

dc\_59\_10

**MTA Doktora Pályázat**

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

**Sápi Zoltán**

**Budapest, 2010.**

## Tartalomjegyzék

<b>Bevezetés .....</b>	<b>3</b>
<b>Módszer.....</b>	<b>6</b>
<b>Eredmények, megbeszélés.....</b>	<b>22</b>
1. A molekuláris módszerek alkalmazhatósága és haszna a preoperatív (aspirációs cytológiai) diagnosztikában.....	22
2. A molekuláris diagnosztika szükségessége, prognosztikai és prediktív értéke a mindennapi rutin szövettani diagnosztikában .....	33
3. Az óriássejtes csont tumor genetikai eltéréseinek vizsgálata.....	50
4. A synoviális sarcoma genetikai eltéréseinek és jelút-rendszereinek vizsgálata.....	68
5. A perifériás idegtumorok genetikai instabilitásának vizsgálata.....	80
6. A Gastrointestinális Stromális Tumor (GIST) mTOR jelút-rendszerének vizsgálata a molekuláris eltérések függvényében .....	95
<b>Válasz a célkitűzésekre, új megállapítások .....</b>	<b>106</b>
<b>Irodalomjegyzék .....</b>	<b>107</b>
<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>127</b>
<b>Sápi Zoltán közlemény jegyzéke (jóváhagyott MTMT szerint) .</b>	<b>128</b>
<b>Tudományos közlemények áttekintő adatai (jóváhagyott MTMT szerint).....</b>	<b>144</b>

## Bevezetés

A molekuláris vizsgálati és kutatási módszerek már meglehetősen régóta kulcsfontosságúak az alapkutatás területén, de újabban komoly előrelépés történt ezen a területen a mindennapi diagnosztikában illetve az alkalmazott kutatásban is. A molekuláris biológiai módszerek alkalmazása mindennapos lett a patológián belül is, sőt egyes speciális területeken – különösen a paraffinos metszeteken végzett vizsgálatok esetén – tovább finomodtak „molekuláris patológiai” módszerekké (161).

Legkorábban a limfoproliferatív betegségek diagnosztikája területén vált nélkülözhetlenné a molekuláris patológiai módszerek alkalmazása, de mostanában ugyanez a helyzet a lágyrész tumorok diagnosztikája esetén is, valamint a lágyrész és csontdaganatok kutatása se képzelhető el molekuláris patológiai módszerek alkalmazása nélkül. Természetesen a patológiai diagnosztikában az alapot ma is a haematoxylin-eosin festés képezi, de ahogy idővel nélkülözhetlenné vált az immunhisztokémia kiegészítő alkalmazása, ugyanez a helyzet a molekuláris patológiai módszerekkel mint kiegészítő módszerekkel is, különösen a lágyrész tumorok és részben a csont tumorok területén ( a limfoproliferatív daganatok után). Az említettek jelentőségét hangsúlyozza, hogy mind a klasszifikációhoz, mind a terápiához nélkülözhetlenné vált az adott cytogenetikai eltérés és az ehhez tartozó molekuláris történések megadása. (61,108)

A lágyrész és csont tumorok a daganatok mintegy 3-4%-át teszik ki, több mint 250 entitást tartanak számon, számos malignus entitás fiatal korban jelentkezik. A lágyrész és csont tumorok a molekuláris patogenezis tekintetében két nagy csoportra oszthatók. Az egyik csoportot a specifikus genetikai eltérések jellemzik ami sokszor viszonylag egyszerű kariotípussal társul, és ezen daganatok esetén reális illetve potenciális esély van specifikus target-terápiára. A másik csoportban a daganatok komplex kariotípussal rendelkeznek, nincs specifikus genetikai eltérés és ennek megfelelően nem lehet target-terápiát alkalmazni. Ma már kevés olyan lágyrész és csont daganatot ismerünk, aminek ne tudnánk a genetikai jellemzőit és jó részük - főleg a malignus daganatok esetén - megfelelő, a kereskedelmi forgalomban is kapható molekuláris próbák állnak a rendelkezésünkre. Az alábbiakban adjuk meg a lágyrész és csont tumorok esetén leggyakrabban előforduló cytogenetikai eltéréseket és az ehhez társuló molekuláris történéseket.

Histológiai típus	Citogenetikai eltérés	Molekuláris történet
Alveoláris légyszarcoma	t(X;17)(p11;q25)	<i>TPE3-ASPL</i> fúzió
Aneurysmális csont ciszta	t(16;17)(q22;p13)	<i>CDH11-USP6</i> fúzió
Angiomatoid fibrózus histiocytoma	t(12;16)(q13;p11) t(12;22)(q13;q12) t(2;22)(q33;q12)	<i>FUS-ATF1</i> fúzió <i>EWSR1-ATF1</i> fúzió <i>EWSR1-CREB1</i> fúzió
Extrasceletális myxoid chondrosarcoma	t(9;22)(q22;q12) t(9;17)(q22;q11) t(9;15)(q22;q21)	<i>EWSR1-NR4A3</i> fúzió <i>TAF2N-NR4A3</i> fúzió <i>TCF12-NR4A3</i> fúzió
Clear cell sarcoma	t(12;22)(q13;q12) t(2;22)(q33;q12)	<i>EWSR1-ATF1</i> fúzió <i>EWSR1-CREB1</i> fúzió
Dezmopaszitikus kis kerek sejtű tumor	t(11;22)(p13;q12)	<i>EWSR1-WT1</i> fúzió
Dermatofibrosarcoma protuberans	gyűrű 17 és 22 chr.-ból t(17;22)(q21;q13)	<i>COL1A1-PDGFB</i> fúzió <i>COL1A1-PDGFB</i> fúzió
Ewing sarcoma/PNET	t(11;22)(q24;q22) t(21;22)(q12;q12) t(2;22)(q33;q12) t(7;22)(p22;q12) t(17;22)(q12;q12) inv(22)q12;q12 t(16;21)(p11;q22)	<i>EWSR1-FLI1</i> fúzió <i>EWSR1-ERG</i> fúzió <i>EWSR1-FEV</i> fúzió <i>EWSR1-ETV1</i> fúzió <i>EWSR1-E1AF</i> fúzió <i>EWSR1-ZSG</i> fúzió <i>FUS-ERG</i> fúzió
GIST	1p,9p,14q és 22q deletio	<i>cKIT</i> és <i>PDGFRA</i> mutáció
Infantilís fibrosarcoma	t(12;15)(p13;q26) 8, 11, 17 és 20-as trisomia	<i>ETV6-NTRK3</i> fúzió
Inflammatorikus myofibroblastos tumor	t(1;2)(q22;p23) t(2;19)(p23;p13) t(2;17)(p23;q23) t(2;2)(p23;q13)	<i>TPM3-ALK</i> fúzió <i>TPM4-ALK</i> fúzió <i>CLTC-ALK</i> fúzió <i>RANB2-ALK</i> fúzió
Leiomyosarcoma	komplex gyakori 1p deletio	
Liposarcoma		
jól-differenciált	gyűrű 12 chr.-ból	<i>MDM2</i> és <i>CDK4</i> amplifikáció
myxoid	t(12;16)(q13;p11) t(12;22)(q13;q12)	<i>TLS-DDIT3</i> fúzió <i>EWSR1-DDIT3</i> fúzió
pleomorph	komplex	
Low grade fibromyxoid sarcoma	t(7;16)(q33;p11)	<i>FUS-CREB3L2</i> fúzió
Malignus perifériás ideghüvely tumor	komplex	
Myxofibrosarcoma	gyűrű 12 chr.-ból	
Rhabdoid tumor	22q deletio	<i>INI1</i> inaktiváció
Rhabdomyosarcoma		
alveoláris	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14)	<i>PAX3-FOXO1A</i> fúzió <i>PAX7-FOXO1A</i> fúzió
embryonális	8, 20 és 2q trisomia	
Synoviális sarcoma		
monofázisos	t(X;18)(p11;q11)	<i>SS18-SSX1,2,4</i> fúzió
bifázisos	t(X;18)(p11;q11)	főleg <i>SS18-SSX1</i> fúzió

Amint látható, számos lágyrész sarcoma jellegzetes cytogenetikai eltéréssel rendelkezik, ezek kimutatása molekuláris módszerrel nagy segítséget jelenthet mind a preoperatív, mind a végleges szövettani diagnosztikában. A csontdaganatok esetében jóval szerényebb a paletta, ugyanakkor egyes daganatok bizonytalan, néha kiszámíthatatlan biológiai viselkedésükkel szinte arra „serkentik” a kutatókat, hogy feltárva a genetikai eltéréseket összefüggést tudjanak kimutatni a daganat későbbi viselkedése és a genetikai eltérés között. Mindezek ismeretében *célkitűzéseimet* az alábbiakban adom meg:

*1, A molekuláris módszerek alkalmazhatósága és haszna a preoperatív (aspirációs cytológiai) diagnosztikában*

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

*3, Az óriássejtes csont tumor genetikai eltéréseinek vizsgálata*

*4, A synoviális sarcoma genetikai eltéréseinek és jelút-rendszereinek vizsgálata*

*5, A perifériás idegtumorok genetikai instabilitásának vizsgálata*

*6, A Gastrointestinális Stromális Tumor (GIST) mTOR jelút-rendszerének vizsgálata a molekuláris eltérések függvényében*

## Módszer

A módszer fejezetben a szövettani módszerek mellett elsősorban olyan molekuláris módszereket részleteztem, melyek többnyire többféle célkitűzésben (fejezetben) szerepelnek, de külön jeleztem, ha valamelyik speciális vizsgálati anyaghoz tartozik. Általánosságban a beteganyag adatait röviden az egyes fejezetek eredményeinek elején adtam meg.

### *Immunhisztokémia*

Standard avidin-streptavidin-peroxidase módszert használtunk, a körülmények standardizálását pedig Ventana320 illetve Bond Max típusú immunfestő automatával teremtettük meg. A következő primer antitesteket használtuk feltüntetve a származási helyet és a hígítást:

<i>Primer antitest</i>	<i>Származási hely</i>	<i>Hígítás</i>
Vimentin	Dako	1:300
Keratin AE1-AE3	Dako	1:200
EMA	Dako	1:200
H-Caldesmon	Dako	1:200
Alfa simaizom actin	Dako	1:400
Desmin	Dako	1:100
Myf4	NovoCastra	1:15
CD68	Dako	1:3000
CD1a	Dako	1:100
CD163	Dako	1:100
CD21	Dako	1:50
CD23	NovoCastra	1:20
CD34	Dako	1:300
CD31	Dako	1:300
CD99	Dako	1:100
CD117	NovoCastra	1:40
Faktor VIII	Dako	1:20
S100	Dako	1:3000
Leu7	NovoCastra	1:10
INI1	BD	1:50
TLE1	Santa Crus	1:50
GFAP	Dako	1:300
CD10	NovoCastra	1:100
BCL2	NovoCastra	1:40
Her-2 (CB11)	NovoCastra	1:1200
Synaptophysin	Dako	1:60
Chromogranin	Dako	1:60
p4EBP1	Dako	1:100
pp70S6K	Dako	1:100
pS6	Dako	1:100
EGFR	Ventana	1:10
FGFR	Lab Vision	1:200
IGFR	Chehicon	1:400
PDGFRA	Lab Vision	1:400
PTEN	Lab Vision	1:400
RAS	Lab Vision	1:200
pACT	Novocastra	1:100
RAF	Lab Vision	1:200
MAPK	Cell Signaling	1:100

WNT	Lab Vision	1:50
APC	Lab Vision	1:300
beta Katenin	NovoCastra	1:200
CYD1	Lab Vision	1:200
P21-SX 118	Dako	1:150
P27	Lab Vision	1:500
CDK2	Lab Vision	1:300
P16	Lab Vision	1:400
NFKB	Lab Vision	1:800

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

Az aspirációs citológiai keneteken és a paraffinba ágyazott metszeteken standard in situ hibridizációt végeztünk kétféle módszerrel: A, az egyik esetben egy ún. painting próbát valamint egy centromerikus próbát használtunk szimultán, ahol a painting próba a teljes kromoszómát festi és antidigoxigenin-rhodominnal (Onkor) jelölt (piros szignál), a másik pedig egy centromerikus próba, mely a kromoszóma centromerikus régióját festi és streptavidin-FITC-el jelölt (sárgás-zöldes). B, a másik esetben break-apart próbákat használtunk, ilyenkor a próbát úgy tervezik, hogy a kérdéses transzlokációs terület két szélét jelölik piros és zöld színekkel, ha nincs transzlokáció, akkor a két szignál együtt marad, míg transzlokáció esetén az egyik szignál pár szétválllik. Mindezek mellett specifikus deletios illetve amplifikációs próbákat is használtunk. A magfestés DAPI-val történt (kék szín). Detektálásra Lucia cytogenetikai képanalizáló rendszert valamint Olympus BX-40 epifluorescens mikroszkópot használtunk, az utóbbinál triplet (hármás) szűrővel. A nagyítás mindkét esetben 1000x-es immerziós nagyítás volt.

Az alábbiakban adjuk meg a különböző próbákat:

22q12 break apart	Vysis Inc. USA	(Ewing, Ewing sarcoma)
18q11.2 break apart	Vysis Inc. USA	(SS18, synovialis sarcoma)
13q14 break apart	Vysis Inc. USA	(FKHR, alveolaris rhabdomyosarc)
12q13 break apart	Vysis Inc. USA	(DDIT3, myxoid liposarcoma)
16p11 break apart	Vysis Inc. USA	(FUS, fibromyxoid sarcoma)
2p23 break apart	Vysis Inc. USA	(ALK, infl. myofibroblasos tumor)
22q deletios	Vysis Inc. USA	(INI1, rhabdoid tumor)
22q11.2/9q34	Vysis Inc. USA	(INI1, BCR/ABL, rhabdoid tumor)
12cent/12q15	Kreatech, UK	(MDM2, jól diff. liposarcoma)
12cent/12q13	Kreatech, UK	(CDK4, jól diff. liposarcoma)
17cent/17q12	Qbiogene, France	(Her2 ampl. synovialis sarcoma)
X centromerikus	Vysis Inc. USA	(GCTB)
1 centromerikus	Oncor USA	(alveolaris lágyrész sarcoma)
3 centromerikus	Vysis Inc. USA	(GCTB, mal.myoepithelioma)
4 centromerikus	Vysis Inc. USA	(GCTB)
6 centromerikus	Vysis Inc. USA	(GCTB)
8 centromerikus	Oncor USA	(alveolaris lágyrész sarcoma)
10 centromerikus	Oncor USA	(alveolaris lágyrész sarcoma)
11 centromerikus/telomerikus	Vysis Inc. USA	(GCTB)

12 centromerikus	Oncor USA	(alveolaris lágyrész sarcoma)
15 centromerikus	Oncor USA	(alveolaris lágyrész sarcoma)
7 centromerikus	Vysis Inc. USA	(PNST)
17 centromerikus	Vysis Inc. USA	(PNST)
17q25 telomerikus	Oncor USA	(alveolaris lágyrész sarcoma)
18 centromerikus	Vysis Inc. USA	(PNST)
3p25	Vysis Inc. USA	(mal.myoepithelioma)
15q22	Vysis Inc. USA	(mal.myoepithelioma)
16q22	Vysis Inc. USA	(mal.myoepithelioma)
13 centromericus	Qbiogene, France	(mal.myoepithelioma)
21 centromericus	Qbiogene, France	(mal.myoepithelioma)

### *A FISH szignálok automatikus képanalízise*

A perifériás idegtumorok interfázisú citogenetikai vizsgálatára a Metafer-4-MetaCite (Metasystem, Germany) használtuk. Röviden, az automatikus szignál analízis a következő eszközökkel és módon történt: egy Axioplan-2 motorizált mikroszkóphoz (Carl Zeiss, Germany) csatlakozik egy erős felbontású CBD kamera és egy 8 tárgylemezt befogadó motorizált tárgylemez asztal, ami összeköttetésben van egy Pentium 4 1.8 Gigahertz Windows 2000 operációs szisztémával. Az előre bejelölt területeken a rendszer automatikus analízis-szűrést végez és a kijelölt darabszámig (esetünkben 300 sejt/tárgylemez) detektálja a szignálokat és egyben rögzíti is azokat sejtenként, amit a végén egy képgaléria formában rögzít és ilyen módon mind a 300 sejt egyenként értékelhető, illetve egyben visszakereshető.

### *Magizoláció*

A paraffinos blokkokból 50 mikrométeres vastagságú metszetet készítettünk, amit konvencionális rehidrációs eljárás követett, majd a metszetek 2 ml 0.5 %-os pepszinben emésztettük, pH1.5-ön, 37 fokon, 60 percig.

Az emésztést mikroszkóposan ellenőriztük. Az emésztési eljárást hideg foszfát pufferrel (PBS) állítottuk le. A magizolációs szuszpenziót nylon anyagon keresztül leszűrtük, majd az üledéket elválasztottuk. Az üledéket reszuszpendáltuk 0.01%-os citrát pufferrel, majd a maradékot cytotentrifugáltuk, a felülúszót leválasztottuk, majd tárgylemezre szélesztettük.

### *DNS tartalom meghatározás képanalízátorral*

A magi nuclearis DNS tartalmat adszorpciós cytofotometriás DNS vizsgálattal határoztuk meg. A kenetek 4 %-os formalinban lettek fixálva 30 percig. A mintákat Feulgen szerint festettük (stöchiometricus módszer) Schiff reagenst használva (Merck, Darmstadt, Germany), az ESAP konszenzus előírása szerint (80). A DNS képanalízist mikroszkóphoz kapcsolódó



DNS mérésre alkalmas software rendszerrel végeztük (CYDOK R, Fa., Hilgers, Königswinter, Germany) (107).

Ez a rendszer eleget tesz azon módszertani követelményeknek, melyek a precíz DNS adszorpciós cytofotometriát lehetővé teszik. 40-es objektívet, és interferenciaszűrőt alkalmaztunk (565±10 nm). Minden keneten legalább 100 diagnosztikus sejt DNS tartalmát határoztuk meg, (de ez számos esetben 200-300 sejt volt). A Feulgen festés szerinti integrált optikai denzitás meghatározására referencia sejtek (limfocyták, és granulocyták) DNS tartalmát határoztuk meg. Ezen sejtek DNS tartalmát, mint normál, diploid sejtek DNS tartalmát (2c), standardként használtuk. A referencia sejtek variációs együtthatója 3 és 5 % között volt. A referencia sejtek a keneten található nem tumorsejtek voltak. Végül 30 referenciasejt és legalább 100 tumorsejt DNS tartalmát határoztuk meg, és a mérés végén a számítógép a képanalízis alapján hisztogramot készített. Az aneuploiditás definíciójához, mi a „stem line” interpretációt használtuk Haroske (81) szerint. A DNS index meghatározása a klasszikus aneuploiditás meghatározása alapján történik, a lemerített sejtek modális DNS tartalmát elosztjuk a normál sejtek lemerített modális DNS tartalmával. Akkor diploid egy daganat, ha ezen hányados 1±10%, és akkor aneuploid egy daganat, ha ezen hányados 1±10 %-nál nagyobb vagy kisebb.

#### *Lágyrésztumorok telomeráz aktivitásának mérése*

##### *Szövetminta preparáció*

25 mg szövetmintát homogenizáltunk 500 µl TRI REAGENT-ben (Sigma) manuálisan, Potter homogenizátorral. A homogenizátumot 12000 g-vel, 10 percig, 4 °C-on centrifugáltuk, hogy eltávolíthassuk a nem oldható anyagot. A tiszta felülúszót új Eppendorf csőbe tettük át. A nucleoprotein komplexek teljes disszociációjának biztosítására a mintát 5 percig szobahőmérsékleten tartottuk. Ezután a mintát 100 µl chloroformban elkevertük, szorosán lezártuk és Vortexeltük (erős rázásnak vetettük alá) 30 mp-ig, majd 3-5 percig szobahőn hagytuk állni. A keletkezett keveréket 12000 g-n, 15 percig, 4 °C-on centrifugáltuk. Ez 3 fázisra szeparálta a keveréket: a vörös organikus fázis tartalmazta a proteint, az interfázis a DNS-t és a felső színtelen, vizes fázis az RNS-t.

##### *RNS izolálás*

A vizes fázist pipettával leszívtuk, áttettük egy új csőbe, azonos mennyiségű (ml) isopropanollal kevertük el, majd szobahőn 5-10 percig állni hagytuk. A mintát 12000 g-n, 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk. Ezáltal az RNS precipitátum a cső alján egy pelletet alkotott. Miután a felülúszót leöntöttük, 500 µl 75%-os ethanolba mostuk a mintát, Vortexeltük és

12000 g-n, 5 percig, 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszót ismét leöntöttük. Az RNS pelletet vákuumban kiszárítottuk, 50 µl RN-áz mentes vízben (DEPC = diethyl pyrocarbonate-os víz) oldottuk. Az izolátumot -80 °C-on azonnal lefagyasztottuk. Az RNS koncentrációját és "tisztaságát" spektrofotométerben határoztuk meg a 260 nm/280 nm-en mért elnyelődéssel. Technikai szempontból fontos, hogy az RNS preparáció DNS-től mentes legyen, mert az analizálandó RNS mennyiségét túlbecsülhetjük a standard módszerű DNS/RNS kvantifikáció során (260 nm mérés), ezért ez téves eredményekhez vezet a hTERT és a PBGD átiratok kvantifikálásakor.

A teljes RNS fotometriás kvantifikációja során használt értékek:

OD260 = nukleinsavak (RNS, DNS) abszorpciós maximuma

OD280 = fehérjék abszorpciós maximuma

OD240 v.320 = háttér abszorpció kontamináció következtében (pl. fenol, stb.)

OD260/OD280 hányados = az RNS preparáció minősége (quality)

(kívánatos tartomány: 1,7-2,0)

OD260/OD240/320 = az RNS preparáció tisztasága (purity)

#### *RT-PCR és a telomeráz (hTERT) assay*

A hTERT mRNS mennyiségét és az ezzel korreláló TA-t real-time RT-PCR módszerrel, TeloTAGGG hTERT Kvantifikációs Kittel, LightCycler segítségével végeztük, a gyártó cég (Roche) használati utasítása szerint.

A tel-kódolt mRNS átírása után, az így keletkezett cDNS-nek egy 198 bázispár nagyságú fragmentjét specifikus primerekkel amplifikáltuk egy lépéses RT-PCR reakcióban. Az amplikont fluoreszcenciával detektáltuk, specifikus hibridizációs próba-párok használatával.

#### *A cDNS fragmentumainak PCR amplifikációja*

A különböző ciklusok során a jelintenzitás a minta hTERT mRNS-ének és a PBGD-nek a kezdeti koncentrációjától függően válik detektálhatóvá. A standardok és a minták szignáljainak folyamatos monitorizálásával keletkezik az amplifikációs görbék sorozata. A minden reakciókeverékhez hozzáadandó, az elnyelődésen alapuló pontos teljes RNS mennyiség megállapítása, kimérése és megfelelő minőségének biztosítása (pl. mentes legyen a degradációtól) nehézségeket okozhat, fennáll a pontatlanság lehetősége. Ezért ún. house-keeping gént kell használni, és ennek transzkriptjét is kvantifikálni kell, mint endogén RNS kontrollt, és minden egyes mintát hitelesíteni kell a house-keeping gén tartalom alapján. A stabilan expresszálandó ún. house-keeping gének olyan fehérjéket kódolnak, melyek aktivitása

a sejtfunciók fenntartásában alapvető. Ezek a gének hasonló szinten expresszálódnak a különböző sejttypusokban. A megfelelő house-keeping gén a vizsgált mintákban nem mutathat változatosságot. Méréseinkben a PBGD (porphobilinogen deaminase, a hem bioszintézisben részt vevő citoszolikus enzim) gént használtuk.

A minták normalizálása a PBGD tartalomhoz viszonyítva történt. Egy külön RT-PCR reakcióban a PBGD mRNS-t dolgoztuk fel. Ez utóbbi reakciótermék szolgált kontrollként és referenciaként a reakcióban és a relatív kvantifikációban. A relatív tel expressziós szintek ennek a génnek az expressziós szintjéhez viszonyítva, arányként lettek meghatározva. Az irodalmi adatok figyelembe vételével - a szövetminták 300 PBGD kópiánál nagyobb, a citológiai minták 150 PBGD kópiánál nagyobb értékek esetén voltak értékelhetőek, azaz tartalmaztak elegendő mennyiségű és minőségű RNS-t a tel tartalom meghatározásához.

A reakcióban a relatív target gén expressziós szint ugyancsak kalibrátorhoz (azaz a legkisebb mérhető mennyiségű hTERT mRNS-t tartalmazó mintához) van hitelesítve. A kalibrátor ezáltal jelzi a target kvantifikáció assay határértékét, mely megfelel a 35. hTERT Ct értéknek. (N hTERT=hTERT minta hTERTkalibrátor/PBGDminta PBGDkalibrátor)

A standard görbe felvétele a kitben található sejtvonalból nyert cDNS-ek különböző hígításaival történik.

A kalibrátor az a minta, melyet a végső eredmények normalizációjához használunk. Minden minta referencia hányadosa osztva van a kalibrátor referencia hányadosával. Ez normalizálja a különböző detekciós szenzitivitásokat a target és referencia termékekre.

A reakcióelegy tartalma:

- 2 µl hTERT reakciókeverék
- 0,1 µl reverz transzkriptáz
- 2 µl hTERT vagy PBGD detekciós keverék
- 13,9 µl víz
- 2 µl saját mintánkból preparált RNS vagy standard RNS templát.

A reakció lépései:

- a) Reverz transzkripció (60 oC, 10 min)
- b) kezdő denaturáció (95 oC, 30 sec)
- c) 40 ciklus: - denaturáció (95 oC, 0.5 sec)
  - primerek kötődése (annealing) (60 oC, 10 sec)
  - extenzió (72 oC, 10 sec - amplifikációs ciklusonként).

A külső standard görbe megállapításához minden, a LightCycler-ben végbemenő ciklus tartalmazza az öt standard hTERT mRNS-ének meghatározását, melyek 1.3 x 10<sup>6</sup>, 9.8 x 10<sup>4</sup>,

8.0 x 103, 7.2 x 102 és 1.4 x 102 /2 µl kópiát tartalmaznak; valamint a - pozitív kontrollként szolgáló - total RNS-t, mely a kitben található hTERT mRNS-t expresszáló HeLa sejtvonalból származik.

*DNS izolálás paraffinos anyagból (szekvenáláshoz, RT-PCR-hez):*

Ehhez az izolálási módszerhez a standard patológiai eljárás szerint puffereelt formalinban fixált és paraffinba ágyazott szövetek kb. 4-5 darab 10 µm vastagságú metszete szükséges, amit egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe teszünk.

1. deparaffinálás:

- 1000 µl xilol hozzáadása a mintához, majd 10 perc inkubálás szobahőmérsékleten, közben néhányszor meg kell rázni, ezután 10 percig 13000 g-n centrifugálás végül a felülúszó leöntése.
- 1000 µl xilol hozzáadása a csapadékhoz, majd 10 perc inkubálás szobahőmérsékleten, közben néhányszor meg kell rázni, ezután 10 percig 13000 g-n centrifugálás végül a felülúszó leöntése.
- 1000 µl absz. etanol hozzáadása a csapadékhoz, majd 10 perc inkubálás szobahőmérsékleten, közben néhányszor meg kell rázni, ezután 10 percig 13000 g-n centrifugálás végül a felülúszó leöntése.
- 1000 µl absz. etanol hozzáadása a csapadékhoz, majd 10 perc inkubálás szobahőmérsékleten, közben néhányszor meg kell rázni, ezután 10 percig 13000 g-n centrifugálás végül a felülúszó leöntése.
- A minta szárítása 10 percig Speed Vac készülékben.

2. emésztés:

- az emésztéshez használt *lízis puffer* összetétele:
  - 1,6 ml 5M NaCl
  - 1,6 ml 0,5M EDTA
  - 0,8 ml 2M TRIS pH=7,9
  - 1 ml 20% SDS
  - 35 ml desztillált víz
  - 40 ml
- 400 µl lízis puffer hozzáadása, 20 µl Proteináz K (10mg/ml) és 2 µl β-merkaptóetanol hozzáadása a mintához, majd rázatás 50 °C-on egy éjszakán át.

3. enzim inaktiválás:
  - Forralás 95 °C-on 5 percig, majd hűtés jégen 5 percig
4. Ezután 10 percig centrifugálás 13000 g-n, majd a felülúszó (melyben a DNS van) átpipettázása Eppendorf csőbe. Ez kb. 420 µl.
5. 42 µl Na-acetát puffer (3M, pH 5.0 Sigma) és 840 µl absz. etanol hozzáadása a mintához, majd 2 percig állni hagyjuk.
6. 5 percig centrifugálás 13000 g-n, ezután a felülúszó leöntése és a csapadék mosása 500 µl 70%-os etanollal, vortexelés, majd újból 5 perc centrifugálás 13000 g-n.
7. felülúszó leöntése, majd a minta szárítása Speed Vac készülékben 10 percig
8. a minta oldása 100 µl minimum pufferben (*10x TE pH:8.0, 10 mM Tris, 0.1 mM EDTA*)
9. a minta koncentrációjának mérése NanoDrop spektrofotométerrel.

Az ily módon izolált, valamint a gyűjtött DNS mintákból a PDGFRA gén 10, 12, 14 és 18-as exonját illetve a c-kit gén 9, 11, 13, 14 és 17-es exonját PCR-rel felamplifikáltuk.

#### *Polimeráz láncreakció (PCR):*

A PCR-t a DNS-szál egy rövid, jól definiált szakaszának felamplifikálására használjuk. A kiválasztott templát DNS-szakasról két megfelelő primer (iniciáló oligonukleotid), DNS polimeráz, nukleotidok és a DNS polimeráz számára megfelelő kémiai környezetet biztosító puffer segítségével nagyszámú másolatot készíthetünk.

A PCR-eljárás több ciklus egymásutánjából áll. Mindegyik ciklus három lépést tartalmaz:

Denaturálás: a kettősszálú DNS-templát szálainak szétválasztása magas hőmérsékleten (94-96 °C), ekkor a két DNS-szálat összekötő hidrogénhidak felbomlanak. Az első ciklus előtt a DNS-t gyakran hosszabb ideig denaturáljuk, hogy a templát DNS és a primerek kettős szálai is teljesen szeparálódjanak. Idő: 1-2 perc.

Annealing vagy kapcsolódási lépés: a DNS-szálak szeparálása után a hőmérsékletet csökkentjük úgy, hogy a primerek hozzá tudjanak kapcsolódni a DNS-szálakhoz. A hőmérséklet ebben a fázisban erősen függ a primerek olvadási hőmérsékletétől, aminél általában 5°C-kal alacsonyabb hőmérsékletet használunk. Ha a kapcsolódási lépésben a hőmérséklet nem megfelelő, a primerek vagy egyáltalán nem kötődnek a templáthoz, vagy véletlenszerűen kötődnek. Idő: 1-2 perc.

