálnak, így a tumorok többnyire NSE pozitívak, és változó mértékű S-100 reakció mellett

synaptophysin illetve PGP 9.5 expressziót mutatnak. (2, 3, 5, 7-10, 19, 28, 33) Mindemellett Shanks és mtsi. fokális simaizom actin (SMA) pozitivitást irtak le a GIST-ok egy részében, mely a daganatsejtek alkalomszerű myogén differenciálódására utal. (8) Ennek ellenére a vizsgált esetek konzekvensen desmin negatívak, így tehát a desmin, a CD-34 és a *c-kit* segítségével, immunfenotípus tekintetében, éles különbség mutatkozik a simaizom és ICC eredetű tumorok között.

II/5 Grading és dignitás

A gastrointestinalis stromalis tumorok, legyenek bármilyen fenotípusúak is, klinikai szempontból legfontosabb tulajdonsága a dignitás. Ennek megítélése, bár esetenként meglehetősen nehéz, függetlenül a daganat fenotípusától, egységes szempontok szerint történik. Ezek alapján célszerűnek látszik a dagantcsoport nevének tágabb értelemben történő használata (tGIST). Ahány tanulmány annyi féle hisztológiai gradelési rendszert alkalmaznak a szerzők a stromalis daganatok esetén (17, 58-62, 67). Az egyes rendszerek a különböző számú (10-50), 400x-os nagyítású látótérben leszámolt mitózisok számát, a nukleáris atípiát, az orsósejtes vagy epithelioid jelleget, a differenciáltság fokát, illetve a nekrózis mértékét használják fel. A klinikailag egyik legmegbízhatóbbnak tűnő, multiparaméteres rendszer az FNCLCC (French Federation of Cancer Centers) lágyrészsarcoma gradelési protokollja (**1. táblázat**), így jelen dolgozatban is ezt használjuk. (58, 66) Egy másik gradelési rendszer a mitózisok számát, és az epithelioid/orsósejtes jelleget veszi figyelembe. (17)

1.táblázat

A lágyrészsarcomák FNCLCC gradelési rendszere.

Differenciáltság	pont
jól differenciált, nincs nucleáris atípiá	1
intermedier differenciáltság, kevesebb, mint 50% atípusos sejtmag	2
rosszul differenciált, több, mint 50% atípusos mag	3
Nekrózis	
nincs értékelhető necrosis	1
fokális nekrózis, a metszet 50 %-ánál kisebb területen	2
kiterjedt nekrózis, a metszet 50%-át meghaladó mértékben	3
Mitózis	
0-1/10 HPF	1
2-5/10 HPF	2
6-10/10 HPF	3
>10/10 HPF	4
grade 0, (benignus)	3
grade 1, (low grade)	4-5
grade 2, (intermedier grade)	6-7
grade 3, (high grade)	8-10

II/6 Prognosztikus faktorok

A daganat biológiai viselkedésének predikciója komoly problémát okoz, és habár több tanulmány foglalkozik a GIST-ok klinikopatológiai (lokalizáció, tumornagyság, metasztázisok jelenléte) (3, 26, 35, 37), proliferációs (S-fázis frakció, mitózis szám, Ki-67, és PCNA index) (26, 35, 37-39), és ploeditási (36, 60, 63-65) paramétereivel, minden esetben alkalmazható prognosztikus faktor még nem találtatott. Rudolph és mtsi. szerint a kórlefolyás szempontjából legerősebb prognosztikus értékkel az FNCLCC lágyrész sarcoma gradelési protokoll, illetve a daganat Ki-67 indexe rendelkezik. (58) A publikált közlemények kiemelik,

hogy a vékonybél eredet, a nagy primer tumor, a metasztázis jelenléte, az aneuploiditás, a nagy mitotikus aktivitás, illetve a magas Ki-67 vagy PCNA index jól korrelál a rossz prognózissal.

II/7 Célkitűzések

Célként tűztem ki az 1991 és 2001 januárja között intézetünkben diagnosztizált gastrointestinalis stromalis tumorok reklassifikálását és teljes patológiai jellemzését, beleértve a széles spektrumú immunohisztokémiai elemzést is. Mindemellett elvégeztem a vélhetőleg 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 (tGIST) gyűjtöttünk össze. Az életkori átlag 55 év (25-75) volt. A daganatok közül három klasszikus leiomyogen differenciálódású (leiomyosarcoma, LMS), 13 pedig nem myogén, Cajal-sejtes fenotípusú (sGIST/GIPACT) volt. Egy betegből (2-es, illetve 7-es eset) az első és a második primer (több mint 4 év az eltelt idő a két tumor észlelése között) tumort is alkalmam volt vizsgálni. Célként tűztem ki jelen tanulmány eredményeinek az összehasonlítását, más, nagy esetszámot reprezentáló külföldi tanulmányokkal (hasonló, több esetet feldolgozó tanulmány Magyarországon még nem publikáltatott).

II/8 Anyag és módszerek

Fénymikroszkópia

A formalin-fixált szövetblokkok processzálása a megszokott módon, automatizálva történt, majd standard hematoxilin-eozin (HE) festést végeztünk. Az immunprofil meghatározására összesen 12-féle immunhisztokémiai markert használtunk, melyet a gyártó

és a típus adatokkal együtt a **2. táblázatban** foglaltunk össze. 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.

2. táblázat A felhasznált antitestek adatai

antitest	típus	klón	gyártó
c-kit	poliklonális	-	Santa Cruz Biotechnology
CD-34	monoklonális	QBEnd/10	Novocastra
desmin	monoklonális	D33	DAKO
α-smooth muscle actin (SMA)	monoklonális	1A4	DAKO
vimentin	monoklonális	v9	DAKO
cytokeratin (CK)	monoklonális	AE1-AE3	Biogenex
chromogranin-A	monoklonális	DAK-A3	DAKO
synaptophysin (SN)	monoklonális	SY38	DAKO
S-100	poliklonális	-	DAKO
neuron specific enolase (NSE)	monoklonális	BBS/NC/VI-H14	DAKO
PGP 9.5	poliklonális	-	Biogenesis
neurofilament (NF)	monoklonális	NRV 170	Biogenex
Ki-67	monoklonális	mib-1	DAKO

Áramlási citometria

A tumorszövet paraffinos blokkjaiból 4db 50 µm vastag metszetet készítettünk, majd a konvencionális rehidráció után a metszeteket 2ml 0.1% pepsin (pH 1.5) oldatban 37C^o-on, 60-90 percig emésztettük. Az emésztést mikroszkóppal ellenőriztük, majd hideg PBS oldattal leállítottuk. A sejtszuspenziót szűrtük és centrifugáltuk, majd reszuszpendáltuk 200 µl PBS-ben, amelyet 2 µl RNase-zal (Sigma, 10mg/ml) egészítettünk ki. 25 perces emésztés után (37°C), 200 µl PBS-t és 3 µl propidium iodidot (Sigma, 6.64 mg/ml) adtunk az oldathoz. 30 perces inkubáció (sötétkamra, szobahő) után, a mintákat Beckton Dickinson FACSort flow

cytométeren mértük az 1-es eset kivételével, amelynek vizsgálatát PARTEC márkájú műszeren végeztük. 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 software-rel több esetben is elvégeztük. A tumorcsoportok közötti különbséget szignifikánsnak tekintettük, ha $p \leq 0.050$ volt.

II/9 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 definiálhatatlan 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 retroperitoneális-intraperitoneális-mesenterialis-cseplez érintettséget észleltünk. **(1. kép)** Itt a

primer tumor helye pontosan nem volt megállapítható. 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. **(2. kép)** 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%). Háromban máj, egyben mesenterialis nyirokcsomó érintettség volt látható, egy pedig a fentebb említett multiplex, több szervet/régiót érintő daganat (6-os eset) volt. **(3a-b. kép)** 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 neurogén 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 nagyságát is összevetettük. Így a leiomyosarcomák átlag mérete 130 mm, míg ugyanez a sGIST-ok esetén 59 mm volt ($p=0.019$). Az adatokat a **3. táblázat** mutatja.

Mikroszkópia

A tumorok fenotípusának 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. **(3. táblázat) (4.-5. kép)** 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. **(4. táblázat)** CK-nal az összes tumor negatívnak, vimentinnel pedig, változó intenzitással, de mind pozitívnak bizonyult. **(6. kép)** A 16 daganatból 3 izom eredetű volt (leiomyosarcoma), melyek a vimentin mellett mind SMA-val, egyikük mindemellett desminnel is pozitívnak bizonyult. **(7.-8. kép)** Mindhárom tumor negatív volt c-kit (CD-117) és CD-34 markerekkel, és csak egyikük (12-es eset) mutatott fokális neurogén marker (NSE, SN) pozitivitást a neurogén tumorok általában diffúz pozitívításával ellentétben. **(9. kép)** A 13 sGIST-ből 12 volt moderaltan-erősen c-kit pozitív, mely a Cajal sejtes eredetet igazolja. **(10. kép)** Csak a 3-as eset volt CD-117 negatív, de emellett PGP 9.5-tel, S-100-al, NSE-vel, valamint synaptophysinnel változó mértékű pozitivitást, emellett desmin és SMA negativitást 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) pozitivitást. **(11. kép)** Mind a 12 sGIST esetben legalább 1, maximum 4 neurogen marker pozitivitást 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%) pozitivitást 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 pozitivitást. **(12. kép) (4. táblázat)**

Proliferatív aktivitás

A proliferatív aktivitást a mitózisok száma és a Ki-67 index alapján határoztuk meg. Mindkét paraméter meglehetősen nagy számbeli eltérést mutatott az egyes esetekben. 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%). **(2. táblázat)** 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 átlagát is összevetettük, amely 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. A mitózis index 16 mitózis/20HPF-nek és 14 mitózis/20HPF-nek adódott 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 16 daganat vizsgálatakor 3 eset kivételével (a 11-es eset, amely nem volt vizsgálható a kevés anyag miatt és a 13-as valamint 16-os eset, amely nem adott értékelhető görbét) 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 ($p=0.716$). Hasonló módon az átlag S-fázis frakciót összehasonlítottuk a soliter és a multinodularis tumorokban. **(3. táblázat)** Mindkét csoport esetében 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 ($p=0.63$). **(3. táblázat)**

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 szövődeményekben 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.

