

# Fej-nyaki daganatok mikrokörnyezetének molekuláris vizsgálata

---

Doktori (PhD) értekezés

**Dr. Járai Tamás**

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs egyetemi tanár

Kutatási témavezető: Dr. Márk László egyetemi docens

Klinikai témavezető: Dr. Lujber László egyetemi docens



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Általános Orvostudományi kar

Fül-orr-gégészeti és Fej-nyaksebészeti Klinika

Pécs

2018

## 1. Bevezetés

A fej-nyaki daganatok több, mint 90%-a laphámrák, ezek 5 éves túlélési aránya csupán mintegy 60%. A daganatok gyakran előrehaladott stádiumban kerülnek felismerésre a specifikus tünetek hiányának és a diagnosztikai nehézségeknek köszönhetően. Minél előrehaladottabb stádiumú a daganat, annál invazívabb diagnosztikus és terápiás eljárások szükségesek. Ezért egy korai molekuláris diagnózis alapvető jelentőséggel bírna a túlélés növelése céljából. Az utóbbi évtizedekben a túlélési ráta nem sokat javult a diagnosztikus és terápiás módszerek fejlődése ellenére.

A dolgozat célkitűzései ezekből az adatokból adódtak – szükség volna egy olyan szélesebb körben is elérhető módszerre, amely lehetővé tenné a daganatok korai felismerését és lehetőséget adna nyomon követésre.

### 1.1. Fej-nyaki daganatok epidemiológiája

Hazánkban a hat leggyakoribb kiemelt halálóki csoport közül a kardiovaszkuláris eredetű után másodikként a daganatok okozta halálozás szerepel. Az európai mortalitási adatok szerint a magyar férfiak az első, míg a magyar nők a második helyen állnak a daganatos mortalitási statisztikát illetően. A hazai Központi Statisztikai Hivatal adatai szerint a felső légúti- és tápcsatornai daganatok által okozott halálesetek száma nagymértékben megnőtt az 1970-es évek óta, ez különösen az ajak- és szájüregi malignus folyamatoknak köszönhető, melyek száma háromszorosára növekedett, mortalitások közel ötszörösére nőtt.

A fej-nyaki daganatok mortalitása szignifikánsan megváltozott az elmúlt 50 évben, Európát tekintve megduplázódott. Amíg a magyarországi összdaganatos halálozás 2,8-szorosára nőtt az 1948 és 2000 közötti időszakban, addig a fej-nyaki daganatos halálozás 6-szorosára emelkedett. Az adatok azt mutatják, hogy a legdinamikusabban emelkedő halálozási arány Magyarországon a fej-nyaki daganatok esetében figyelhető meg, ez az arány Európán

belül nálunk a legmagasabb.

Az 1970-es évek óta a mortalitás közel hatszorosára nőtt, míg Európa-szerte csak megkétszereződött, így hazánk az európai országok élén áll.

## 1.2. Etiológia és rizikófaktorok

A fej-nyaki daganatok kialakulását befolyásoló etiológiai tényezők közül elsősorban az elvileg megváltoztatható magatartásformák, mint a dohányzás és túlzott alkoholfogyasztás szerepe emelhető ki.

### 1.2.1. Dohányzás

A legfontosabb oki tényező a dohányzás. Karcinogenezis szempontjából nemcsak a cigaretta formájában történő fogyasztás a fontos, hiszen a dohányzás füsttel, vagy füst nélkül is rendkívül káros. A passzív dohányzás kétszeresére növeli a dohányosokkal együtt élők körében a légúti rákban történő megbetegedések valószínűségét.

Magyarországon a 15 éves és idősebb lakosság csaknem harmada, összességében több mint 2,5 millió ember dohányzik, többségük napi rendszerességgel. A dohányzás hirtelen abbahagyása csak lassan vezet eredményhez, a magas kockázatot legalább 3 évig nem befolyásolja, ezután a rizikó csak fokozatosan csökken, és csak kb. 10-15 év múlva éri el a nemdohányzók szintjét.

### 1.2.2. Alkoholfogyasztás

Szintén alapvető etiológiai tényező az alkoholfogyasztás minden formája. A hazánkban jellemző alkoholfogyasztási szokások kedveznek a daganatok kialakulásának. A fogyasztott ital mennyisége mellett fontos az alkohol minősége is: a Magyarországon jellemző tömény szeszesital fogyasztás kiemelten káros hatású. A két rizikófaktor együttes előfordulása 15-szörösére emeli a fej-nyaki tumorok kockázatát mivel az etanol elősegíti a dohányfüst karcinogén anyagainak felszívódását.

### 1.2.3. Rossz szájhigiéne

A rossz szájhigiéne önmagában is mechanikai irritatív tényezőt, így krónikus gyulladást, sőt, prekancerózus elváltozásokat eredményez, emellett a plakk mikroflórája által termelt acetaldehid direkt kémiai karcinogén hatással bír. A rossz szájhigiéne bizonyítottan emeli az orális HPV fertőzés gyakoriságát is.

### 1.2.4. Infekciók

A szájüregi és oropharyngealis daganatok 40-60%-ában mutatható ki a HPV DNS-e. Az esetek több, mint 95%-ában a magas malignitású P16-os szerotípus mutatható ki a nyelvgyök, tonsillo-lingualis átmenet környékén elhelyezkedő tumorból. Más tanulmányok szerint az EBV ill. a JCV együttes vagy külön jelenléte is összefüggésbe hozható a hám eredetű szájüregi daganatokkal.

### 1.2.5. Alultápláltság, helytelen táplálkozás

A felszívódási zavarok kb. 10-15 %-ban lehetnek a szájüregi daganatok okai.

### 1.2.6. Immunszuppresszív állapotok

Az immunrendszer károsodása okozhatja a rosszindulatú szájüregi daganatok kifejlődését.