Elongáció: a DNS-polimeráz létrehozza a hiányzó szálat. A munkát a kapcsolódott primernél kezdi, és végigmegy a DNS-szálon. A szintetizálás során a szülő nukleinsavszál szolgál

templátként a leány lánc szintetizálásához. A meghosszabbítás hőmérséklete a DNS-polimerázról függ. A lépés időigénye egyrészt függ magától a DNS-polimerázról, másrészt az amplifikálandó DNS-szakasz hosszától.

Ezen három lépést ismételve az enzim az újonnan képződött szálakat is templátként használja, így ideális esetben a primerek által behatárolt DNS-szakasz mennyisége exponenciálisan nő.

A PCR során használt c-kit, PDGFRA és lágyszarcoma sarcoma primereinek szekvenciái

#### c-KIT primerek

Exon	Primer	Seq 5'-3'	T <sub>A</sub> (°C)	Amplikon (bp)
9	KIT9-F	GCCACATCCCAAGTGTTTTATG	60	310
	KIT9-R	GAGCCTAAACATCCCCTTAAATTG		
11	KIT11-F	CCAGAGTGCTCTAATGACTG	60	223
	KIT11-R	AGCCCCTGTTTCATACTGAC		
13	KIT13-F	CTTGACATCAGTTTGCCAGTTGT	60	203
	KIT13-R	GACAGACAATAAAAGGCAGCTTG		
17	KIT17-F	TGGTTTTCTTTTCTCCTCAA	60	184
	KIT17-R	GCAGGACTGTCAAGCAGAGA		
14	KIT14-F	GTCTGATCCACTGAAGCTG	50	
	KIT14-R	ACCCCATGAACTGCCTGTC		

#### PDGFRA primerek

Exon	Primer	Seq 5'-3'	T <sub>A</sub> (°C)	Amplikon (bp)
10	PDGFRA10-F	GGCCCTATACTTAGGCCCTTTT	60	251
	PDGFRA10-R	TGTCCTGACTGTTGAGGAACT		
12	PDGFRA12-F	CTCTGGTGCCTGGGACTTT	60	233
	PDGFRA12-R	GCAAGGGAAAAGGGAGTCTT		
14	PDGFRA14-F	TCTGAGAACAGGAAGTTGGTAGC	60	208
	PDGFRA14-R	CCAGTGAAAATCCTCACTCCA		
18	PDGFRA18-F	CTTGCAGGGGTGATGCTATT	60	230
	PDGFRA18-R	AGAAGCAACACCTGACTTTAGAGATTA		

#### Synovialis sarcoma

##### SYT-SSX1 fúzió

Forward primer CCACAGCCACCCAGC  
 Reverse primer GTGCAGTTGTTTCCATCGT  
 TaqMan próba AAAATGATTCGAAGGGAGTGTGTCAGAAGCAT

##### SYT-SSX2 fúzió

Forward primer CCACCACAGCCACCC  
 Reverse primer GCACAGCTCTTCCATCAT

dc\_59\_10<sup>5</sup>-

TaqMan próba AAGGAAATGATTCGGAGGAAGTGCCAGA

Clear cell sarcoma

EWS-ATF1 fúzió (1-es típus): EWS exon 8 /ATF1 exon 4

Forward primer CATGAGCAGAGGTGGGCG  
Reverse primer CCCC GTGTATCTTCAGAAGATAAGTC  
TaqMan próba AGGAGGACGCGGTGGAATGGG

EWS-ATF1 fúzió (2-es típus): EWS exon 7 /ATF1 exon 5

Forward primer GCCAAGCTCCAAGTCAATATAGC  
Reverse primer CAACTGTAAGGCTCCATTTGGG  
TaqMan próba CAGAGCAGCAGCTACGGGCAGCA

Myxoid liposarcoma  
FUS-CHOP fúzió

"Külső" primer pár

Forward primer AGCAAAGCTATAATCCCCCTCAG  
Reverse primer GAAGGAGAAAGGCAATGACTCA

"Belső" primer pár

Forward primer GACAGCAGAACCAGTACAACAGCAG  
Reverse primer GCTTTCAGGTGTGGTGATGTATGAAG

b-aktin primerek szekvenciái (kontroll)

Forward primer CCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG  
Reverse primer GGAGCAATGATCTTGATCTTC

A PCR során használt reakcióelegy összetétele

Felhasznált anyagok	Törzsoldat koncentrációja	V (µl)	Végkoncentráció
ImmoMix Red (Bioline)	2x	10	1x
Forward primer	100 µM	0,1	10 µM
Reverse primer	100 µM	0,1	10 µM
H <sub>2</sub> O		8,8	
Templát DNS		1 (20-100 ng/reakció)	

**A PCR beállításai**

Folyamat	Hőmérséklet (°C)	Időtartam (sec)	ciklusszám
Kezdeti denaturáció	95	10	1
denaturáció	95	20	40
Primer hibridizálás/szintézis	60	60	
HOLD	10	végtelen	1

*Agaróz Gélelektroforézis:*

A PCR reakció után a termékek 2%-os agaróz gélben lettek futtatva.

## Agaróz gél készítése:

1. 100 ml 1X TAE (TRIS, ecetsav, EDTA) pufferbe 2 g agaróz bemérése.
2. Mikrohullámú sütőben melegítve (kb. 3 perc) az agaróz feloldása.
3. 10 µl etídium-bromid hozzáadása, mely a DNS két szála közé interkalálódó fluoreszcens festék.

## Fésű behelyezése, gél megöntése

A gél megszilárdulása után futtatókádba helyeztük, melyet 1x TAE pufferrel kell feltölteni úgy, hogy a zsebeket is ellepje. Ezután a PCR csövekből 8 µl mintát tettünk a zsebekbe. A minták mellett 1 kb-os molekulásúly markert futtattunk, a PCR termékek ellenőrzése céljából. A minták felvitele után 3 percig 60V feszültséget kapcsolunk, hogy a minták belépjenek a gélbe, ezután 100V-on 27 percig folyt az elektroforézis.

A gél fotózásakor Stratagene Eagle Eye II készüléket és a hozzá tartozó számítógépes programot használtunk.

A megfelelő denzitású PCR amplikonokat kétirányú direkt szekvenálással analizáltuk. A PCR termékeket megtisztítottuk, majd szekvenáló reakciót mértünk össze. A termékeket tisztítottuk és denaturáltuk, ez után következett a kapilláris elektroforézis és a fluoreszcens detektálás. Az eredményeket számítógépes program segítségével értékeltük ki.



*PCR termék tisztítása:*

Az ExoSAP-IT (Affymetrix) két hidrolitikus enzimet tartalmaz: az exonukleáz I-et és a Shrimp alkalikus foszfatázt. Ezekre azért van szükség, mert eltávolítják a PCR reakció során fel nem használt dNTP-eket és primereket, melyek zavarhatják a későbbi szekvenáló reakciót. Az exonukleáz I az egyszálú DNS-t, a SAP pedig a megmaradt nukleotidokat bontja le nukleozidokra és foszfátra.

1. A futtatás utáni maradék pcr termékekhez (12 µl) 2 µl ExoSAP-ot adtam.
2. 30 perc inkubálás 37 °C-on, ezen a hőmérsékleten optimális az enzimműködés.
3. 15 perc inkubálás 80 °C-on, hogy inaktiválódjanak az enzimek.

*Cycle sequencing reakció:*

A klasszikus Sanger-féle szekvenálás alapelve:

A Sanger által kitalált módszert láncterminációs illetve didezoxi módszernek is nevezik. A módszer alapelve, hogy a DNS szintézis csak úgy folytatódhat, hogy a cukor-foszfat lánc utolsó tagjának 3' végén OH csoport található, mert a polimeráz enzim csak ehhez tudja a következő nukleotidot kapcsolni. Sanger olyan didezoxi (2' és 3' szénatomon nincs OH) nukleotidokat használt a dNTP-k mellett, melyekkel lehetővé vált hogy a beépülés bármely nukleotidnál megszakadjon. Statisztikai alapon minden pontban le tud állni a szintézis, ha pedig a reakciók száma kellően nagy, meghatározhatjuk a szekvenciát, ehhez természetesen valahogyan meg kell jelölnünk a DNS-t.

Nagy lépések a kezdeti elképzeléshez képest hogy a radioaktív jelölést felváltotta a fluoreszcens jelölés, az elektroforetikus lépésnél megjelentek a gélolvató készülékek, valamint a kapilláris elektroforézis, a PCR eljárás széleskörű elterjedésével pedig már nincs szükség a vizsgált gén izolálására. Emellett a folyamat automatizált.

Jelölt Terminátorú Ciklikus Szekvenálás módszere:

A módszer előnye a primer jelöléssel szemben hogy a négy stop-nukleotid négy különböző fluoreszcens festékkel jelölt, így egyszerre, egyazon reakcióban használható és az elektroforézis egy sávban futtatható, ez pedig kényelmesebb leolvasást tesz lehetővé.

BigDye Terminator ReadyReaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) tartalmazza:

1. az AmpliTaq® DNS polimeráz FS enzimet (a Taq polimeráz módosított változata), melynek nincs 5'⇒3' nukleáz aktivitása, pontmutációkkal csökkentették a diszkriminációját a didezoxi-nukleotidokkal szemben
2. dNTP-ok

3. jelölt ddNTP-ok
4. puffer

A Cycle Sequencing reakció után kapilláris elektroforézissel a szekvencia meghatározható. A módszer rendkívül jó felbontóképességű, 1 bázisnyi hosszkülönbség is detektálható, a detektálás pedig lézer segítségével történik, így a különböző fluoreszcens jelek segítségével a bázissorrend meghatározható.

**A cycle sequencing reakció során használt reakcióelegy összetétele**

Felhasznált anyagok	V (µl)
BigDye puffer (10x híg)	1
BigDye MasterMix	1
Primer (forward vagy reverse)	1
Templát DNS	2-4 (20-30 ng/reakció)

**A cycle sequencing reakció beállításai**

Folyamat	Hőmérséklet (°C)	Időtartam (sec)	ciklusszám
Kezdeti denaturáció	96	60	1
Denaturáció	96	30	30
Primer hibridizálás	55	15	
Szintézis	60	240	
HOLD	10	végtelen	1

*Tisztítás NucleoSeq kittel:*

A BigDye terminátor, a primerek és a megmaradt nukleotidok NucleoSeq kit segítségével (Macherey Nagel) történő eltávolítása után a mintákat szekvenáló csőbe tesszük át.

*Denaturálás:*

a terméket 1 percig 95°C-on tartjuk majd jégre tesszük

A kapilláris elektroforézist ABI PRISM 310 Genetic Analyzer-ben végeztük. Az elektroferogramok kiértékeléséhez BioEdit programot használtuk. A vizsgált DNS szekvenciákat az NCBI genetikai adatbankjában megtalálható normál referenciaszekvenciákhoz hasonlítjuk.

*FISH immunfestett keneteken – Relokalizáció (óriássejtes csont tumorok)*

5 kromoszómát választottunk méretüket és kereskedelmi forgalomban elérhető színjelölésüket figyelembe véve, míg a 11-es kromoszóma rövid karjának centromerikus és szubtelomerikus régióját a TAS által való gyakori érintettsége miatt vizsgáltuk.

A fedőlemez eltávolítása után az immunfestett keneteken fluoreszcens in situ hibridizációt végeztünk, melyhez a kereskedelmi forgalomban kapható X-, 3-as, 4-es és 6-os kromoszóma centromerikus alfa szatellit próbáit szimultán alkalmaztuk. A lehetséges telomerikus eltérések detektálására a 11p szubtelomerikus és a 11-es kromoszóma centromerikus próbáinak szimultán hibridizációját végeztük. A CD68-negatív és pozitív sejtek FISH képeinek elkülönítésére a Bioview Duet Automated Scanning System (Bioview, Tel Aviv, Israel) rendszert alkalmaztuk, mely relokalizálva a korábban beszkenelt CD68 immunfestett sejtek helyét a keneten, megtalálta ugyanazon, immár FISH szignálokat mutató sejteket és párosította azok FISH képét az immunhisztokémiai képpel. Az egyes próbák specificitásának meghatározására FISH reakciót végeztünk 400 normál kontrol sejten, ami alapján cut-off szinteket állítottunk fel a fals monoszómia és triszómia kizárására (az  $\text{átlag} \pm 2\text{SD}$ -t használva), melyek 2.93%-nak, illetve 3.54%-nak bizonyultak. 100 mononukleáris tumorsejtet elemeztünk lemezenként, melyek 20-50 %-a volt CD68-pozitív az adott minta histiocytatartalmától függően. A vizsgált kromoszómák egyedi centromerikus szignáljai és az összszi gnálszám alapján határoztuk meg a kromoszóma nyérések illetve a vesztesékek számát. Az egyes kromoszómák szignálszámát külön elemezve a monoszómiák, triszómiák és más aneuszómiák jelenlétét tudtuk detektálni. A kapott aneuszómia-gyakoriságokat az egyes kromoszómákra és az egyes sejtekre vonatkoztatva is kiszámoltuk, mely alapján megkülönböztettünk kromoszómális aneuszómia (C-ANEU) és individuális sejt-aneuszómia (I-ANEU) értékeket. Az I-ANEU érték kombinált információt ad mind a négy kromoszómára (3, 4, 6 és X) vonatkozóan, míg a C-ANEU érték a különböző kromoszómák számbeli eltéréseire vonatkozó információt ad. Ha minden vizsgált kromoszómában megfigyelhető volt a centromerikus szignálok egész számú többszöröse (4x, 8x), poliszómia gyakoriságokat számoltunk mind az egyes kromoszómákra, mind az egyes sejtekre vonatkozóan kromoszómális poliszómia (C-POLY), illetve individuális sejt-poliszómia (I-POLY) értékek felállításával. Ha a vizsgált CD68-negatív sejtek több mint 20%-a mutatta ugyanazt a kromoszóma veszteséget vagy nyérést, az eltérést klonálisnak tekintettük (22).

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

Kiválasztottuk azokat a kromoszómákat (az X, 3-as, 4-es, 6-os vagy 11-es kromoszómák közül), amelyek a legmagasabb százalékban mutattak aneuszómiát előző eredményeink alapján. FISH reakciót végeztünk 23 pericentrin immunfestett keneten, mely lehetővé tette a centroszóma és kromoszóma eltérések együttes meghatározását. Mind a centroszómaszámot, mind a kromoszómális centromerikus szignálokat 100 nem átfedő interfázisos mononukleáris sejten vizsgáltuk. Az egy vagy két centroszómát tartalmazó sejteket negatívnak, a több mint két centroszómát tartalmazó (tehát centroszóma amplifikációt mutató) sejteket pedig pozitívnak tekintve a centroszóma amplifikációt a következőképpen gradáltuk: negatív (a sejtek 0-2%-a); gyenge (a sejtek 2-10%-a); közepes (a sejtek 11-20%-a); erős (a sejtek több mint 21%-a). A vizsgált kromoszómák egyedi centromerikus szignáljai alapján a monoszómiákat, triszómiákat, valamint az 5x, 6x, 7x kromoszómaszerelvényeket aneuszómiának tekintettük; a poliszómiás sejteket, vagyis amelyek a normál kromoszómaszerelvény egész számú többszörösét (4x, 8x, stb.) mutatták, nem értékeltük. Minthogy csak egy kromoszómát vizsgáltunk esetenként, az aberráns centroszómaszámot mutató diszómiás sejteket nem vettük bele az értékelésbe, I-FISH vizsgálattal csak a normál centroszóma-tartalmú aneuszómiás sejtek, valamint a centroszóma amplifikációt mutató aneuszómiás sejtek arányát tanulmányoztuk.

*RFLP - Restriction fragment length polymorphism*

A restriktív enzimek olyan endonukleázok, amelyek specifikus szekvenciákat ismernek fel és ezeknél hasítják a DNS szálakat. A restriktív enzim felismerő szekvenciák ugyanúgy ki vannak téve a mutációnak, mint bármely más DNS szakasz. Ha a felismerő hely mutál, az enzimek nem képesek a DNS-hasításra.

Az RFLP-technikával az inszerciót, a deléciókat és a bázisváltást is ki tudjuk mutatni. A deléció és az inszerció megváltoztatja az érintett fragmentumok elektroforetikus mobilitását. A fragmentumok számának változása és új fragmentumok megjelenése pedig azt jelzi, hogy bázis szubsztitúció, inszerció vagy deléció miatt egy enzim hasítási helye megszűnt, illetve egy új hely jött létre.

A PCR-RFLP vizsgálat során a paraffinos blokkba ágyazott szövetből metszés után DNS-t izolálunk, majd a célgén vizsgálandó exonjait mutagenikus polimeráz láncreakcióval felamplifikáljuk. Ezt követően mutáció-specifikus restriktív enzimkezelést végzünk, s az így keletkezett DNS fragmentumokat nagy felbontású mikrokapilláris elektroforézis segítségével futtatjuk. A mutációkat a normális alléltól való eltérő migrációs mintázat alapján azonosítjuk.

Béta-katenin gén pontmutációinak PCR-RFLP módszerrel történő kimutatásához használt primerek és restrikciós enzimek

Aminosav csere	Primer szekvenciák		Amplikon hossz	Restrikciós enzim	Hasított termék mérete
T41A	Sense	TGGACTCTGGAATCCATCTCG	120bp	TspRI (R0582S)	wt -120
	Antis.	AAAATCCCTGTTCCCACTCA			mut -88+32
S45F	Sense	TTTGATGGAGTTGGACATGG	141bp	Ddel (R0175S)	wt -117+24
	Antis.	TCAGGATTGCCTTTACCACTCTG			mut -141
S45P	Sense	TGGTGCCACTACCACAGCTACT	101bp	BseRI (R0581S)	wt -101
	Antis.	AAAATCCCTGTTCCCACTCA			mut -89+12

### *HR-CGH ( nagy felbontású komparatív genomikus hibridizáció)*

A fagyasztott tumor részletből kriosztáttal 3x20 µm-es fagyasztott metszeteket készítettünk DNS kivonás céljából. 37°C-on centrifugáltuk a metszeteket a következő lizáló oldatban: dH<sub>2</sub>O, 20%SDS, 0,5M EDTA és 20mg/ml Proteinase-K. Majd 6M NaCl-t és abs. alkoholt adtunk hozzá DNS precipitáció céljából. 80%-os alkoholos mosás után, a kinyert DNS-t TE pufferben tároltuk. A DNA koncentráció megbecslésére optical densitást mértünk a minta 2µl oldatából a Nanodrop-1000 programot használva.

Első lépésként ugyanolyan mennyiségű referencia és tumor DNS-t jelöltünk meg fluorochrommal a CGH Nick Translatiós procedúra szerint.

A translatiós enzimek (DN-ase I., DNA polymerase) építették be a zölddel jelölt dUTP-eket a tumor DNS-be és a pirossal jelöltek a referencia DNS-be. A fragmentumok hosszát 1%-os agarose gel elektroforesissel ellenőriztük. Nagy többségben a DNS fragmentumok a 600-2000 bp. közötti szakaszon voltak

A CGH hybridizáció során, az összekevert jelölt referencia és tumor DNS-t ráhibridizáltuk a már korábban tárgylemezre szélesztett (normál) metafázisokra. A kijelölt területet lefedtük, lezártuk és lemezeket inkubáltuk (37°C, 48-72h). Ezután posthibridizációs mosás történt és a metafázisokat megfestettük aspecifikus, kéken fluoreszkáló DNS festékkel, hogy azonosítani tudjuk a „pseudo G striped” kromoszómákat.

Ezek után képeket készítettünk a metafázisokról külön-külön majd együtt is használva a zöld és a piros filtert. A kettős filterrel készült képeken a piros területek jelezték a deléciókat, míg a zöldek az amplifikációkat. A detektálás Lucia citogenetikai elemző software-rel történt. Ezen technika segítségével 3-5 Mb-nyi eltéréseket már detektálni lehet szemben a tradicionális CGH-vel mely esetén mintegy 10 Mb-nyi érzékenység van csupán (109).

*Statisztika*

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

## Eredmények, megbeszélés

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

94 tumor aspirációs citológiai vizsgálata során komplex kiegészítő vizsgálatokat végeztünk, melyek immuncitokémia, DNS-tartalom meghatározás és FISH technika voltak (195). Ezen eredmények együttes értékelése alapján a preoperatív diagnosztikában négy fő csoportot tudtunk elkülöníteni, megfelelő terápiás javaslattal.

A 94 lágyrésztumor aspirációs citológiai vizsgálata során interfázisú sejteken 16 esetben tudtunk specifikus transzlokációt kimutatni, melynek segítségével szövettani értékű definitív diagnózis volt adható még a műtét előtt. A 16 eset a következő módon oszlott meg: myxoid liposarcoma 5 eset, t(12;16) (1. ábra); synovialis sarcoma 6 eset, t(X;18) (2,3. ábra); clear cell sarcoma 2 eset, t(12;22); Ewing/PNET tumor 2 eset, t(11;22) (4. ábra); desmoplasticus kis kereksejtes tumor 1 eset, t(11;22). A csoportra a következők voltak jellemzőek:

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

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

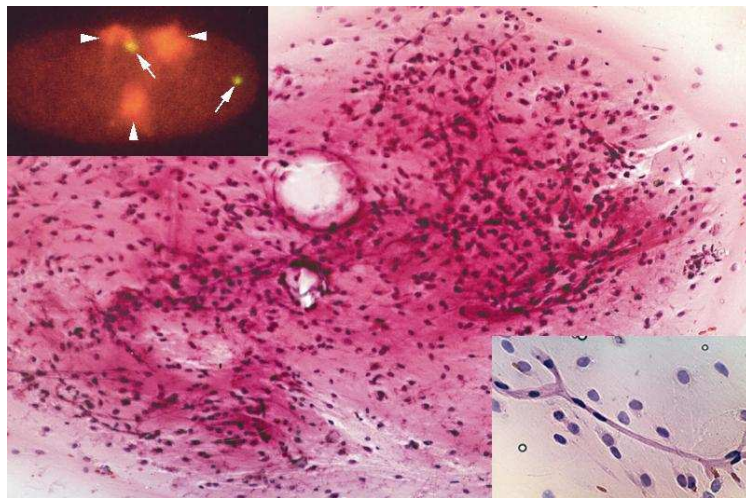
Javasolt terápia: bármilyen sebészi beavatkozás és bármilyen preoperatív terápia megengedett.

A részletes eredményeket a következő táblázatban (1. Táblázat) foglaltuk össze:

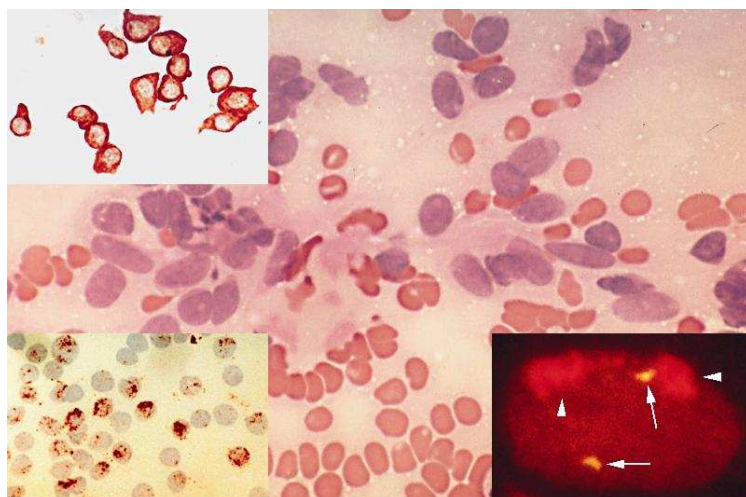
## 1. Táblázat A tumorok pontos hisztogenetikai eredettel csoport klinikopatológiai jellemzői

Cit. diagnózis	Kor,nem	Anatómiai lok.	DI	PI	FISH	Immunocytokémiá	Histopatológia
1. Myxoid liposc.	36 F	j. comb	1.04	10%	t(12; 16)	VIM:+	Myxoid liposc. grade I.
2. Myxoid liposc.	34 F	csigolya mellett	1.02	6%	t(12; 16)	VIM:+	Myxoid liposc. grade I.
3. Myxoid liposc.	38 F	b. térdhajlat	1.02	9%	t(12; 16)	VIM:+	Myxoid liposc. grade I.
4. Myxoid liposc.	54 F	j. comb	1.10	7%	t(12; 16)	VIM:+	Myxoid liposc. grade I.
5. Myxoid liposc.	72 N	j. alkar	1.02	9%	t(12; 22)	VIM:+	Myxoid liposc. grade I.
6. Synovial sc.	20 F	j váll	1.06	29%	t(X; 18)	Vim:+, Ker: +, EMA:+	Synovial sc. grade III.
7. Synovial sc.	23 F	b. talp	1.24	36%	t(X; 18)	Vim:+, Ker: +, EMA:+	Synovial sc. grade III.
8. Synovial sc.	52 F	j. comb	1.04	28%	t(X; 18)	Vim:+, Ker: +, EMA:+	Synovial sc. grade III.
9. Synovial sc.	18 N	b. sarok	0.98	16%	t(X; 18)	Vim:+, Ker: +, EMA:+	Synovial sc. grade III.
10. Synovial sc.	40 F	b. lábszár	1.08	31%	t(X; 18)	Vim:+, Ker: +, EMA:+	Synovial sc. grade III.
11. Synovial sc.	21 N	b. lágyéki terület	1.12	28%	t(X; 18)	Vim:+, Ker: +, EMA:+	Synovial sc. grade III.
12. Clear cell sc.	42 F	b. alkar	1.32	30%	t(12; 22)	CD-117+, Melan A +, HMB-45 +	Clear cell sc. grade III.
13. Clear cell sc.	47 F	b. láb	1.28	26%	t(12; 22)	CD-117+, Melan A +, HMB-45 +	Clear cell sc. grade III.
14. Ewing/PNET	25 F	j. váll	1.08	34%	t(11; 22)	Vim:+, CD-99:+Ker: -	Ewing/PNET
15. Ewing/PNET	19 N	b. comb	1.14	30%	t(11; 22)	Vim:+, CD-99:+Ker: -	Ewing/PNET
16. DSRCT	22 F	b. mellkas	1.09	32%	t(11; 22)	Vim:+, Ker: +, Desm: +	DSRCT of pleura

DSRTC: kis kereksejtes desmoplastikus tumor, DI: DNS Index, PI: Proliferációs Index

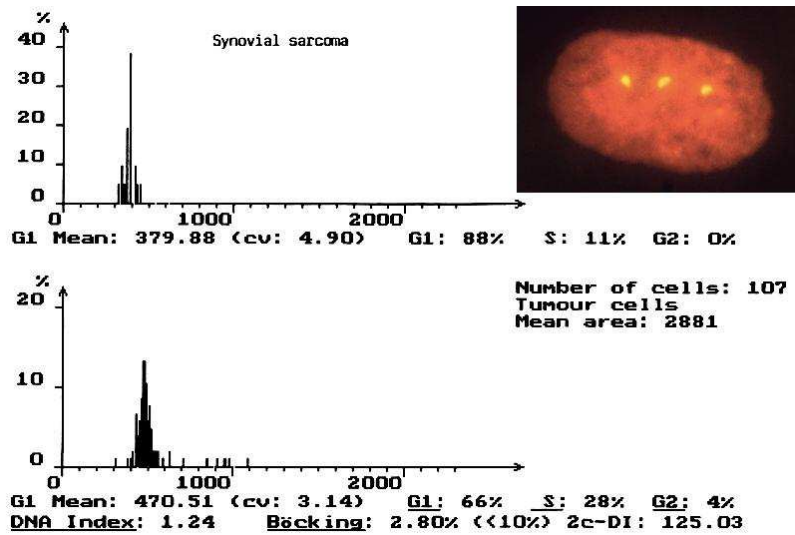


1. ábra Myxoid liposarcoma jellegzetes cytologiai képe monomorph daganatsejtekkel, az inzertben (jobb alsó) plexiform capillarissal. A t(12;16) egyértelműen igazolható FISH vizsgálattal (inzert, bal felső). A piros foltok a 12-es paint próbát jelzik, a zöld dotok pedig a 16-os centromerikus próbát.

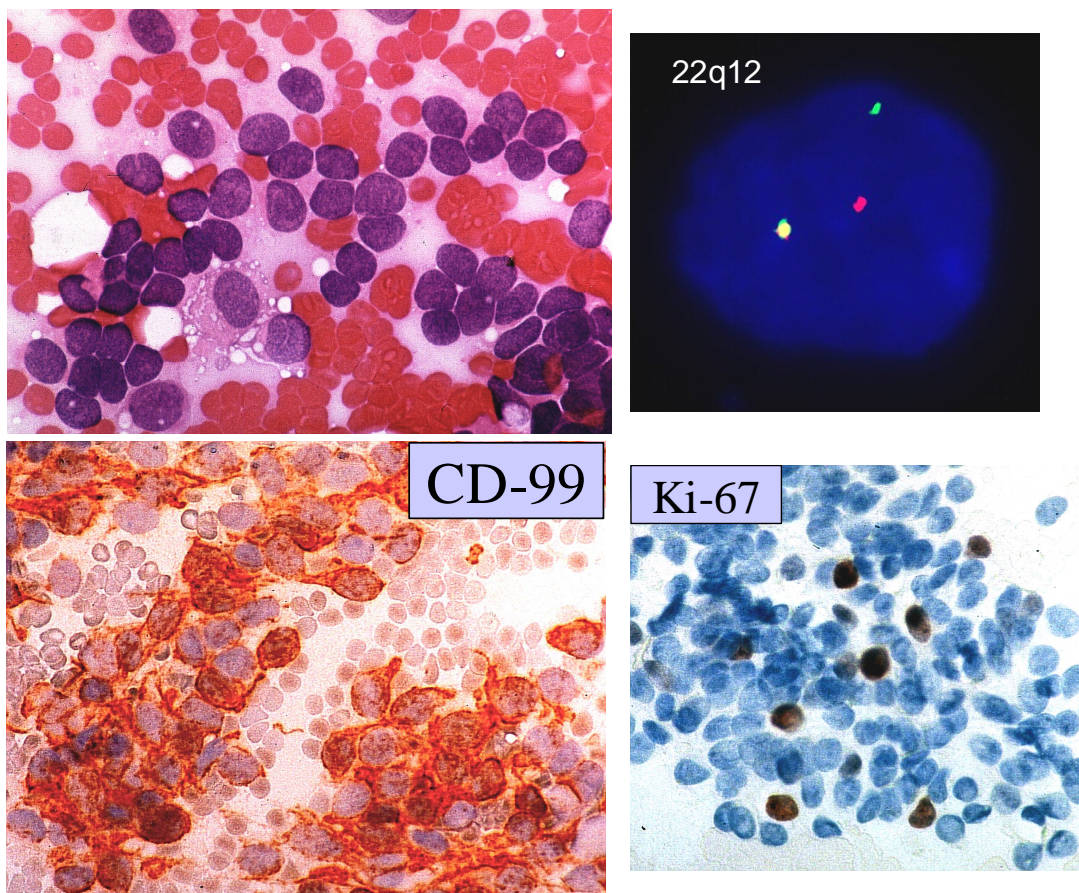


2. ábra Synoviális sarcoma jellegzetes cytologiai képe monomorph daganatsejtekkel. Az inzertben (jobb alsó) a jellegzetes t(X;18) igazolható FISH vizsgálattal. Mivel férfiról van szó így csak 1 piros folt (X painting próba) és 1 extra signál látható juxtapozícióban az egyik zöld dottal (18-as centromerikus próba). A bal felső index vimentin, a bal alsó cytokeratin pozitivitást mutat.

dc\_59\_10<sup>4</sup>-



3. ábra Synoviális sarcoma hisztogramja aneuploid értékkel. Ebben az esetben transzlokációt nem találtunk, de a szintén jellegzetes 18-as triszómia FISH vizsgálattal igazolható volt. (inert jobb felső) a zöld dotok a 18-as centromerikus próbának felelnek meg.