3. táblázat Prognosztikus faktorok és túlélési adatok a vizsgált tGIST-ok esetén

eset	méret	jelleg	áttét	lokalizáció	mitózis	típus	grade	Ki-67	ploiditás	S-fázis	túlélés	kor
1	135	M	-	gyomor	16/20	kevert	GII	45%	diploid	8%	é. 113	42 év
2	55	S	-	jejunum	6/20	orsó	GI	4%	diploid	14%	é. 51	62 év
3	50	S	+ &	ileum	114/20	orsó	GIII	44%	diploid	25%	m. 5	61 év
4	25	S	-	jejunum	2/20	orsó	GI	2%	diploid	4%	é. 11	54 év
5	50*	M	+	gyomor	5/20	epith.	GI	10%	diploid	6%	é. 30	26 év
6	115*	M**	+***	cseplesz**	20/20	epith.	GII	15%	diploid	7%	m. 13	61 év
7	150	S	+	jejunum	14/20***a	orsó	GII	10%	diploid	4%	é. 51	66 év
8	15	S	-	rectum	3/20	orsó	GI	2%	diploid	0%	é. 4	69 év
9	40	S	-	jejunum	1/20	orsó	GI	0%	diploid	3%	m #	70 év
10	130	S	- &	vékonybél	30/20 a	orsó	GIII	42%	diploid	1%	é. 10	25 év
11	110	S	-	duodenum	13/20 a	orsó	GII	3%	nv.	nv.	é. 87	66 év
12	150	S	-	vékonybél	13/20	orsó	GIII	10%	diploid	9%	m ###	32 év
13	25	S	-	duodenum	3/20	orsó	GI	7%	né.	né.	é. 2	61 év
14	35	S	+	duodenum	7/20****	orsó	GI	16%	diploid	5%	é. 46	50 év
15	45	S	-	gyomor	2/20	kevert	GI	8%	diploid	5%	é. 1	62 év
16	35	S	-	gyomor	0/20	orsó	GI	1%	né.	né.	m #	75 év

méret: a tumor legnagyobb átmérője mm-ben, M = multinoduláris tumor, S = szoliter tumor, & = lokális terjedés, mitózis: 20 db 400x-os nagyítású látótérben észlelt osztlások száma, a = atípusos mitózis, orsó = orsósejtes, epithelioid = epithelioid sejtes, kevert = orsó/ epithelioid sejtes, GI, GII, GIII = grade I,II,III, Ki-67: pozitív magok száma/1000 sejtre nézve %-ban kifejezve, é = él, m = meghalt, túlélési adatok hónapban, * = a legnagyobb nodulus, ** = multiplex cseplesz és retroperitoneális érintettség, *** = a metasztázisban 46/20 mitózis, **** = a metasztázisban 5/20 mitózis, né. = nem értékelhető, nv. = nem vizsgálva, # = 9-es és 16-os esetek: autopsziás melléklelet, ## = 12-es eset: meghalt a műtét után.

4.táblázat A vizsgált tGIST-ok immunohisztokémiai profilja

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
NSE	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
NF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CHR	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SN	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
PGP-9.5	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
S-100	-	-	+	+	-	+/-	+	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-
CD-34	-	-	-	+	+/-	-	-	+	+	-	-	-	-	+/-	-	
c-kit	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Vimentin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Desmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
SMA	+/-	-	-	+/-	-	+	+	-	+/-	+	+	+	-	+/-	+/-	+/-
CK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
diagnózis	GIST	GIST	GIST	GIST	GIST	GIST	GIST	GIST	GIST	LMS	LMS	LMS	GIST	GIST	GIST	GIST

NSE=neuron specificus enolase, NF=neurofilament, CHR=chromogranin, SN= synaptophysin, SMA= simaizom aktin, CK= cytokeratin, mitózis: pozitív sejtmagok százkékbán megadva, - = negatív, + = pozitív, +/- = fokális pozitivitás, mitózis index: mitózis/20 HPF (400x-os nagyítású látótér) GIST = gastrointestinalis stromalis tumor, LMS= leiomyosarcoma

II/10 Megbeszélés

Makroszkópia

Megfigyeléseinket több szempontból összevetettük az eddig publikált tanulmányok hasonló paramétereivel. A stromális tumorok leggyakoribb előfordulási helye a gyomor és vékonybél, de ritkábban a daganat előfordulhat az oesophagusban, a colorectumban, illetve retroperitoneumban is. (2-9, 19, 23-29) A daganatok lokalizációs megoszlásával kapcsolatban érdekes különbséget tapasztaltunk. A publikált tanulmányok 43-59%, egyesek 60-70% közé teszik a gyomor GIST-ek előfordulási arányát. (14, 18, 19, 25, 58, 70) Ugyanezen tanulmányokban a gyomor GIST-ek előfordulása a vékonybél lokalizációhoz viszonyítva általában 2:1 arányt mutat. Tanulmányunkban vizsgált eseteinknél a gyomor lokalizáció lényegesen ritkább volt (4/16, 25%), mint a vékonybél, amely 63%-nak adódott (10/16). Ez több, mint 2.5 x-es különbség, ami meglepő. Habár jelen tanulmány esetszáma néhány publikált külföldiétől elmarad, egy komparábilis esetszámú nyugati tanulmányban is a 2:1 arány érvényesül a gyomor tumorok javára (18). A fordított arány oka nem ismert, de mindenképpen lényeges kérdés, mivel a vékonybél eredetű GIST-ek proliferatív paraméterei, illetve biológiai viselkedése, mint ahogy azt már bemutattuk, lényegesen rosszabbak a gyomor tumorokénál. Talán a daganat nem túl gyakori előfordulásával magyarázhatóan, hasonló tanulmány magyar populáción még nem készült, így adatainkat összehasonlítani nem tudjuk, azonban a kapott eredmény elég meglepő, így egy későbbi időpontban, nagyobb esetszámon a kérdést újra meg kell vizsgálni. A férfi/nő arány eseteiben 2:1-nek adódott.

A 16 daganatból 3 multinoduláris volt (19%). Ez mindenképpen ennek a makroszkópos megjelenési típusnak a relatív gyakoriságát húzza alá. Érdekes adat, hogy a multinodularitás főleg a gyomor tumorokra (2/4) volt jellemző (minden vékonybél eredetű tumor soliter volt), illetve az is megemlítenő, hogy mindhárom a neurogén differenciálódású, Cajal sejtes csoportból került ki. Érdekes továbbá, hogy a multinoduláris daganatok átlagos

nagysága (a legnagyobb tumornodulus átlagos átmérője) lényegesen nagyobb volt, mint a soliterek hasonló paramétere (100mm és 67mm, $p=0.303$). A multinodularitás gyakoriságára vonatkozó adattal nem találkoztam az irodalomban.

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 esetek hasonló paraméterénél (64 mm). Ez a tulajdonság megmagyarázható a rapidabb növekedéssel, illetve az agresszívebb biológiai viselkedéssel. A különbség sorozatunkban mindazonáltal nem szignifikáns ($p=0.345$).

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 (lásd alább).

Mikroszkópia

A gastrointestinalis stromális tumorok relatíve ritka daganatok változó differenciálódással és morfológiával. (11-22) Összegyűjtött eseteink döntő többségében a daganat orsósejtes, kisebb részben epithelioid sejtes vagy kevert fenotípust mutatott. A hisztológiai gradelés kapcsán benignus tumort nem találtunk, amely főleg az összes tumorban, néha csak minimális mértékben, de megtalálható pleomorfia jelenlétével magyarázható. A GI-es II-es és III-as tumorok százalékos megoszlása hasonló egy előző, ugyanazon gradelési elvet követő tanulmányban észlelthez. (58) 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 egybevág a vékonybél esetek irodalomban is leírt agresszívebb viselkedésével. Várható módon az áttétet képező és/vagy lokálisan terjedő daganatok hasonló paramétere (2.0), habár nem szignifikáns mértékben, 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 szignifikánsnak bizonyult. A multinoduláris és soliter esetekben az eltérés (1.4 és 1.6) elhanyagolható. A használt gradelési rendszer tehát egyértelműen megmutatta az izom eredetű tumorok szignifikánsan magasabb átlag grade-jét, amely előre vetíti a myogén csoport agresszívebb viselkedését. A makroszkópos értelemben malignitás jeleit mutató tumorcsoport jóval magasabb átlag grade-je csak visszaigazolja a nagy proliferatív aktivitás és a malignus biológiai viselkedés közötti szoros kapcsolatot.

A tGIST-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. (2, 3, 5, 7-10, 19, 28, 33) 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, sokat vizsgált markere a CD-34, amely egyben endotél és hemopoietikus őssejt marker is. A közlemények szerint az esetek 45-83%-a expresszálja a markert. (6, 8, 11, 18, 25, 34) Saját sorozatunkban 46% volt a pozitív esetek száma, amely a publikált gyakorisági ráták alsó értékével egyezik. Habár eseteinkben desmin és CD-34 koexpressziót nem láttunk, az irodalmi adatok szerint myogén tumorok is mutathatnak CD-34 reakciót, amely megkérdőjelezi ezen antitest diszkriminatív értékét. (18) Az utóbbi két-három év legfontosabb vívmánya a stromális tumorok kutatása terén a Cajal-sejtes daganattípus jellegzetességeinek és ezzel összefüggésben c-kit pozitivitásának leírása. A mi 13 esetünk közül 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 autonóm idegrendszeri eredetét (GANT) megerősítette, így az eset szűkebb értelemben vett GIST-nek (sGIST) felel meg. (57) A c-kit specificitása a gastrointestinalis stromális tumorok esetén igen jó, CD-34 reakció mellett a c-kit expresszió a legalkalmasabb a myogén és a Cajal-sejtes jelleg elkülönítésére. Ezt igazolja az a tény is, hogy a háromból 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 (sGIST) 8 mutatott fokális, vagy diffúz pozitivitást, amely ezen daganat típus 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 különféleképpen csoportosított daganatok proliferációjának vizsgálatakor érdekes, részben meglepő eredményeket kaptunk. Mind a mitózis index, (0/20 HPF-114/20 HPF), 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. (19, 70) 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 praktikus 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 progresszivebb növekedését emeli ki. A myogén daganatok neurogénéhez viszonyított rosszabb prognózisáról 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 ismételtlen sem lehetett analízisre alkalmas görbét kapnunk. A paraffinos izolátumok alapjelensége a viszonylag nagy mennyiségű sejttörmelék, 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. (58) Ez összefüggést mutat az ismert kromoszómális deléciókkal (del. 1p, del. 14q22), amelyek gyakori események ebben a daganat típusban. Mindezen jelenségeket figyelembe véve nem volt aneuploid esetünk. Az aneuploid tumorok az irodalmi adatok szerint rossz prognózisúak. Ezt sok tanulmány bizonyítja. (26, 58, 60, 63-65) 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 egybevág 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.