### 1.2.7. Életkor és nem

A fej-nyaki laphámrákok néhány évvel ezelőtt Európában, így hazánkban is, döntően 40 év felett fordultak elő, az elmúlt években azonban a fiatalabb korosztály egyre nagyobb arányú érintettségét látjuk. A nemek közötti különbségek részben az addiktív tényezők gyakoriságbeli különbözőségével, részben pedig habitusbeli okokkal.

### 1.2.8. Külső tényezők, foglalkozás

Ionizáló sugárexpozíció, a levegőszennyezettség, a rossz szociális viszonyok, a stressz szerepet játszhatnak a karcinogenezis folyamatában, a betegek késői orvoshoz fordulása az előrehaladott stádiumok miatt pedig a túlélési esélyeket rontja.

### 1.2.9. Endogén, genetikai tényezők

A környezeti hatás érvényesüléséhez a szervezet állapota lényegesen hozzájárul, ezt az egyéni érzékenységet nagymértékben endogén, genetikai tényezők határozzák meg

### 1.3. A korai felismerés és kezelés jelentősége

A fej-nyaki daganatok magas mortalitásának talán legfőbb oka, hogy a betegek legtöbbször csak a betegség előrehaladott stádiumában kerülnek felismerésre, amikor a terápiás lehetőségek eleve korlátozottak. Nincsenek kizárólag csak a fej-nyaki tumorokra jellemző tünetek, a daganatok sokáig „rejtve” maradhatnak, sokszor egy-egy banális betegségtől csak a szimptomák fennállásának hossza alapján lehet elkülöníteni őket.

Amennyiben a diagnózis korai és nincs nyaki áttét, sebészi megoldás vagy sugárterápia általában kiváló hosszú távú eredményhez vezet, azonban a betegek többsége nem ebbe a csoportba tartozik, legtöbb esetben csak kiterjesztett műtét jön szóba sebészi terápiaként.

### 1.4. Prevenációs lehetőségek

Annak ellenére, hogy az esetszámok stagnálni látszanak az utóbbi években, a szokatlanul magas halálozási arány miatt mind a primer, mind a szekunder prevencióra is nagyobb hangsúlyt kellene fektetni, hogy ez a népegészségügyi probléma leküzdhetővé váljon.

A **primer prevenció** a karcinogén anyagok elkerülésére összpontosít, fej-nyaki rákok esetében például a mérsékeltebb alkoholfogyasztásra és dohányzás mellőzésére.

A **szekunder prevenció** (szűrés) a betegség korai, premorbid stádiumában való felismerését célozza. A primer és szekunder prevenció határán a molekuláris és prediktív epidemiológia játszik fontos szerepet a daganatok prevenciójában. A primer és a szekunder prevenció határán mozog a prediktív és molekuláris epidemiológia, mely a korai biomarkerek segítségével, mint

érzékeny biológiai indikátorokkal az expozíció→betegség folyamat valamely lépését a definitív betegség diagnosztikus markereinek pozitivitása előtt jelzi-

**A terciér prevenció a betegek** rehabilitációját, a szövődmények, a metasztázisok, a recidívák kivédését jelenti. Módszere a gondozás és rehabilitáció.

## **2. Elméleti alapok**

### 2.1. Karcinogenezis

A daganatképződés egy többlépcsős folyamat, melyhez genetikai, epigenetikai módosulások kellene a normál sejtekben, amiket pedig különböző környezeti hatások idéznek elő, és így válnak tumorsejteké. Az utóbbi évek kutatásaira alapozva megalkották az úgynevezett cancer-field elméletet, mely széles körben elfogadott a fej-nyak tumorok kialakulásának sémás mechanizmusaként.

### 2.2. Tumormarkerek

Tumormarkereknek tekintünk minden olyan testazonos anyagot, amelynek megjelenése vagy koncentrációjának változása jelzi a tumort.

A tumormarkerek alapvetően két csoportra oszthatók:

- Elsődleges (primer) markerek. Olyan molekulák, amelyeket a daganatsejtek termelnek, és mennyiségi változásuk a vérből vagy a daganatszövetből kimutatható. Szerkezetük szerint igen sokfélék lehetnek: fehérjék, kis molekulatömegű hormonok, nukleinsavak stb.
- Másodlagos (szekunder) markerek. A tumor növekedési sajátágaiból és a szervezet válaszreakcióiból származó molekulák. Elvben bármilyen mérhető laboratóriumi paraméter felfogható szekunder markernek. Ezek a paraméterek egyáltalán nem daganat specifikusak, de jelzik a szervezet érintettségét.

### 2.3. Nyáldiagnosztika

A nyálban található fehérjék, fehérje töredékek, és egyéb patológiás biomarkerek analitikai vizsgálata nagyban hozzájárul a modern diagnosztika fejlődéséhez. Napjainkban számos olyan kutatás folyik, amely a betegségekre jellemző fehérjék és egyéb biomarkerek kimutatását célozza, hiszen könnyen hozzáférhető, noninvazív, nem időigényes, nem drága és nagy mennyiség nyerhető belőle

## 3. Vizsgálataink célja

1. Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy nyálból kimutathatók-e fej-nyaki daganatos betegekre jellemző tumorspecifikus biomarkerek számító proteinek?
2. Az azonosított proteinek mennyire specifikusak fej-nyaki daganatokra?
3. Az azonosított tumormarkerek vélt proteinek valóban megtalálhatók-e a daganatos, illetve a környező szövetekben?
4. A proteinek szövetekben való megoszlásának vizsgálatával a mikro környezetben lezajló változások mennyire jellemezhetők - tumorgenezis?
5. További célunk volt egy gyors, megbízható és lehetőség szerinti egyszerű vizsgálati protokoll kidolgozása, mely a későbbiekben egy nagy betegszámú tanulmány alapjául szolgálhatna.