4. ábra Ewing sarcoma cytológiai képe monomorph kis kerek daganatsejtekkel (bal felső). A Ewing sarcomára jellemző t(11;22) igazolható break apart próbával (jobb felső), míg a jellegzetes DC99 immuncytokémiai reakció látható a bal alsó képen. A proliferáció viszonylag mérsékelt, mintegy 30% (jobb alsó)



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

b) magas malignitású sarcomák – 22 eset

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

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

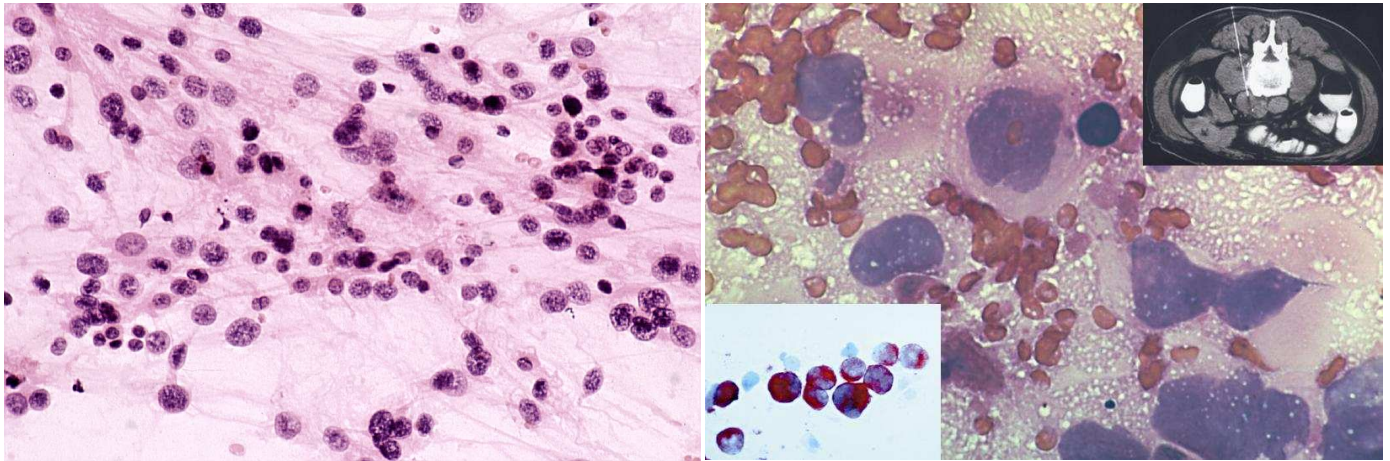
A részletes eredményeket a 2. táblázatban foglaltuk össze:

2. Táblázat A magas malignitású csoport klinikopatológiai jellemzői

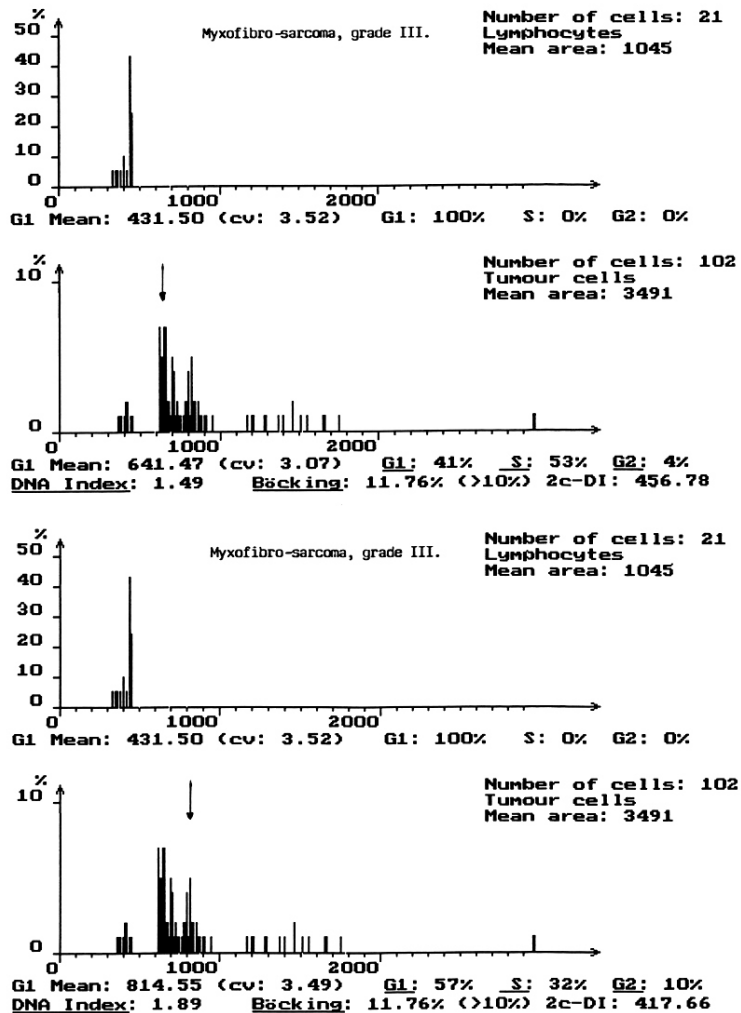
Cit. diagnózis	Kor, nem	Anatómiai lok.	DI	PI	FISH	Immunocyt	Histopatológia
1. HGS	29 F	j. comb	1.40; 1.65	28%	ND	Vim:+;Ker:-	MFH grade III.
2. HGS	61 N	b. comb	1.39; 1.61	23%	no t(12; 16)	Vim:+;Ker:-	Myxofibrosc.grade II.
3. HGS	75 N	j. comb	1.36; 1.70	35%	ND	Vim:+;Ker:-	Myxofibrosc.grade III.
4. HGS	60 F	b. comb	1.37; 1.66	31%	ND	Vim:+;Ker:-	MFH grade III..
5. HGS	57 F	j. lábszár	1.41; 1.82	41%	ND	Vim:+;Ker:-	Myxofibrosc.grade III.
6. HGS	39 N	j. felkar	1.38; 1.70	30%	ND	Vim:+;Ker:-	Myxofibrosc.grade III.
7. HGS	41 F	medence	1.35; 1.65	38%	ND	Vim:+;Ker:-	MFH grade III.
8. HGS	58 F	j. comb	1.49; 1.89	38%	ND	Vim:+;Ker:-	Myxofibrosc.grade III.
9. HGS	64 F	b. felkar	1.34; 1.74	40%	no t(12; 16)	Vim:+;Ker:-	Myxofibrosc.grade III.
10. HGS	55 N	j. alkar	1.41; 1.73	37%	ND	Vim:+;Ker:-	MFH grade III.
11. HGS	30 F	b. láb	1.34	27%	ND	Vim:+;Ker:-	Alveolar soft part sarcoma
12. HGS	18 F	j. alkar	1.39	43%	ND	Vim:+;Des:+	Rhabdomyosc.
13. HGS	21 N	hashártya mögött	1.43; 1.81	39%	ND	Des:+	Rhabdomyosc.
14. HGS	22 F	j. boka	1.28; 1.72	20%	ND	$\alpha$ -smooth-actin+	Leiomyosc.grade: II.
15. HGS	54 F	b. comb	1.28; 1.64	18%	ND	$\alpha$ -smooth-actin+	Leiomyosc.grade: II.
16. HGS	48 N	medence	1.37; 1.62	40%	ND	$\alpha$ -smooth-actin+	Leiomyosc.grade: III.
17. HGS	21 N	b. comb-med.	1.51	37%	ND	Vim:+;Ker:+	Epithelioid sc.
18. HGS	24 F	j. térdhajlat	1.24	31%	no t(X; 18)	Vim:+;Ker:-, EMA+	Synovial sc.
19. HGS	18N	b. láb	1.35; 1.83	41%	ND	S-100:+	MPNST
20. HGS	58 F	hash. mögött	1.39; 1.90	39%	ND	Vim:+;Ker:-	Liposarcoma grade: III.
21. HGS	71 F	hash. mögött	1.35; 1.84	33%	ND	Vim:+;Ker:-	Liposarcoma grade: III.
22. HGS	63 F	b. láb	1.28; 1.70	22%	ND	Vim:+;Ker:-	Myxofibrosc.grade III.

HGS: high-grade sarcoma, MFH:malignant fibrous histiocytoma, MPNST: malignant periferial nerver sheath tumor, DI: DNS Index, PI: Proliferációs Index

A képek (5,6. ábra) jól demonstrálják a fentieket, részben a cytologiai atypia, polomorphia szembetűnő, részben jól megfigyelhető a két szubpopuláció jelenléte. Az inzert CT kép pedig demonstrálja, hogy az aspirációs cytológia számára könnyen elérhető még a retroperitoneális tér is, a szúrás és mintavétel CT vezérléssel könnyen kivitelezhető. Ugyanerről a területről biopsziát venni már jóval problémásabb.



5. ábra Pleiomorf daganatsejtek myxifibrosarcomából (bal kép) és rhabdomyosarcomából (jobb kép). Pontos diagnózis annak ellenére nem volt mondható, hogy desmin pozitivitás igazolódott (jobb kép alsó inzert), hiszen ez nem elég specifikus. A felső inzert kép jelzi a CT vezérelt mintavételt.



6. ábra Myxofibrosarcoma DNS histogrammja. A nyilak jelzik a két aneuploid subpopulációt, DI: 1.49 és DI: 1.89

A benignus csoportban 29 esetet vizsgáltunk (3. táblázat), természetesen nem minden esetben tudtunk pontos diagnózist mondani, csupán abban voltunk biztosak, hogy az alábbi kritériumok alapján biztosan jóindulatú lágyrész tumorral állunk szemben. Viszont azokban az esetekben amikor a citológiai jellegzetességek is megvoltak (7,8. ábra), törekedtünk a pontos diagnózisra illetve néha immuncytokémiai kiegészítést is végeztünk.

c) benignus lágyrésztumорок – 29 eset

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

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

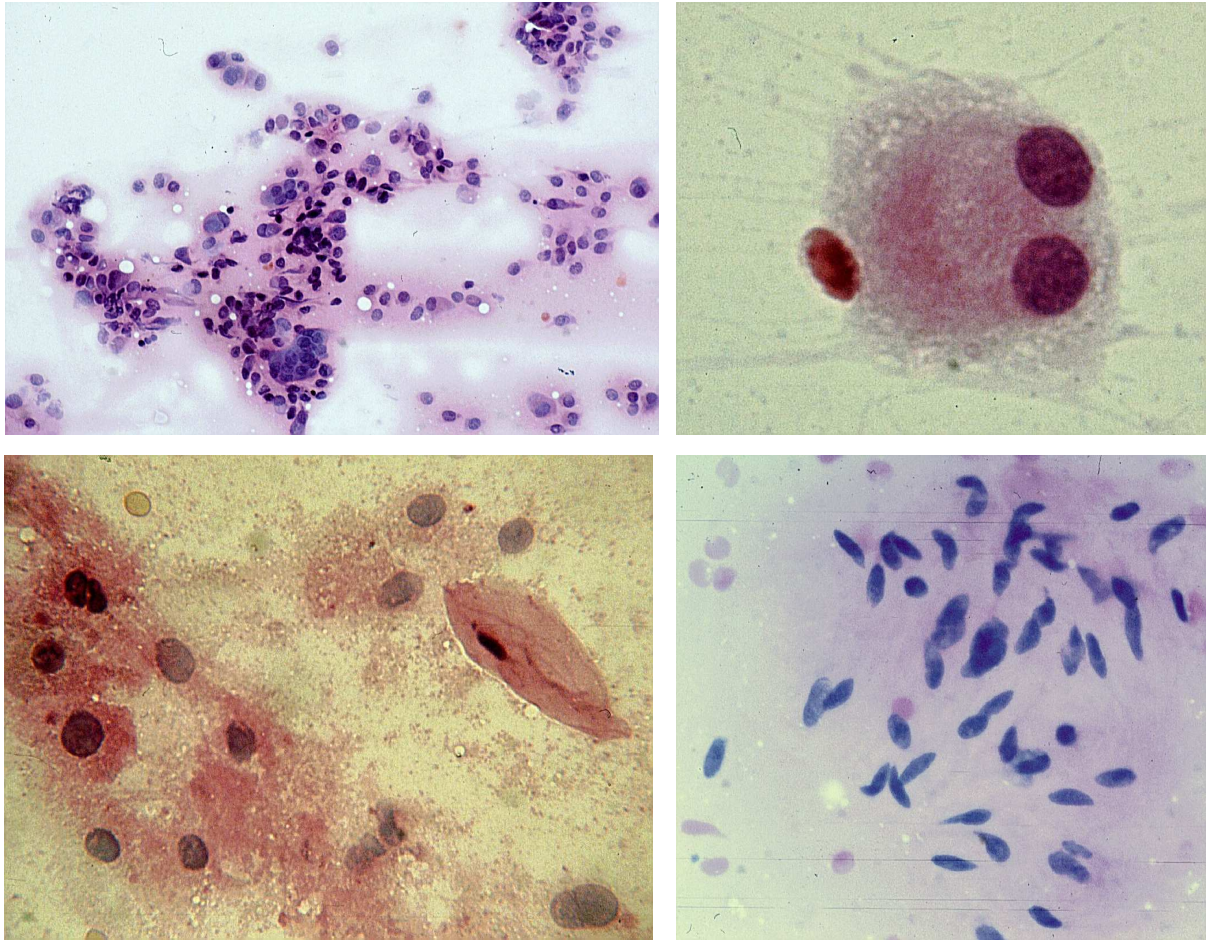
3. Táblázat A benignus csoport klinikopatológiai jellemzői

Cit. diagnosis	Kor,nem	Anatómiai lok.	DI	PI	FISH	Immunocyt	Histopatológia
1. BSTT	31 N	j. váll	1.08	2%	ND	Vim: +	Nodular fasciitis
2. BSTT	48 N	b. alkar	1.03	4%	ND	Vim: +	Nodular fasciitis
3. Nodular fasciitis	42 F	b. comb	1.05	3%	no t (X; 18)	Vim: +	Nodular fasciitis
4. BSTT	28 N	j. alkar	1.03	1%	ND	ND	Dermatofibroma
5. Juvenilis xanth.	8 N	j. comb	1.07	3%	ND	CD-68: +, Vim:+	Juvenilis xanth.
6. BSTT	52 F	nyak	1.04	2%	ND	ND	Dermatofibroma
7. BSTT	47 F	mellkas	1.01	2%	ND	ND	Dermatofibroma
8. Fibromatosis	3weeks N	nyak	1.04	1%	ND	ND	Fibromatosis colli
9. Fibromatosis	2 weeks N	nyak	1.03	1%	ND	ND	Fibromatosis colli
10. Fibromatosi	2 weeks F	nyak	1.01	1%	ND	ND	Fibromatosis colli
11. BGTTS	45 N	b. kéz	1.02	<1%	ND	ND	BGTTS
12. BGTTS	48 N	b. kéz	1.02	1%	ND	ND	BGTTS
13. BGTTS	31 F	b. csukló	1.06	<1%	ND	ND	BGTTS
14. BGTTS	37 N	j. láb	1.04	4%	ND	ND	BGTTS
15. BGTTS	62 N	b. kéz	1.05	1%	ND	ND	BGTTS
16. BSTT	38 F	nyak	1.06	1%	ND	ND	Benign Schwannoma
17. Benign Schwannoma	49 N	b. felkar	1.06	1%	ND	S-100:+	Benign Schwannoma
18. Benign Schwannoma	70 N	b. láb	1.05	<1%	ND	S-100:+	Benign Schwannoma
19. Elastofibroma	44 N	j. lapocka	ND	<1%	ND	ND	Elastofibroma
20. BSTT	38 N	j. lapocka	ND	<1%	ND	ND	Elastofibroma
21. Angiolipoma	42 F	b. vese	ND	<1%	ND	ND	Angiolipoma
22. Angiolipoma	29 N	b. vese	ND	<1%	ND	$\alpha$ -smooth-actin:+	Angiolipoma
23. Angiolipoma	51 N	j. vese	ND	<1%	ND	ND	Angiolipoma
24. Granulár cell tu.	41 N	hasfal	1.03	3%	ND	S-100:+	Granular cell tu.
25. Granulár cell tu.	62 N	b. alkar	1.05	1%	ND	S-100:+	Granular cell tu.
26. BSTT	57 N	b. fenék	ND	1%	ND	ND	Ancient haematoma
27. Intramusc. lipoma	47 N	b. hát	ND	>1%	ND	ND	Intramusc. lipoma
28. Intramusc. lipoma	42 F	j.comb	ND	>1%	ND	ND	Intramusc. lipoma
29. BSTT	35 N	j. alkar	1.03	1%	ND	$\alpha$ -smooth-actin:+	Glomangioma

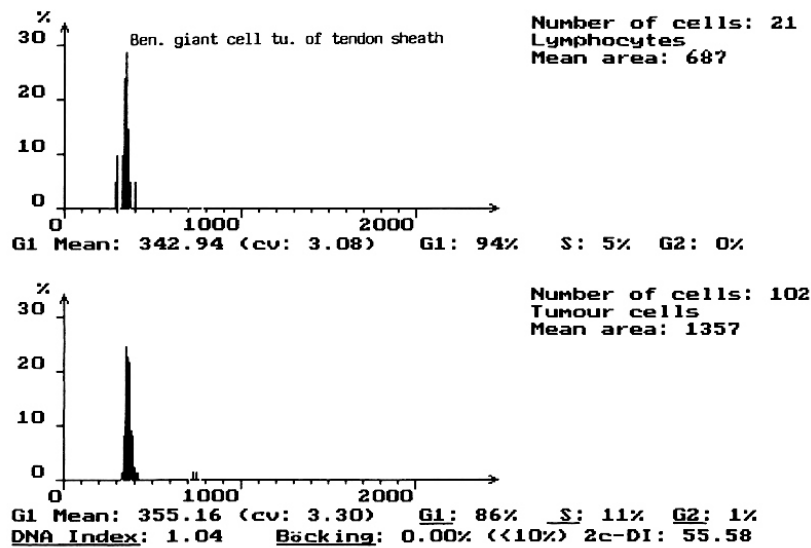
DI: DNS Index, PI: Proliferációs Index, ND: nem végeztük, BSTT: benignus lágyrész tumor, BGTTS: benignus óriássejtes inhiüvely tumor

Az alábbi képekből kiemelendő a jellegzetes cytomorphologiai kép, valamint a teljesen „szimpla” DNS hisztogramm. A jobb felső kép egy cysta synoviálisra jellemző citomorphologiai kép ami nagyon jellegzetes, bár a táblázatban nem szerepel. (A ganglionokat csak úgy mint a sima lipomákat kihagytuk a vizsgálatból, mert torzították volna az eredményeket pozitív irányba.)

dc\_59\_10<sup>8</sup>-



7. ábra Bal felső: óriássejtes inhuvelytumor képe monomorph mononukleáris és többmagvú osteoclast típusú óriássejtekkel. Jobb felső: binuclearis synovialis sejt jellegzetes myxosus háttérrel. Bal alsó: kissé egyenőtlen mag nagyságú, de jellegzetes széles, erősen granulált, elmosott határu cytoplazmával bíró sejtek granularis sejtjes tumorban. Jobb alsó: jellegzetes kihegyezett csavarodott magvú sejtek neurofibromából.



8. ábra Egyértelműen diploid histogramm, mely az egész csoportra jellemző.

A kérdéses biológiai viselkedésű csoport összesen 20 daganat tartozott, és ahogy a név alapján várható ezekben az esetekben se hisztogenetikai diagnózist nem tudtunk mondani, valamint azt se tudtuk eldönteni, hogy vajon a daganat benignus vagy malignus (4. tábla). Kiemelendő az, hogy némely esetben bár komoly gyanú volt konkrét diagnózisra, de mivel nem tudtuk igazolni molekuláris vagy egyéb módszerekkel a feltevésünket, biztonsági okokból inkább ebbe a csoportba tettük a megfelelő következményekkel (9-11. ábra).

d) lágyszövetű daganatok kérdéses biológiai viselkedéssel – 20 eset

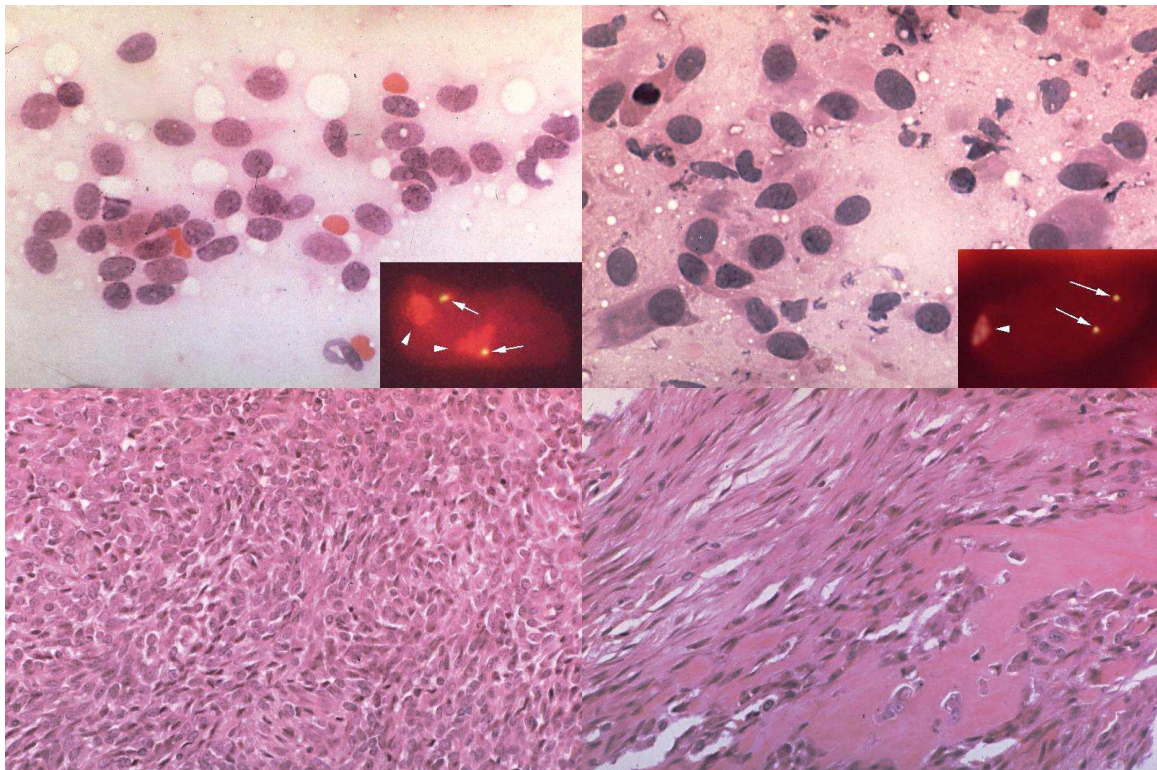
- monomorph citomorfológiai kép, kifejezett cellularitás
- DI: diploid vagy peridiploid
- PI: nagyobb, mint 5% és kisebb, mint 15%
- nincs jellegzetes citogenetikai vagy immunocitokémiai eredmény

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

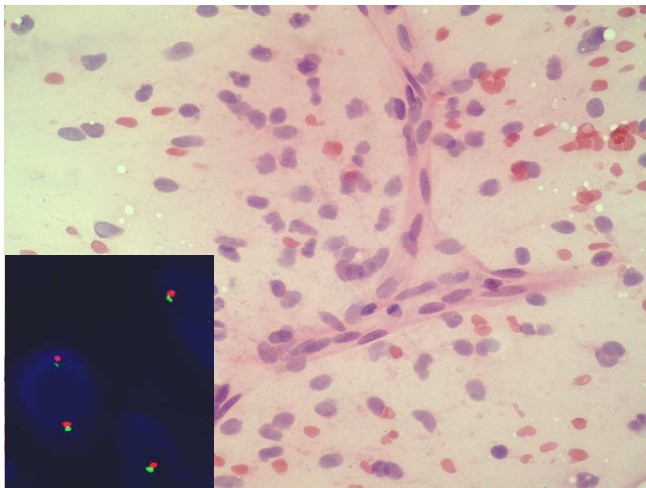
#### 4. Táblázat A kérdéses biológiai viselkedésű csoport klinikopatológiai jellemzői

Cit. diagnózis	Kor, nem	Anatómiai lok.	DI	PI	FISH	Immunocyt	Histopatológia
1. TQN	27 N	b. comb	1.06	8%	ND	Vim: +, Ker: -	Haemangiopericytoma
2. TQN	61 F	mellkas	1.10	6%	ND	Vim: +, Ker: -	Haemangiopericytoma
3. TQN	32 N	b. csukló	1.12	9%	no t(X;18)	Vim: +, Ker: -	DGTTS
4. TQN	44 N	b. térdhajlat köz.	1.08	7%	no t(X;18)	Vim: +, Ker: -	DGTTS
5. TQN	57 N	b. váll	1.08	9%	ND	Vim: +, Ker: -	Extraabdominal fibromat.
6. TQN	81 F	mellkas	1.10	6%	ND	Vim: +, Ker: -	Extraabdominal fibromat.
7. TQN	39 F	j. fenék	1.05	7%	ND	Vim: +, Ker: -	Extraabdominal fibromat.
8. TQN	22 N	j. comb	1.04	8%	ND	Vim: +, CD-31: +	Intramuscul. haem. (Masson)
9. TQN	37 N	b. láb	1.08	11%	no t(X;18)	S-100: +	Sarcomatoid Schwannoma
10. TQN	33 N	b. térdhajlat	1.04	7%	no t(12;16)	Vim: +, Ker: -	Spindle cell lipoma
11. TQN	48 F	j. csukló	1.05	9%	no t(X;18)	Vim: +, Ker: -, EMA: -	Panniculitis ossificans
12. TQN	28 N	j. comb	1.32	14%	ND	Vim: +, Ker: -	Mal. HPC. grade I.
13. TQN	42 F	j. vese	1.30	13%	ND	Vim: +, $\alpha$ -smooth-actin: +	Mal. angiomyolipoma
14. TQN	37 F	b. comb	1.30	7%	no t(12;16)	Vim: +, Ker: -	Myxofibros. grade I.
15. TQN	84 N	b. comb	1.18	13%	ND	Vim: +, CD-68: +	MFH giant cell type grade I.
16. TQN	72 N	j. fenék	1.28	8%	no t(12;16)	Vim: +, Ker: -	Myxofibros. grade I.
17. TQN	67 F	b. láb	1.30	9%	no t(12;16)	Vim: +, Ker: -	Myxofibros. grade I.
18. TQN	28 F	b. lapocka	1.20	10%	ND	$\alpha$ -smooth-actin: +	Myofibroblastic sc. grade I.
19. TQN	49 N	b. comb	1.09	6%	no t(12;22) no t(12;16)	Vim: +	Myxoid liposc. grade I.
20. TQN	61 F	j. láb	1.27	11%	ND	Vim: +, $\alpha$ -smooth-actin: +	Leiomyosc. grade I.

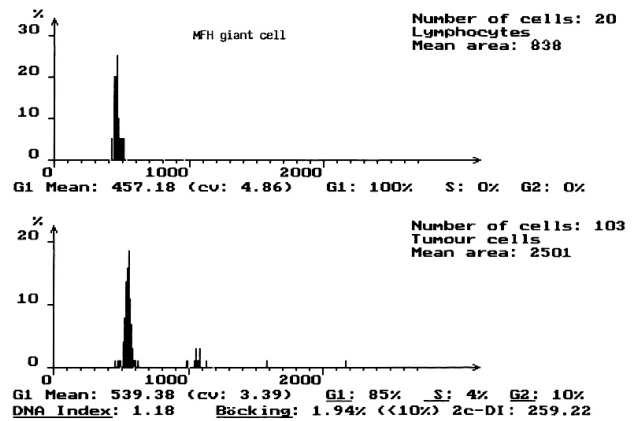
DI: DNS Index, PI: Proliferációs Index, ND: nem végeztük, TQN: tumor kérdéses biológiai viselkedéssel, HPC: haemangiopericytoma, DGTTS: diffúz óriássejtes inhomogén tumor



9. ábra A bal felső és a jobb felső képen maglehetősen hasonló cytológiai kép figyelhető meg, mindkét esetben felmerült synoviális sarcoma lehetősége (figyelembe véve a lokalizációt is; csukló). A bal felső kép inzerájén viszont igazolható FISH vizsgálattal a t(X;18), így a diagnózis synovialis sarcoma lett, míg a másik inzerájén nem. Ezen utóbbi esetben a daganatot a kérdéses biológiai viselkedésű csoportba tettük. (Mindkét eset férfi; piros folt X painting próba, zöld szignál 18-as centromerikus próba). A bal alsó szövettani képen igazolódott a synovialis sarcoma diagnózisa, míg a másik eset (jobb alsó kép) panniculitis ossificansnak bizonyult.



10. ábra. A cytológiai kép jellegzetes myxoid liposarcomára, söt plexiform kapillaris hálózat is látható, viszont break apart próbával t(12;16) nem volt igazolható, így a daganat a kérdéses biológiai viselkedésű csoportba került.