II/11 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 tGIST-ok két nagy csoportja közül a myogén (LMS) csoportban az átlagos nagyság és az átlag hisztológiai grade szignifikánsan nagyobb a Cajal sejtes (sGIST) 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 betegségcsoportban.
8. A multinoduláris GIST-ek, jelentősen, de nem szignifikánsan nagyobbak a solitereknél.
9. A vizsgált daganatok 19%-a multinoduláris volt. Az összes a Cajal-sejtes csoportból, kétharmaduk a gyomor tumorok közül került ki, így ez utóbbi csoportnak az 50%-a volt multinodularis. A gyakori multinodularitás, és a multinoduláris tumorok átlagosan nagyobb mérete kiterjedtebb, illetve radikálisabb sebészi beavatkozást indokolhat.
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. Az sGIST (Cajal-sejtes tumor) immunprofilja: *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 immunprofilja: 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.

II/12 Irodalom

1. Herrera G. A., Moraes H. P., Grizzle W. E., Han S. G.: Malignant small bowel neoplasm of enteric plexus derivation (plexosarcoma). *Dig. Dis. Sci.* 29: 275-284, 1984
2. Dhimes P., López-Carreira M., Ortega-Serrano M., García-Munoz H., Martínez-González M. A., Ballestín C.: Gastrointestinal autonomic nerve tumours and their separation from other gastrointestinal stromal tumours: an ultrastructural and immunohistochemical study of seven cases. *Virch. Arch.* 426: 27-35, 1995.
3. Lauwers G. Y., Erlandson R. A., Casper E. S., Brennan M. F., Woodruff J. M.: Gastrointestinal autonomic nerve tumours. A clinicopathological immunohistochemical and ultrastructural study of 12 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 17(9): 887-897, 1993.
4. Matsumoto K., Min W., Yamada N., Asano G.: Gastrointestinal autonomic nerve tumours: immunohistochemical and ultrastructural studies in cases of gastrointestinal stromal tumour. *Pathol. Int.* 47(5): 308-314, 1997
5. MacLeod C. B., Tsokos M.: Gastrointestinal autonomic nerve tumour. *Ultrastruct. Pathol.* 15(1): 49-55, 1991
6. Ojanguren I., Ariza A., Navas-Palacios J. J.: Gastrointestinal autonomic nerve tumour: Further observations regarding an ultrastructural and immunohistochemical analysis of six cases. *Hum. Pathol.* 27: 1311-1318, 1996
7. Segal A., Carello S., Caterina P., Papadimitriou J. M., Spagnolo D. V.: Gastrointestinal autonomic nerve tumours: clinicopathological, immunohistochemical and ultrastructural study of 10 cases. *Pathology.* 26(4): 439-447, 1994

8. Shanks J. H., Harris M., Banerjee S. S., Eyden B. P. Gastrointestinal autonomic nerve tumours: a report of nine cases. *Histopathology*, 29: 111-121, 1996
9. Walker P., Dvorak A. M. Gastrointestinal autonomic nerve (GAN) tumour. Ultrastructural evidence for a newly recognized entity. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 110: 309-316, 1986
10. Herrera G. A., Cerezo L., Jones J. E., Sack J., Grizzle W. E., Pollack W. J., Lott R. L.: Gastrointestinal autonomic nerve tumours. "Plexosarcomas". *Arch. Pathol. Lab. Med.* 113: 846-853, 1989.
11. Erlandson R. A., Klimstra D. S., Woodruff J. M.: Subclassification of gastrointestinal stromal tumours based on evaluation by electron microscopy and immunohistochemistry. *Ultrastruct. Pathol.* 20(4): 373-393, 1996
12. Franquemont D. W., Frierson H. F. Jr.: Muscle differentiation and clinicopathologic features of gastrointestinal stromal tumours. *Am. J. Surg. Pathol.* 16(10): 947-954, 1992
13. Franquemont D. W.: Differentiation and risk assesment of gastrointestinal stromal tumours. *Am. J. Clin. Pathol.* 103(1): 41-47, 1995
14. Hurlimann J., Gardiol D.: Gastrointestinal stromal tumours: an immunohistochemical study of 165 cases. *Histopathology.* 19: 311-320, 1991
15. Ma C. K., Amin M. B., kintanar E., Linden M. D., Zarbo R. J.: Immunohistologic characterization of gastrointestinal stromal tumours: a study of 82 cases compared with 11 cases of leiomyomas. *Mod. Pathol.* 6(2): 139-144, 1993
16. Mentzel T., Katenkamp D.: Gastrointestinal stromal tumour with skeinoid fibres and bidirectional immunohistochemical differentiation. *Histopathology.* 29(2): 175-177, 1996.

17. Newman P. L., Wadden C., Fletcher C. D. M. Gastrointestinal stromal tumours: correlation of immunophenotype with clinicopathological features. *J. Pathol.* 164:107-117, 1991.
18. van de Rijn M., Hendrickson M. R., Rouse R. V.: CD34 expression by gastrointestinal tract stromal tumours. *Hum. Pathol.* 25: 766-771, 1994
19. Ueyama T., Guo K. J., Hashimoto H., Daimaru Y., Enjoji M.: A clinicopathologic and immunohistochemical study of gastrointestinal stromal tumours. *Cancer.* 69: 947-955, 1992
20. Min K. W. Small intestinal stromal tumours with skeinoid fibres. Clinicopathological, immunohistochemical and ultrastructural investigations. *Am. J. Surg. Pathol.* 16(2): 145-155, 1992.
21. Suster S., Sorace D., Moran C. A.: Gastrointestinal stromal tumours with prominent myxoid matrix. Clinicopathologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of nine cases of a distinctive morphologic variant of myogenic stromal tumour. *Am. J. Surg. Pathol.* 19(12): 1444-1445, 1995
22. Suster S., Fletcher C. D.: Gastrointestinal stromal tumours with prominent signet ring-cell features. *Mod. Pathol.* 9(6): 609-613, 1996
23. Thomas J. R., Mrak R. E., Libuit N.: Gastrointestinal autonomic nerve tumour presenting as high-grade sarcoma. Case report and review of the literature. *Dig. Dis. Sci.* 39(9): 2051-2055, 1994
24. Tworek J. A., Appelman H. D., Singleton T. P., Greenson J. K.: Stromal tumours of the jejunum and ileum. *Mod. Pathol.* 10(3): 200-209, 1997
25. Miettinen M., Virolainen M., Rikala M. S. Gastrointestinal stromal tumours- value of CD34 antigen in their identification and separation from true leiomyomas and Schwannomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 19(2): 207-216, 1995.

26. Antonioli D. A.: Gastrointestinal autonomic nerve tumours. Expanding the spectrum of gastrointestinal stromal tumours. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 133: 831-833, 1989
27. Drews G., Keine S., Emmrich P., Lehmann J.: Maligner Tumour des autonomen Nervensystems des Magens (GAN Tumour). Ein Fallbericht einer neuen Entität. *Zentralbl. Chir.* 117(10): 564-568, 1992
28. Lam K. Y., Law S. Y., Chu K. M., Ma L. T.: Gastrointestinal autonomic nerve tumour of the oesophagus. A clinicopathologic, immunohistochemical, ultrastructural study of a case and review of the literature. *Cancer.* 78(8): 1651-1659, 1996
29. Walsh N. M., Bodurtha A. Auerbach's myenteric plexus. A possible site of origin for gastrointestinal stromal tumours in von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 114: 522-525, 1990.
30. Shek T. W., Luk I. S., Loong F., Ip P., Ma L.: Inflammatory cell-rich gastrointestinal autonomic nerve tumour. An expansion of its histologic spectrum. *Am. J. Surg. Pathol.* 20(3): 325-331, 1996.
31. Fuller C. E., Williams G. T.: Gastrointestinal manifestations of type 1 neurofibromatosis (von Recklinghausen's disease). *Histopathology.* 19(1): 1-11, 1991.
32. Zoller M. E., Rembek B., Oden A., Samuelsson M., Angervall L.: Malignant and benign tumours in patients with neurofibromatosis type 1 in a defined Swedish population. *Cancer.* 79(11): 2125-2131, 1997.
33. Thompson E. M., Evans D. J.: The significance of PGP 9.5 in tumours- an immunohistochemical study of gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology.* 17(2): 175-177, 1990
34. Monihan J. M., Carr N. J., Sobin L. H.: CD34 immunoexpression in stromal tumours of the gastrointestinal tract and in mesenteric fibromatoses. *Histopathology.* 25: 469-473, 1994

35. Carillo R., Candia A., Rodriguez-Peralto J. L., Caz V.: Prognostic significance of DNA ploidy and proliferative index (MIB-1 index) in gastrointestinal stromal tumours. *Hum. Pathol.* 28(2): 160-165, 1997
36. Cooper P. N., Quirke B. M., Hardy G. J., Dixon M. F.: A flow cytometric, clinical, and histological study of stromal neoplasms of the gastrointestinal tract. *Am. J. Surg. Pathol.* 16(2): 163-170, 1992
37. Franquemont D. W., Frierson H. F. Jr.: Proliferating cell nuclear antigen immunoreactivity and prognosis of gastrointestinal stromal tumours. *Mod. Pathol.* 8(5): 473-477, 1995
38. Franquemont D. W., Geary W. A.: Gastrointestinal stromal tumours and proliferating cell nuclear antigen. Prognostic challenges. *Am. J. Clin. Pathol.* 100(4): 369-370, 1993
39. Yu C. C. W., Fletcher C. D. M., Newman P. L., Goodlad J. R., Burton J. C., Levison D. A.: A comparison of proliferating nuclear antigen (PCNA) immunostaining, nucleolar organizer region (AgNOR) staining, and histological grading in gastrointestinal stromal tumours. *J. Pathol.* 166: 147-152, 1992
40. Szekeres G, Le Tourneau A., Benfares J., Auduoin J., Diebold J.: Effect of desoxyribonuclease I on immunostaining of Ki-67 in fixed-embedded sections. *Pathol Res Pract.* 191(1): 52-56, 1995
41. Seidal T., Edvardsson H.: Expression of c-kit (CD-117) and Ki-67 provides information about the possible cell of origin and clinical course of gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 34: 416-424, 1999
42. Kindblom L.G., Remotti H.E., Aldenborg F., Meis-Kindblom M.: Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT). Gastrointestinal stromal tumors show phenotypic