## 4. Analitikai módszerek

### 4.1. Mintavétel

A nyálminták gyűjtésére hideg csapvizes öblítést követően, stimulálás nélkül került sor reggel 8 és délelőtt 10 óra között mind a tumoros, mind a kontrollcsoportban egy széles körben elfogadott módszer szerint. A résztvevőket megkértük, hogy a begyűjtés előtt öblítsék ki a szájüregüket háromszor csapvízzel; a nyálmintákat a nem-stimulált szájüregben, a

bukkális redőből 5 ml-es fecskendővel vettük, majd Eppendorf csőben (Eppendorf Austria GmbH, Bécs, Ausztria) jégen tároltuk. Ezt követően a mintákat 2500/min fordulaton, 12 percig, 4°C-on centrifugáltuk. A nyálminták felülúszóját további vizsgálatokig -80°C-on tároltuk.

#### 4.2. Elektroforézis

A fehérjék azonosításához legtöbbször nem tiszta, nem csak egyféle fehérjét tartalmazó oldat áll rendelkezésünkre. A benne lévő fehérjéket szét kell választani. Az elektroforetikus módszerek mára a legnépszerűbb szeparációs technikák közé tartoznak. Lényegük, hogy vizes közegben létrehozott elektromos térben a töltéssel rendelkező molekulák elmozdulnak az ellentétes töltésű elektród felé. Ha a vándorlásuk iránya vagy sebessége különböző, a molekulák egymástól elválaszthatók. A vándorlás sebessége függ a molekula töltésétől, tömegétől és a súrlódási együtthatótól, továbbá az elektromos tértől.

Fehérjék esetében a legjobb felbontást az SDS-PAGE biztosítja, ahol a fehérjéket nátrium-dodecil-szulfát (SDS) jelenlétében denaturálják, így azok egymástól elválaszthatók lesznek kizárólag a tömegük alapján. Ismert molekulatömegű fehérjékkel kalibrálva lehetőség nyílik a fehérjék molekulatömegének meghatározására.

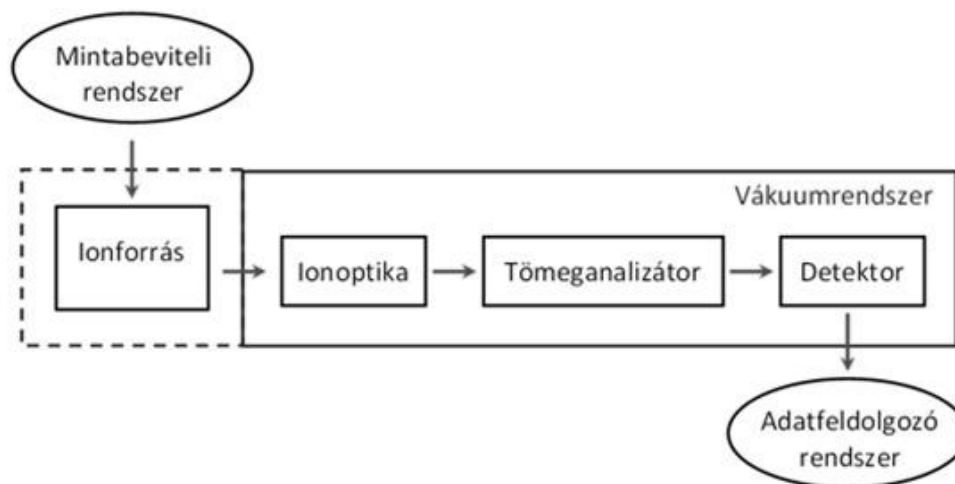
#### 4.3. Tömegspekrometriás vizsgálat

A tömegspektrómétria (mass spectrometry, MS) szerves és szervetlen komponensekből képződött ionok tömeg/töltés ( $m/z$ ) arányának mérésén alapuló nagyhatékonyságú szerkezetvizsgáló és analitikai módszer. A módszer azon alapul, hogy az elemzett anyag részecskéiből a gép ionokat állít elő, majd ezeket relatív tömegük és töltésük hányadosa szerint az analitikus rendszere szétválasztja.

##### 4.3.1. A tömegspektróméter felépítése és működése



A tömegspektrométer részei: mintaelőkészítő-bevivő rendszer, ionforrás, analizátor és detektor, valamint az ezekhez kapcsolódó számítógépes adatfeldolgozó és irányító rendszer.



**1. ábra:** Tömegspektrométer működési elvének sematikus rajza

#### 4.3.2. Mintaelőkészítés

Tömegspektrometriával elméletileg bármilyen halmazállapotú sokkomponensű rendszer vizsgálható, azonban ezt nagyban befolyásolja az alkalmazott mintabeviteli és ionizációs technika. Illékony vegyületeket (például: gázok, könnyen párolgó anyagok) közvetlenül be lehet vezetni a forrásba, ahol az ionizáció megtörténik.

#### 4.3.3. Ionforrások

A méréshez szükség van a vizsgált részecskék ionizálására. Az ionizációs technika megválasztását főként a vizsgálandó molekula és az azt körülvevő mátrix határozza meg. Mivel univerzálisan alkalmazható ionizációs technika nincs, így a készülékek fejlődésénél meghatározó szerepű a különböző ionforrások cseréjének gyorsasága és egyszerűsége.

#### 4.3.4. Analizátor

Az analizátorban a képződött ionok szétválasztása történik a tömegük és a töltésük hányadosa szerint. Minél kisebb az ion tömege és minél nagyobb a töltése, annál nagyobb

sebességre képes szert tenni egy adott gyorsítófeszültség hatására. Minőségi analízist végezhetünk, a gép alkalmas a nagy áteresztőképességet igénylő mérésekre (high throughput típus), hiszen akár napi 6500 mérést is képes elvégezni automatizált üzemmódban.