11. ábra Az erre a csoportra jellemző peridiploid DNS index:1.18-as értékkel látható malignus fibrosus histiocytomában

*Megbeszélés:* a mesenchymalis tumorok aspirációs cytológiai diagnosztikája meglehetősen nagy kihívást jelent a cytopatológus számára (29,105,187). A legtöbb közlemény megközelítőleg 95%-os pontosságról számol be (104,243), de valójában benignus és malignus elváltozásokat különítenek el, és a legproblémásabb csoportot, az intermedier malignitású daganatokat egyszerűen kihagyják. Sajnos többnyire a sebészi megközelítés meglehetősen egyforma, függetlenül a cytológiai eredménytől a sebész excisionális vagy vastag tű (core) biopsziát vesz, és ami még talán ennél is fontosabb, a citológiára építve nem mer praeoperatív kezelést (kemo és radioterápia) alkalmazni. Ugyanakkor igen jól ismert, hogy a primer sebészi kezelés sorsdöntő a beteg számára (53,54). Abból a célból, hogy megoldjuk ezt a problémát és elkerülhessük a nyílt biopsziát (188) egy sokkal inkább klinikopatológiai megközelítést alkalmaztunk, a kiegészítő (részben molekuláris) vizsgálatokra támaszkodva. Mindezek figyelembevételével négy csoportot képeztünk megfelelő terápiás javaslattal. A magas malignitású csoport, valamint a tumorok pontos hisztogenetikai eredettel csoport esetén (az esetek mintegy fele), lehetőség van szinte tetszés szerinti praeoperatív kezelésre, és lényegében bármilyen radikalitású műtétre. Mindez természetesen azért lehetséges, mert lényegében szövettani értékű diagnózist tudunk ezekben az esetekben mondani. A benignus csoport esetén (az esetek mintegy negyede) a teendő egyszerű: a daganat eltávolítható, sőt adott kritikus lokalizációban mintegy kigördíthető, és nem kell ügyelni feltétlenül az épben történő eltávolításra. A negyedik csoport - lágyrésztumorok kérdéses biológiai viselkedéssel - meglehetősen nagy (szintén mintegy negyede az eseteknek) de a teendő itt is egyértelmű: a daganatot szélesen az épben kell eltávolítani, meg kell várni a pontos szövettani diagnózist, és minden további teendő csak ez után lehetséges. Különösen fontos ez a beteg számára, hiszen ezen csoportban többnyire alacsony malignitású sarcomák vannak, melyek esetében a primer sebészi kezelés perdöntő a beteg további sorsát illetően.

A kiegészítő technikákat illetően a FISH alkalmazása forradalmi volt (245), hiszen így nagy számban lehet interfázisú sejteket vizsgálni. Az aspirációs cytológiai anyag ideális erre a célra, hiszen friss anyagról és nem elvágott magokról van szó. Szintén fontos, hogy aspirációval egy nagy tumor esetén több helyről is könnyedén tudunk anyagot nyerni, ami előny az intratumorális heterogenitás miatt (159) (szemben pl. a core vagy excisionális biopsziával). A különböző specifikus break apart próbákat ma már rutin szerűen tudjuk alkalmazni, így a synovialis sarcoma, Ewing sarcoma, myxoid liposarcoma, low grade fibromyxoid sarcoma, alveolaris lágyrész sarcoma biztonsággal diagnosztizálható (39,43,60,75,85,134,155,158,179). Mivel a Ewing gén számos más lágyrész daganatban is partner géneként szerepel, további daganatok diagnosztizálhatók (pl. clear cell sarcoma, kis

kereksejtes desmoplasticus tumor, extrasceletalis myxoid chondrosarcoma stb.), figyelembe véve a citomorphológiát és a többi kiegészítő vizsgálatot (30,38). 16 esetben a FISH technika segítségével definitív diagnózist tudunk adni. A cytológiai definitív diagnózis koncepciója (molekuláris alapon) ma már széles körben a nemzetközi irodalom alapján is elfogadott (104,188). A DNS próbák számának szaporodásával remény van arra is, hogy újabb daganatokat lehessen diagnosztizálni, pl. atypusos lipomatózus tumor, rhabdoid tumor stb (33,40,189).

A DNS tartalom meghatározásának hasznát illetően a szkepticizmus abban van, hogy néhány esetben fals aneuploiditást találtak benignus daganatoknál (pl. fasciitis nodularis) (118), másrészt viszont ismert, hogy alacsony malignitású sarcomák peridiploid vagy diploid értéket is mutathatnak. Mindezen eredmények azonban flow cytometriás vizsgálatokkal születtek túlnyomóan. A képelemző citofotometriás mérés előnye, hogy könnyű kis aneuploid subpopulációt detektálni, míg ez flow cytometria esetén gyakorlatilag elvész (201). Eseteinkben a magas malignitású csoportban volt a legnagyobb jelentősége a ploiditásnak. A sokszor két aneuploid subpopuláció nagyon jellegzetes erre a csoportban, magas proliferációs index is megfigyelhető, ugyanakkor a cytogenetikai eltérések nem specifikusak. Nem ismert egyetlen olyan benignus lágyrész daganat se, mely aneuploid lenne, a proliferációs index több mint 15% és cytomorphologiai megjelenésében pleiomorph vagy anaplasticus lenne. Természetesen, ha bármi kétség merül fel, és valamelyik kritérium nincs meg, akkor a daganat a bizonytalan malignitású csoportba kerül. Valójában azonban többségben vannak azok a cikkek, melyek a ploiditás meghatározásának hasznát hangsúlyozzák (142,201), és ha a DNS tartalom meghatározást kiegészítjük kromoszómális szintű vizsgálattal is (FISH) akkor még további információkhoz juthatunk és még precízebb betekintésünk lesz a genetikai eltéréseket illetően (147).

Az immuncitokémiának döntő szerepe van a differenciáldiagnosztikában, különösen a tumorok pontos hisztogenetikai eredettel csoportban, és abban az esetben ha az a kérdés, hogy egyáltalán primer lágyrész sarcomáról van-e szó. Nagyon fontos elkülöníteni a metasztatikus carcinomákat valamint a lymphomákat a primer lágyrésztumoroktól, minthogy nem ritkán utánozhatják (főleg klinikai megjelenésükben) ezeket. A Ki-67 index meghatározásának is igen fontos szerepe van (26,27,88,92). Az általunk meghatározott százalékok az egyes csoportokat illetően megbízhatónak bizonyultak, és lényegében egyeznek is az irodalmi adatokkal különösen a magas malignitású csoportot illetően (37,104,148,241). A magas malignitású, pleiomorph sarcomák esetén nem törekszünk pontos hisztogenetikai



meghatározásra, hiszen ez immuncytokémiával meglehetősen nehézkes lenne, valamint nem sok jelentősége van a praeoperatív kezelés tervezését illetően (26,128).

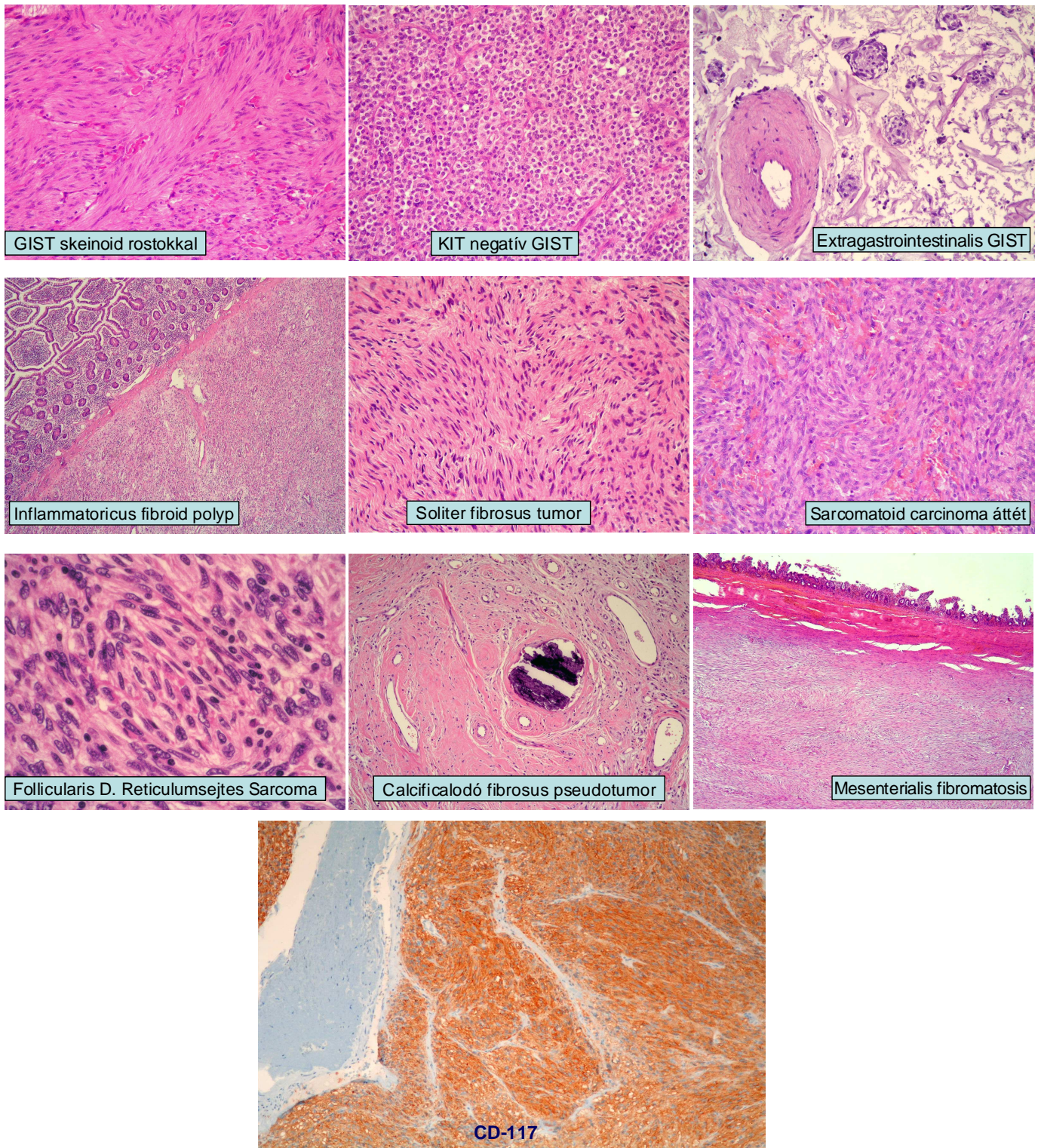
Összefoglalva: a lágyszöveti tumorok preoperatív diagnosztikájában a molekuláris módszerek segítségével olyan diagnosztikai algoritmust sikerült kidolgozni, mely támpontot ad a neoadjuváns kezeléshez és nagy segítséget jelent a végtagmegtartó műtétek tervezésében.

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

### *A GIST-ek differenciáldiagnosztikája és prediktív faktorai*

A gastrointestinális traktus leggyakoribb mesenchymális tumora a GIST, mégis számos differenciáldiagnosztikai probléma merülhet fel, részben a morfológiai hasonlóság részben az immunreakciók átfedése miatt (47,59,91,154,183). Bár a CD117 (c-kit) immunhisztokémiai vizsgálat forradalmat jelentett a GIST-ek diagnosztikájában, de nem elég szenzitív, valamint a meglehetősen karakterisztikus CD34 pozitivitás pedig nem elég specifikus. Korábbiakban, még a CD117 vizsgálat lehetősége előtt számos GIST entitást más tumorként diagnosztizáltunk, ennek felmérése, revidálása országos szinten is megtörtént a magán tanulásaival (52, 160, 162, 202 204, 205, 238). Ugyanezen munkákban tudtuk elemezni azokat a leggyakoribb tumor féleségeket is melyek valóban differenciáldiagnosztikai problémát jelentenek. A problémákat lényegében két csoportra lehet osztani: a, nem típusos morfológia vagy lokalizáció esetén bizonyítani kell, hogy valóban GIST-ről van szó b, a GIST-et utánozó és mind morfológiai mind immunhisztokémiai átfedést mutató daganatok esetén ezen daganatokat el kell különíteni a GIST-től. A lista meglehetősen hosszú: soliter fibrosus tumor, inflammatoricus fibroid polyp, folliculáris dendriticus reticulum sejtes sarcoma, sarcomatoid carcinoma áttéte, mesenterialis fibromatosis, calcifikálódó fibrosus pseudotumor, synoviális sarcoma, valamint a „klasszikus” gyakoribb differenciáldiagnosztikai problémák, mint a benignus és malignus myogén illetve neurogén daganatok. Az alábbiakban (12. ábra) illusztráljuk azokat a leggyakoribb daganatokat, melyeket el kell különíteni a GIST-től.

dc\_59\_10<sup>4</sup>-



12. ábra Jellegetes és kevésbé jellegetes (extragastrintestinalis GIST) GIST képek mellett demonstráljuk a fontosabb differenciáldiagnosztikai kórképeket. Kulcsszerepe van a CD117 immunreakciónak, a differenciáldiagnosztikában (alsó kép).

A fenti ábrák igen jól illusztrálják a GIST-ek differenciáldiagnosztikájának nehézségeit, problémáit. Bár kulcsszerepe van az immunreakcióknak a differenciáldiagnosztikai megoldásban, mégis a mutációk vizsgálata nélkülözhetetlen, elsősorban a helyes kezelés megválasztása érdekében, de részben adott esetben a pontos diagnosztika miatt is. Rutin szerűen, minden közepes és magas rizikójú csoportba tartozó GIST esetén mutáció analízist végzünk, melyet adatbázisban tárolunk (országos GIST munkacsoport), így a klinikusok részére az adatok bármikor hozzáférhetőek. A metastatikus GIST-ek esetén ez azonnali lehetőséget jelent, de az esetleg évek múlva bekövetkező metastasis esetén is az adatok könnyen visszakereshetőek. A terápia szempontjából igen lényeges, hogy egy c-kit immun pozitív GIST esetén 11-es vagy 9-es exon mutációt találunk, hiszen az első esetben standard 400 mg Glivec kezeléssel, míg az utóbbi estén emelt (800 mg) dózisú kezeléssel kezdenek. Továbbá szintén fontos, hogy a c-kit pozitív tumorok esetén, ha nincs mutáció a 9-es illetve a 11-es exonban akkor a többi exonban található-e egyáltalán mutáció, vagy a daganat un. vad típusnak bizonyul. Ezen adatok alapvetően befolyásolhatják a kezdő terápia milyenségét, illetve a terápiás váltás (Sutent) lehetőségét. Amennyiben a daganat c-kit immun negatív, akkor un. kit negatív GIST-ről beszélünk, ha igazolni tudjuk egyébként a GIST diagnózist. Ebben segít a morfológia, a CD34 immunpozitivitás és a PDGFRA mutáció kimutatása. A PDGFRA egyik leggyakoribb mutáció félesége a 18-as exon D82V pontmutációja, ami megerősíti ugyan a GIST diagnózist, de egyben kontraindikációt is jelent a Glivec kezelést illetően (ugyanakkor más szerek mint pl. Sutent szóba jöhetnek). A disszertáció benyújtásának idejéig **195** esetben készült mutációs analízis szekvenálással, az alábbi megoszlásban:

c-kit immun pozitív GIST, c-kit gén

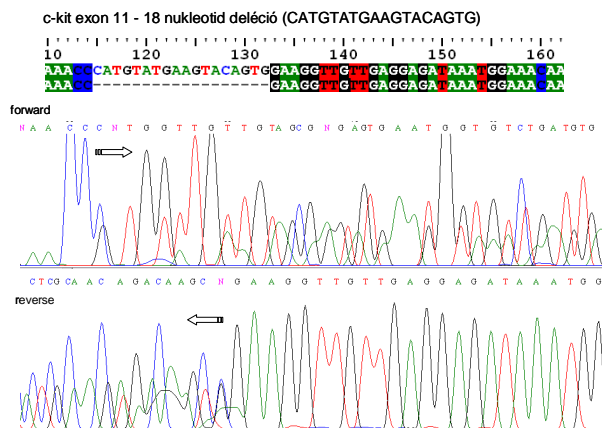
exon 11	83
exon 9	12
exon13	2
exon 17	1
exon14	0
vad típus	77

c-kit immun negatív GIST, PDGFRA gén

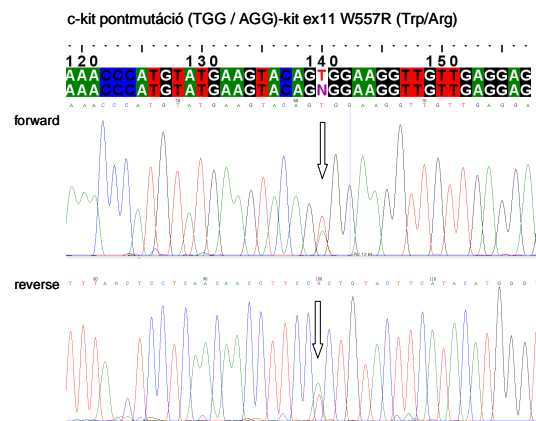
exon 18	15
exon 10	5
exon 12	0
exon 14	0

Megjegyzendő hogy a különböző exonmutációk százalékos megoszlása lényegében megegyezik az irodalomban találtakkal, kivéve, hogy a vad típus a mi anyagunkban kissé gyakrabban fordul elő. Ez azonban könnyen magyarázható azzal a ténnyel, hogy meglehetősen sok problémás eset érkezik konzíliumi vizsgálatra, ami miatt a vad típusú esetek száma mintegy „feldúsul”. Új mutációt is találtunk, melyeket publikáltunk, így egyben a nemzetközi adatbázis részévé is vált. Érdeemes megjegyezni, hogy új mutáció esetén fontos az arról való meggyőződés, hogy valóban funkcionyerő mutációról van-e szó, ami a következőképpen történik: hosszabb deléciók insertiók stb. esetén nincs szükség külön vizsgálatra, annak valószínűsége, hogy ez egy úgynevezett SNP (normál variáció a populáció kis egyedszámában) legyen, gyakorlatilag nulla. Ugyanakkor, ha pontmutációról van szó minden esetben megszekvenáljuk a tumor melletti normál szövetet is, és ha abban ugyanazt az eltérést találjuk, akkor SNP-ről van szó, míg ha a mutáció csak a tumorszövetben mutatkozik, akkor valódi funkcionyerő mutációt sikerült igazolni.

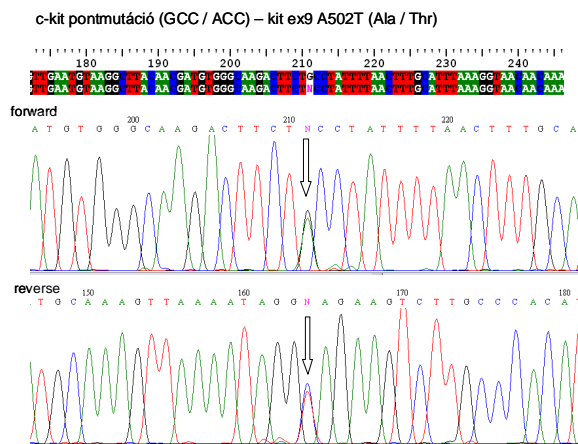
Az alábbiakban (13-20. ábra) egy-egy példával illusztráljuk a különböző mutációkat.



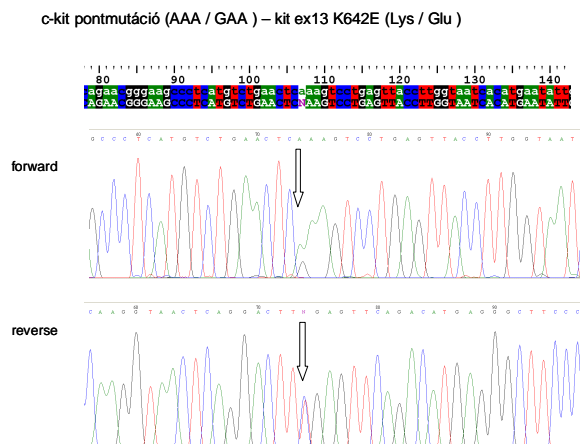
13. ábra KIT 11-es exon nagy delécióval.



14. ábra KIT 11-es exon, pont mutáció.

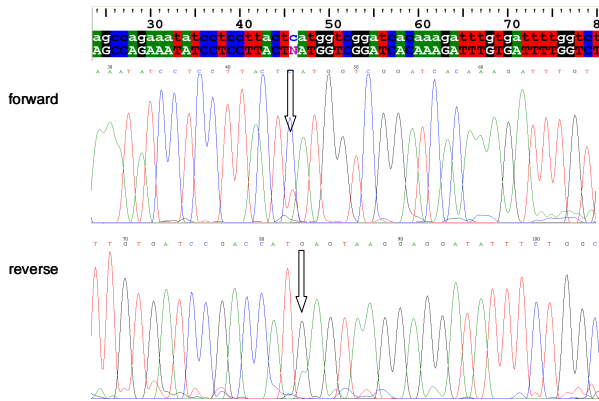


15. ábra Pont mutáció a KIT 9-es exonban.



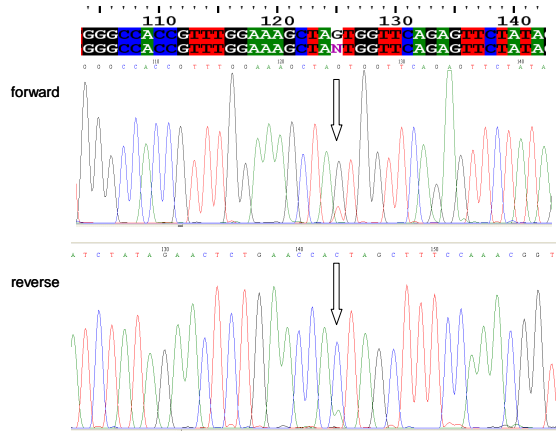
16. ábra Pont mutáció a KIT 13-as exonban.

c-kit pontmutáció (CAT / TAT) – kit ex17 H802Y (His / Tyr)



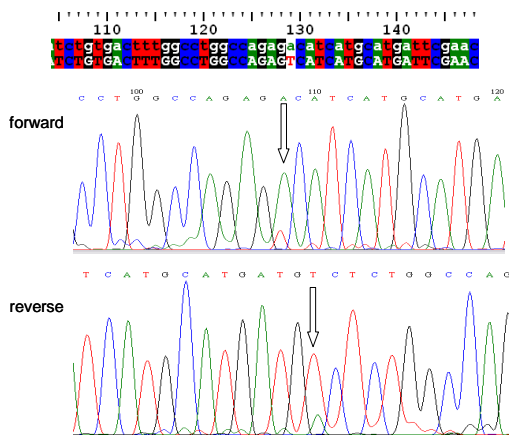
17. ábra Pont mutáció a KIT 17-es exonban.

c-kit pontmutáció (GTG / TTG)- kit ex9 V473L (Val/Leu)



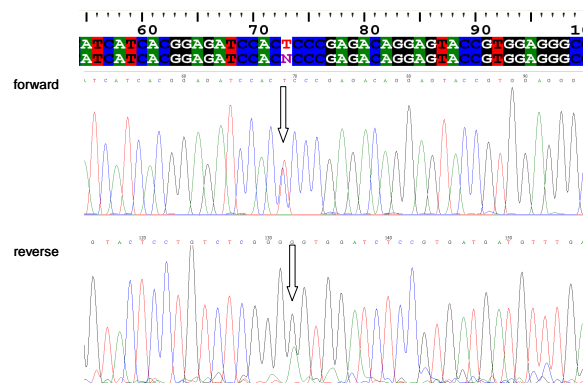
18. ábra Pont mutáció a KIT 9-es exonban.

PDGFR-A pontmutáció (GAC / GTC)- ex18 D842V (Asp / Val)



19. ábra A leggyakoribb PDGFRA pontmutáció.

PDGFR-A pontmutáció (TCC / CCC)- ex10 S518P (Ser / Pro)



20. ábra PDGFRA pontmutáció a 10-es exonban.

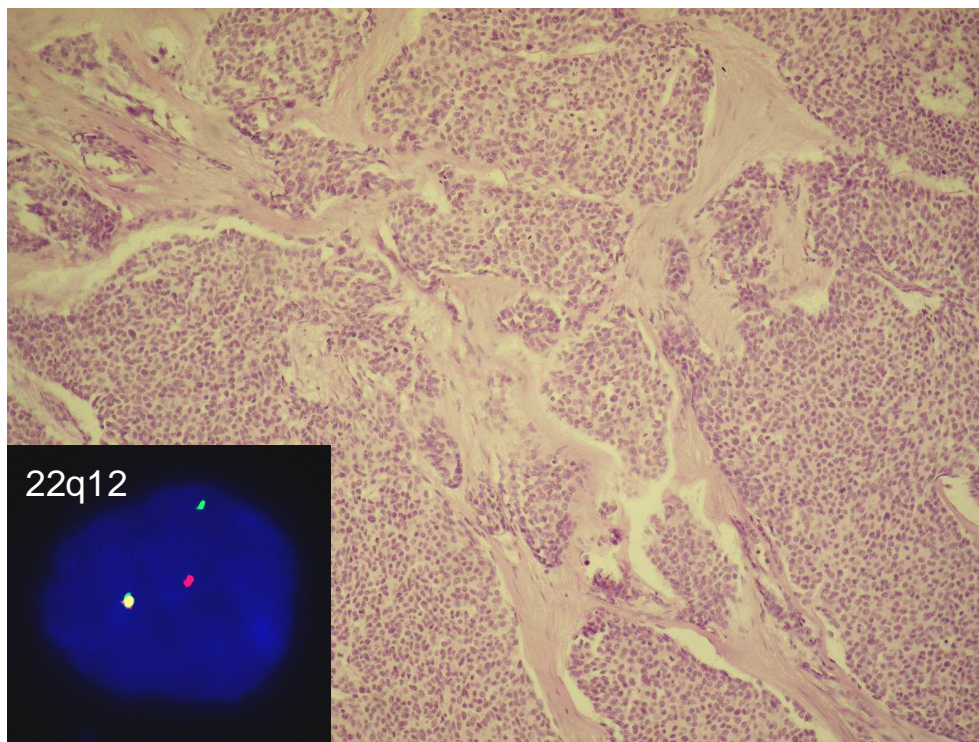
A mutációanalízis eredményei alapvetően prediktívek, de fontos, hogy ezen leggyakoribb gastrointestinalis mesenchymális daganat esetén részletes klinikopatológiai összefüggéseket is feltárjunk, kitérjünk a kezelés hatékonyságának elemzésére, valamint támpontot adjunk a prognózist illetően is. Ezen utóbbi kérdést illetően a DNS tartalom mérésnek, valamint a proliferációs aktivitás mérésének lehet többek között jelentősége saját vizsgálataink szerint is. Azt találtuk (204,205), hogy a mai osztályozás szerinti alacsony rizikójú csoportba tartozó GIST-ek diploidok, a magas rizikócsoporthoz tartozóak aneuploidok (különösen a magas proliferációs aktivitással rendelkezők), míg a közepes rizikó csoportba tartozó daganatok lehetnek diploidok vagy aneuploidok, de az utóbbiak prognózisa rosszabb. Mindez segítséget jelenthet a klinikusnak abban, hogy a kezelés szempontjából kritikus közepes rizikójú

csoportot milyen módon kövesse, esetlegesen kezelje, természetesen figyelembe véve a mutáció analízis eredményeit is.

### *Esetismertetések*

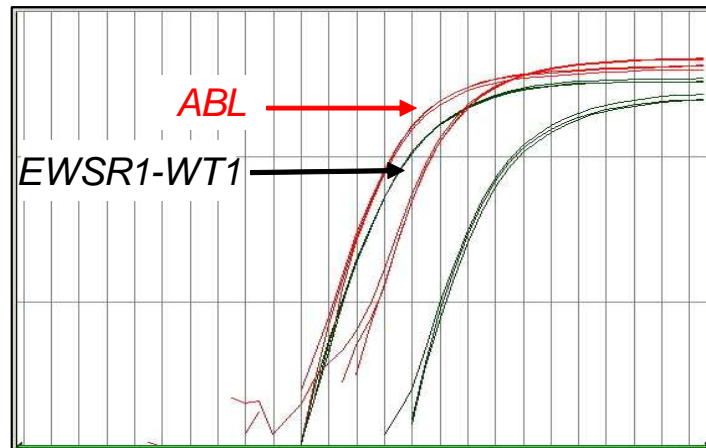
A lágyrész és csont tumorok esetében olyan sok entitás és egyes entitáson belül olyan sok variáció létezik, hogy csupán a korrekt diagnózis érdekében számos kiegészítő vizsgálatra, sokszor kiegészítő molekuláris vizsgálatra vagy éppen DNS tartalom meghatározásra van szükség, az utóbbi esetén a prognózis vagy éppen a benignitás – malignitás kérdése miatt. A publikációink közül (17,57,66,73,139,163,198,206,209,210,211,212,226,227,229,237) csupán néhány érdekesebbet szeretnék röviden ismertetni.

1, A pleura kis kereksejtes desmoplasticus tumorának esete (213) rámutat a pathológia mai modern, molekuláris szintű diagnosztikájára. A karakterisztikus immunhisztokémiai leletek mellett a diagnózis megerősítést nyert RT-PCR reakcióval is, ami kimutatta a jellegzetes EWS-WT1 gén fúziót (21,22. ábra). Mindezek mellett ultrastrukturális vizsgálattal elsőként írtuk le, hogy a daganat olyan rövid microvillusokat tartalmaz, amelyek a submesothelialis sejtekre jellemzőek, egyben igazolva a submesothelialis, ún. „mesothelioblastos” sejt eredetet (23. ábra).

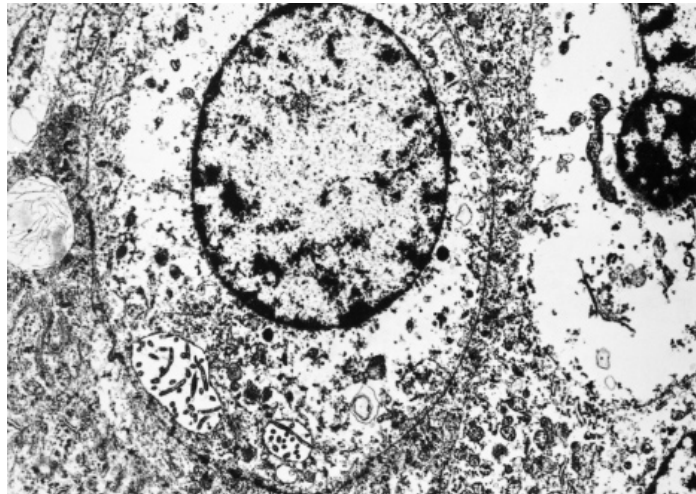


21. ábra Kis kerek anaplasztikus jellegű daganatsejtek kifejezetten desztoplasztikus strómában. A 22q12 régióban a signálszétválás igazolja a Ewing gén érintettségét, de nem igazolja önmagában a specifikus transzlokációt.

dc\_59\_10<sup>9</sup>-

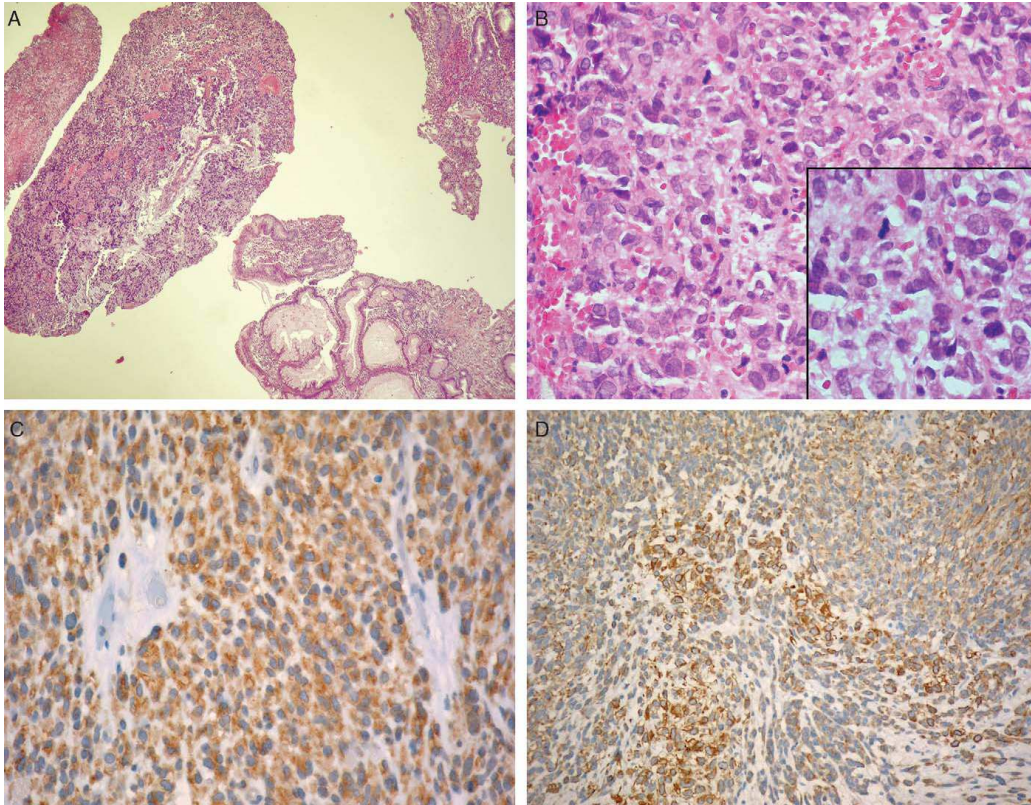


22. ábra Valós idejű PCR reakció mely a kontroll géntermék (ABL) mellett egyértelműen detektálta a kis kerek sejtes desmoplastikus daganatra jellemző t(11;22)(p13;q12)-t.