- characteristics of interstitial cells of Cajal. Am. J. Pathol. 152 (5): 1259-1269, 1998
43. Mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract: a paradise for acronyms (STUMP, GIST, GANT and now GIPACT), implication of *c-kit* in genesis and yet another of many emerging roles in the interstitial cell of Cajal in the pathogenesis of gastrointestinal diseases. Chan J.K.C. Adv. Anat. Pathol. 6 (1) 19-40, 1999
44. Robinson T.L., Sircar K., Hewlett B.R., Chorneyko K, Riddell R.H., Huizinga J.D.: Gastrointestinal stromal tumors may originate from a subset of CD-34-positive interstitial cells of Cajal. Am. J. Pathol. 156 (4): 1157-1163, 2000
45. Vanderwinden J.M., Rumessen J. J., De Laet M. H., Vanderhaeghen J.J., Schiffmann S.
N.: CD-34+ cells in human intestine are fibroblasts adjacent to, but distinct from, interstitial cells of Cajal. Lab. Invest. 79 (1) 59-65, 1999
46. Kim N.G., Kim J.J., Ahn J.Y., Seong C. M., Noh S. H., Kim C. B., Min J. S. Kim H.: Putative chromosomal deletions on malignant gastrointestinal stromal tumors. Int. J. Cancer 85 (5): 633-638, 2000
47. El-Rifai W., Sarloo-Rikala M., Andersson L. C., Miettinen M., Knuutila S.: High-resolution deletion mapping of chromosome 14 in stromal tumors of gastrointestinal tract suggests two distinct tumor suppressor loci. Genes Chromosomes Cancer 27 (4): 387-391, 2000
48. Hirota S., Isozaki K., Moriyama Y., Hashimoto K., Tishirou N., Ishiguro S., Kawano K.,
Hanada M., Kurata A., Takeda M., Tunio G. M., Matsuzawa Y., Kanakura Y., Shinomura Y., Kitamura Y.: Gain-of-function mutations of *c-kit* in human gastrointestinal stromal tumors. Science 279: 577-580, 1998
49. Lasota J., Jasinski M., Sarlomo-Rikala M., Miettinen M.: Mutations in exon 11 of *c-kit*

- occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. *Am. J. Pathol.* 154 (1): 53-60, 1999
50. Moskaluk C. A., Tian Q., Marshall C. R., Rumpell C. A., Franquemont D. W., Frierson H. F. Jr.: Mutations of *c-kit* JM domain are found in a minority of human gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 18 (10): 1897-1902, 1999
51. Huizinga J. D., Thuneberg L., Klüppel M., Malysz J., Mikkelsen H. M., Bernstein A.: *W/kil* gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 373: 347-349, 1995
52. Ernst S. I., Hubbs A. E., Przygodzki R. M., Emory T. S., Sobin L. H., O'Leary T. J.: Kit mutation portends poor prognosis in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Lab. Invest.* 78 (12): 1633-1636, 1998
53. Lux M., Rubin B. P., Biase T. L., Chen C-J., Maclure T., Demetri G., Xiao S., Singer S., Fletcher C. D. M., Fletcher J. A.: KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am. J. Pathol.* 156 (3) 791-795, 2000
54. Sakurai S., Fukuyama M., Kaizaki Y., Saito K., Kanazawa K., Kitamura M., Iwasaki Y., Hishima T., Hayashi Y., Koike M.: Telomerase activity in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer* 83 (10): 2060-2066, 1998
55. Marci V., Casorzo L., Sarotto I., Dogliani N., Milazzo M. G., Risio M.: Gastrointestinal stromal tumor, uncommitted type, with monosomies 14 and 22 as the only chromosomal abnormalities. *Cancer Genet. Cytogenet.* 102 (2): 135-138, 1998

56. O'Brian P., Kapusta L., Dardick I., Axler J., Gnideck A.: Multiple familial gastrointestinal autonomic nerve tumors and small intestinal neuronal dysplasia. *Am. J. Surg. Pathol.* 23 (2): 198-204, 1999
57. Tornóczy T., Kálmán E., Hegedűs G., Horváth Ö.P., Sápi Z., Antal L., Jáksó P., Pajor L.: High mitotic index associated with poor prognosis in gastrointestinal autonomic nerve tumour. *Histopathology* 35,121-128, 1999
58. Rudolph P., Gloeckner K., Parwaresch R., Harms D., Schmidt D.: Immunophenotype, proliferation, DNA ploidy, and biological behaviour of gastrointestinal stromal tumors: A multivariate clinicopathologic study. *Hum. Pathol.* 29(8): 791-800, 1998
59. Sanders L., Silverman M., Rossi R. et al.: Gastric smooth muscle tumours: Diagnostic dilemmas and factors affecting outcome. *World J. Surg.* 20: 992-995, 1996
60. Lerma E., Oliva E., Tugues D., et al.: Stromal tumours of the gastrointestinal tract: A clinicopathological and ploidy analysis of 33 cases. *Virchows Arch.* 424: 19-24, 1994
61. McGrath P.C., Neifeld J.P., Lawrence W.J., et al.: Gastrointestinal sarcomas: Analysis of prognostic factors. *Ann. Surg.* 206: 706-710, 1987
62. Lee J.S., Nascimento A.G., Farnell M.B., et al.: Epithelioid gastric stromal tumors (leiomyoblastomas): A study of fifty-five cases. *Surgery* 118: 653-660, 1995
63. Kiyabu M.T., Bishop P.C., Parker J.W., et al.: Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract: Flow cytometric quantitation of DNA and nuclear antigen content and correlation with histologic grade. *Am. J. Surg. Pathol.* 12: 954-960, 1988
64. Suzuki H., Sugihira N.: Prognostic value of DNA ploidy in primary gastric leiomyosarcoma. *Br. J. Surg.* 80: 1549-1550, 1993
65. Shimamoto T., Haruma K., Sumii K., et al.: Flow cytometric DNA analysis of gastric smooth muscle tumours. *Cancer* 70: 2031-2034, 1992
66. Trojani M., Contesso G., Coindre J.M., et al.: Soft-tissue sarcoma of adults: Study of

- pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system.
Int. J. Cancer 33: 37-42, 1984
67. Evans H.L.: Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract: A study of 56 cases followed for a minimum of 10 years. Cancer 56: 2242-2250, 1985
68. Amin M.B., Ma C.K., Linden M.D., Kukus J.J., Zarbo R.J.: Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen index in gastric stromal tumors. Correlation with mitotic count and clinical outcome. Am. J. Clin. Path. 100: 428-432, 1993
69. Miettinen M., Lasota J.: Gastrointestinal stromal tumors-definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. Virchows Arch. 438: 1-12, 2001
70. Emory T.S., Sobin L.H., Lukes L., Lee D.H., O'Leary T.J.: Prognosis of gastrointestinal smooth muscle (stromal) tumors. Am. J. Surg. Path. 23(1):82-87, 1999

III. Alveoláris légysz sarcoma

III/1 Bevezetés

Az alveolaris légysz sarcoma (ASPS) egy igen ritka, ismeretlen eredetű, malignus légysz daganat, amely főleg gyermekekben illetve fiatal felnőttekben fordul elő. (1,2) Számos kísérletet történt már a daganat sejteredetének tisztázására, azonban az eredmények ellentmondásosak. Az elvégzett ultrastruktúrális 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. (3-5) Az aktin filamentek jelenléte felvetette a sarcoma izom eredetének lehetőségét. Néhány szerző neurogénnek tartotta a daganatot annak a paragangliomákhoz, vagy éppen a granulasejtes tumorokhoz hasonló fenotípusa miatt. (3,6,7) Később a daganat immunohisztokémiai analízise szintén ellentmondásos eredményekhez vezetett. A tanulmányok döntő többsége az izom eredetet támogatja, azonban néhány másik rámutat az izom markerek ritka expressziójára, vagy annak teljes hiányára a daganatban. (8-15) Egyes szerzők még a desmin pozitivitást sem tekintették az izom eredet/differenciálódás biztos jelének.(16,17)

A daganatban bekövetkező kromoszómális változásokkal kapcsolatban meglehetősen kevés az adat. A kromoszómális abnormalitások egy része jellegzetesnek tűnik, azonban ezidáig a tumor kialakulásában definitive szerepet játszó gén vagy gének nem találtak. (18-20) Néhány szerző arra a következtetésre jutott, hogy a 17-es kromoszóma vesztese, vagy ugyanezen kromoszóma hosszú karjának változásai kulcsszerepet játszhatnak a daganat kialakulásában. (20-24) Mindemellett komplex kromoszómális abnormalitásokat is leírtak egyes szerzők, amely jelentősen bonyolíthatja a kérdést, és megnöveli azon gének illetve kromoszómális régiók számát, amelyek részt vehetnek a daganat keletkezésében. A publikált közlemények nagytöbbségében a szerzők a karyotipizálás során a konvencionális „G-banding-et” használták, de a vizsgált metafázisok száma általában kevés volt. Kérdéses az is, hogy vajon néhány metafázis sejt reprezentálhat-e egy alacsony proliferációs frakciójú tumorpopulációt, ahol a daganatsejtek döntő többsége interfázisban van.

III/2 Célkitűzések

Az alveolaris lágyrész sarcomával foglalkozó harmadik fejezetben céлом 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 fluoreszcens *in situ* hibridizációt (FISH) végeztünk.

III/3 Anyag és módszerek

Fénymikroszkópia, immunohisztokémia

A kimetszett szövetblokkokat az előbbiekhöz hasonló módon pufferezett formalinban fixáltuk, majd processzálásuk a megszokott módon, automatizálva történt. A standard hematoxilin-eozin (HE), a PAS és a PAS-D (D: 30 perc diasztáz előemésztés) festéseket Shandon festőautomatán végeztünk. Az immunprofil meghatározására összesen 11-féle monoklonális és poliklonális antitestet használtunk, melyet a gyártó és a típus adatokkal együtt, hasonlóan az eddigiekhez az **1. táblázatban** foglaltunk össze. A MyoD1 kivételével minden esetben standard citrát pufferes mikrohullámú előkezelést (700W, 3x5 perc) alkalmaztunk. A MyoD1 esetén hasonló citrát oldatban kuktában történt az antigén feltárása. A reakcióknál 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 pozitív sejtmagok százalékos arányában adtuk meg. Függetlenül a festés intenzitásától minden pozitív sejtet értékeltünk.