#### 4.3.5. Detektor

A tömegspektrométerben haladó ionok csoportja lényegében a forrástól a detektorig tartó elektromos áramot jelent. A készülékek detektorai a hozzájuk érkező rendkívül kis ionáramot ( $10^{-10}$ – $10^{-15}$  A) érzékelik, és értékével arányos analóg elektromos jelet képeznek.

#### 4.3.6. Fragmentálás és tandem tömegspektrometria

Ha viszonylag kis energiával ionizáljuk a vizsgálandó anyagunkat, akkor a molekulák egészben maradnak, és a tömegükre és töltésükre jellemző ún. molekulacsúcsot [ $M^+$ ,  $M^-$ ] kapunk. Többnyire azonban jóval nagyobb mennyiségű információ nyerhető, ill. speciális problémákra (pl. több anyag elkülönítése, szekvenálás) jobb megoldást jelent, ha a részecskéket kinetikus energia hozzáadásával pontosan szabályozott módon széttördeljük, fragmentáljuk. Ez a folyamat végbemehet az ionizációs folyamat során, ill. röviddel utána (in source és post source decay, ISD, PSD), vagy az analizátorban egy inert gázzal való ütközés révén (collision induced dissociation, CID; és electron transfer dissociation, ETD).

#### 4.3.7. A tömegspektrum

A tömegspektrum a tömeg/töltés ( $m/z$ ) arány és az ionintenzitás függvényeszerű ábrázolása. A legmagasabb csúcs a báziscsúcs, ehhez viszonyítjuk az összes többi komponenst. Az abszolút ionmennyiség arányos a mintában jelen levő anyagmennyiséggel, a fragmentumok relatív ionintenzitásai pedig a molekulatípusra és az alkalmazott mérési eljárásra jellemzőek.

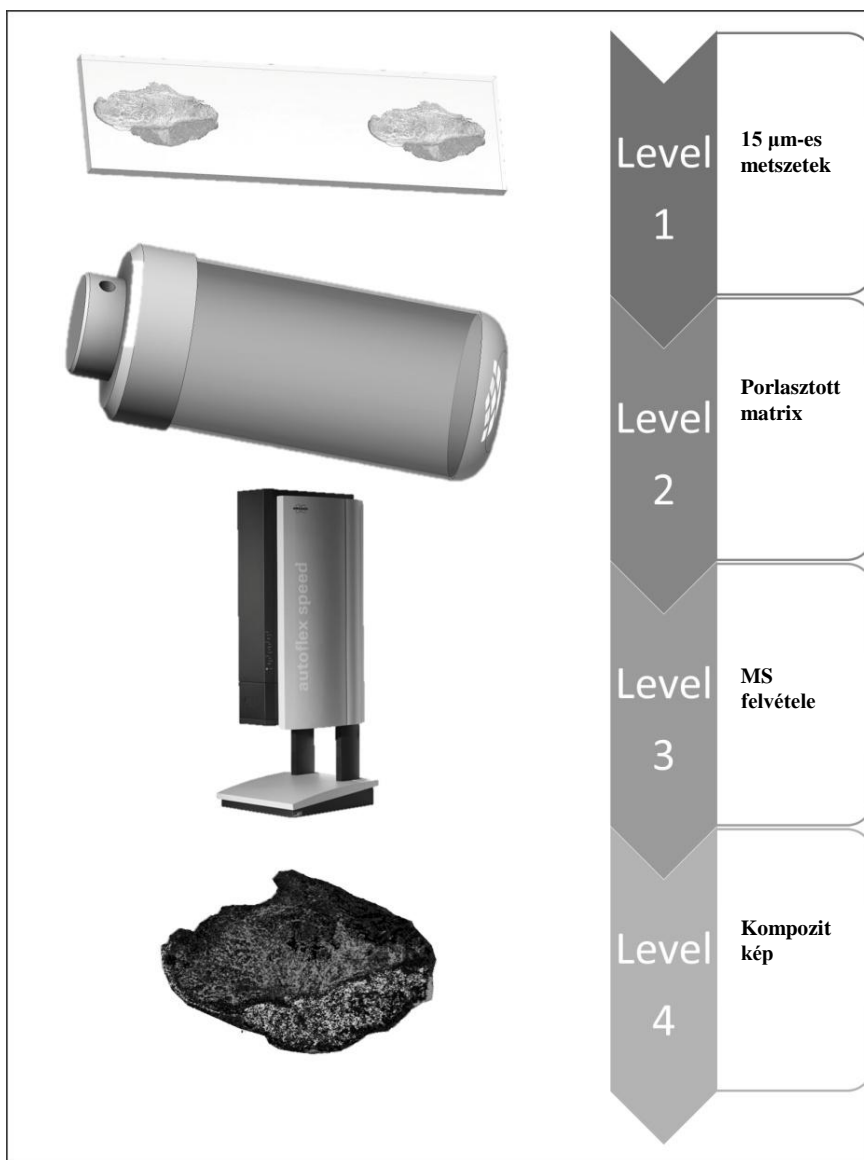
#### 4.3.8. Fehérjék azonosítása - PMF (Peptide Mass Fingerprinting)

A fehérjék proteolitikus hasítási termékeinek adatbázisban történő lekeresésén alapuló vizsgálatok alapját az képezi, hogy a fehérjék adott specificitású enzimmal, vagy kémiai úton

való emésztése révén kapott peptidekhez a szekvenciájuknak megfelelő tömegek tartoznak. Ez azt jelenti, hogy adott szekvenciával rendelkező fehérje egy tömeglistát ad meghatározott emésztés során, amit az adatbázis lekeresések az adatbázisban lévő fehérjék elméleti emésztése során kapott peptidek tömeglistájával hasonlítanak össze. Ilyen adatbázis kereső programok például a Mascot, SwissProt, NCBI nr. Az adatbázis keresés felhasználja a peptidek MS/MS spektrumát, amely alapján lehetséges aminosav szekvenciákat határoz meg, összevetve ezt az adatbázisban lévő fehérjék szekvenciájával.