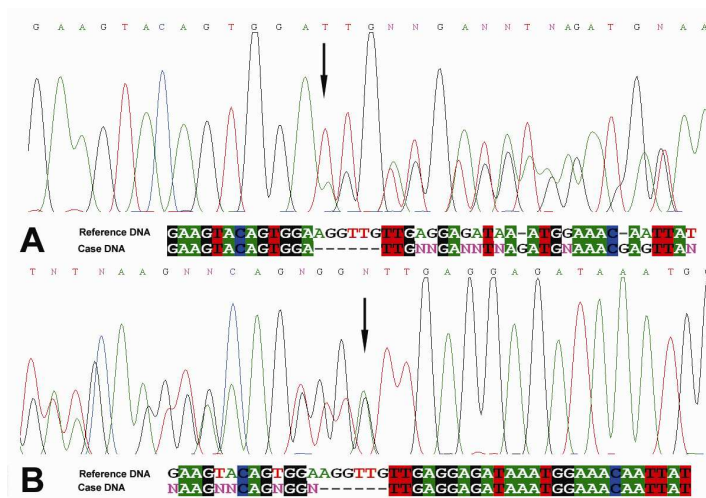


23. ábra Differenciálatlan tumorsejtek intracitoplasmikus neoluminákkal (EM; x6000)

2, A mutációanalízis szükségességét mutatja az alábbi ritka eset is, mely tanulsága és érdekessége miatt közlésre is került (130). Gyomorvérzéssel és hasi fájdalmakkal került egy 45 éves nő vizsgálatra, gasztroszkópia történt és a biopsziás minta szövettani diagnózisa anaplasztikus carcinoma lett (a daganat anaplasztikus jellegű volt és citokeratin pozitív). Időközben cseplezsi metasztázis is igazolódott, ennek konzíliumi anyagát vizsgáltuk, mely során igen ritka keratin pozitív GIST-et diagnosztizáltunk melyet a mutációanalízis erősített meg (24,25. ábra).



24. ábra A, Kifekélyződő gyomorrészletek a bal oldalon a tumor szövettel B, Anaplasztikus epithelioid sejtek proliferációja, jól látható osztódással az insetben. C és D, Erős cytoplazmatikus CD117 és keratin AE1/AE3 pozitívítás a daganatsejtekben (immunperoxidáz reakció)

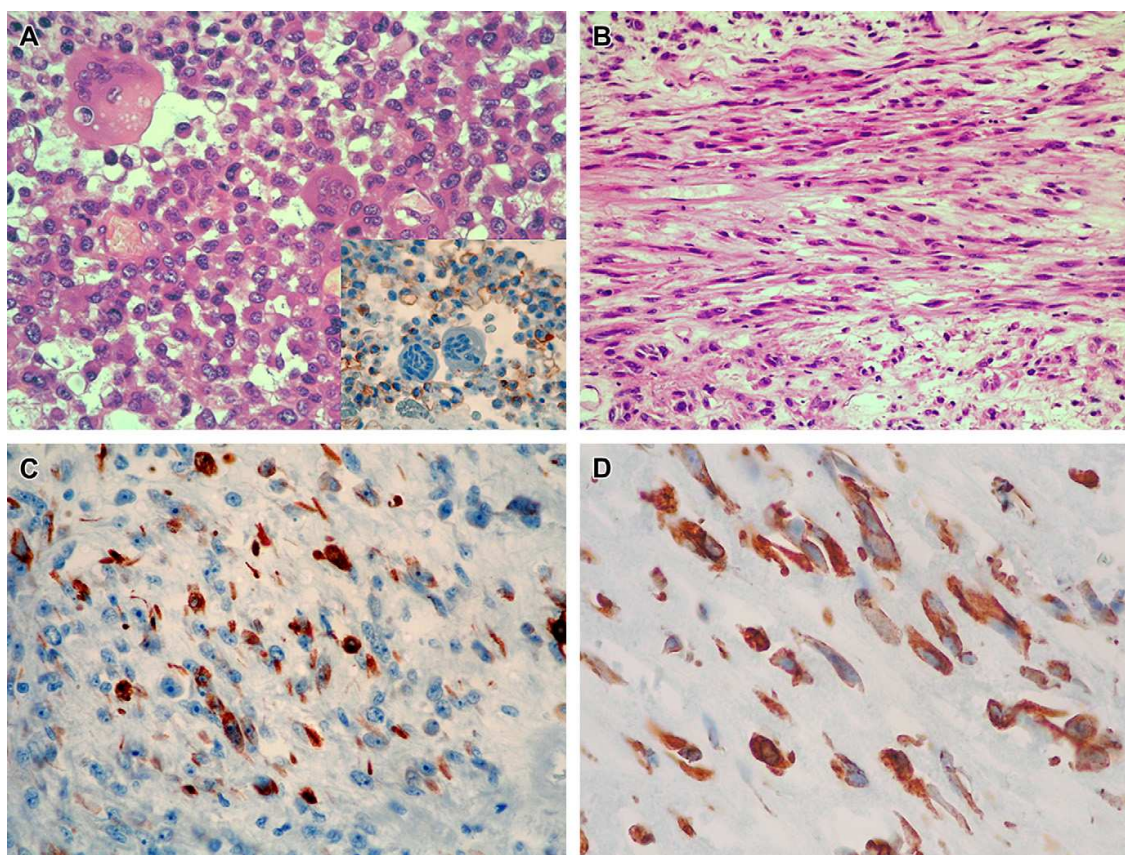


25. ábra Előre (A) és visszafele (B) történő szekvenogram, a nyíl jelzi a mutáció helyét, mely hexanucleotid deletionnak bizonyult (AGGTTG).

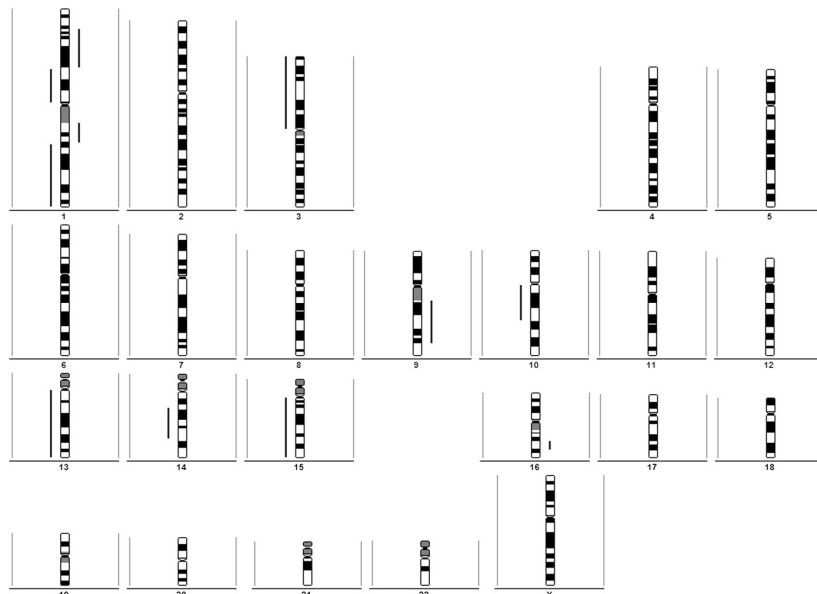
3, A lágyszövetek malignus myoepitheliális tumora önmagában is ritka és diagnosztikus kihívást jelentő daganat, de esetünkben a molekuláris vizsgálatok nem a diagnózis megerősítését célozták, hanem az entitás „önállóságát” vizsgáltuk, összehasonlítva az irodalomban talált más myoepitheliális rosszindulatú daganatokkal. A lágyszövetek malignus myoepitheliális daganataihoz képest relatíve gyakoribbak a nyálmirigyek és az emlő rosszindulatú myoepitheliális daganatai. Arra voltunk kíváncsiak, vajon genetikailag a



lágyrészek myoepithelialis tumorai különböznek-e a nyálmirigyek és az emlő myoepitheliális tumoraitól a megegyező morfológiai és fenotípusos megjelenés ellenére, ami választ adhat az önálló entitás kérdésére, de egyben egyfajta prognosztikai faktornak is számíthat (12). Míthogy rendelkezésünkre állt ebben az esetben natív anyag is meg tudtuk vizsgálni a daganat genetikai jellemzőit nagy felbontású komparatív genomikus hibridizációval (CGH), és elemezni tudtuk a teljes tumor genomra vonatkozó DNS vesztéseket és többleteket. A CGH analízis során a következő DNS szakaszokon találtunk többleteket: 1p31~p34, 1q21~q23, 9q12~q33, és 16q22; valamint vesztéseket: 1p11~p22, 1q24~q44, 3p, 10q11.1~q22, 13q, 14q13~q24 és 15q. Mindezeket FISH vizsgálattal megerősítettük, valamint igazoltuk a 13-as és 15-ös kromoszómák monoszómiáját (26, 27. ábra). Eredményeink alátámasztották azt a feltételezést, hogy a lágyrészek malignus myoepitheliális tumora önálló entitás, különbözik genetikailag az emlő és a nyálmirigyek malignus myoepitheliális tumoraitól és feltehetően ennek megfelelően különbözhet a prognózis is, aminek bizonyítására természetesen nagyobb esetszámot elemző klinikopatológiai tanulmány szükséges. Az alábbi ábrákkal szemléltetjük ezen ritka esetet:



26. ábra (A) Bőséges cytoplasmájú, plasmocytoid jellegű daganatsejtek „mintázat nélküli mintázata”; elsősorban osteoclast jellegű óriássejtek szintén láthatók. Inzert: esős EMA pozitívítás (immunoperoxidáz reakció) B) Szolid kötegekbe rendeződő orsósejtek (C) Erős pankeratin és (D) S100 pozitívítás (immunoperoxidáz reakció).



27. ábra Malignus myoepithelioma összefoglaló idiogrammja. Mindegyik vonal DNS vesztesést vagy többletet jelez, a veszteségek bal oldalon, míg a többletek jobb oldalon láthatók.

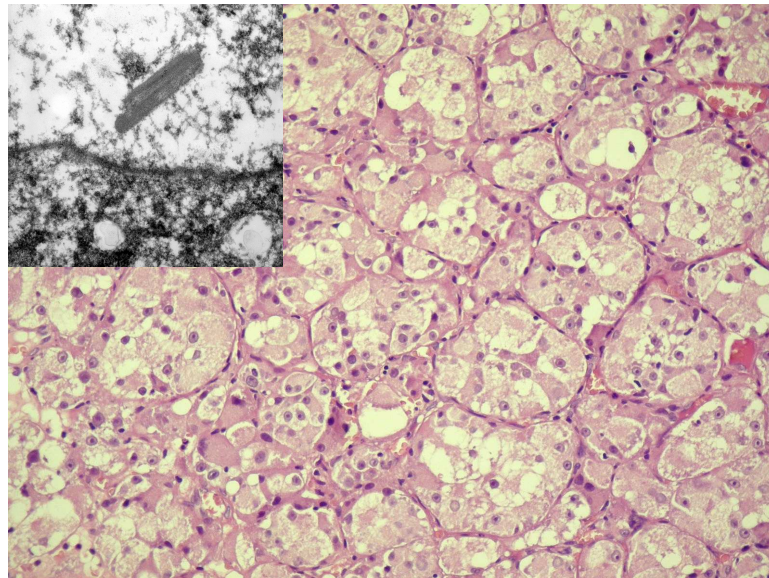
### Tanulmányok

A különböző lágyszövetű daganatok klinikopatológiáját (beleértve a prognosztikai faktorokat is) számos összefoglaló tanulmányban írtuk le, melyeket röviden, lényegében kronológiai sorrendben szeretném ismertetni.

Már az 1980-as években, mikor még a molekuláris lehetőségek meglehetősen korlátozottak voltak kísérletet tettünk arra, hogy elkülönítsük a jó és rosszindulatú lágyszövetű daganatokat a DNS tartalom citofotometriás mérése alapján. 69 lágyszövetű daganat lenyomati és/vagy aspirációs citológiai Feulgen festett kenetének mérése alapján a malignus daganatok esetén 97.7%-os szenzitivitást találtunk 2.3%-os fals negatívitás mellett, valamint a benignus eseteknél 75%-os szenzitivitás mellett nem találtunk fals negatív esetet (199,201). Mindezen eredményeket igen jól tudtuk használni később, mikor aspirációs keneteken a DNS tartalom meghatározása mellett kiegészítő molekuláris vizsgálatokat is végeztünk (lásd: A molekuláris módszerek alkalmazhatósága és haszna a preoperatív (aspirációs citológiai) diagnosztikában fejezetet). Nem sokkal később hasonló kérdéseket feszegetve vizsgáltuk a lágyszövetű daganatok nukleoláris organizációs régióit és itt is biztató eredményeket kaptunk. 138 lágyszövetű daganatot vizsgálva tovább finomítottuk a kérdést a gyakorlat szempontjából és azt néztük hogy négy csoportot képezve (1, benignus; 2, benignus diagnosztikus nehézséggel; 3, intermediér malignus és 4, malignus) elkülöníthetőek a különböző csoportok a nukleoláris organizációs régió analízisével (200). Képanalizáló készülék segítségével az egyes magokban mértük a nukleoláris régiót reprezentáló „dot”-ok (ezüstözéssel fekete pöttyök) számát valamint

területüket és ezek szorzatából számítottunk egy un. malignitási faktort. Figyelembe véve a malignitási faktort a 2-es és 3 csoport nem mutatott szignifikáns különbséget, ugyanakkor ezen két csoporttól a másik kettő szignifikánsan különbözött (T próba). Az annak idején használt csupán dot számolási technikák mellett ez előrelépést jelentett, hiszen a dotok pusztán számolásával a csoportok között egyértelmű átfedések voltak megfigyelhetők. Bár a módszer hasznos volt és segítséget jelentett egy daganat malignitásának megítélésében, meglehetősen időigényesnek és kissé komplikáltnak bizonyult, így a molekuláris módszerek elterjedésével a nukleoláris organizációs régiók vizsgálata „elfelejtődött”.

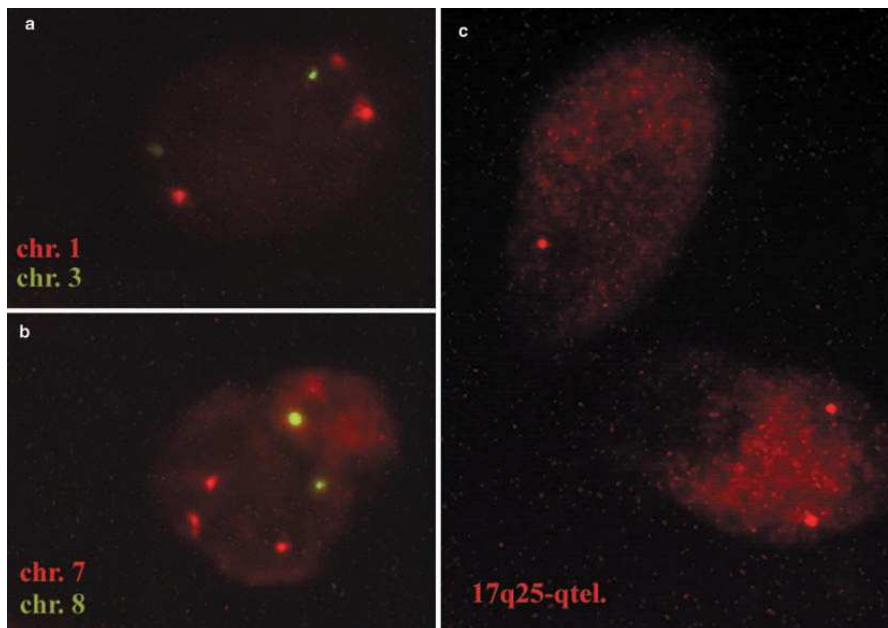
A későbbiek során már molekuláris módszereket használva vizsgáltunk egyes lágyszöveti tumor típusokat és megpróbáltuk feltérképezni az egyes genetikai jellemzőket. Ilyen daganat volt pl. az alveoláris lágyszöveti sarcoma (28. ábra) ahol még a mintegy 50%-ban jellegzetes t(X;17)(p11;q25) felfedezése előtt interfázis citogenetikai vizsgálatokat végeztünk a genetikai eltérések feltérképezésére (239). Az alveoláris lágyszöveti sarcoma igen ritka lágyszöveti daganat, mégis 4 esetben interfázisú FISH vizsgálatot végeztünk 12 centromerikus (1, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 15, 17, 18, és X) és 1 telomerikus (17q25-qtel) próbával. Karakterisztikusnak találtuk a 7-es triszómiát valamint a 8-as és 18-as monoszómiát, feltételezve, hogy ezen kromoszóma eltéréseknek szerepe van a daganat patogenezisében esetleges progressziójában (5. táblázat). Igen érdekes, hogy az egyik esetben 17q25 deléciót találtunk a sejtek 15%-ában ami részben jelezte ezen terület fontosságát (29. ábra). Nem sokkal ezután jelentek meg cikkek amik pont ezen régiót érintő karakterisztikus transzlokációt írtak le. Néhány képpel és egy táblázattal mutatjuk be a leírtakat.



28. ábra Alveoláris lágyszöveti sarcoma jellegzetes szöveti képe az inzerthben (elektronmikroszkópos kép) patognomikus krisztalloiddal.

## 5. Táblázat Alveolaris lágyrész sacomák kromoszómális eltérései.

Chromosoma	Eltérés	Kontrol+3SD	Eset 1	Eset 2	Eset 3	Eset 4
1	Trisomia	1.4+1.05%	13%	19%	7%	4%
3	Trisomia	3.5+4.05%		13%	9%	
	Tetrasomia	0.2+0.6%			8%	4%
4	Monosomia	3.3+4.8%		27%		9%
	Trisomia	0.8+2.7%			12%	
6	Monosomia	3.3+6.6%	11%	11%	12%	
7	Monosomia	3.3+0.6%				13%
	Trisomia	0.7+1.05%	10%	13%	54%	30%
	Tetrasomia	0%	4%		9%	
8	Monosomia	2.7+3.45%	18%	12%	22%	23%
	Trisomia	0.5+0.6%		8%	7%	
	Tetrasomia	0%			7%	
10	Monosomia	2.9+3.15%		13%		
	Tetrasomia	0%			8%	
12	Monosomia	3.1+2.63%	12%		9%	
17q25-qtel.	Monosomia	0%	15%			
18	Monosomia	4.8+4.8%	18%	11%	19%	18%



29. ábra 3 piros szignál (1-es kromoszóma) a 2 normális zöld szignál (3-as kromoszóma) (a), 3 piros szignál (7-es kromoszóma) és két normál szignál (8-as kromoszóma) (b), ami 1-es és 7-es triszómiát jelez. 17q25-el egyértelmű deléció mutatkozik a felső sejtben (c). FISH reakciók.

Izgalmas és reményteljes kérdésnek ígérkezett a *telomeráz aktivitás* meghatározása különböző daganatokban többek között lágyrész daganatokban is. A telomer épségének igen nagy

jelentősége van a genom integritásában és stabilitásában melyben nagy szerepet játszik a telomeráz enzim mind fiziológias mind kóros daganatos folyamatokban. Az élet során a germinális sejtek kivételével a telomeráz aktivitás represszálódik, csupán regeneratív folyamatok során lehet csökkent telomeráz aktivitást mérni. Ugyanakkor a sejtek immortalitásához kifejezett telomeráz aktivitásra van szükség, ami a legtöbb malignus daganatban meg is található. Munkánk során tumorbankunkból (-80 fokon tárolva) 86 daganatot vizsgáltunk, vajon találunk-e összefüggést a különböző daganatok esetén a benignitás, malignitás az agresszív viselkedés valamint a humán reverz transzkriptáz (hTERT) tartalom és a telomeráz aktivitás (TA) között (114). 24 vesetumor, 17 lágyszűrtumor, 28 hólyagelváltozás és 18 pajzsmirigy elváltozás vizsgálata során megállapítottuk, hogy míg a hámtumороk/tumorszerű elváltozások esetén hTERT és TA jól használható a benignitás malignitás valamint részben a prognózis tekintetében is, addig lágyszűrtumorok esetén nincs összefüggés a hisztogenezis, agresszivitás és a prognózis tekintetében sem. Valójában úgy tűnik alig található telomeráz aktivitás a lágyszűrtumorok esetén, ami azt sugallja, hogy a malignus lágyszűrtumороknál a telomer hossz fenntartása alternatív telomer hosszabító mechanizmusokkal történhet. Mindezen negatív adatok azért is fontosak, mert az egyébként a terápiában használatos telomeráz inhibitorok lágyszűrtumorok esetén nyilvánvalóan hatástalanok lennének. Az alábbi táblázat (6. táblázat) demonstrálja a 17 lágyszűrtumor mért eredményét.

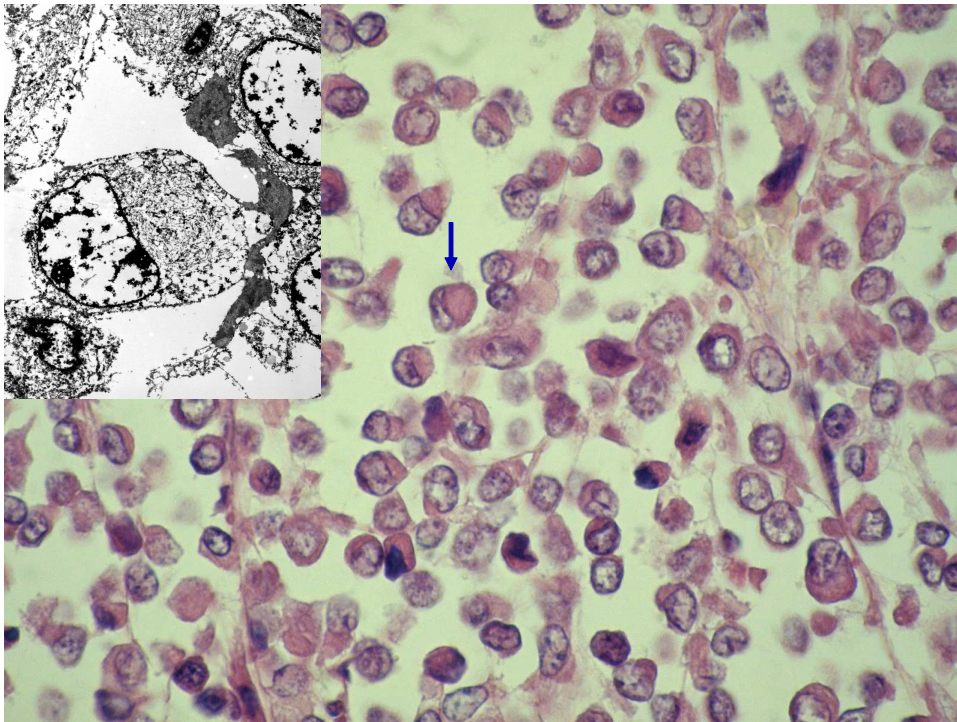
6. Táblázat 17 lágyszűrtumor hTERT és telomeráz aktivitása

Minta	Histologiai és cytologiai klasszifikáció	PBGD	hTERT	TA (%)
1.	Synovialis sarcoma	677	very low level	Neg.
2.	Synovialis sarcoma	0	0	-
3.	Synovialis sarcoma, gr. II.	894	25	<b>3</b>
4.	Leiomyosarcoma	8717	36	<b>0.4</b>
5.	Recidív fibrosarcoma, gr. II.	11130	0	Neg.
6.	Recidív fibrosarcoma, gr. II.	0	0	-
7.	Recidív MFH, storiform-pleomorph, gr. III.	2043	0	Neg.
8.	Mal. mesenchymoma	44	0	Neg.
9.	Mal. Haemangiopericytoma	1820	285	<b>16</b>
10.	Myositis ossificans	62930	7.6	Neg.
11.	Myositis ossificans	1898	7.4	<b>0.4</b>
12.	Desmoid	0	0	-
13.	Benignus granularsejtes tu.	11450	0	Neg.
14.	Benignus granularsejtes tu.	832	0	Neg.
15.	PNET	1580	386	<b>244</b>
16.	Myxoid tumor, intermediar mal.	290	0	Neg.
17.	Synplasticus leiomyoma (uterus)	395	4.8	<b>16</b>

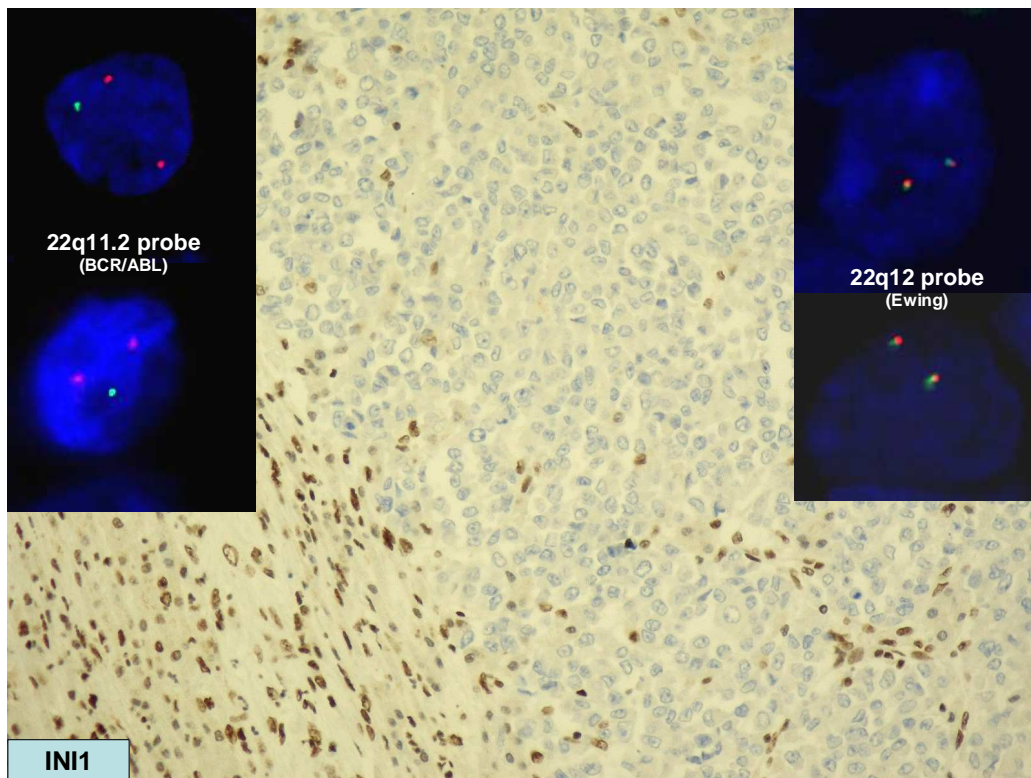
PBGD: porphobilinogén deamináz (house-keeping gén)

Több cikkben írtunk valamint számos hazai és nemzetközi kongresszuson előadtunk a mindennapi rutin során használható molekuláris metódusok gyakorlati jelentőségéről, hasznáról (114, 196, 197). Az alábbiakban néhány fontos még ez idáig nem említett, hazánkban a lágyszöveti tumorok területén többnyire elsőként alkalmazott molekuláris vizsgálat jelentőségére mutatunk rá.

Az INI1 szupresszor gén vizsgálata (normál szövetben és a tumorok döntő többségében intenzív magpozitivitás mutatkozik) az utóbbi időkben kiemelten fontos lett, hiszen kiderült, hogy míg a rhabdoid tumor (30. ábra) esetén az INI1 immun negatívításhoz biallelikus deléció és/vagy mutáció társul (31. ábra) addig egyes egyéb lágyszöveti tumorok mint pl. epithelioid sarcoma esetén bár INI1 magnegatívitás mutatkozik, még sincs genetikai eltérés. Mindezek alapján feltételezhető, hogy epigenetikus vagy más fehérje szintű mechanizmusok játszanak szerepet az INI1 fehérje inaktivitásában. Ezért adott esetben fontos annak megállapítása, hogy egy INI1 immunnegatív daganat esetén van-e genetikai eltérés vagy nincs, ami segít elkülöníteni adott esetben a rhabdoid tumort a proximális típusú epithelioid sarcomától, melyek egyébként morfológiai és immunfenotípusukban csaknem megegyeznek. Mindezekről felkért előadásban a 22. Európai Patológus Kongresszuson (Firenze, 2009 szeptember 4-9) beszéltem esetbemutatás kapcsán.