1. táblázat A felhasznált antitestek adatai

antitest	típus	klón	gyártó
α-sarcomeric actin (SMA)	monoklonális	α -Sr-1	DAKO
desmin	monoklonális	D33	DAKO
α-smooth muscle actin (SMA)	monoklonális	1A4	DAKO
vimentin	monoklonális	v9	DAKO

cytokeratin	monoklonális	KL-1	Immunotech
myoglobin	poliklonális	-	DAKO
S-100	poliklonális	-	DAKO
neuron specific enolase (NSE)	monoklonális	BBS/NC/VI-H14	DAKO
PGP 9.5	poliklonális	-	Biogenesis
MyoD1	monoklonális	5.8A	Novocastra
Ki-67	monoklonális	mib-1	DAKO

Próbakészítés és interfázis citogenetika

Az interfázis cytogenetikai analízist (IPC) a daganatok formol-paraffinos blokkjaiból izolált magokon végeztük el. Négy 50 µm vastag metszetet készítettünk, melyeket rehidráció után 2 ml 0.5% pepsin oldatban (pH 1.5) emésztettünk 37C^o-on, 60-90 percig. Az emésztést mikroszkóp alatt ellenőriztük, majd hideg PBS-ben leállítottuk. A magszuspenziót szűrtük, ülepedni hagytuk, majd reszuszpendáltuk 0.01% citrát pufferben. A sejtszuspenziót mikrohullámú sütőben kezeltük (700W, 5 perc), majd 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, Oncor) ISH próbát használtunk a vizsgálatokhoz. (2 táblázat). A nem megfelelő szignálintenzitást (9, 11, 16, 20, Y), vagy a kereszreakciókat (5/19, 13/21, 14/22) adó próbákat nem használtuk fel az értékelésnél. A DNS próbák biotin- (3, 4, 6, 8, 12, 17, 18 kromoszómák) illetve digoxigenin-konjugációját (1, 7, 10, 15, X kromoszómák) nick transláció módszerével, dUTP (Boehringer) felhasználásával végeztük. A felhasznált próbák irodalmi hivatkozásai, a jelölés módszere, illetve a FISH menetét már korábban publikáltuk. (33) A hasonló jelintenzitást adó próbákat párokba rendeztük, és együtt alkalmaztuk (double target, two colour *in situ* hybridization). A FISH kivitelezésekor 10 ng próba/60% formamid/2xSSC (Baker) tartalmú, 5 µl hibridizációs oldatot cseppentettünk a sejt preparátumokhoz, majd plasztikkal fedtünk. A mintákat és a próbákat szimultán denaturáltuk 90 C^o-on, 10 percig, melyet éjszakán át tartó hibridizáció követett (37°C, nedves kamra). A poszthibridizációs mosás 60% formamid/2xSSC-t tartalmazó (Baker, 3x5 perc, 37°C), majd 2xSSC (3x5 perc, szobahőmérséklet) oldattal történt pH 7-en. A biotin-jelölt próbák előhívása avidin-FITC (Vector), a digoxigenin jelölt próbáké anti-digoxigenin-rhodamine (Boehringer) rendszerrel történt, amely zöld és piros fluoreszcenciát eredményezett. Végül a preparátumok

fedése 0.02 µg/ml DAPI-t tartalmazó Vectashield mounting medium-mal történt (Vector Laboratories Inc.). Minden esetben az előírt hígításokat és mennyiségeket alkalmaztuk.

2. táblázat A centromerikus és telomerikus próbák, illetve a klónok nevei, a jelölés módja és az előhívó rendszer.

kromoszóma	klón	jelölés	előhívó rendszer
1	PUC1.77	digoxigenin	antidigoxigenin/rhodamine
3	pα3.5	biotin	avidin/FITC
4	MCG4-01	biotin	avidin/FITC
6	MCG6-01	biotin	avidin/FITC
7	p7t1	digoxigenin	antidigoxigenin/rhodamine
8	pJM128	biotin	avidin/FITC
10	D10Z1	digoxigenin	antidigoxigenin/rhodamine
12	pα12H8	biotin	avidin/FITC
15	D15Z1	digoxigenin	antidigoxigenin/rhodamine
17	p17H8	biotin	avidin/FITC
17q25-qtel.		digoxigenin	antidigoxigenin/rhodamin
18	L1.84	biotin	avidin/FITC
X	pBamX5	digoxigenin	antidigoxigenin/rhodamine

A hibridizációs szignálok értékelése

Metszetenként minimum 100 sejtmagot vizsgáltunk és értékeltünk. A szignálokat csak intakt, egymást át nem fedő magokon értékeltük. Négy egészséges, felnőtt perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek szolgáltak kontrollként a hibridizációs jelek normál eloszlásának megállapítására. A fixálás hatásának vizsgálatára egy reaktív nyirokcsomó formol-paraffinos blokkjából izolált limfoid sejteken is elvégeztük a FISH-t, melynek kapcsán az előbbiekhöz hasonló eredményt kaptunk. A kontroll esetek hibridizációs jeleit (átlag + 3x standard deviatio) a tumor minták vizsgálatokor 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. Az eredményeket a **4. táblázatban** foglaltuk össze.

III/4 Eredmények

Betegek, klinikai adatok és a makroszkópos leírás

Négy alveoláris lágyrész 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 nyelvben, a bal lábszárbán, illetve a bal combon helyezkedtek el az 1-es, 2-es, 3-as, illetve 4-es esetekben. A klinikopatológiai adatokat a **3. táblázat** tartalmazza. 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.

3. táblázat Klinikopatológiai jellemzők.

	1. eset	2. eset	3. eset	4. eset
nem	férfi	nő	férfi	nő
kor	25 év	14 év	30 év	63 év
lokalizáció	alkar	nyelv	alszár	comb
méret	55 mm	33 mm	70 mm	110 mm

Fénymikroszkópos leletek

A mikroszkópos vizsgálat kapcsán mind a négy eset az erre a daganatra jellegzetes szolid-alveoláris mintázatot mutatta. A daganatsejteknek centrálisan vagy excentrikusan elhelyezkedő magjaik voltak, melyekben csak egy, prominens nukleolusz volt megfigyelhető. Citoplazmájuk nagy, kerek, vagy poligonális volt élénk eozinofíliával. A daganatsejtek alveoláris tereket formáltak, melyeket finom, szinuszoid-szerű erek fogtak körül. **(1-2. kép)** A PAS-D festéssel típusos, diasztáz rezisztens, PAS pozitív, citoplazmális krisztalloid struktúrákat és/vagy finom, porszerű granulomokat észleltünk a vizsgált esetekben **(3. kép)**. Az tumorok immunohisztokémiai profilját a **4. táblázat** mutatja. Két esetben (2-es és 3-as esetek) erős, diffúz vimentin és fokális, közepes-erős desmin reakciót észleltünk **(4. kép)**. Szintén két eset (1-es és 2-es) mutatott moderált myoglobin pozitivitást, de csak egyben észleltünk simaizom aktin (SMA) reakciót. Mind a négy tumor szarkomerikus aktin (SRCA) pozitív volt, mely jellegzetes citoplazmális granuláris mintázatot adott **(5. kép)**. A MyoD1 marker szintén granuláris, nem-specifikus, citoplazmális reakciót adott mind a négy esetben. Az alkalmazott neurogén markereknél az észlelt reakció változó intenzitású volt. Mind a négy eset moderált, diffúz, részben granuláris neuron specifikus enoláz (NSE), és fokális, néhol

granuláris PGP9.5 reakciót mutatott, míg csak egy eset volt S100 pozitív. Mind a négy daganat KL1 negatív volt, és csak két esetben figyeltünk meg korlátozott proliferatív aktivitást a Ki67 reakcióval a 2-es és 4-es jelű tumorok perifériáján (**4. táblázat**)

4. táblázat A négy alveoláris lágyrész sarcoma immunoprofilja.

antitest	1. eset	2. eset	3. eset	4. eset
vimentin	-	+	+	-
desmin	-	+ (fokális)	+ (fokális)	-
myoglobin	+	+	-	-
α -sarcomeric actin (SRCA)	+ (granuláris)	+ (granuláris)	+ (granuláris)	+ (granuláris)
α -smooth muscle actin (SMA)	-	+ (fokális)	-	-
MyoD1	-	-	-	-
neuron specific enolase (NSE)	+ (fokális)	+	+	+
S100	-	-	+ (fokális)	-
KL1	-	-	-	-
PGP9.5	+ (fokális)	+ (fokális)	+ (fokális)	+ (fokális)
Ki67 (mib1)	1% alatt	8%	1% alatt	14%

Interfázis citogenetika (FISH)

Mind a négy eset szignifikáns numerikus kromoszómális eltéréseket mutatott. Ezek mono-, tri-, vagy tetraszómia formájában mutatkoztak, amelyek a preparátumokban egy, három, vagy négy *in situ* hibridizációs szignálként jelentkeztek. Az adatok az **5. táblázatban** láthatók. Mind a négy esetben 1-es kromoszóma triszómiát észleltünk, melyek közül kettőben a triszómiás sejtpopuláció meghaladta a 10%-ot (13% és 19% az 1-es és 2-es esetekben) (**6. kép**). Az első esetben, a 4-eshez hasonlóan, az 1-es kromoszóma tetraszómiája elérte a 6%-ot, amely a triszómiás populációval együtt 19%-nak adódott. Ez 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 erre a kromoszómára nézve. 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 (**6. kép**). 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 nyeres 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 többlet, triszómia csak két esetben (2-es 8% és 3-as 7%) mutatkozott. A 22% monoszómia mellett, 7% triszómiát és 7% tetraszómiát is láttunk a 3-as esetben, mely az aneuszómiás populációt 36 %-ra emelte. A 10-es kromoszóma esetében az eltérések 13% monoszómia és 8% tetraszómia voltak a 2-es, illetve 3-as esetben, míg a 12-es kromoszómánál az 1-es és 3-as esetekben a daganatsejtek 12% illetve 9%-a mutatott monoszómiát a másik két eset diszómiája mellett. A 15-ös és 17-es kromoszómák kapcsán a kontrollhoz viszonyítva nem találtunk változást. Ezzel ellentétben a 18-as kromoszóma esetén monoszómiát észleltünk az összes vizsgált tumorban (18%, 11%, 19% és 18% az 1-es, 2-es, 3-as, 4-es esetben). Az egyik férfi beteg mintájában, az egyetlen szex-diszkordáns leletként 8% diszómiát figyeltünk meg az X kromoszómánál. A 17q25-qtel. próbával az 1-es esetben a daganatsejtek 15%-ában találtunk szignálvesztést. A másik három daganatban (2-es, 3-as és 4-es esetek) 2 szignál/sejtmag volt megfigyelhető. (**6. kép**)

5. táblázat A négy eset kromoszómális eltérései százalékban kifejezve.

kromoszóma	eltérés	kontroll+3SD	case 1	case 2	case 3	case 4
1	triszómia	1.4+1.05%	13%	19%	7%	4%
3	triszómia	3.5+4.05%		13%	9%	
	tetraszómia	0.2+0.6%			8%	4%
4	monoszómia	3.3+4.8%		27%		9%
	triszómia	0.8+2.7%			12%	
6	monoszómia	3.3+6.6%	11%	11%	12%	
7	monoszómia	3.3+0.6%				13%
	triszómia	0.7+1.05%	10%	13%	54%	30%
	tetraszómia	0%	4%		9%	
8	monoszómia	2.7+3.45%	18%	12%	22%	23%
	triszómia	0.5+0.6%		8%	7%	
	tetraszómia	0%			7%	
10	monoszómia	2.9+3.15%		13%		
	tetraszómia	0%			8%	
12	monoszómia	3.1+2.63%	12%		9%	
17q25-qtel.	monoszómia	0%	15%			
18	monoszómia	4.8+4.8%	18%	11%	19%	18%
X	diszómia	0%			8%	

Csak az átlag kontroll + 3xSD értékeket mutatjuk. A 10%-ot elérő értékek vastagon szedettek. Az üres helyek normoszómiát jelentenek. A 8%-os X diszómia férfi betegnél alakult ki.