#### 4.4. Képkalkotó tömegspektrometria (MALDI-IMAGING)

Napjaink egyik legígéretesebb peptid és protein biomarker diagnosztikai alkalmazása a MALDI TOF/TOF tömegspektrometriára épülő képkalkotó módszer (MALDI Imaging), amelynek során egy speciális mintatartóra 10-20 mikronos szövettani metszetet és mátrixot szárítunk. Ezt követően a mintáról előre meghatározott szisztémában és lézerintenzitással több ezer tömegspektrumot veszünk fel. Ezeket a megfelelő szoftver az egyes  $m/z$  értékekhez tartozó intenzitások alapján képként jeleníti meg. A módszer óriási előnye, hogy párhuzamosan alkalmazható az egyéb (in vivo fluoreszcens, NMR, MRI, CT, FT-IR) képkalkotási módszerekkel, így olyan új tudományos és diagnosztikai eredményeket szolgáltat, amelyek forradalmasítják a klinikai diagnosztika mai módszertanát. A MALDI imaging lehetőséget ad a fehérjék vizsgálatára direkt in situ a szöveti felszíneken, vagy vékony metszetekben, megőrizve a szövet szerkezeti integritását. Következésképp olyan kép hozható létre, mely igen hasonlatos a szövettani metszetéhez és a molekuláris komponensek térbeli eloszlását mutatja. Így nem csak ép és kóros szövet közötti különbség tehető láthatóvá, hanem lehetőséget ad arra is, hogy a malignus transzformáció olyan korai szakaszát észleljük, amely szövettanilag még nem detektálható.



**2. ábra:** Képképzési tömegspektrometria folyamata

#### 4.5. Immunhisztokémia, konfokális mikroszkópia

A sejtek morfológiai sajátosságait vizsgálhatjuk festés után hagyományos képképző eljárásokkal, de ellenanyagokkal való specifikus jelölés segítségével pontosabb molekuláris információkra tehetünk szert. A sejtek intracelluláris és sejt felszíni fehérjemolekulái ellen fejlesztett specifikus poli- vagy monoklonális ellenanyagokkal, enzim vagy kovalensen kötött fluoreszcens jelzés felhasználásával immunhisztokémiai eljárással mikroszkópos megfigyeléseket tehetünk a sejtek fehérje alkotóelemeiről. A konfokális mikroszkóp

fluoreszcensen jelölt minták vizsgálatára alkalmas. Jobb felbontású képeket ad, mint a hagyományos fluoreszcens mikroszkópok, és képes "optikai szeletelésre", vagyis képet alkotni a minta egyetlen szeletéről. A kapott digitális kép számítógéppel kezelhető és elemezhető. Több szelet képét összerakva a fluorofór térbeli elhelyezkedése is vizsgálható.

## **5. Eredmények**

Kísérleti munkánk két fázisra tagolódott. Az elsőben elvégeztük a beteganyagból származó nyálminták proteomikai elemzését annak érdekében, hogy fehérje biomarkereket azonosítsunk. A második fázisban a betegek szövettani metszeteiből származó mintákat képkalkotási tömegspektrometria segítségével vizsgáltuk a biomarkerként azonosított proteinek lokális eloszlásának, expressziójának meghatározása céljából. A dolgozat is ezt a felépítést követi, így az eredmények részben két nem egyező számú beteganyagon végzett multimodális vizsgálat eredményeit mutatom be.

### **5.1. Fehérje biomarkerek azonosítása nyálmintákból**

#### **5.1.1. Beteganyag**

A kutatásban 25, az anyaggyűjtésbe beleegyező, fej-nyaki tumorban szenvedő beteg (10 nő, 15 férfi) vett részt; az átlagéletkor 56,48 év volt (a legfiatalabb beteg 22, a legidősebb 78 éves volt). A fej-nyaki tumoros betegeket egy 25 egészséges önkéntesből álló kontrollcsoporttal (15 dohányzó, 10 nem dohányzó) hasonlítottuk össze kor és nem szerint. A tumoros csoportban 19 betegnél malignus, 6 betegnél benignus fej-nyaki daganat állt fenn. A fej-nyaki laphámkarzinómával diagnosztizált betegek mindegyike erős dohányosnak számított (legalább 1 csomag cigaretta naponta). A betegek közül senki sem részesült terápiában a nyálminta gyűjtését megelőzően.

#### **5.1.2. SDS-PAGE**

Az előkészített mintákat SDS-poliakrilamid gélen futattuk, hogy a fehérjék méret szerint szétváljanak. Az elektroforetogrammon tisztán kivehető a különbség a kontrol és a tumoros nyálminták összetételében.

### 5.1.3. Tömegspektrometriás elemzés

Az elektroforetikus futtatás után a géleket bescanneltük, majd a vizuális összehasonlító elemzés után, az extra sávokat, amelyek a betegek mintáiban keletkeztek, szikével kimetszettük.

A tömegspektrometriás méréshez Autoflex II TOF/TOF típusú (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) készüléket használtuk. A MALDI TOF „peptid mass fingerprint (PMF)” elkészítésére a LIFT mode for PSD (post source decay) és CID (collision induced decay) fragmentációt alkalmaztunk automatizált üzemmódban, FlexControl 2.4 számítógépes program vezérlésével. A mérések során  $m/z$  800 és 5000 között detektáltuk a tömegspektrumokat, és minden egyes mérési eredményt 500 egymást követő lézerlövés egyesített adataiból számoltunk ki.