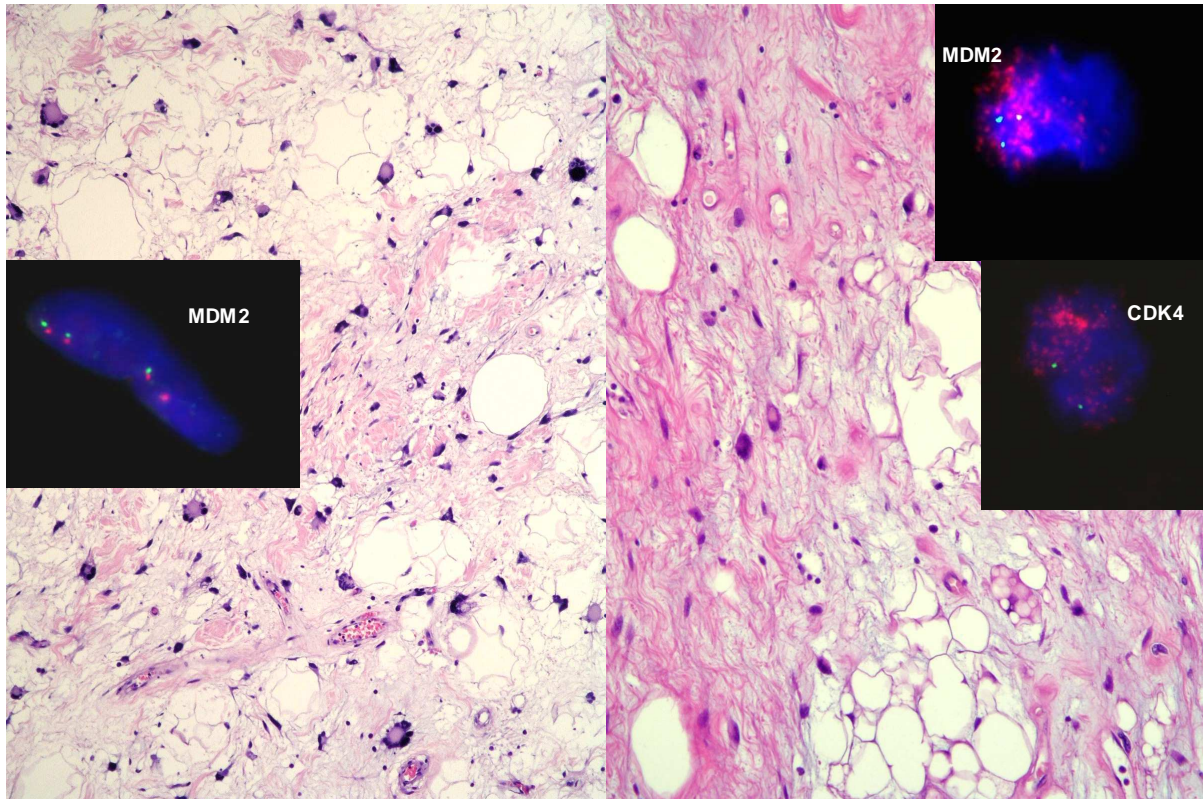


30. ábra Rhabdoid tumor jellegzetes képe hólyagos félrenyomott magokkal (nyíl), viszonylag széles eosinophil cytoplasmával, melyeket örvényszerű intermedier filamentumkötegek építenek fel (elektronmikroszkópos inzert).



31. ábra A daganatsejtek INI1 mag-negatívitást mutatnak, míg a környező normál szövet és a tumorsejtek közötti reaktív elemek egyértelmően pozitívak. A bal oldali inzert FISH képen jól látható az INI1 deléció ( a zöld szignál a BCR gén mely ugyanabban a régióban helyezkedik el mint az INI1 gén; a piros szignál az ABL mely normál 2 kópiát mutat. Érdekes, hogy a 22q11.2 régió mellett közvetlenül elhelyezkedő 22q12 régió (Ewing break apart próba) nem érintett, ami szépen mutatja sz INI1 régió specifikus deletióját. A másik allélon PCR-el mutációt tudtunk kimutatni.

Mai tudásunk szerint a legmegbízhatóbb módszer a lipómák, pleiomorph lipómák és az atípusos lipomatózus tumorok/jól differenciált liposarcomák közötti különbségtételre az MDM2 és CDK4 amplifikáció kimutatása. Bár ez elméletileg immunhisztokémiai reakciókkal is végezhető, de ennek interpretálása annyira szubjektív és olyan sok a fals pozitív eredmény, hogy a gyakorlatban sokkal inkább a teljesen egyértelmű FISH reakciót használjuk. Hazánkban ezt először az Intézetünkben vezettük be, és azt tapasztaltuk, hogy igen sokszor rendkívül nagy segítséget jelent ezen igen problémás csoport esetén a benignitás malignitás elkülönítésében (32. ábra).

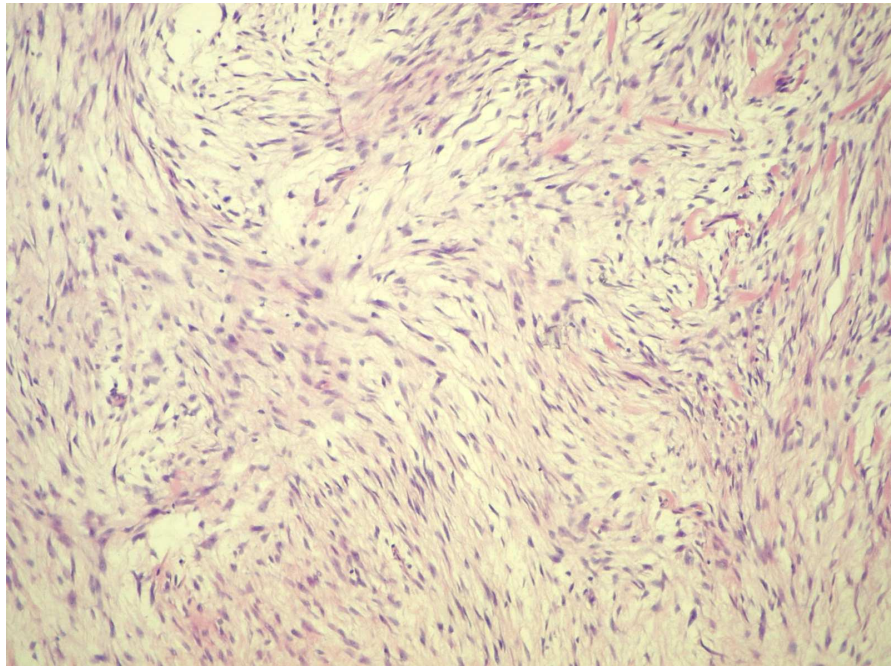


32. ábra Pleiomorph lipoma (bal oldali H&E kép) és jól differenciált liposarcoma (jobb oldali H&E kép), melyek morfológiailag alig különböznek, ugyanakkor az MDM2 és CDK4 amplifikáció (piros szignálok) igen látványos. A zöld szignálok jelzik a 12-es kromoszómát. Ezekben az esetekben is a molekuláris vizsgálat tette egyértelművé a diagnózist.

Szintén elsőként állítottuk be Intézetünkben a béta katenin mutáció vizsgálatát, melynek igen nagy jelentősége van a fibromatózisok diagnosztikájában illetve prognózisának megítélésében. Immunhisztokémiai magi pozitivitással ki tudjuk mutatni a béta katenin akkumulációját a magban, de ez a béta katenin jelútrendszer számos pontján történő hiba végső eredménye, többek között a béta katenin mutációé is lehet. Ilyen módon fontos meghatározni magát a mutációt, mely a mélyen elhelyezkedő fibromatózisokra jellemző, míg a szuperfíciaálisokra nem, irodalmi adatok szerint, és az általunk vizsgált 21 fibromatózis alapján is (33. ábra).

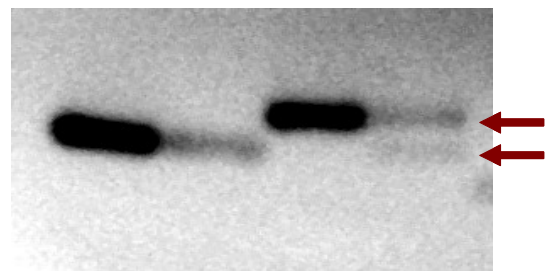
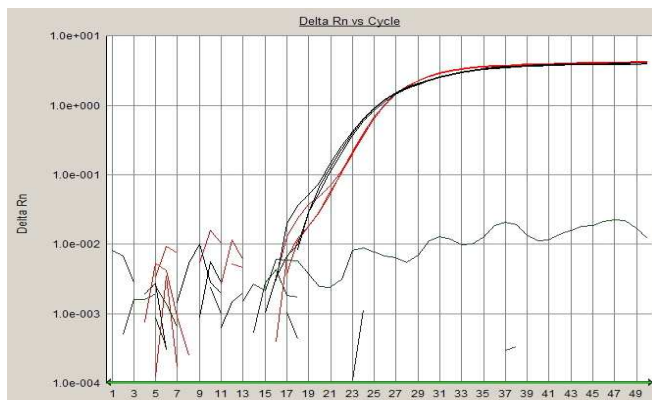


dc\_59\_10<sup>49</sup>-



FUS-CREB3L2 fúziós RNS  
nem volt igazolható t(7;16)(q33;p11)

Béta katenin mutáció  
1 exon codon 41, 45a és 45b



Mutáció 45a TCT - TTT

33. ábra Kissé szokatlan megjelenésű fibromatózis H&E képe egy 59 éves nő bordaközi tumorából. A morfológiai kép alapján inkább low grade fibromyxosarcoma lehetősége merült fel, de fibromatózis lehetősége is szóba jött. A low grade fibromyxosarcomára jellegzetes t(7;16)(q33;p11) RT-PCR-el nem volt igazolható, míg mutációt találtunk RFLP metódussal az 1-es exon 45a kódon területén.

### **3. Az óriássejtes csont tumor genetikai eltéréseinek vizsgálata**

#### *Klinikopatológiai háttér*

Az osteolitikus, potenciálisan agresszív óriássejtes csont tumor (osteoclastoma, GCTB) az esetek 80%-ában benignus lefolyású, de lokális recidívák és malignus átalakulás előfordulhat komoly kockázatot jelentve a beteg számára (240). A daganatra jellemző, hogy változó arányban osteoclast típusú óriássejteket tartalmaz, melyek egyenletes eloszlást mutatnak a mononukleáris kerek, valamint orsó jellegű sejtek háttérében. Az orsó alakú sejteket tarthatók a neoplasztikus komponensnek, melynek karakterisztikus fenotípusa azonban még nem ismert (176,177). A kiújulások száma növeli az óriássejtes csonttumor malignus transzformációjának esélyét, bár metasztázist már az első megjelenésnél is adhat a daganat a benignus szövettani kép ellenére is (231). Differenciáldiagnosztikai szempontból típusos esetben, amennyiben mind a szövettani mind a radiológiai kép jellegzetes, nem nehéz az óriássejtes csonttumor diagnózisa, de néhány esetben gondot okozhat mind benignus mind malignus daganatoktól való elkülönítés. Ilyen pl. az osteoclast gazdag osteosarcoma esete, illetve benignus részről az aneurysmalis csontcysta esete is.

Összefoglalva az alábbi kategóriákat különíthetjük el a szövettani vizsgálat során (lényegében a gyakoriság sorrendjében):

*Benignus GCTB:* benignus histológiai kép; számos viszonylag egyenletes eloszlású osteoclast típusú óriássejt monomorf mononukleáris sejtek háttérében.

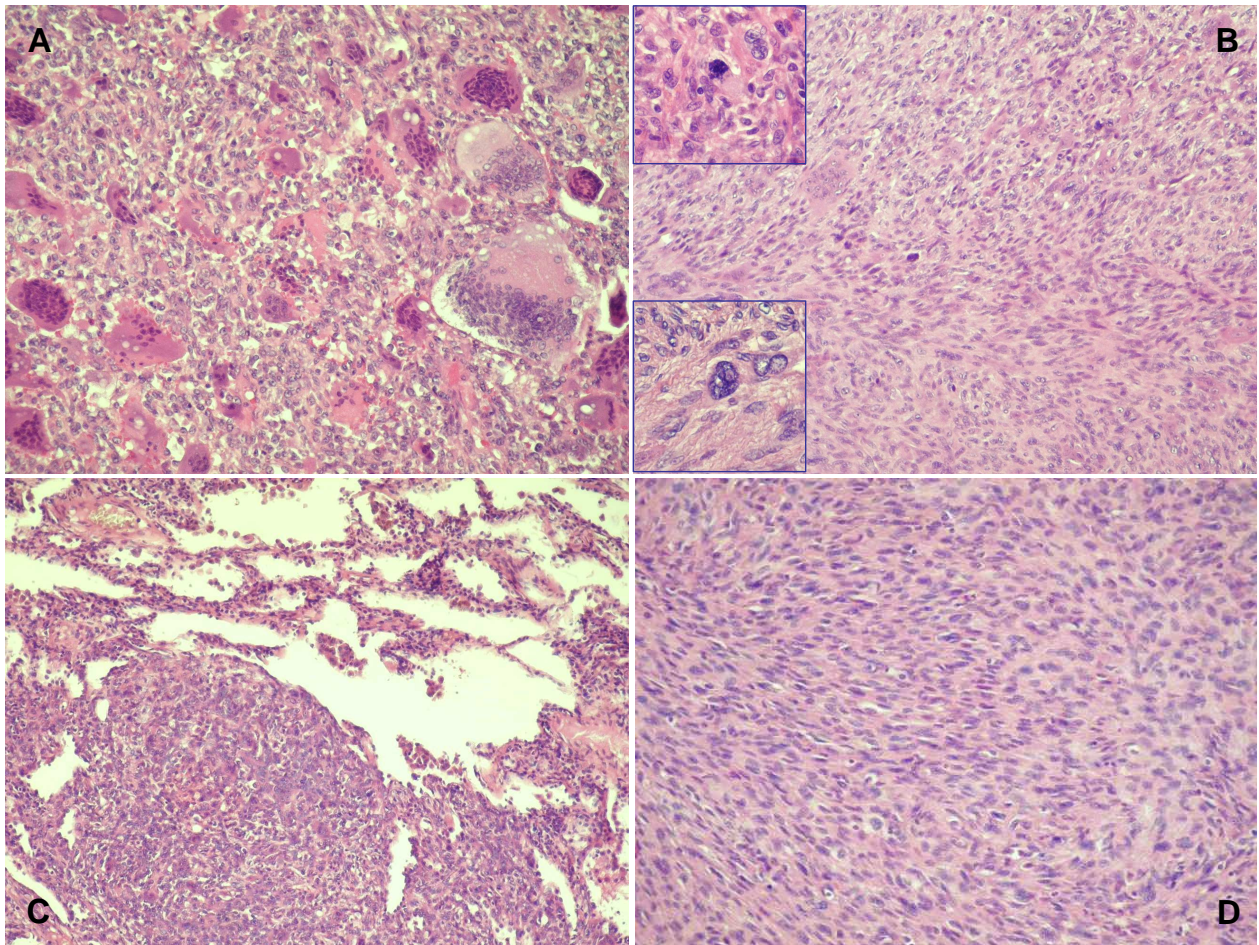
*Metasztatizáló GCTB:* az előzőekben leírt szöveti kép ellenére távoli metasztázis igazolható.

*Szekunder malignus GCTB:* recidíva során sarcoma megjelenése; progresszió ugyanabban a tumorban.

*Malignus GCTB/óriássejt gazdag MFH (primer malignus GCTB):* a benignus hisztológiai területek mellett, többnyire éles határral, magas malignitású sarcoma detektálható óriássejtek nélkül.

Mind ez idáig ugyanakkor jelenleg nem ismert olyan klinikai, radiológiai, biológiai vagy szövettani marker, mely előre jelezné a tumor klinikai viselkedését (19,46,56,121,133, 135,157,194,221,214).

A 34. ábrán mutatunk mindezekre egy-egy példát.



34. ábra A, Típusos óriássejtes csonttumor képe számos egyenletes eloszlású osteoclasttal. B, Primer malignus GCTB képe a felső részben benignus kép mutatkozik majd viszonylag éles határral óriássejteket nem tartalmazó orsósejtes proliferáció képe látható. Az inzertekben osztódó forma (felső) és kifejezett atípia mutatkozik (alsó). C, Tüdőbe metasztatizáló benignus morfológiai képet mutató GCTB. D, Szekunder malignus GCTB; a recidíva során már csak atypusos orsósejtes proliferáció mutatkozik.

#### Az óriássejtes csonttumor kezelése

Az elsőként választandó sebészi terápia a legtöbb lokalizációban az intralézionális kürettázs, melyet csont graft és/vagy csontcement kitöltés követ (120,123,230). A szélesen az épben történő rezekció általában agresszív stage 3-as tumoroknál választandó, amikor a csontdestrukció kiterjedt, és ízület-megtartás nem lehetséges. A sebészi kezelést radio- vagy kemoterápiával lehet kiegészíteni malignus vagy metasztatizáló eseteknél. A kiújulási tendenciát részben a különböző adjuváns kezelések, illetve részben a tumor lokalizációja befolyásolja. Az óriássejtes csonttumor kezelése ma is kihívást jelent, mivel nincs prediktív értékű kliniko-radiológiai vagy szövettani jellemző a sebész kezében, mely pontosan előre jelezné a kimenetelt, pedig a sebészi beavatkozások számának csökkentése érthető igény lehetne.

*A sejtek eredete óriássejtes csonttumorban*

Az osteoclastomák alapvetően két sejttypusból állnak. A mononukleáris stromasejtekből, melyek tovább oszthatók a CD68 és CD163 pozitív, valószínűsíthetően reaktív, monocytamacrophag vonalhoz tartozó histiocyta és a CD68 negatív, feltételezhetően neoplasztikus sejtpopulációra, melyek sejtenyészetben proliferálnak és inkább osteoblastos fenotípust mutatnak. A csontdestrukció óriássejtes csonttumorban a többmagvú osteoclast típusú óriássejtek által mediált. Ezen osteoclastok csontvelői eredetű keringő, monocita/makrofág fenotípust mutató prekursorokból alakulnak ki, valamint azon makrofág előalakokból, melyek magának a tumornak a mononukleáris komponensét is képezik. A RANKL (receptor activator for nuclear factor  $\kappa$  B ligand) és a MCSF (macrophage colony stimulating factor) a két fő kanonikus osteoclast képződésért felelős faktor, melyek szubsztitumai (pl. a LIGHT, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-11 mint a RANKL; és a HGF [hepatocyte growth factor] és VEGF [vascular endothelial growth factor] mint az MCSF szubsztitutumai) a nem kanonikus úton létrejövő osteoclastogenezisért felelősek (62,110). A mikroenvironmenti hipoxia szintén hozzájárul az osteoclastogenezishez a HIF (hypoxia-inducible factor) expresszió indukciója és a következményes VEGF szekréció stimulálása révén osteoblastokban és osteoclastokban. A mononukleáris orsó jellegű sejtek kulcsszerepet játszanak a pre-osteoclastok kemotaxisában és az intratumorális osteoclast képződésben. Képesek mind keringő, mind intratumorális mononukleáris osteoclast prekursor sejtekből osteoclast-képzést indukálni szolubilis RANKL termelő képességük révén, valamint különböző extracelluláris mátrix komponensek bontásához is hozzájárulnak gelatináz és kollagenáz termelésükkel (110). Mivel ezen CD68-negatív stroma sejteknek az eredete jelenleg ismeretlen, ezidáig nem tisztázott, hogy az óriássejtes csonttumor mely sejtjei jelentik valójában a neoplasztikus komponensét.

*Cytogenetikai jellemzők*

Az osteoclastomákra általában nem jellemző valamely speciális kromoszóma eltérés a telomerikus asszociációk (TAS) vagy telomerikus fúziók kivételével, melyekről az esetek 85%-ában számolnak be (18,216,218,219). Az eddig leírt TAS által leggyakrabban érintett telomerek a 11p, 15p, 19q, 21p, 18p, 13p, és 20q. A telomerfúziók és visszatérő telomerikus eltérések nagy száma óriássejtes csonttumorokban azt a feltételezést támasztja alá, hogy ezen telomerikus események nem csupán mellékleletet jelentenek, hanem köztes lépésként szolgálnának vagy prekursor eltérések lennének további strukturális aberrációk felé. A hTERT expressziója ugyan valóban tetten érhető osteoclastomákban, nem korrelál azonban

sem a telomer hosszal, sem a TAS gyakoriságával, mely az előbbi elméletet cáfolni látszik (63). Szintén leírták a passzálások számával együtt emelkedő TAS gyakoriságot óriássejtes csonttumorban, mely arra utal, hogy a TAS-pozitív sejteknek in vitro szelektív előnyük van (63). A teljes DNS tartalom meghatározást illetően részben ellentmondásos adatok jelentek meg a prognózist illetve a benignitás malignitás kérdését illetően, hangsúlyozva, hogy az aneuploid jelleg egyértelműen malignus transzformációra utal (7,8,152,153,190).

*Egyéb patogenetikai faktorok - a receptor tirozin kinázok (RTK) szerepe*

Az IL-6 és az urokináz-típusú plazminogén aktivátor mellett sejtciklus-szabályozó fehérjéről (p53, p27, cyclin D1) és onkogénekről (c-myc) (58) szintén leírták, hogy szerepük lehet az óriássejtes csonttumor patogenezisében (41,67,68,98-100,136). A mononukleáris sejtes komponens szeparált vizsgálatát lehetővé tevő DNS kenet-citofotometriának is lehet prognosztikus értéke proliferációs aktivitás meghatározással kombinálva. Növekvő irodalma van a receptor tirozin kinázok szerepének csont újraképződésben, különösen az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR), thrombocytá-eredetű növekedési faktor receptor-alfa (PDGFR $\alpha$ ), hepatocytá növekedési faktor/scatter faktor receptor (c-Met), 1-es típusú inzulin-szerű növekedési faktor receptor (IGF-1R), transzformáló növekedési faktor-béta1 (TGF $\beta$ 1) és a VEGF vesz ebben részt (69,95,96,110,119). In vivo vizsgálatok kimutatták, hogy az EGF-szerű ligandok közvetve serkentik az osteoclastogenezist csontvelői monocytákból a csapda receptor osteoprotegerin (OPG) termelésének csökkentésén és a monocytá kemoattraktáns protein 1 (MCP1) szintjének emelésén keresztül stromális osteoblastokban (69).

*A kromoszómális instabilitás lehetséges oka: a centroszómák szerepe*

Egyre több tapasztalat utal arra, hogy az aneuploiditás kialakulását abnormális centroszóma, tehát mikrotubulus organizáló centrum konfiguráció okozza multipoláris sejtszétválások révén. A centroszóma amplifikáció és az aneuploiditás foka között erős korrelációról számoltak be solid tumorokban, leukaemiákban és lymphomákban (36,50,64,65,71). A centroszóma kettőződés és számbeli integritás fontos sejtciklus-szabályozó fehérjék, mint ciklin-dependens kinázok, polo-like kinázok, Aurora kinázok, p53, BRCA1 és cyclin B1 által kontrolált, melyekről kimutatták, hogy a centroszómához lokalizálódnak. A tapasztalatok azt mutatják, hogy a centroszóma eltérés gyakori jelenség malignus mesenchymális tumorokban, mint pl. osteosarcomában, amelyre nagy arányú aneuploiditás jellemző. Mindezek ellenére

eltérőek a vélemények a centroszóma aberrációk közvetlen szerepéről a kromoszómális instabilitás létrehozásában (48,49,64,173).

Mindezek figyelembevételével célul tűztük ki az óriássejtes csonttumor kialakulásának vizsgálatát, s ennek révén olyan használható prognosztikai faktor keresését, mely előre jelezhetné a klinikai viselkedést (11,150,151). A legtöbb eddig megjelent beszámoló az osteoclastoma kevert sejtpopulációját elemezte, mely befolyásolhatta az eredményeket. Vizsgálatainkban ezért relokalizációs technikát állítottunk be, mely lehetővé tette a genetikai instabilitásnak csupán a neoplasztikus sejtekben történő tanulmányozását. Szeparált CD68-negatív sejteket használtunk a 3-as, 4-es, 6-os, 11-es és X kromoszómák számbeli eltéréseinek, és a 11p telomerikus régió eltéréseinek vizsgálatára multikolor fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) technika alkalmazásával, valamint a lehetséges gén veszteségek és nyerések detektálására array alapú komparatív genomikus hibridizáció (array-CGH) segítségével. A citofotometriás ploiditás-mérést szintén a mononukleáris sejtpopuláción végeztük. A genetikai instabilitás lehetséges okának keresésekor a TP53, CTNNB1 (béta-catenin) és BCL2 expresszióját is vizsgáltuk az előzőleg FISH analízissel és array-CGH segítségével analizált esetek formalin-fixált paraffinba ágyazott metszetein. A centroszómális eltérések szerepét az aneuszómia kialakulásában ezidáig nem vizsgálták óriássejtes csonttumorban. Hogy betekintést nyerjünk a kromoszómális instabilitás kialakulásának lehetséges mechanizmusába ebben a tumorban, meghatároztuk a centroszóma mintázatot recidív és malignus osteoclastomákban és azt a kiújulást nem mutató esetekéhez viszonyítottuk. A centroszóma amplifikáció és a kromoszómális aneuszómia között talált összefüggést elemezve arra kerestük a választ, hogy a centroszómális eltérések hozzájárulhatnak-e a kromoszómális aneuszómia kialakulásához óriássejtes csonttumorban. Hipotézisünk szerint az EGF, mint növekedési faktor elősegítheti az osteoclastoma stromasejtjeinek proliferációját. Ennek megfelelően tanulmányoztuk az EGF lehetséges szerepét a stromasejtek proliferációjában és osteoblastos differenciációjában.

#### *Eredmények, megbeszélés*

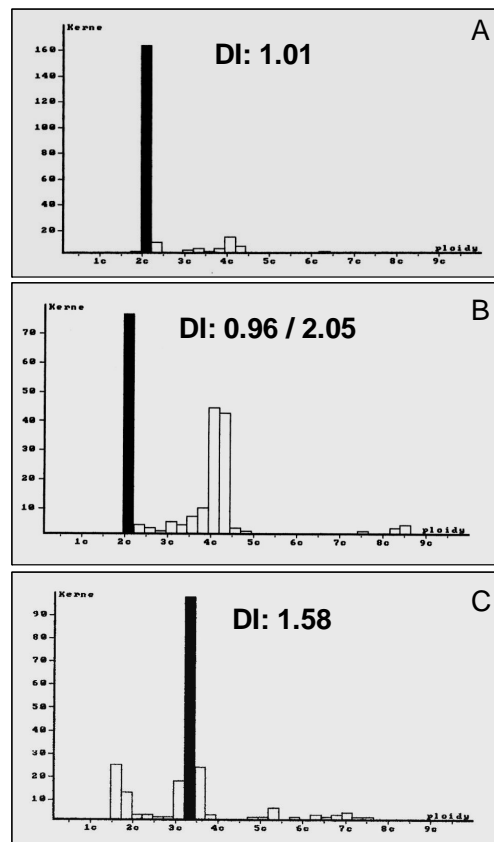
A ploiditás és kromoszómális instabilitás vizsgálatához azon 52 fagyasztott szövetmintát választottunk a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikájának (44 eset), valamint az Istituti Ortopedici Rizzoli Laboratory of Oncologic Research (8 eset) tumorbankjából, amelyeknél a teljes, sebészi és radiológiai adatokat is magában foglaló klinikai utánkövetési adatok elérhetőek voltak. A betegek közül 25 férfit és 27 nőt vizsgáltunk, az átlagéletkor 28.5 év (15-67 év), az átlag utánkövetési idő pedig 48 hónap volt.

A centroszóma abnormalitások vizsgálatához 100 óriássejtes csonttumoros esetet (57 primer nem recidív, 35 recidív, 8 malignus) elemeztünk a Semmelweis Egyetem Oropédiai Klinikájának (n=87), az Istituti Ortopedici Rizzoli (n=3) és a Nuffield Orthopaedic Centre Oxford (n=10) archív anyagából. A malignus esetek közül kettő metasztatizált, 3 primeren malignus volt (high grade sarcoma keletkezett az óriássejtes csonttumorban), 3 esetben pedig sarcoma lépett fel a korábban dokumentált osteoclastoma helyén. Immunohisztokémiai reakciót végeztünk 59 óriássejtes csonttumoros esetet tartalmazó (31 primer nem recidív, 23 recidív, 5 malignus) szöveti microarray metszeteken; a fennmaradó 41 esetet (26 primer nem recidív, 12 recidív, 3 malignus) pedig fluoreszcens immuncitokémiával vizsgáltuk.

Az összes benignus óriássejtes csonttumor kezelése intralézionális kürettázzsal történt, míg a primeren vagy szekunderen malignus tumorok esetében rezekciót végeztek.

#### *A ploiditás és klinikai jellemzők alapján felállított alcsoportok*

A talált DNS index (35. ábra) értékek és klinikai viselkedés alapján öt csoportot különítettünk el kizárólag a CD68-negatív sejtpopulációt vizsgálva: a diploid nem-recidív (n=20; DNRC), tetraploid nem-recidív (n=6; TNRC), diploid recidív (n=5; DRC), tetraploid és/vagy aneuploid recidív (n=14; TRC), valamint malignus esetek (n=7) csoportját.



35. ábra Jellegzetes DNS hisztogramok A, diploid; B, tetraploid; C, aneuploid értékekkel.