III/5 Megbeszélés

Christopherson és munkatársai 1952-ben egy új, jellegzetes, igen ritka lágyrész sarcoma típust írtak le. Azóta ez a daganat, az alveoláris lágyrész sarcoma (ASPS), a patológusok állandó “cél táblájává vált” annak sejteredete tekintetében. Az ASPS az összes malignus lágyrész daganat kevesebb, mint 1%-t alkotja. (27) Főleg a végtagok, a törzs és a fej-nyak régió lágyrészeiben fordul elő. Jellegzetesen lassan növekvő tumor, amely a tüdőben, az agyban, illetve a vesékben képezhet áttéteket, néha a primer tumor megjelenése után évekként. (11,28,35) Ritkábban a daganat előfordulhat az uterusban, a mediastinumban illetve a lágyrészeken kívül, primer tumorként a csontokban is. (14,38,34)

A kutatók többsége bizonyítékot próbált keresni a tumor myogén eredetére. (3,7,13,15,16,19,27,30,31,32,36) A morfológiai hasonlatosság, illetve az immunoprofil miatt néhány más lehetőség is (paraganglioma, granular sejtes myoblastoma, neurogén eredet, angioreninoma) felmerült. (8,23,32) A számos publikáció ellenére egyik sem tudott meggyőző bizonyítékot felfedni a valós eredettel kapcsolatban. Ezért ezt a daganatot még ma is az ismeretlen eredetű lágyrész sarcomákhoz soroljuk. Habár immunohisztokémiai leletünk bizottsággal nem tudja igazolni az eredettel kapcsolatos egyik elméletet sem, rámutat a daganat myogén differenciálódásának/eredetének a lehetőségére, hiszen vizsgált eseteink 75%-ában desmin és/vagy myoglobint pozitívan észleltünk (az 1-es eset myoglobint, a 3-as desmint, a 2-es desmint, myoglobint és SMA pozitívan mutatott). Néhány izomspecifikus marker expressziója, mint például a SRCA és a MyoD1 szintén érdekesnek bizonyult. Mindkettő finom granuláris mintázatot mutatott, amely hasonló néhány neurogén marker (NSE, PGP9.5) esetén tapasztaltakhoz. Ez nagy valószínűséggel nem-specifikus immunreakciót jelent. A MyoD1 (korai, intranukleáris myogén regulátor protein) immunreakciója kapcsán az adatok ellentmondásosak. (9) Rosai és munkatársai beszámoltak egy olyan esetről, amelyben a MyoD1 a daganatsejtek magjában erősen expresszáldott,

azonban ezidáig ezt a jelenséget más szerzők nem tudták megerősíteni. (17,40,46) Az ellentmondásos eredmények az alkalmazott eltérő fixálási és/vagy antigén feltárási módszerekkel magyarázhatók. Standard formol-paraffinos mintán citrát pufferes kuktás előkezelést alkalmazva eseteink közül egyik sem mutatott intranukleáris pozitivitást. A SRCA az irodalmi és saját adatok szerint megbízható markernek bizonyult a harántcsíkolt izom irányú differenciálódás kimutatására. (42) Eseteink mindegyikében erős, granuláris, citoplazmális, a MyoD1-hez és néhány neurogén markerhez hasonló expressziót tapasztaltunk. A hasonló mintázatú antigén expresszió mindenképpen felveti a nem-specifikus reakció lehetőségét, melyet igazolni, vagy elvetni csak újabb vizsgálatokkal (Western blot analízis) lehetne. A neurogén markerek fokális pozitivitása (NSE, PGP9.5, S100) nem bizonyíthatják a neurogén eredetet, mivel hasonló pozitív reakció más myogén eredetű daganatokban, sőt a normál harántcsíkolt, illetve simaizom esetén is várható. (5,22,29,44) A tumor ultrastrukturális analízise egy unikális, jellegzetes, elektrondenz krisztalloid struktúrát fedett fel, mely aktin filamentumokból áll. Mindemellett azonban ún. „krisztalloid deficiens” eseteket szintén előfordulnak, amely differenciáldiagnosztikus problémákat vethet fel. (45) A krisztalloid struktúrák pontos összetételére vonatkozólag egy immunelektronmikroszkópos tanulmány található csak. A vizsgálat kapcsán desmin és vimentin koexpressziót észleltek a krisztalloid állományában az intermedier filamenteken. Ezekre az adatokra alapozva a szerzők azt a következtetést vonták le, hogy az ASPS egy primitív myogén tumor, amely nem mutat sem egyértelmű rhabdomyogén, sem leiomyogén differenciálódást. (19)

Adatainkat az irodalomban találtakkal összehasonlítva hasonlóságokat és eltéréseket egyaránt találhatunk. Ezidáig 13 ASPS esetet vizsgáltak meg komparatív genomiális hibridizáció (CGH) módszerével, melynek során ismétlődő aberrációkat fedeztek fel. Ezek az 1q, 8q, 12q és 16p többlet („gain”). A fenti eredményekhez hasonlóan a kromoszómális anyag nyérése gyakori volt a mi eseteinkben is, amelyek ismétlődő triszómiák, néhol tetraszómiák

formájában jelentkeztek. Kariotipizálás módszerét felhasználva a fentieken kívül 8 újabb esetet elemeztek. Egy esetben X „painting”, illetve 17-es centromerikus és telomerikus próbákkal végzett FISH-val is kiegészítették a vizsgálatot. A 8 esetből 6-ban főleg a disztális q25 szegmenseket érintő 17-es kromoszóma eltéréseket találtak, melyek részben 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. (10,18,21,26,41,43,48) 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), találtunk. Ílymódon a kapott eredmények alapján nem zárhatjuk ki az esetleges kisebb eltéréseket ebben a régióban a másik három esetben. Éppen ezért eredményeink szintén nem zárják ki annak a lehetőségét, hogy az adott szegmensben lévő gének játszanak szerepet az ASPS kifejlődésében, vagy progressziójában, de rámutatnak arra, hogy a nagy kromoszómális szegmenseket érintő 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. (4,43,48) Csak az utóbbi, a 8-as triszómia volt megfigyelhető egyik esetünkben (2-es) az interfázis magok 8%-ában. Ez azonban nem tekinthető specifikusnak erre a sarcoma típusra, hiszen 8-as triszómia más lágyrész tumorokban is, előfordul (clear cell sarcoma, a myxoid liposarcoma, a Ewing sarcoma, kongenitális fibrosarcoma).(4)

Az interfázis FISH vizsgálataink során talált sokféle kromoszómális változás közül a legjelentősebbnek a 7-es triszómia (4/4 eset), a 8-as és a 18-as monoszómia (4/4 eset) bizonyult. A 6-os monoszómia és 1-es triszómia kevésbé gyakori, de ismétlődő elváltozások

voltak. Bár 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 a fentebb leírt 7-es, illetve 1-es triszómiát, valamint 6-os, 8-as és 18-as monoszómiát nem találtak ASPS-ban. (49) Jelenleg nincs ismert kapcsolat az egyes numerikus vagy struktúrális kromoszómális változások és a betegség klinikai progressziója, vagy a daganat metasztatizis-képző hajlama között, mivel a molekuláris patológiai módszerekkel vizsgált és publikált esetek száma kevés, illetve nincs releváns adat a vizsgált esetek klinikai követéséről. A feltárt eltérések jellegzetesnek tűnnek az ASPS-ra, de nem specifikusak, hiszen más, teljesen eltérő hisztogenezisű tumorok is mutathatók, habár jóval kisebb számban, hasonló numerikus kromoszómális elváltozást. Például a primer és metasztatikus malignus melanómák egy részében, az 1p36 vesztes mellett, a 7-es és 1-es kromoszómák számbeli növekedése ismert. (6,37) A 7-es és 1-es triszómia, mint ismétlődő numerikus eltérés gyomor, oesophagus illetve colorectális, és lokalizált prostata adenocarcinómákban, valamint papilláris vesecarcinómákban egyaránt előfordul. (2,24,25,39) Ezért 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, bármilyen daganatban, mint szignifikáns numerikus aberráció még nem fordult elő. (24, 49)

A FISH lényegét tekintve ki kell emelni: a vizsgált nukleáris populáció kevert. A daganatsejtekhez stromális és endoteliális sejtek is hozzákeverednek hígítva a célpopulációt. Ezért a leírt eredmények bizonyosan alulreprezentálják a genetikai aberrációk valószínű frekvenciáját. Az közölt ASPS esetekben a vizsgálómódszer főleg konvencionális kariotipizálás volt. Egy daganat interfázis mag populációja a jóval kisebb metafázis

populációnál jobban reprezentálhatja egy olyan tumor egészét, amelynek proliferatív aktivitása alacsony (Ki-67 index a **4-es táblázatban**). Az interfázis citogenetikai vizsgálat tehát kiegészíti a konvencionális kariotipizálás során nyert adatokat, és újakat tehet hozzá a meglévőkhöz ezzel is bővítve az adott tumor patogenezisére vonatkozó ismereteinket (49).

III/6 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. Bár 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. Az említett aneuszómiákat ezidáig még nem írták le ASPS-ben.
5. Eseteink közül egyben tudtuk a 17-es kromoszóma hosszú karjának delécióját igazolni. Ez kevesebb, mint ahogy azt az irodalmi adatok alapján vártuk. Ennek a magyarázata az, hogy az alkalmazott próbával finom kromoszómális elváltozások nem minden esetben vizualizálhatók, azonban a kromoszóma veszteség, 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 veszteségének az esélye ASPS-ben kicsiny.
6. A kapott kromoszómális eltérések frekvenciája felveti annak a lehetőségét, hogy az adott szegmensekben lévő gének játszanak szerepet az ASPS kifejlődésében, vagy progressziójában.