A fehérjék PMF azonosítása MSDB (Swiss-Prot) és NCBI-nr adatbázisok alkalmazásával, majd MASCOT adatbázis (MASCOT Server 2.2 search engine, MatrixScience Ltd., London, UK) keresőmotor és Bruker BioTools 3.0 software (BrukerDaltonics, Bremen, Germany) segítségével történt. A MALDI-TOF/TOF tömegspektrometria felhasználásával azonosítottuk azokat a fehérjéket, melyek jelenléte kimutatható a betegségek manifesztációja során, illetve amik diagnosztikai értékűek lehetnek. A meghatározás során rögzítettük az elsődleges tömegspektrumot, majd ezt követően a nagyobb intenzitású, vagy diagnosztikailag jelentős peptideket PSD,- vagy CID fragmentációval tovább bontottuk. Így tudtuk meghatározni a peptidek pontos elsődleges szerkezetét és annak módosulásait

A legnagyobb mennyiségben jól ismert, általános funkciójú proteineket találtunk a

daganatos és az egészséges önkéntesek mintáiban, mint amiláz, keratinok és aktin. Emellett az annexin 1, zinc finger protein 28, regulator G-protein 3, indoleamine 2,3-dioxygenase, OFD1 protein és CEP290 proteinek emelkedett szintje volt regisztrálható a daganatos betegek nyálmintáiban.

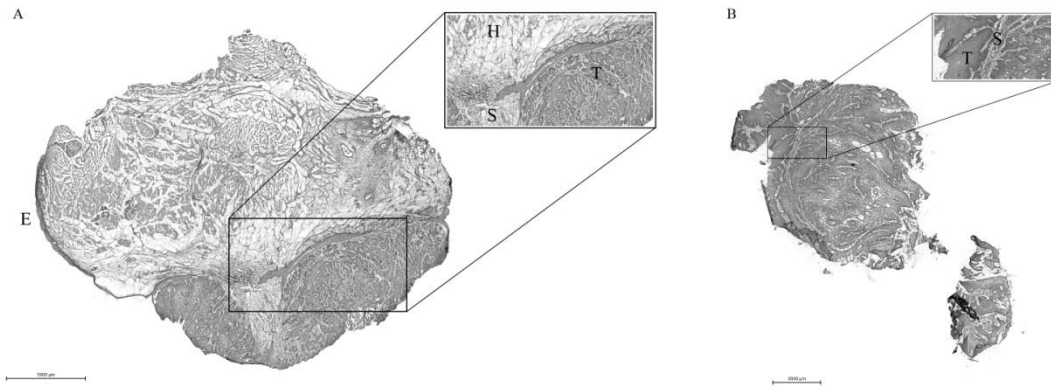
## **5.2. Biomarkerként azonosított fehérjék lokális expressziójának meghatározása képkalkotási tömegspektrometriás vizsgálatokkal**

Méréseink során számos olyan korábban biomarkerként azonosított fehérjét detektáltunk, amelyek megjelenése a neoplasztikus vagy stromalis környezetre korlátozódott. Dolgozatomban ezek közül csak kettőt emelnék ki, amelyek jelenléte az epitheliális eredetű neoplasztikus elváltozásokban a mai napig is számos kérdést vet fel. Ez a két fehérje a kalciumkötő fehérjékhez tartozó S100 proteinek közé sorolható S100A8 és A9.

### **5.2.1. Beteganyag, mintavétel**

Ebben a vizsgálati szakaszban 32 önként jelentkező fej-nyaki daganatos beteg vett részt (6 nő, 26 férfi), átlagéletkoruk 60,44 év (43 - 81 év) (függelék 4. táblázat). Minden betegről az előzőekben már részletesen tárgyalt módszerrel nyálmintát gyűjtöttünk. Ezt követően a fej-nyaki betegek kivizsgálási protokolljának megfelelően minden beteg úgynevezett direct laryngoscopián esett át.

A vizsgálat során a daganatra gyanús elváltozás mellett a környező stromális és a daganattól távoli, makroszkóposan is egészségesnek vélt területből is mintát vettünk. Szövettanilag minden minta jól differenciált laphámkarcinómának bizonyult. In situ hibridizációs méréseink alapján minden minta HPV negatív volt.

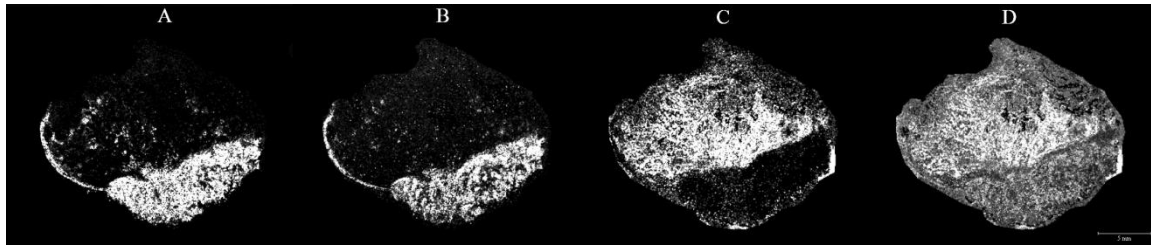


**3. ábra:** Standard haematoxylin-eosin festésű szövettani metszetek. Mindkét minta szövettanilag jól differenciált laphámkarcinómát mutat alacsony mitotikus aktivitással, minimális atípiával és minimális keratinizációs jelleggel.

#### 5.2.2. Képképző tömegspektrometria

A kiválasztott fej-nyaki daganatos betegek CMC-be ágyazott fagyasztott metszeteit előkészítettük MALDI IMS vizsgálatra: A szövettanilag nem daganatosnak bizonyult régiókat használtuk a vizsgák minták kontrolljaiként. Ebben a vizsgálatban, S100A8 és az S100A9 helyi megoszlását vizsgáltuk fehérjék felhasználásával MALDI TOF / TOF tömegspektrometriás imaging segítségével. Nyilvánvalóvá vált, hogy a calgranulinok overexpressziója a daganatos és a neostromalis területekre lokalizálódik, nem figyelhető meg a nem daganatos, egészséges szövetekben. A daganatos és az egészséges területek között szignifikáns különbségek mutathatóak ki. Meglepetésként észleltük a calgranulin jelenlétét a nem daganatos hámfelszínen is. Itt enyhe hiperplázia volt észlelhető, de szignifikáns gyulladás, vagy invazív jelleg nem.