## 7. Táblázat DNS index, I-POLY, I-ANEU és a 11p eltérés értékei

Case	DNA Index	I-POLY <sup>a</sup> (%)	Polysomy mean	I-ANEU <sup>b</sup> (%)	Aneusomy mean	11p-alteration (%)	11p-alteration mean
DNRC <sup>c</sup> -1	1.00	0.00	Mean: 1.1352	11.49	Mean: 9.4580	10.00	Mean: 13.8148
DNRC-2	0.95	0.00	SD <sup>d</sup> : 2.2147	3.33	SD: 3.4395	13.64	SD: 4.6958
DNRC-3	1.04	0.00	SEM <sup>e</sup> : 0.4952	8.54	SEM: 0.7691	11.11	SEM: 1.0500
DNRC-4	1.05	0.00	Range: 8.2192	8.62	Range: 13.4664	11.11	Range: 20.8827
DNRC-5	1.01	1.52		7.58		14.55	
DNRC-6	1.00	1.98		13.86		11.59	
DNRC-7	1.04	0.00		12.50		15.56	
DNRC-8	1.02	0.00		10.87		19.05	
DNRC-9	0.98	1.16		8.14		23.91	
DNRC-10	1.00	0.00		4.31		12.22	
DNRC-11	0.97	0.00		9.91		14.44	
DNRC-12	1.00	0.00		10.81		8.33	
DNRC-13	1.00	8.22		12.33		21.11	
DNRC-14	1.05	6.06		10.61		17.78	
DNRC-15	0.99	0.00		8.45		16.67	
DNRC-16	0.96	0.00		2.50		13.33	
DNRC-17	1.09	0.00		6.94		12.20	
DNRC-18	1.00	1.79		12.50		3.03	
DNRC-19	0.95	1.98		9.90		10.00	
DNRC-20	0.90	0.00		15.97		16.67	
TNRC <sup>f</sup> -1	0.96/1.95	2.17	Mean: 9.7154	15.22	Mean: 14.6373	18.48	Mean: 9.3324
TNRC-2	1.00/2.02	6.67	SD: 8.2775	20.00	SD: 8.8658	3.85	SD: 4.9740
TNRC-3	1.04/2.10	6.82	SEM: 3.3793	9.09	SEM: 3.6195	8.96	SEM: 2.0306
TNRC-4	0.99/2.10	22.54	Range: 20.3613	5.63	Range: 23.6765	8.85	Range: 14.6321
TNRC-5	0.98/2.00	17.24		29.31		6.25	
TNRC-6	0.96/2.05	2.86		8.57		9.62	
TRC <sup>g</sup> -1	1.02/2.08	3.13	Mean: 11.8650	40.63	Mean: 39.5564	7.78	Mean: 14.4713
TRC-2	1.05/2.15	22.39	SD: 8.7401	50.75	SD: 16.0575	15.66	SD: 5.7371
TRC-3	1.05/2.05	21.88	SEM: 2.3359	26.56	SEM: 4.2915	21.28	SEM: 1.5333
TRC-4	0.87/1.85	14.10	Range: 31.4286	44.87	Range: 66.4368	17.59	Range: 17.0498
TRC-5	1.00/2.00	15.52		6.90		22.76	
TRC-6	1.01/2.02	12.35		50.62		17.39	
TRC-7	1.02→1.06/ 2.00	0.00		73.33		13.44	
TRC-8	2.1→1.63	31.43		42.86		15.22	
TRC-9	1.01/2.02	8.70		52.17		11.43	
TRC-10	1.05/2.02	3.57		35.71		24.83	
TRC-11	0.96→1.01/ 2.00→1.85	6.32		22.11		7.84	
TRC-12	1.05/2.05	8.93		44.64		9.59	
TRC-13	0.98/2.02	5.17		36.21		9.18	
TRC-14	0.99/2.00	12.64		26.44		8.60	
DRC <sup>h</sup> -1	1.06	1.79	Mean: 3.1914	37.50	Mean: 26.0687	7.49	Mean: 8.2266
DRC-2	1.01	2.33	SD: 3.5389	20.93	SD: 7.3933	10.13	SD: 2.2011
DRC-3	1.00	9.26	SEM: 1.5827	29.63	SEM: 3.3064	6.38	SEM: 0.9844
DRC-4	0.91	2.59	Range: 9.2593	21.55	Range: 16.7683	6.16	Range: 4.8145
DRC-5	0.90	0.00		20.73		10.98	
MAL <sup>i</sup> -1	1.06/2.10	27.66	Mean: 11.1586	65.96	Mean: 54.0241	21.43	Mean: 16.1927
MAL-2	2.00	17.24	SD: 8.8685	41.38	SD: 19.1594	30.21	SD: 7.3914
MAL-3	1.58	6.52	SEM: 3.3520	67.39	SEM: 7.2416	15.12	SEM: 2.7937
MAL-4	0.92/1.88	12.82	Range: 25.5319	84.62	Range: 50.5728	9.78	Range: 20.4257
MAL-5	1.61	5.22		34.78		10.00	
MAL-6	0.98/2.00	6.52		50.00		15.38	
MAL-7	1.62	2.13		34.04		11.43	

<sup>a</sup>I-POLY, individual polysomy.<sup>b</sup>I-ANEU, individual aneusomy.<sup>c</sup>DNRC, diploid non recurrent.<sup>d</sup>SD, standard deviation.<sup>e</sup>SEM, standard error of mean.<sup>f</sup>TNRC, tetraploid non recurrent.<sup>g</sup>TRC, tetraploid recurrent.<sup>h</sup>DRC, diploid recurrent.<sup>i</sup>MAL, malignant group.

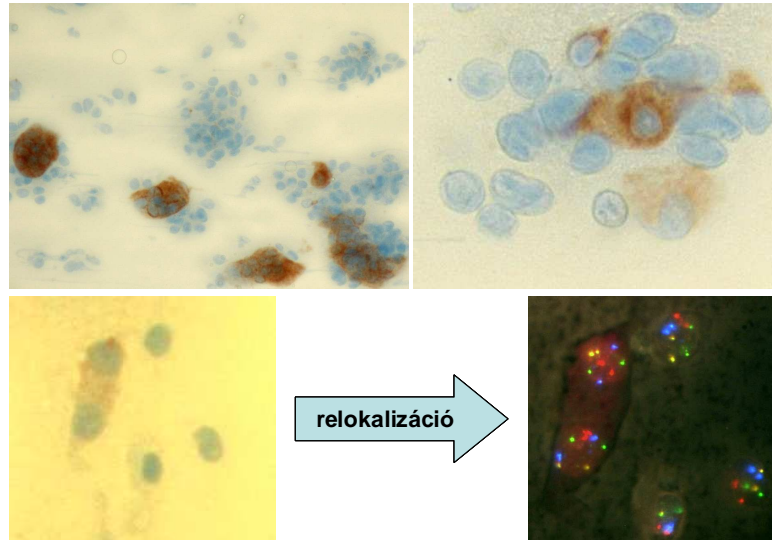
Arrows indicate changes in ploidy-values during clinical course.

A random egyedi-sejtes aneuszómia szignifikánsan gyakoribbnak bizonyult ( $p < 0.001$ ) a recidív csoportokban ( $36.01 \pm 11.94\%$ ) a benignus nem-recidív esetekhez ( $10.65 \pm 3.66\%$ ) képest. A diploid recidív csoport szignifikánsan emelkedett ( $p < 0.001$ ) kiegyensúlyozott



aneuszómiát mutatott a diploid nem-recidív csoporthoz képest, míg a tetraploid nem-recidív csoport euszómiás poliszómiát mutatott. Az array-CGH és FISH vizsgálatok csak a malignus csoportban mutattak klonális kromoszóma eltéréseket (7. táblázat).

FISH vizsgálat, relokalizációs technika (36. ábra)



36. ábra Relokalizációs FISH technika. CD68 immuncytokémiai reakcióval jól elkülönülnek a pozitívat mutató többmagvú és mononukleáris hisztiocyter sejtek (felső sor). A CD68 pozitív és negatív elkülönített sejteket a gép megjegyzi a koordináták alapján majd a fedőlemez eltávolítás és a FISH vizsgálat után az egyes sejtek azonosíthatók. Az alsó sor képén jól látható, hogy ugyanarról az 5 sejtről van szó immunfestés és FISH reakció után is.

8. Táblázat Az egyes csoportok relokalizációs FISH vizsgálatának részletes adatai

Group	Chr. #	monosomy %	trisomy %	other aneusomy %	polysomy %	gain %	loss %	C-ANE U <sup>2</sup> %
DNRC <sup>2</sup>	3	1,4 ± 0,3 -5,63	2,38 ± 0,38 -5,17	0,2 ± 0,11 -1,79	2,13 ± 0,7 -12,33	2,38 ± 0,38 -5,17	1,61 ± 0,35 -5,63	3,98 ± 0,39 -6,9
DNRC	4	2,14 ± 0,36 -6,9	1,92 ± 0,57 -9,24	0,09 ± 0,09 -1,98	1,61 ± 0,646 -9,59	1,92 ± 0,57 -9,24	2,24 ± 0,37 -6,9	4,15 ± 0,59 -10,08
DNRC	6	0,75 ± 0,21 -3,49	1,23 ± 0,31 -4,35	0,07 ± 0,07 -1,37	1,91 ± 0,92 -15,07	1,3 ± 0,32 -4,35	0,75 ± 0,21 -3,49	2,05 ± 0,32 -5,36
DNRC	fX	0 ± 0 0	0,26 ± 0,18 -1,52	0 ± 0 0	1,74 ± 1,18 -12,12	0,26 ± 0,18 -1,52	0 ± 0 0	0,26 ± 0,18 -1,52
DNRC	mX	- - -	0,12 ± 0,12 -1,16	0 ± 0 0	2,67 ± 1,74 -17,81	0,12 ± 0,12 -1,16	0 ± 0 0	0,12 ± 0,12 -1,16
DNRC	11	2,14 ± 0,45 -6,67	1,23 ± 0,36 -5,56	0,06 ± 0,06 -1,11	2,72 ± 0,45 -6,36	1,29 ± 0,38 -5,56	2,14 ± 0,45 -6,67	3,42 ± 0,65 -11,11
TNRC <sup>2</sup>	3	0,74 ± 0,47 -2,27	2,14 ± 0,75 -4,55	1,97 ± 1,38 -8,7	11,09 ± 3,7 -20,36	2,14 ± 0,75 -4,55	2,72 ± 1,67 -10,87	4,86 ± 1,82 -11,61
TNRC	4	1,14 ± 0,85 -5,17	4,94 ± 2,06 -13,79	0,65 ± 0,41 -2,17	11,26 ± 3,14 -18,25	5,59 ± 2,17 -14,11	1,14 ± 0,85 -5,17	6,73 ± 2,97 -19,28
TNRC	6	1,11 ± 1,11 -6,67	2,35 ± 0,81 -5	0,29 ± 0,29 -1,72	12,66 ± 2,88 -17,28	2,35 ± 0,81 -5	1,4 ± 1,09 -6,67	3,75 ± 1,72 -11,67
TNRC	fX	1,41 ± 0 0	4,23 ± 0 0	0 ± 0 0	22,54 ± 0 0	4,23 ± 0 0	1,41 ± 0 0	5,63 ± 0 0
TNRC	mX	- - -	0,98 ± 0,68 -3,45	0 ± 0 0	11,91 ± 2,35 -13,55	0,98 ± 0,68 -3,45	0 ± 0 0	0,98 ± 0,68 -3,45
TNRC	11	2,44 ± 0,56 -3,71	2,07 ± 0,62 -3,85	0 ± 0 0	9,98 ± 4,01 -28,32	2,07 ± 0,62 -3,85	2,44 ± 0,56 -3,71	4,51 ± 0,93 -5,65
TRC <sup>2</sup>	3	6,12 ± 1,77 -25	8,67 ± 1,19 -14,38	1,92 ± 0,71 -7,41	17,8 ± 3,771 -51,16	9,81 ± 1,3 -14,38	6,9 ± 2,02 -28,13	16,71 ± 2,31 -28,39
TRC	4	4,81 ± 1,86 -26,67	5,82 ± 1,06 -11,26	3,11 ± 1,44 -16,07	19,76 ± 4,22 -51,43	7,78 ± 1,86 -24,69	5,96 ± 2,28 -26,67	13,74 ± 2,92 -36,55
TRC	6	1,98 ± 0,55 -6,67	4,43 ± 1,08 -13,33	0,64 ± 0,32 -3,85	23,97 ± 4,21 -54,02	5,2 ± 1,15 -13,33	1,98 ± 0,55 -6,67	7,05 ± 1,42 -20
TRC	fX	0,88 ± 0,68 -6,67	4,44 ± 1,27 -13,33	1,46 ± 0,67 -5,13	28,3 ± 5,33 -49,77	5,9 ± 1,33 -13,33	0,88 ± 0,68 -6,67	6,78 ± 1,81 -20
TRC	mX	- - -	0 ± 0 0	0 ± 0 0	4,8 ± 3,83 -16,09	0 ± 0 0	0 ± 0 0	0 ± 0 0
TRC	11	1,63 ± 0,46 -5,38	2,5 ± 0,76 -10	1,24 ± 0,5 -5,71	17,34 ± 4,28 -53,47	3,74 ± 1,19 -15,71	1,63 ± 0,46 -5,38	5,37 ± 1,19 -18,57
DRC <sup>2</sup>	3	3,61 ± 1,49 -8,44	6,4 ± 1,77 -10,71	1,23 ± 0,78 -3,7	4,38 ± 1,85 -11,11	7,14 ± 2,01 -11,11	4,09 ± 1,47 -8,44	11,23 ± 1,07 -5,67
DRC	4	4,66 ± 0,59 -3,23	4,76 ± 2,88 -16,07	2,2 ± 1,08 -5,56	6,09 ± 1,83 -9,89	5,87 ± 2,82 -16,07	5,75 ± 1,04 -6,21	11,62 ± 3,41 -20,89
DRC	6	3,77 ± 1,11 -5,92	2,94 ± 1,1 -5,56	0,73 ± 0,45 -1,85	5,74 ± 1,88 -11,11	3,67 ± 1,53 -7,41	3,77 ± 1,11 -5,92	7,44 ± 2,59 -11,96
DRC	fX	0,29 ± 0,29 -0,86	1,72 ± 0,46 -1,58	1,23 ± 1,23 -3,7	5,47 ± 3,88 -12,96	2,95 ± 1,38 -4,69	0,29 ± 0,29 -0,86	3,24 ± 1,18 -3,83
DRC	mX	- - -	0,89 ± 0,89 -1,79	0 ± 0 0	10,9 ± 1,6 -3,2	0,89 ± 0,89 -1,79	0 ± 0 0	0,89 ± 0,89 -1,79
DRC	11	5 ± 1,64 -9,45	1,78 ± 0,43 -2,2	0,35 ± 0,25 -1,27	3,68 ± 0,74 -4,24	2,13 ± 0,53 -2,85	5 ± 1,64 -9,45	7,13 ± 1,71 -10,08
MAL <sup>2</sup>	3	7,94 ± 2,63 -17,87	11,94 ± 3,64 -28,26	3,94 ± 2,65 -19,15	18,23 ± 4,75 -36,17	15,52 ± 4,66 -29,74	8,299 ± 2,91 -20,37	23,82 ± 5,01 -35,65
MAL	4	10,14 ± 3,78 -25	21,32 ± 3,51 -23,99	3,9 ± 1,95 -14,89	18,43 ± 3,58 -26,6	24,25 ± 4,14 -27,66	11,11 ± 4,19 -27,5	35,36 ± 4,84 -33,63
MAL	6	3,01 ± 1,05 -7,69	10,99 ± 3 -23,47	5,1 ± 3,52 -25,53	31,85 ± 8,16 -63,09	16,09 ± 4,8 -36,12	3,01 ± 1,05 -7,69	19,1 ± 5,17 -38,25
MAL	fX	1,45 ± 1,45 -4,35	3,55 ± 3,55 -10,64	17,27 ± 14,84 -46,81	27,84 ± 9,85 -34,13	20,82 ± 18,37 -57,45	1,45 ± 1,45 -4,35	22,26 ± 17,59 -53,1
MAL	mX	- - -	0,43 ± 0,43 -1,72	0 ± 0 0	38,15 ± 13,6 -66,37	0,43 ± 0,43 -1,72	0 ± 0 0	0,43 ± 0,43 -1,72
MAL	11	4,14 ± 2,15 -14,02	7,33 ± 6,73 -47,67	2,65 ± 1,8 -12,86	11,77 ± 3,75 -30	9,98 ± 6,53 -47,67	4,14 ± 2,15 -14,02	14,12 ± 5,9 -47,67

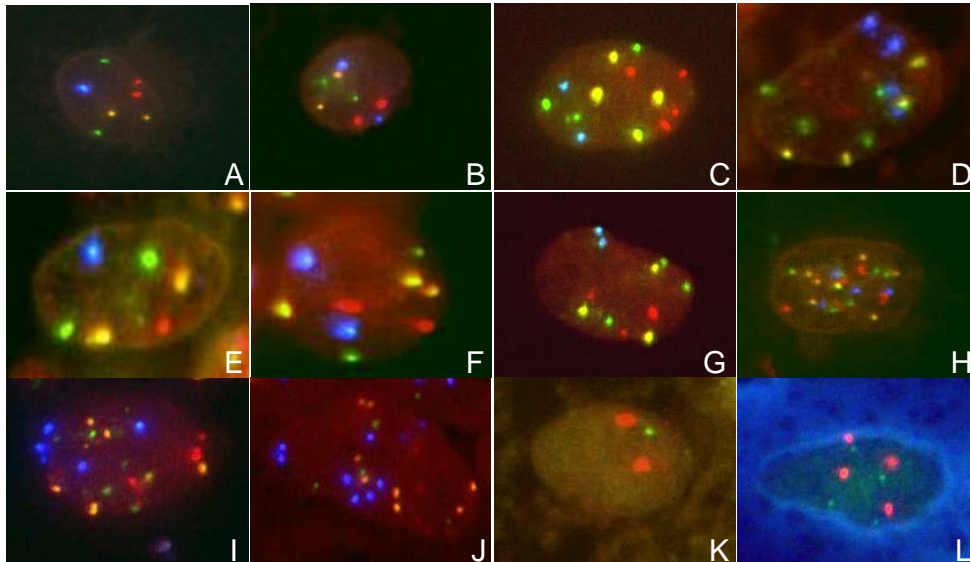
Nem találtunk szignifikáns különbséget a CD68-pozitív és normál kontrol sejtek C-ANEU értékei ( $p=0.27 - 0.91$ ) között, ahogy 11p telomerikus eltérések gyakorisága között sem. Az I-ANEU érték magasabbnak bizonyult a CD68-negatív neoplasztikus sejtpopulációban ( $25.76\pm 2.79\%$ ) mind a kontrol, mind a CD68-pozitív sejtpopulációhoz képest. Összehasonlítva a C-ANEU értékeket nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni a gyakoriságok között, mely random aneuszómia jelenlétére utal mind a négy csoportban (DNRC, DRC, TNRC, TRC) (38 b. ábra).

Összességében a kromoszóma nyéréseket és vesztéseket körülbelül egyenlőnek találtuk a nem-recidív és recidív csoportokban, míg a malignus esetekben a kromoszóma nyérések domináltak. A poliszómia gyakoriságok (I-POLY átlagértékek) növekvő tendenciát mutattak a különböző csoportokat összehasonlítva (DNRC: 1.13%, DRC: 3.19%, TNRC: 9.71%, TRC: 11.86%, MAL: 11.16%).

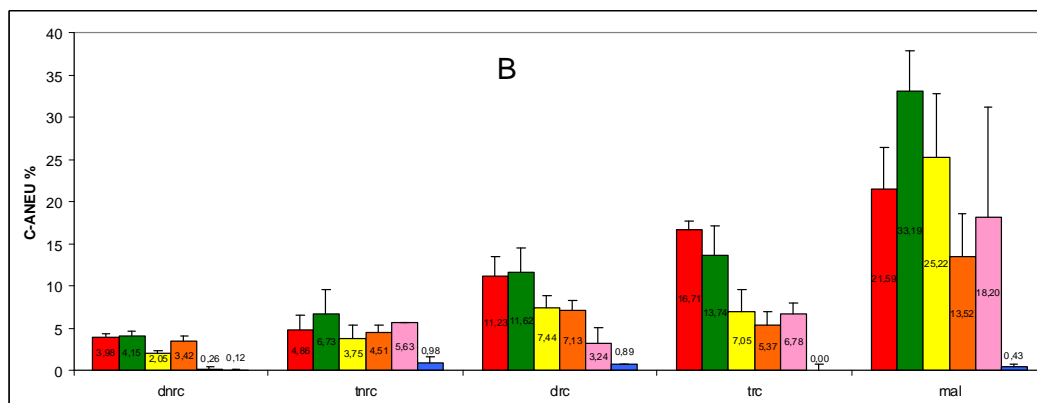
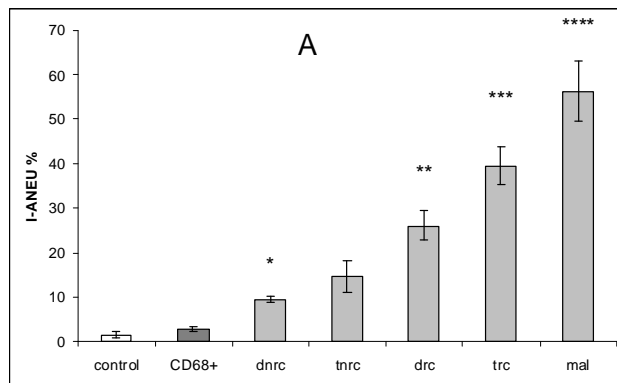
Emelkedő I-ANEU értékeket találtunk a különböző osteoclastoma-csoportokban, szignifikáns különbségeket találva a DRC ( $26.06\pm 3.30\%$ ) vs DNRC ( $9.45\pm 0.77\%$ ), TRC ( $39.55\pm 4.29\%$ ) vs DRC és TNRC ( $14.63\pm 3.62\%$ ), valamint a MAL ( $54.02\pm 7.24\%$ ) vs TRC csoportok között. A MAL csoportban az aneuszómia gyakorisága magasnak bizonyult FISH analízissel (I-ANEU:  $54.02\pm 7.24\%$ ) (7-8. táblázat és 37,38. ábra)).

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

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



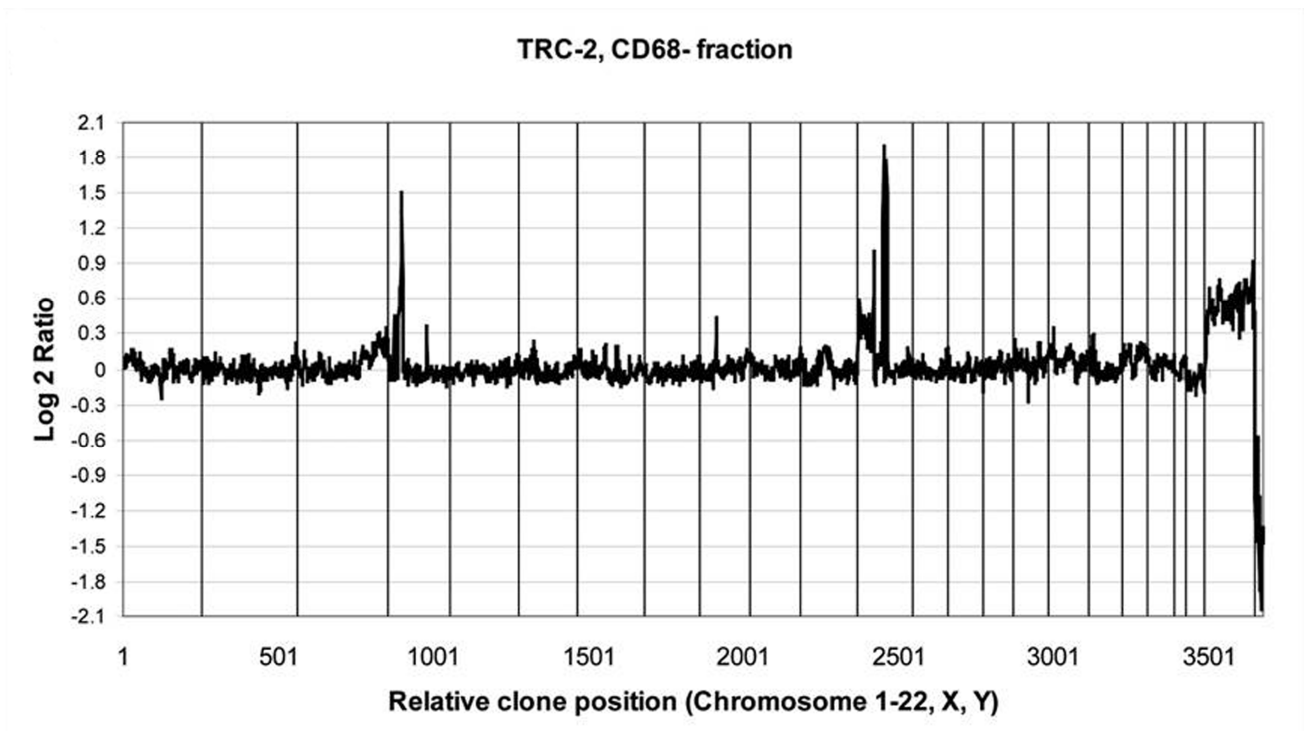
37. ábra A különböző csoportok típusos FISH mintázatai. Centromerikus próbák: X(kék), 3(piros), 4(zöld) és 6(sárga). (A, B) Disomiás sejt férfi (DNRC-1) és nő (DNRC-19) betegből a DNRC csoportban. (C, D) Tetrasomiás sejtek férfiből (TNRC-2) (kettő X szignál) és nőből (TNRC-4) (négy X szignál). A TNRC csoportra a tetraszomiás sejtek voltak jellemzők aneuszómia nélkül (euszomiás poliszómia). (E, F) Férfi (DRC-1) (4-6 kromoszóma diszómia, X és 3 monoszómia) és nő (DRC-4) (3-4-X diszómia, 6 triszómia) a DRC csoportból. (G, H) Férfi (TRC-9) (X diszómia, 3-4-6 triszómia) és nő (TRC-8) (3 és X tetraszómia, 4 pentaszómia és 6 hextaszómia) a TRC csoportból. (I, J) Férfi (MAL-2) és nő (MAL-1) a malignus csoportból súlyos aneuszómiaikkal. (K, L) Disomiás sejtek 11p telomer vesztéssel (DRC-4), és tetraszomiás sejt ép telomerrel (TNRC-2). A 11-es kromoszóma centromerikus (piros) and subtelomerikus (zöld) szignáljai.



38. ábra (A) A kontrol és normál sejtek valamint a különböző GCTB csoportok I-ANEU értékei. A bar a standard hibát mutatja. A histiocyták nem mutatnak szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest ( $P = 0.1992$ ), míg a neoplasztikusak igen a histiocytákhoz képest ( $*P < 0.001$ ). Növekvő I-ANEU értékek mutatkoztak a GCTB csoportokban szignifikáns ( $P < 0.001$ ) különbségekkel a DRC\*\* versus DNRC, TRC\*\*\* versus DRC, és MAL\*\*\*\* versus TRC csoport. (B) C-ANEU értékek kromoszómákként 3 (piros), 4 (zöld), 6 (sárga), 11 (narancs), női X (lila), és férfi X (kék).

*Array komparatív genomikus hibridizáció (CGH)*

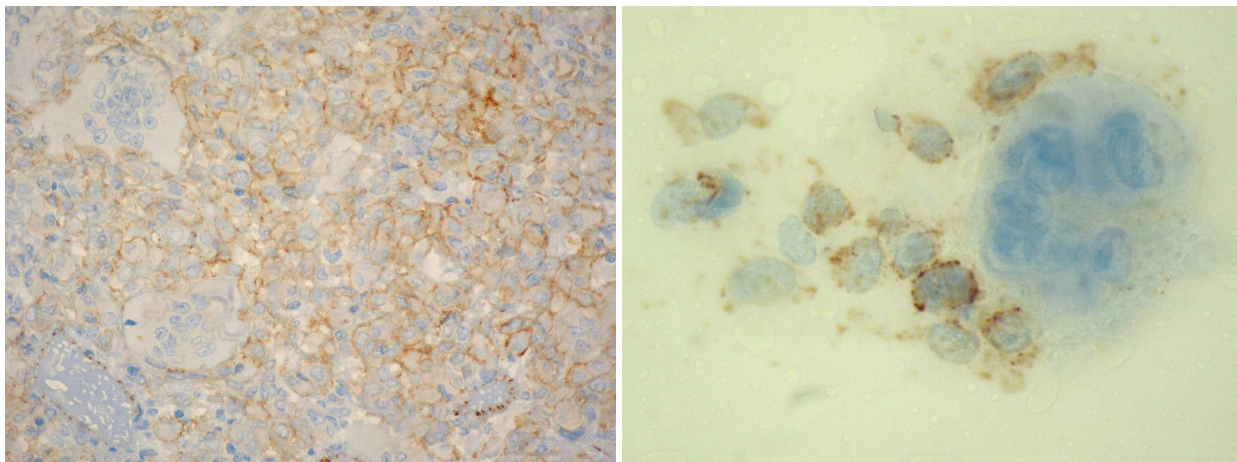
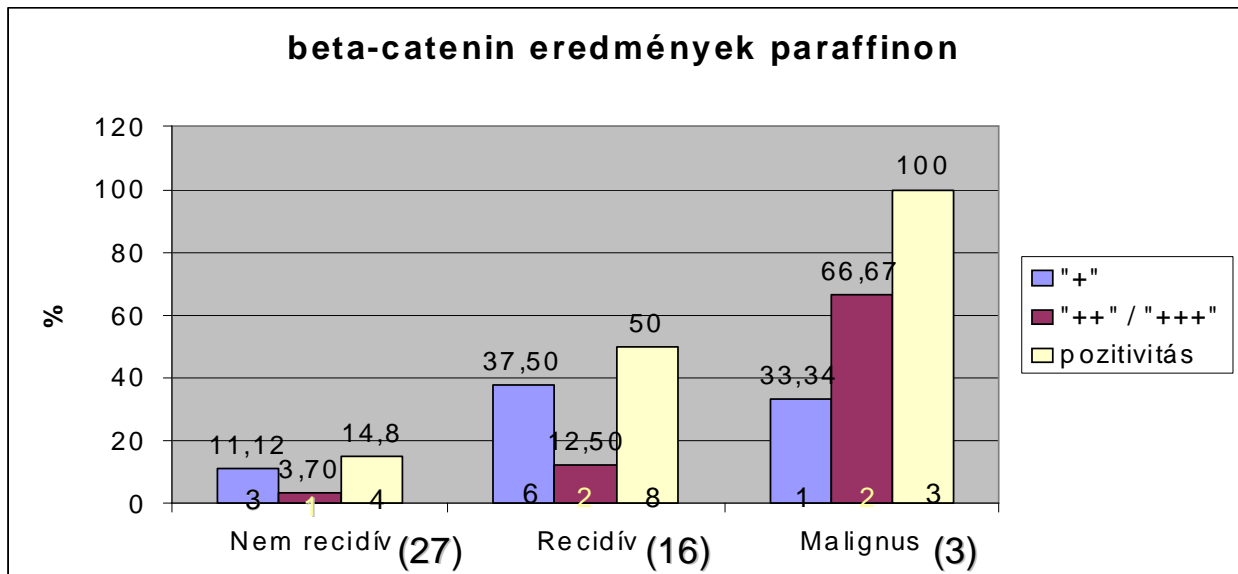
3 (egy recidív és két malignus) eset mutatott klonális genomikus eltérést az 51-ből, amelyek mindegyike változó nagyságú kromoszóma szegmentumok random nyerése és/vagy vesztese volt (39. ábra).



39. ábra Mágnesesen szeparált CD68 negatív sejtek array CGH profilja. A TRC-2 es esetben a 4-es és 12-es kromoszómánál magas szintű amplifikáció látható.