Irodalom

1. Auerbach HE, Brooks JJ.: Alveolar soft part sarcoma. A clinicopathologic and immunohistochemical study. *Cancer* 60: 66-73. 1987
2. Barranco MA, Alcaraz A, Corral JM, Sole M, Mallofre C, Llopis J, Rodriguez A, Ribal MJ, Alvarez-Vijande R, Carretero P.: Numeric alterations in chromosome 7 and 8 detected by fluorescent in situ hybridization correlate with high-grade localized prostate cancer. *Eur. Urol* 34: 419-425. 1998
3. Carstens PHB.: Membrane-bound cytoplasmic crystals, similar to those in alveolar soft part sarcoma, in human muscle spindle. *Ultrastruct. Pathol* 14: 423-428. 1990
4. Craver RD, Heinrich SD, Correa H, Kao YS.: Trisomy 8 in alveolar soft part sarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet* 81: 94-96. 1995
5. Coindre JM, de Mascarel A, Trojani M, de Mascarel I, Pages A.: Immunohistochemical study of rhabdomyosarcoma. Unexpected staining with S-100 protein and cytokeratin. *J. Pathol* 155: 127-132. 1988
6. D'Alessandro I, Zitzelsberger H, Hutzler P, Lehmann L, Braselmann H, Chimenti S, Hofler H.: Numerical aberrations of chromosome 7 detected in 15 micron paraffin-embedded tissue sections of primary cutaneous melanomas by fluorescence in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *J. Cutan Pathol.* 24: 70-75. 1997
7. Denk H, Krepler R, Artlieb U, Gabbiani G, Rungger-Brandle E, Leoncini P, Franke WW.: Proteins of intermediate filaments. An immunohistochemical and biochemical approach to the classification of soft tissue tumors. *Am. J. Pathol* 110: 193-208. 1983
8. DeSchryver-Keckskemeti K, Kraus FT, Engleman W, Lacy PE.: Alveolar soft part sarcoma- A malignant angioendothelioma. Histochemical, immunohistochemical, and electronmicroscopic study of four cases. *Am. J. Surg. Pathol* 6: 5-18. 1982

9. Dias P, Parham DM, Shapiro DN, Tapscott SJ, Houghton PJ.: Monoclonal antibodies to the myogenic regulatory protein MyoD1: Epitope mapping and diagnostic utility. *Cancer Research* 52: 6431-6439. 1992
10. van Echten J, van den Berg E, van Baarlen J, van Noort G, Vermey A, Dam A, Molenaar WM An important role for chromosome 17, band q25, in the histogenesis of alveolar soft part sarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet* 82: 57-61. 1995
11. Enzinger FM, Weiss SW (3rd ed.): Alveolar soft part sarcoma. In Enzinger FM, Weiss SW eds. *Soft Tissue Tumors*. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc.: 1067-1074. 1995
12. Evans HL.: Alveolar soft part sarcoma. A study of 13 typical examples and one with a histologically atypical component. *Cancer* 55: 912-917. 1985
13. Fisher ER, Howard R.: Electron microscopic evidence suggesting the myogenous derivation of the so-called alveolar soft part sarcoma. *Cancer* 27: 150-159. 1971
14. Flieder DB, Moran CA, Suster S.: Primary alveolar soft-part sarcoma of the mediastinum: a clinicopathological and immunohistochemical study of two cases. *Histopathology* 31: 469-473. 1997
15. Foschini MP, Ceccarelli C, Eusebi V, Skalli O, Gabbiani G.: Alveolar soft part sarcoma: immunological evidence of rhabdomyoblastic differentiation *Histopathology* 13: 101-108. 1988
16. Foschini MP, Eusebi V: Alveolar soft part sarcoma: a new type of rhabdomyosarcoma? *Semin. Diag. Pathol*: 11; 58-68. 1994
17. Gomez JA, Amin MB, Ro JY, Linden MD, Lee MW, Zarbo RJ.: Immunohistochemical profile of myogenin and MyoD1 does not support skeletal muscle lineage in alveolar soft part sarcoma. A study of 19 tumors. *Arch. Pathol. Lab. Med* 123: 503-507. (1999)
18. Heimann P, Devaick C, Debusscher C, Sariban E, Vamos E.: Alveolar soft-part

- sarcoma: further evidence by FISH for the involvement of chromosome band 17q25. *Genes Chromosomes Cancer* 23: 194-197. 1998
19. Hirose T, Kudo E, Hasegawa T, Abe JI, Hizawa K.: Cytoskeletal properties of alveolar soft part sarcoma. *Hum. Pathol* 21: 204-211. 1990
 20. Jong R, Kandel R, Fornasier V, Bell R, Bedard Y.: Alveolar soft part sarcoma: review of nine cases including two cases with unusual histology. *Histopathology* 32: 63-68. 1998
 21. Joyama S, Ueda T, Shimizu K, Kudawara I, Mano M, Funai H, Takemura K, Yoshikawa H.: Chromosome rearrangement at 17q25 and Xp11.2 in alveolar soft-part sarcoma: A case report and review of the literature. *Cancer* 86: 1246-1250. 1999
 22. Kapadia SB, Meiss JM, Frisman DM, Ellis GL, Heffner DK.: Fetal rhabdomyoma of the head and neck: A clinicopathologic and immunophenotypic study of 24 cases. *Hum. Pathol* 24: 754-765. 1993
 23. Karauchnow PH, Magner D. The histogenesis of alveolar soft part sarcoma. *J. Pathol.* 86: 169-177. 1963
 24. Katsura K, Sugihara H, Nakai S, Fujita S.: Alteration of numerical chromosomal aberrations during progression of colorectal tumors revealed by a combined fluorescence in situ hybridization and DNA ploidy analysis of intratumoral heterogeneity. *Cancer Genet. Cytogenet.* 90: 146-153. 1996
 25. Kattar MM, Grignon DJ, Wallis T, Haas GP, Sakr WA, Pontes JE, Visscher DW. Clinicopathologic and interphase cytogenetic analysis of papillary (chromophilic) renal cell carcinoma. *Mod. Pathol.* 10: 1143-1150. 1997
 26. Kiuru-Kuhlenfelt S, El-Rifai W, Sarlomo-Rikala M, Knuutila S, Miettinen M.: DNA copy number changes in alveolar soft part sarcoma: a comparative genomic hybridization study. *Mod. Pathol* 11: 227-231. 1998

27. Lieberman PH, Brennan MF, Kimmel M, Erlandson RA, Garin-Chesa P, Flehinger BY.: Alveolar soft part sarcoma. A clinico-pathologic study of half of a century. *Cancer* 63: 1-13. 1989
28. Lillehei KO, Kleinschmidt-DeMasters B, Mitchell DH, Spector E, Kruse CA.: Alveolar soft part sarcoma: an unusually long interval between presentation and brain metastasis. *Hum. Pathol* 24: 1030-1034. 1993
29. Miettinen M, Rapola J.: Immunohistochemical spectrum of rhabdomyosarcoma and rhabdomyosarcoma-like tumours. Expression of cytokeratin and 68-kD neurofilament protein. *Am. J. Surg. Pathol* 13: 120-132. 1989
30. Miettinen M, Ekfors T.: Alveolar soft part sarcoma. Immunohistochemical evidence for muscle cell differentiation. *Am. J. Clin. Pathol* 93: 32-38. 1990
31. Mukai M, Torikata C, Iri H, Mikata A, Sakamoto T, Hanaoka H, Shinohara C, Baba N, Kanaya K, Kageyama K.: Alveolar soft part sarcoma. An elaboration of a three-dimensional configuration of the crystalloids by digital image processing. *Am. J. Pathol* 116: 398-406. 1984
32. Mukai M, Torikata C, Shimoda T, Iri H.: Alveolar soft part sarcoma. Assessment of immunohistochemical demonstration of desmin using paraffin sections and frozen section. *Virchow Archiv A Pathol. Anat* 414: 503-509. 1989
33. Pajor L, Szuhai K, Méhes G, Kosztolányi G, Jáksó P, Lendvai G, Szanyi I, Kajtár P.: Combined metaphase, interphase cytogenetic and flow cytometric analysis of DNA content of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry* 34: 87-94. 1997
34. Park YK, Unni KK, Kim YW, Han CS, Yang MH, Wenger DE, Sim FH, Lucas DR, Ryan JR, Nadim YA, Nojima T, Fletcher CDM. Primary alveolar soft-part sarcoma of bone. *Histopathology* 35: 411-417. 1999
35. Perel Y, Rivel J, Alos N, Pignol ML, Guillard JM. Alveolar soft part sarcoma. A rare

- tumor of unusual evolution in pediatrics. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol* 15: 435-438. 1993
36. Persson S, Willems JS, Kindblom LG, Angerwall L.: Alveolar soft part sarcoma. A immunohistochemical, cytologic and electron-microscopic study and a quantitative DNA analysis. *Virchow Archiv A Pathol. Anat* 412: 499-513. 1988
 37. Poetsch M, Woenckhaus C, Dittberner T, Pambor M, Lorenz G, Herrmann FH.: An increased frequency of numerical chromosomal abnormalities and 1p36 deletions in isolated cells from paraffin sections of malignant melanomas by means of interphase cytogenetics. *Cancer Genet. Cytogenet* 104: 146-152. 1998
 38. Radig K, Buhtz P, Roessner A.: Alveolar soft part sarcoma of the uterine corpus. Report of two cases and review of the literature. *Pathol. Res. Pract* 194: 59-63. 1998
 39. Rao PH, Mathew S, Lauwers G, Rodriguez E, Kelsen DP, Chaganti RS.: Interphase cytogenetics of gastric and esophageal adenocarcinomas. *Diagn. Mol. Pathol* 2: 264-268. 1993
 40. Rosai J, Dias P, Parham DM, Shapiro DN, Houghton P.: MyoD1 protein expression in alveolar soft part sarcoma as confirmatory evidence of its skeletal muscle nature. *Am. J. Surg. Pathol* 15: 974-981. 1991
 41. Sciot R, Dal Cin P, de Vos R, van Damme B, de Wever I, van den Berghe H, Desmet VJ.: Alveolar soft part sarcoma: evidence for its myogenic origin and for the involvement of 17q25. *Histopathology* 23: 439-444. 1993
 42. Skalli O, Gabbiani G, Babai F, Seemayer TA, Pizzolato G, Schürch W.: Intermediate filament proteins and actin isoforms as markers for soft tissue tumor differentiation and origin. II. Rhabdomyosarcomas. *Am. J. Pathol* 130: 515-531. 1988
 43. Sreekantaiah C, Li FP, Weidner N, Sandberg AA.: Multiple and complex abnormalities in a case of alveolar soft part sarcoma. *Cancer Gen. Cytogen.* 55: 167-171. 1991

44. Suster S, Moran CA, Koss MN.: Rhabdomyosarcomas of the anterior mediastinum: report of four cases unassociated with germ cell, teratomatous, or thymic carcinomatous components. *Hum. Pathol* 25: 349-356. 1994
45. Tucker JA.: Crystal-deficient alveolar soft part sarcoma. *Ultrastruct. Pathol* 17: 279-286. 1993
46. Wang NP, Bacchi CE, Jiang JJ, McNutt MA, Gown AM.: Does alveolar soft-part sarcoma exhibit skeletal muscle differentiation? An immunocytochemical and biochemical study of myogenic regulatory protein expression. *Mod. Pathol* 9: 496-506. 1996
47. Welsh RA, Bray DM, Shipkey FH, Meyer AT.: Histogenesis of alveolar soft part sarcoma. *Cancer* 29: 191-204. 1971
48. Culinane C, Thorner PS, Greenberg ML, Kwan NgY, Kumar M, Squire J.: Molecular genetic, cytogenetic, and immunohistochemical characterization of alveolar soft-part sarcoma. *Cancer* 70: 2444-2450. 1992
49. T. Tornóczy, E. Kálmán, Z. Sápi, 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.