**4. ábra:** A vizsgált proteinek eloszlásai imaging MS segítségével a B2-es szövettani metszeteken. S100A8 (A), S100A9 (B), hemoglobin alfa lánc (C). D: A három vizsgált protein eloszlásának kompozit képe.

## 6. Megbeszélés

Az elmúlt néhány évben a proteomika jelentős fejlődésen ment át, jelenleg képesek vagyunk azonosítani és jellemezni sejtekből, szövetekből és biológiai folyadékokból kivont fehérjéket, valamint meghatározni azok relatív mennyiségét. A proteomika nagy jelentősége abban van, hogy a genom szintjén kódolt és a fehérjék szintjén végrehajtott jelátvitel, szabályozás, enzimatikus aktivitás és szerkezeti sajátosságok közvetlenül vizsgálhatók fehérje szinten. A fej-nyaki laphámrákok rossz túlélési arányának javításában az elsődleges és valószínű recidiváló tumorok korai felismerése a legfontosabb.

Vizsgálataink első fázisában azonosítottunk néhány, potenciálisan molekuláris biomarkernek bizonyuló fej-nyaki laphámkarzinómára jellemző fehérjét humán nyálmintából.

Munkánk második fázisa során a MALDI-t használtuk az S100A8 és A9 molekuláris vizsgálatára szövetmintákban és emberi nyálban. Eredményeink azt mutatták, hogy az S100A8 és A9 jelen van a nyálban, mint potenciális biomarker HNSCC esetén. Továbbá a proteinek overexpressziója figyelhető meg a daganatos szövetekben és a környező stromális régióban, de nincs jelen az ép szövetekben.

## 7. Az eredmények összefoglalása

1. Módszerünkkel sikerült nyálból több olyan alacsony molekulású peptidet azonosítanunk, melyek soros összefüggésbe hozhatók a fej-nyaki laphám karcinómával. Annak ellenére, hogy a daganatos folyamat kialakulásában betöltött pontos szerepüket még nem ismerjük, gyanítható, hogy a karcinogenezis korai szakaszának biomarkereinek tekinthetők. Korábban ezen peptidket szérumból, illetve tumorszövetből izolálták már, nyálból azonban kutatócsoportunknak sikerült elsőként kimutatni ezen biomarkereket.
2. Eredményeink azt mutatták, hogy, mint potenciális biomarker az S100A8 és A9 jelen van a nyálban fej-nyaki laphámkarcinóma esetén.
3. Vizsgálataink az S100A8 és S100A9 lokális expressziójának szignifikáns emelkedését mutatták a szövettani mintákban. A proteinek overexpressziója a daganatos szövetekben és a környező stromális régióban figyelhető meg, de nincs jelen az ép szövetekben.
4. A sejtciklus szabályozásában bizonyított szerepű calgranulinok up-regulációja a daganatos szövetekben és a nem daganatos, de hiperplastikus hámban azt sugallja, hogy az S100A8 és S100A9 peptidok a tumorok mikro környezetében lezajló változásokat mutattva potenciális biomarkerek lehetnek a tumorgenezis igen korai szakaszában.
5. Vizsgálati protokollunk egy jól működő, standardizálható folyamat, mely bármikor reprodukálható. A biomarkerek stabil kimutathatósága előrevetítheti szűrővizsgálatok lehetőségét.

## 8. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőimnek, Dr. Márk László és Dr. Lujber László egyetemi docens uraknak a PTE ÁOK Biokémiai Intézetéből és a PTE KK Fül-Orr-Gégészeti és Fejnyaksebészeti Klinikáról, akik odaadással segítettek dolgozatom megírását. Mindkét Intézet számos dolgozóját köszönet illeti a kutatások háttérmunkálatainak elvégzéséért.

Külön köszönettel tartozom intézetvezetőmnek, Dr. Gerlinger Imre professzor úrnak, a kitartó ösztönzésért, amivel a klinikai munka rutinjából kiszakítva a tudományos élet felé terelt, valamint, hogy biztosította számomra, hogy a mindennapi klinikai munka mellett időt fordíthassak a tudományos munkára is.

**Legnagyobb hálámat családomnak szeretném kifejezni, tudva azt, hogy milyen sokat segítettek a türelmükkel, szeretetükkel. Feleségem Tímea, kisfiam Dávid, valamint szüleim biztatása és áldozatvállalása mindenben segített.**

## 9. Tudományos közlemények

9.1. A témához kapcsolódó tudományos közlemények és előadások

1. Járai T, Maász G, Burián A, Bóna Á, Jámbor É, Gerlinger I, Márk L. Mass spectrometry-based salivary proteomics for discovery of head and neck squamous cell carcinoma. *Pathology And Oncology Research* 18(3):623-8, 2012 (IF:1.555)
2. Járai T, Schmidt J, Kajtar B, Raics K, Nyitrai M, Lujber L, Tornoczky T, Mark L. Local Expression of Calgranulins in the Tumor Microenvironment of Head Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Proteomics* (under review)
3. Járai T, Habon K, Károly B, Márk L, Móricz P, Gerlinger I. Fehérje biomarkerek azonosítása nyálból proteomikai módszerrel fejnyaki daganatoknál. Nemzeti Fül-, Orr-, Gégészeti Kongresszus, Budapest, 2010
4. Járai T, Maasz G, Schmidt J, Burián A, Kajtár B, Szanyi I, Lujber L, Gerlinger I,

Raics K, Márk L. Calgranulinok (S100A8/A9) localis expressiojának vizsgálata fejnyaki laphámcarcinomákban: tömegspektrometriás imaging vizsgálatok. MFOE 43. Kongresszus, Tapolca, 2014