IV. Rövidítések

ASPS	alveolar soft part sarcoma
ATP	adenozin trifoszfát
ATP	adenozin trifoszfát
CD34	endotél és hemopoietikus marker
CGH	Comparative genomic hybridization
CK	cytokeratin (AE1-AE3)
c-kit	CD-117, <i>c-kit</i> tirozin kináz fehérje elleni antitest jelölése
CSF-1	colony stimulating factor-1
FISH	fluoreszcens <i>in situ</i> hybridizáció
FNCLCC	French Federation of Cancer Centers
GANT	gastrointestinal autonomic nerve tumor
GIST	gastrointestinal stromal tumor
GIMT	gastrointestinal mesenchymal tumor
sGIST	GIST, szűkebb értelemben
tGIST	GIST, tágabb értelemben
GNB-M	ganglioneuroblastoma, intermixed
GNB-N	ganglioneuroblastoma, nodular
GN-M	ganglioneurinoma, mature (érett)
GN-MG	ganglioneurinoma, maturing (érő)
HE	hematoxilin-eozin
HPF	high power field (nagy nagyítású látótér)
ICC	interstitial cell of Cajal
INSS	International Neuroblastoma Staging System
INPC	International Neuroblastoma Pathology Committee
Ki67	mib-1, proliferációs marker
LMS	leiomyosarcoma
LOH	loss of heterozigosity
MPNST	malignant peripheral nerve sheath tumor
NB-DF	neuroblastoma, differentiating (differenciálódó)
NB-PD	neuroblastoma, poorly differentiated (rosszul differenciált)

NB-UD	neuroblastoma, undifferentiated (differentiálatlan)
NF	neurofilament
N-myc PCR	kompetitiv <i>N-myc</i> polimeráz lánreakció
NSE	neuron specificus enolase
PCR	polymerase chain reaction
SMA	smooth muscle actin
SRCA	sarcomeric actin
SN	synaptophysin

V. Saját közlemények, előadások és absztraktok jegyzéke

Publikációk jegyzéke

1. T. Tornóczy, 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. Tornóczy, K. Szuhai: Multiple tumor case: Report and analysis of an autopsy case. *Tumori*, 83: 719-721, 1997
3. T. Tornóczy, 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., Tornóczy Tamas dr.: Pyeloureteralis obstructiót okozó fibroepithelialis polyp gyermekkorban. *Orvosi Hetilap* 139(50), 3019-3021, 1998
5. T. Tornóczy, E. Kálmán, G. Hegedűs, Ö.P. Horváth, Z. Sápi, 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. Tornóczy, 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. Tornóczy 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, Tornóczy 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. Tornóczy 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 cysplatin-combined chemotherapy protocol. *Cancer Detection and Prevention* 24(Suppl.1) s-248, 2000

Kongresszusi 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 clinicopathológiája. Klinikopathológiai Konferencia POTE, Gyermekklinika, 1992, Pécs
3. Tornóczy Tamás, Méhes Gábor, Pajor László: Barrett oesophagus térképbiopsias vizsgálata immunhistochemiai és flow cytometriás módszerekkel, Magyar Pathologus Társaság Kongresszusa, Székesfehérvár, 1994.
4. Tornóczy Tamás: Dunántúli Pathologus Találkozó, előadás (Esetismertetés) Pécs, 1995.
5. Tornóczy Tamás: Candida albicans okozta septicus endocarditis csecsemőben. Klinikopathológiai Konferencia, POTE Tudományos Szakosztálya, Pécs, 1996.
6. Tornóczy Tamás: A fej-nyak régió daganatainak molekuláris pathológiája. Harmadik Tudományos Hétvége, Pécs, 1997.
7. Tornóczy Tamás: A víruskimutatás lehetőségei a nôgyógyászati pathológiában. Klinikopathológiai Konferencia, POTE Tudományos Szakosztálya, Pécs, 1997
8. Tornóczy Tamás: Nasopharyngealis carcinoma esete. Anaplasias nagysejtes lymphoma esete. EBER-RNA-ISH EBV kapcsolt daganatokon. Haematopathológiai Tutorial, Pécs 1997.
9. Tornóczy Tamás: EBV kimutatás oligonucleotid próbákkal, EBER-mRNA-ISH módszerével. Novocastra-Vector Symposium, Budapest, 1997.
10. Tornóczy Tamás: Az electronmicroscopia szerepe a pathológiai diagnosztikában. (kreditpontos kurzus medicusoknak) Pécs, 1998.

11. Olasz L., Tóth B., Németh Á., Kubatov M., Tornóczy T.: Kiterjedt facialis carcinoma komplex ellátása. A Magyar Onkológusok Társasága Dunántúli Szekciója V. Tudományos Vándorgyűlése, Pécs, 1998
12. Dr. Györke Zsuzsa, Dr. Kollmann Erzsébet, Dr. Tornóczy Tamás, Dr. Kustos Gyula, Dr. Sulyok Endre.: Hormontermelő mellékvesekéreg adenoma. ENDOPED 98. A Magyar Gyermekendokrinológiai Szekció Tudományos Ülésének Programja. Dobogókő, 1998
13. Tornóczy Tamás dr., Kálmán Endre dr., Pajor László Dr., Kelényi Gábor Dr.: EBER oligonucleotid in situ hybridizatio EBV-asszociált daganatokban (EBER versus LMP-1, előemésztés versus microhullámú kezelés). A Magyar Pathológusok Társaságának és a Nemzetközi Pathológiai Akadémia (IAP) Magyar Divíziójának Kongresszusa, Gyula, 1998
14. 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
15. 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
16. Tihanyi M., Battyány I., Tornóczy T.: Lágyrész tumorok diagnosztikai és terápiás problémái. A Magyar Sebész Társaság Dél-Dunántúli Sectiójának Tudományos Ülése. Bonyhád, 1998
17. 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 and 2nd Joint Meeting of Hungarian-German Neuropathologists. Budapest, 1999
18. Tihanyi M., Tornóczy T., Battyány I.: Duodenalis leiomyosarcoma esete situs inversus totalisban észlelt betegnél. A Magyar Sebész Társaság Dél-Dunántúli Sectiójának Tudományos Ülése. Mohács, 1999

19. Tornóczy Tamás , Vass János A., Kajtár Pál, Lendvai Gábor, Pajor László: N-myc amplifikatio vizsgálata humán neuroblastomákban és neuroblastoma sejtvonalakon kompetitív N-myc PCR segítségével. Magyar Humán-genetikai Társaság II. Kongresszusa: Pécs, 1999
20. 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
21. Tornóczy Tamás : Cellularis typusú foetalis rhabdomyoma esete. Dunántúli Pathologus Találkozó. Pápa, 1999.
22. 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.
23. H. Ábrahám, T. Tamás, G. Kosztolányi, L. Seress: Peri- and postnatal cell formation in the human brain. Society for Neuroscience. Miami Beach, Florida, 1999
24. Tornóczy Tamás : Alveolaris lágyrészsarcoma. Congenitalis mesoblastos nephroma. Országos Metszetkonzultáció. Budapest, SOTE II. sz. Pathologiai Intézet, 2000 jún. 2.
25. Tornóczy Tamás : A neuroblastos tumorok legújabb klasszifikációja és molekuláris patológiája. Magyar Pathologusok Társasága Dunántúli Pathologus Sectio Tudományos Ülése, Tatabánya, Komárom-Esztergom Megyei Szent Borbála Kórház, Pathologiai Osztály, 2000 nov. 2.
26. Tornóczy Tamás: A gyermekkori kis kereksejtes tumorok differenciáldiagnosztikája. A Magyar Gyermekonkológiai Munkacsoport Tudományos Ülése. Budapest, 2000 dec. 8.
27. Tornóczy Tamás: A neuroblastoma patológiája. A MGYT Gyermekonkológiai Sectioja XXX. Tudományos Ülése. Visegrád, 2001 jún. 1.

VI. Köszönetnyilvánítások

Először családomnak, kislányomnak, feleségemnek szeretnék köszönetet mondani, támogatásukért, türelmükért, biztatásukért. Sok időt vettem el tőlük, és bár kárpótolni ezt nehéz lenne, remélem ők is úgy gondolják, hogy a munka nem volt hiábavaló. Köszönettel tartozom szüleimnek, hiszen általuk olyan környezetben nőttem fel, ahol az igényes szellemi munka alapvető érték és elvárás volt mindenkivel szemben.

A tudományos fokozat eléréséhez elkészített dolgozat általában az addig végzett tudományos munka összegzésének számít, így talán feljogosít az elmúlt 12 év eseményeinek végiggondolására. Abban, hogy érdeklődő TDK hallgatóból patológus lettem, és abban, hogy az is maradtam meghatározó szerepe volt Kelényi professzor Úrnak, aki intézetébe fogadott, személyes példamutatásával, szorgalmával, állandó érdeklődésével, tanításával ösztönzött, a hibákat azonnal jelezte. Köszönet mindezért. Ezúton mondok köszönetet Pajor professzornak, jelenlegi főnökömnek, munkám támogatásáért, illetve az intézeti infrastruktúra európai szintű kibővítéséért, amely lehetővé teszi a magas szintű rutin és kutatómunka végzését. Ezúton szeretném megköszönni Kajtár professzor Úrnak, a Gyermekonkológiai Munkacsoport vezetőjének támogatását, biztatását, melynek révén a neuroblastos tumorok kutatása és igényes feldolgozása, molekuláris diagnosztikája intézetünk és a gyermekklinika kooperációjában elindult. Ennek eredménye több európai neuroblastoma kutatócsoporttal kiépült jó kapcsolatunk is. Csak köszönettel tartozhatok kedves kollégámnak, és barátomnak Dr. Kálmán Endrének, akivel több tudományos problémát igen kritikus szemlélettel vitattunk meg, melyek eredménye közös tudományos közleményekben, előadásokban nyilvánult meg, de elért a mindennapos rutin diagnosztika és oktatás szintjére is. Köszönöm kedves kollégámnak Vass Jánosnak hathatós segítségét, mely hozzájárult munkám eredményességéhez, valamint Jáksó Pálnak a flow citometriás analízisek elvégzését. Több intézeti asszisztensek, Medve Lászlónénak, Kneif Józsefnének, Bornemissza Gergőnek, Horváth Eszternek, Csala Juditnak, és Rödler Miklósnénak is köszönettel tartozom a preparátumok elkészítésében nyújtott segítségükért.