5. Papai Z, Schmidt J, Jarai T, Maasz G, Mark L. Local expression of calgranulins in head neck squamous cell carcinoma, 32nd Informal Meeting on Mass Spectrometry, Balatonszárszó, 2014.05.11-14 (poszter)
6. Papai Z, Jarai T, Schmidt J, Burian A, Kajtar B, Maasz G, Raics K, Futo K, Lukacs A, Lujber L, Mark L. Local expression of calgranulins (S100 A8/A9) in head neck squamous cell carcinoma: an imaging mass spectrometric approach, 30th International Symposium on MicroScale Bioseparations, Pécs, 2014.04.27-05.01 (poszter)
7. Schmidt J, Papai Z, Jarai T, Burian A, Kajtar B, Tornoczky T, Mark L. Molecular Heterogeneity of Head Neck Squamous Cell Carcinoma. 2014. OURCON II. Imaging Mass Spectrometry Conference, Antalya, Turkey, 2014. November 18-21.

## 9.2. Egyéb tudományos közlemények

1. Pytel J, Hajas T, Járai T. A középfül rezonancia-frekvencia és az otoakusztikus emisszió frekvenciaspektrumának összefüggése. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 43, 1997 (7-13)
2. Járai T. Otoakusztikus emisszió az univerzális objektív újszülöttkori hallásszűrésben. Békésy-díjas pályamunka Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesülete 2001
3. Gerlinger I, Lujber L, Járai T, Pytel J. KTP-532 laser-assisted endoscopic nasal sinus surgery. Clinical Otolaryngology 28. 2., 67-71(2003) (**IF: 0.665**)g
4. Gerlinger I, Járai T, Pytel J. Laserfizikai alapismeretek klinikusoknak. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 48, (3), 2002 (165-176)
5. Móricz P, Hajas T, Járai T, Lujber L, Ráth G, Gerlinger I, Pytel J. Provox

- hangprotézis a pécsi Fül-, Orr-, Gégeklínikán (1996. május-2002. május). Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 49, (1), 2003 (17-21)
6. Pytel J, Járai T, Bognár. Auditoros steady-state válaszok. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 50, (1), 2004 (55-59)
  7. Gerlinger I, Ráth G, Járai T, Pytel J. Lézerrel asszisztált dobhártyapótlás a mellső negyedeket érintő és szubtotális perforációk eseteiben. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 50, (4), 2004 (300-305)
  8. Járai T, Somogyvári K, Gerlinger I, Ráth G, Pytel J. A mellékpajzsmirigy intraoperatív identifikálásának lehetőségei. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 50, (4), 2004 (312-319)
  9. Nagy Gy, Bauer M, Járai T, Németh A, Pytel J. A saccotomia szerepe a Meniere betegség kezelésében. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 50, (4), 2004 (345-348)
  10. Ráth G, Balázs K, Gerlinger I, Móricz P, Járai T, Bauer M, Pytel J. Gyermekkori tympanoplasticák hosszú távú audiológiai nyomonkövetése. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 50, (4), 2004 (358366)
  11. Somogyvári K, Járai T, Kálmán E, Kovács K, Pytel J. Mellékpajzsmirigy identifikálása contact endoscopos technikával cadaveren. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 50, (4), 2004 (367-371)
  12. Tóth E, Járai T, Pytel J. Orrműtétek eredményességének nyomonkövetése akusztikus rhinometria segítségével. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 50, (4), 2004 (376-379)
  13. Gerlinger I, Járai T, Lujber L, Pytel J. Poland's syndrome and head-and-neck tumour: an unusual association causing a reconstruction dilemma. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 264, 2007 (553-556) (**IF: 0.648**)
  14. Somogyvári K, Bakó P, Járai T, Szigeti N. Szokásostól eltérően készített percutan endoscopos gastrostoma fej- nyak daganatos betegeken. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat

53, (1), 2007

15. Gerlinger I, Járai T, Lujber L, Pavlovics G, Pytel J. Fej-nyak tumor Poland szindrómás betegben : rekonstrukciós dilemmát okozó ritka kombináció. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 53, (3), 2007
16. Szanyi I, Bauer M, Gerlinger I, Járai T, Göbel G, Lujber L, Szabadi E, Fehér K, Ember A, Ember I, Kiss I. Changes in expression of oncogenes and TP53 tumour suppressor gene as biomarkers in head and neck cancers. Eur Arch Otorhinolaryngol. 268(7):1041-6, 2011 (**IF: 1.287**)
17. Járai T, Maász G, Burián A, Bóna Á, Jámbor É, Gerlinger I, Márk L. Mass spectrometry-based salivary proteomics for discovery of head and neck squamous cell carcinoma. Pathology And Oncology Research 18(3):623-8, 2012
18. Járai T, Piski Z, Lujber L, Gerlinger I. Az arteria sphenopalatina endoszkópos ellátása makacs hátsó orrvérzések eseteiben - technika, buktatók, anatómiai variációk. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 59, (3), 2013
19. Járai T, Pápai Z, Schmidt J, Burian A, Kajtar B, Raics K, Nyitrai M, Gerlinger I, Tornoczky T, Mark L. Local Expression of S100A8/A9 in the Tumor Microenvironment of Head Neck Squamous Cell Carcinoma. Journal of Mass Spectrometry (under review)
20. Gerlinger I, Molnár K, Járai T, Menyhei G, Lujber L, Hegedüs I, Nepp N, Harmat K, Bölcsföldi T. B. Vezérfonal a fej-nyaki paragangliomák kivizsgálásához és kezeléséhez. Fül-Orr-Gégegyógyászat 63, (3) 2017

Könyvrészlet: Pytel J, Járai T, Somogyvári K, Gerlinger I, Móricz P. Intraoperative identification of parathyroid glands

in: Liber Amicorum, TorGraf 2009, Editor: Luisa Bellussi (p. 257-262)