*CTNNB1, TP53 és BCL2 expresszió*

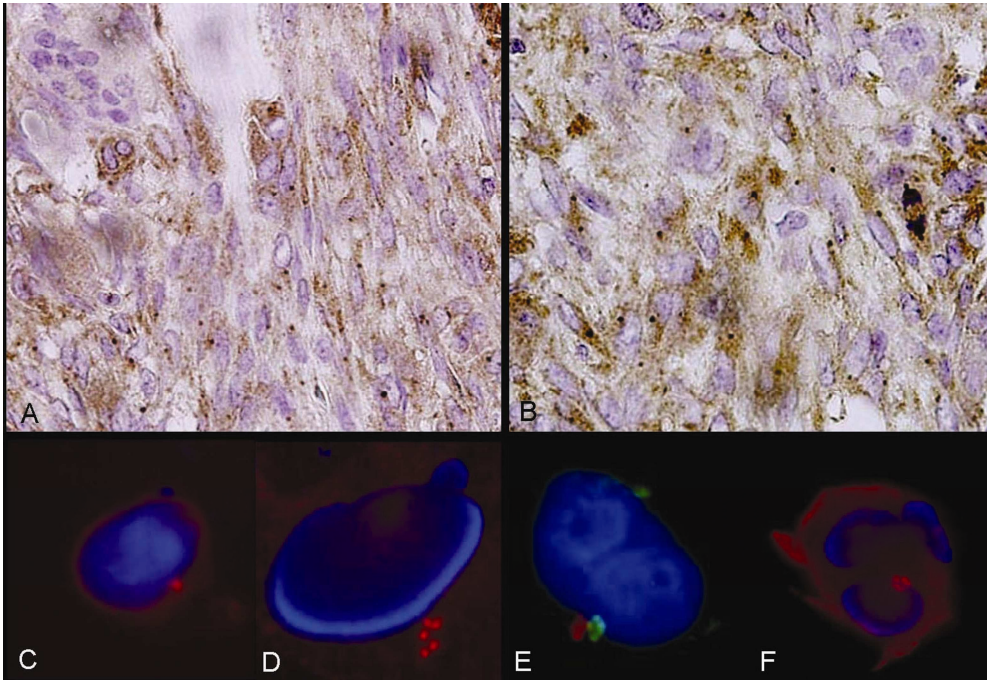
A 26 nem-recidív esetből 3 (12%), a 16 recidív esetből pedig 8 (50%) mutatott gyenge membrán pozitivitást beta-catenin ellenes antitesttel, míg mindkét vizsgált malignus esetben közepes/erős membrán pozitivitás volt látható. 6 beta-catenin membrán pozitivitást mutató eseteknél FISH analízist végezve a fent leírt relokalizációs technikával nem tudtunk összefüggést kimutatni a beta-catenin pozitivitás és az aneu/poliszómia között ( $p=0.56$ ) (40. ábra). Nem találtunk BCL2 expressziót sem a mononukleáris, sem az óriássejtekben, és csupán két malignus eset mutatott gyenge magi p53 pozitivitást.



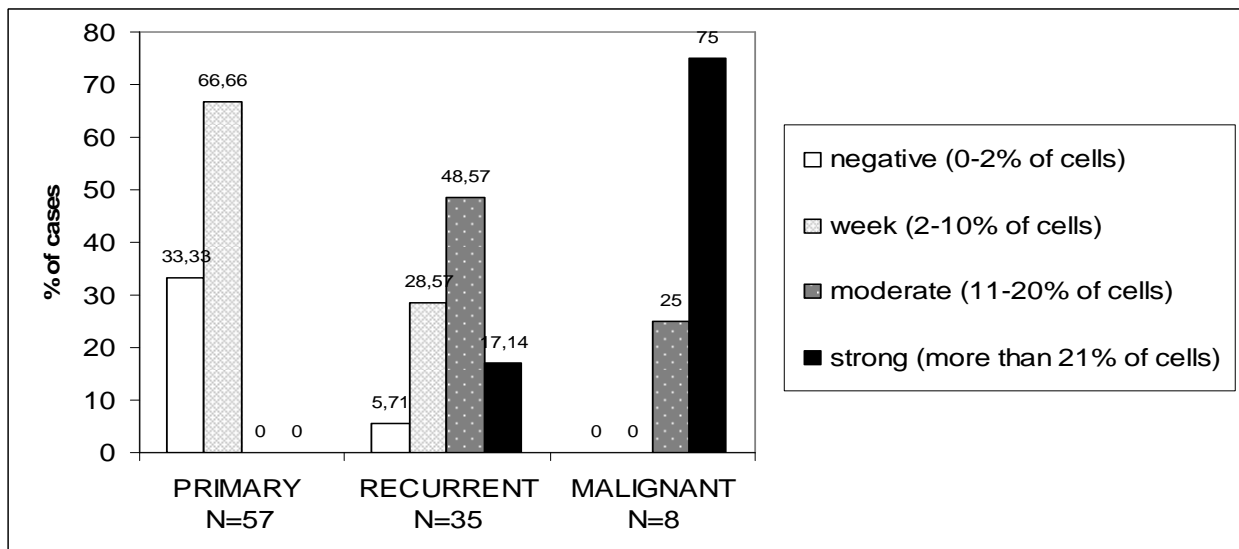
40. ábra Béta katenin expresszió a különböző GCTB csoportokban. Bár emelkedő tendencia megfigyelhető a (membrán) pozitivitásban, az aneuzómiával való összevetés során szignifikáns különbség nem mutatkozott ( $p=0,56$ ) (diagramm). Béta katenin membránpozitivitás szövettani metszeten (bal alsó kép) és cytológiai keneten (jobb alsó kép).

#### *A centroszóma profil és a klinikai viselkedés*

Centroszóma amplifikációt nem csak a malignus, hanem benignus óriássejtes csonttumoros esetek mononukleáris stromasejtjeiben is igazolni tudtunk (41. ábra). A centroszóma sokszorozódás szignifikánsan magasabb volt a kiújulást mutató és malignus esetekben a nem kiújuló esetekhez képest (42. ábra). Hasonló összefüggést találtunk I-FISH analízissel, ahol a centroszóma amplifikáció aránya magasabb volt a malignus esetekben (36.5%) a recidív (16.6%) és nem-recidív (5%) esetekkel összehasonlítva.



41. ábra Gamma-tubulin expresszió egy nem recidív esetben, (A, C) normális centroszóma mintázattal valamint egy recidív eset (B, D) centroszóma amplifikációval. A pericentrin (piros) kolokalizációt mutat a gamma-tubulinnal (zöld), mely gyakori jelenség a malignus GCTB-ekben (E). 23 (60.87%) I-FISH-el vizsgált esetből 14 eset centroszóma csoportulásokot mutatott függetlenül a klinikai viselkedéstől, esetenként az érték 3-18% között volt (F).

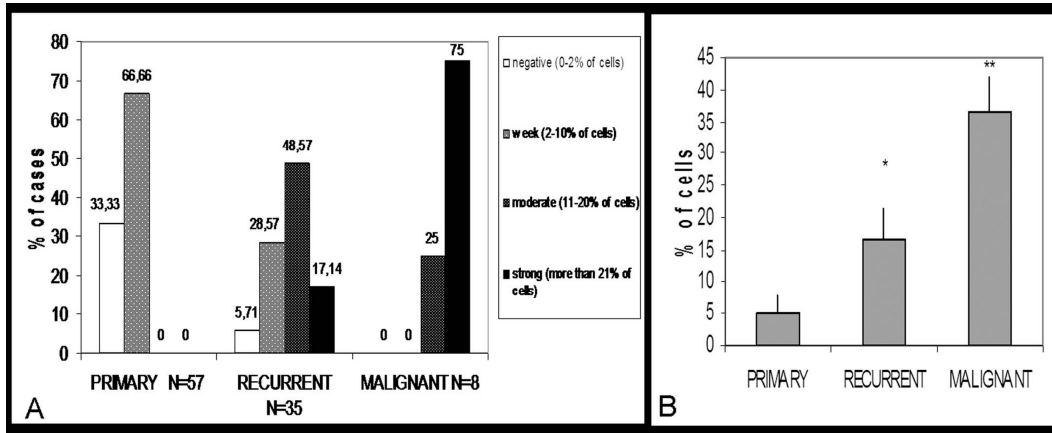


42. ábra A centroszóma amplifikáció (több mint 2 centroszóma /sejt) szignifikánsan nagyobb volt a recidív és malignus GCTB-ben összehasonlítva a nem recidív tumorokkal ( $p < 0,001$ ).

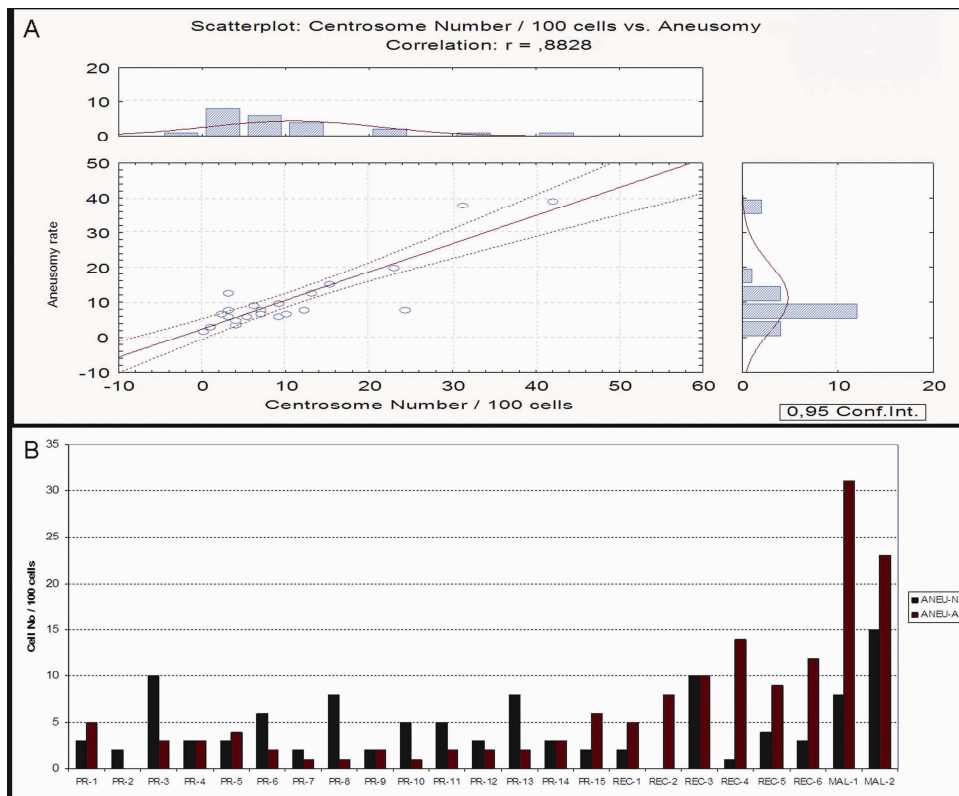
### *Kromoszóma számbeli- és centroszóma abnormalitások*

Statistikailag szignifikáns korreláció mutatkozott a centroszóma számbeli eltérések és a kromoszómális instabilitás között mononukleáris osteoclastoma sejtekben (43. ábra). Egyedi-sejt szinten I-FISH analízissel vizsgálva azonban a normál centroszóma-tartalmú aneuszómias

sejtek gyakoriságát a centroszóma amplifikációt mutató aneuszómiás sejtekéhez képest, nem jött ki szignifikáns összefüggés a kromoszóma számbeli eltérések és a centroszóma aberrációk között ( $p=0.31$ ) (44. ábra). A 23 I-FISH analizált esetből a sejtek  $4.69\pm 2.84\%$ -a mutatott aneuszómiát normál centroszóma tartalommal, míg a sejtek  $6.47\pm 5.36\%$ -a volt aneuszómiás amplifikált centroszóma számmal.



43. ábra A centrosoma amplifikáció szignifikánsan magasabb a recidív és malignus csoportban mint a nem recidív GCTB-ben ( $p<0.001$ ) (A). Egyedül az I-FISH vizsgálattal szignifikáns különbséget találtunk a csoportok között; a centroszóma amplifikáció a malignus csoportban (36.5%), a recidív csoportban (16.6%) és a nem recidív csoportban (5%) volt ( $p<0.001$ ) (B).

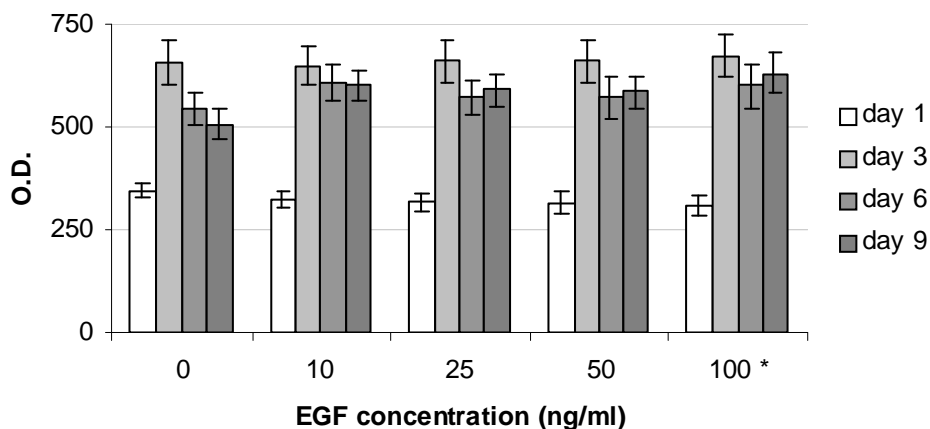


44. ábra Szoros koreláció ( $p<0.001$ ) mutatkozik a diagrammon az aneusomia és a centrosoma amplifikáció között (minden sejtet figyelembe véve), ami azt sugallja, hogy a centrosoma abnormalitásoknak szerepük van a GCTB-k genetikai instabilitásának kialakulásában (A). Ha azonban kizárólag a 23 eset aneuszómiás sejtjeit vizsgáljuk, akkor az aneuszómiás sejtek normális centroszómát tartalmazó aránya (ANEU-N) és a centroszóma amplifikációt tartalmazó aránya (ANEU-A) nem mutatott szignifikáns különbséget (B). PR: primer nem recidív, REC: benignus recidív, MAL: malignus óriássejtes csont tumor.

## Funkcionális vizsgálatok

### *Az EGF serkenti az óriássejtes csonttumoros stromasejtek proliferációját*

A CD45-negatív osteoclastoma stromasejtek emelkedett proliferációs aktivitást mutattak különösen a 100 ng/ml koncentrációjú EGF kezelés hatására a 6. és 9. napon (45. ábra). Az EGF proliferációt serkentő hatását azonban nem kíséri osteoblastos differenciációt elősegítő hatás a stromasejtek alkalikus foszfatáz (ALP) aktivitásának, mint osteoblastos differenciációs markernek a jelenlétét vizsgálva. A 4 osteoclastoma stroma sejt mintából kettő ALP negatív volt, a pozitív esetek ALP aktivitásainak szintjei pedig nem változtak emelkedő koncentrációjú EGFRt adva a tenyészetekhez.



45. ábra Növekvő GCTB stromalis sejtes proliferáció primer sejttenyészetekben emelkedő koncentrációjú EGF kezelésre. A kezeletlen kontrollokkal összehasonlítva a sejtszám szignifikáns emelkedése (\* $p < 0.05$ ) figyelhető meg, különösen a 100 ng/ml EGF koncentráció esetén.

Megbeszélés: tanulmányunkban az óriássejtes csonttumorok DNS tartalmát citofotometriával vizsgálva azt találtuk, hogy bár a nem-recidív tumorok többsége diploid, mégis mutatkozik egy tetraploid szubpopulációt tartalmazó csoport közöttük, ahogy a recidív, tendenciájukban tetraploid vagy aneuploid tumorok között is előfordulnak normál diploid esetek. Így a ploiditás önmagában nem elegendő az óriássejtes csonttumor klinikai viselkedésének előrejelzéséhez. Mivel gyanítható volt ezek alapján, hogy mind az öt csoport random egyedi-sejtes aneuszómiát tartalmaz, vagyis nem lehet szignifikáns különbség a különböző kromoszómák aneuszómia gyakorisága között, vizsgálatunkat kromoszómális szinten folytattuk. Szignifikánsan magasabb random egyedi-sejtes aneuszómiát találtunk a recidív tumorokban a nem-recidívekhez képest mind a diploid, mind a tetraploid csoportban, míg



klonális kromoszóma eltéréseket egyedül a malignus tumorokban voltak. Euszómiás poliszómia mutatkozott néhány tetraploid nem-recidív esetben és gyakrabban volt látható kiegyensúlyozott aneuszómia (a kromoszóma nyerések és veszteségek egyenlők) a diploid recidív esetekben a diploid nem-recidív esetekhez képest. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a jellemző telomerikus asszociációkon felül a számbeli kromoszómális eltérések lehetnek felelősek az óriássejtes csonttumor agresszív klinikai lefolyásáért.

Klonális kromoszómális eltéréseket a 7 malignus esetből 5-ben találtunk FISH analízissel és 2-ben array komparatív genomikus hibridizációval, így összesen 6 malignus eset mutatott klonális eltérést a 7-ből. A malignus viselkedés ezek alapján nagyon valószínű, ha eltérések mutatkoznak array-CGH vizsgálattal, vagy az aneuszómia gyakoriság magasabb, mint 20% FISH-sel. 3 recidív eset mutatott klonális eltéréseket FISH-, egy pedig array-CGH vizsgálattal (a FISH analízissel egybehangzóan). A nem-recidív esetekben nem volt klonális eltérés. Az aneuszómia tendenciája és a klonális eltérések arra utalnak, hogy az óriássejtes csonttumor genetikai instabilitásában biológiai kontinuitás lehet.

Összefoglalóan az alábbi sematikus ábrával (46. ábra) illusztráljuk a genetikai instabilitás jellegzetességeit a különböző típusú óriássejtes csont tumorokban:

46. ábra

Osteoclastok és histiocyták: szürke maggal jelölt sejtek

Színes sejtek: tumorsejt populáció

A kromoszóma nyerések és veszteségek “+” és “-” jelzéssel, míg a különböző kromoszómák eltérő színekkel vannak jelölve ( a FISH esetén használt színekkel egyezően).

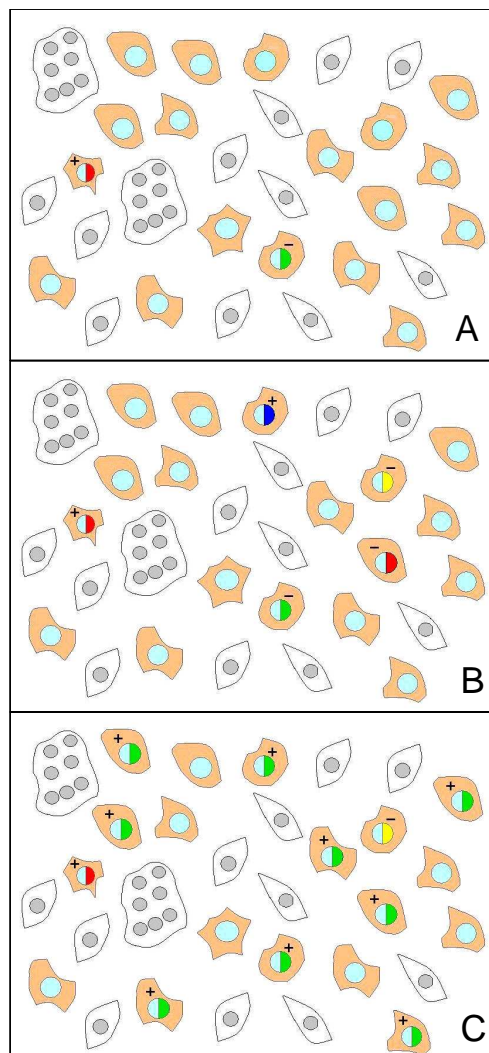
A genetikai eltérést tartalmazó sejtek aránya megközelítőleg mutatja az általunk talált eredményeket.

a, Nem recidív csoport (DNRC, TNRC);  
kevés random aneuszómia

b, Recidív csoport (TRC, DRC); szignifikánsan  
magasabb random aneuszómia

c, Malignus csoport; klonális eltérések jellemzőek

Eredményeink szerint a ploiditás meghatározása FISH-analízissel kombinálva jól előrejelezheti az osteoclastoma recidív hajlamát.



Az eseteink 30%-a ugyan beta-catenin pozitivitást mutatott, mely egybehangzó két korábban kevesebb osteoclastomás eseten mások által közölt tanulmánnyal (149,246), de nem mutatkozott szignifikáns összefüggés sem a beta-catenin pozitivitás és az aneuszómia foka, sem a CTNNB1 expresszió és a kiújulási tendencia között (78). A lehetséges szupresszor gén károsodás jeleként, magi TP53 expressziót kizárólag néhány malignus esetben találtunk korábbi tanulmányokkal szintén összhangban (10,96,98,110). Lehetnek azonban fehérje felhalmozódást nem okozó TP53 eltérések, ezért további vizsgálatok szükségesek a TP53 abnormalitásoknak, mint a genetikai instabilitás okának biztos kizárásához. Az apoptózis jelút-károsodás lehetséges indikátorát, az anti-apoptotikus BCL2 expresszióját vizsgálva negativitást találtunk minden esetben.

A különféle eddig vizsgált molekuláris mechanizmusok között óriássejtes csonttumorban ezidáig még nem tanulmányozták az aberráns centroszómaszám szerepét a kromoszómális instabilitás kialakulásában egyedi sejt szinten. Tudomásunk szerint ez az első beszámoló a számfeletti centroszómák direkt szerepének vizsgálatáról a kromoszómális instabilitás kialakulásában nagyobb óriássejtes csonttumoros anyagon, olyan tumoron, mely változó mértékben mutat agresszív viselkedést és ritkán metasztatizálhat is. A centroszóma aberrációk direkt szerepéről szóló vélemények a kromoszómális instabilitás kialakulásában eltérőek. A centroszómaszám és aneuszómia-arány statisztikai korrelációjáról szóló néhány tanulmány kimutatta, hogy a számfeletti centroszómák okozta mitotikus multipolaritás a felelős az aneuszómia kialakulásáért epitheliális tumorokban, mint pl. az emlőrákok vagy kolorektális rákok esetén (14,70,72,77,129,220). Hasonlóan azonban az általunk óriássejtes csonttumorban találtakkal, más malignus epitheliális, valamint benignus és malignus mesenchymális tumorok sem mutattak korrelációt a centroszómaszám és az aneuszómia-frekvencia között (4). Eredményeink szerint a centroszóma amplifikáció tetten érhető a benignus óriássejtes csonttumoros esetekben, mely arra utal, hogy önmagában nem karakterisztikus a malignus osteoclastomákra. A tumor viselkedésével talált korreláció felveti, hogy a centroszómaszám meghatározás hasznos eszköz lehet a tumor klinikai lefolyásának előrejelzésében. A kromoszómális instabilitás és a centroszóma eltérések egyedi sejt szinten talált függetlensége arra utalhat, hogy a centroszóma amplifikáció egymagában nem tehető felelőssé a mitotikus abnormalitások kialakulásáért óriássejtes csonttumorban. Mivel azonban fontos lenne különösen az első kiújulás alkalmával a tumor viselkedését előrejelző megbízható markereket találni, a centroszóma funkció szabályozásában résztvevő faktorok részletesebb vizsgálata lenne szükséges osteoclastomában.

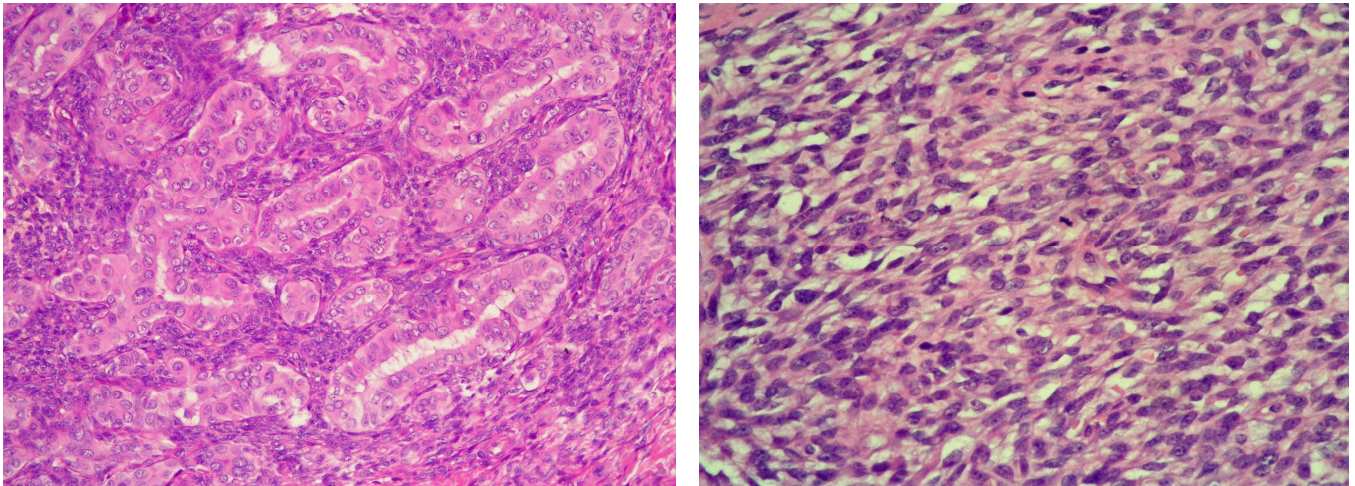
Az EGF és az MCSF együttesen serkenti az osteoclastogenezist perifériás vér mononukleáris sejtekből. Nem detektálható azonban csontrezorbeáló aktivitás az így keletkezett osteoclast típusú óriássejtekben. Kimutattuk, hogy az EGFR jelút elsődleges szerepe az óriássejtes csonttumorban a stromasejt-proliferáció elősegítése osteoblastos differenciáltató hatás nélkül. Az általunk vizsgált 4 esetből kettőben nem is tudtunk ALP-pozitivitást kimutatni, ami az osteoblastok teljes hiányát jelenti e két esetben, vagyis az osteoclastoma stromasejtek nem mindig mutatnak osteoblastos fenotípust. Mindezek arra utalnak, hogy az EGF a tumor növekedéshez, így a tumor progressziójához hozzájárulhat, de ezen hatása nem osteoblastos jellegű differenciációval történik.

### **Következtetések**

1. Relokalizációs technika segítségével bizonyítani tudtuk, hogy a CD68-pozitív mononukleáris stromasejtek nem tartalmaznak szignifikáns kromoszóma számbeli és telomerikus eltérést, lényegében az osteoclastokhoz hasonló normál populációnak tekinthetők.
2. Eredményeink arra utalnak, hogy a számbeli kromoszómális abnormalitások a telomerikus asszociációkkal együtt felelősek az agresszív klinikai lefolyásért. A ploiditás meghatározás FISH vizsgálattal kombinálva segítheti az óriássejtes csonttumor kiújulási hajlamának előrejelzését.
3. Pozitív korrelációt találtunk a centroszóma amplifikáció gyakorisága és a klinikai viselkedés között, így a centroszóma eltérés immunhisztokémia meghatározása FISH vizsgálattal kombinálva valamint ploiditás-meghatározással kiegészítve még szenzitívebb marker lehet a tumor progressziójának előrejelzésében.
4. A centroszóma eltéréseket, mint a kromoszómális instabilitás lehetséges okát vizsgálva arra a következtetésre jutottunk, hogy a centroszóma amplifikáció és kromoszóma számbeli eltérések között egyedi-sejt szinten nincs összefüggés, így az osteoclastomák genetikai instabilitásának kialakulásában más mechanizmus játszik szerepet.
5. Funkcionális eredményeink arra utalnak, hogy az EGF hozzájárulhat a tumor növekedéséhez, így a tumor progresszióhoz, de ezt a hatást nem az osteoblastos differenciáción keresztül éri el.

#### 4. A synoviális sarcoma genetikai eltéréseinek és jelütrendszereinek vizsgálata

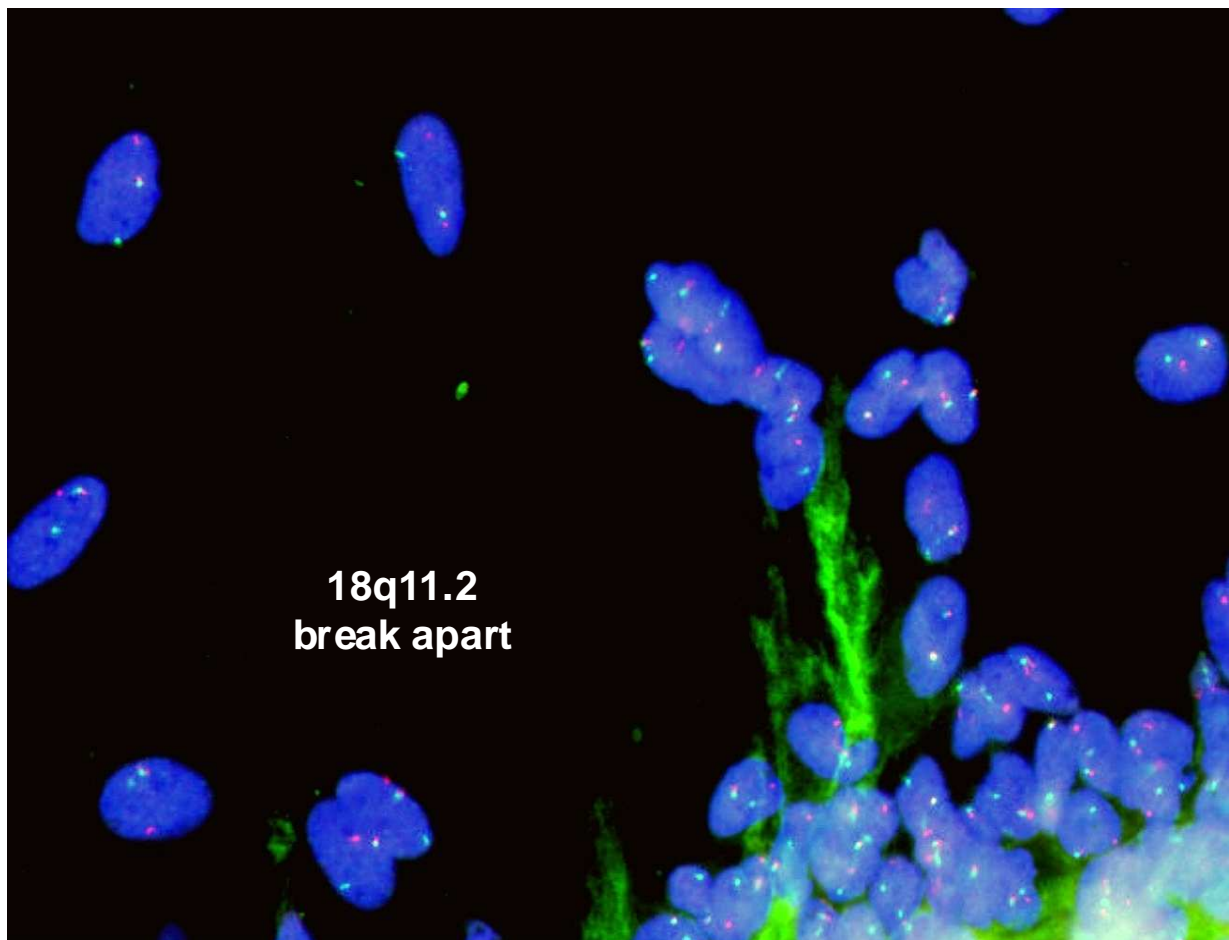
A synovialis sarcoma klinikailag és morfológiailag jól definiált entitás, amelyet igen kiterjedten ír le az irodalom. Primeren a végtagok paraarticularis régiójában fordul elő, általában az ideghüvellyel, a bursákkal és az ízületi tokkal összefüggésben. Nevével ellentétben ritkán fordul elő az ízületi üregben, és nem jelentkezik együtt a vele látható összefüggésben levő synovialis struktúrákkal. Így előfordulhat a parapharyngealis regioban, a hasfalban, a pleurában, és a szívben is, de gyakorlatilag bárhol. Ma már tudjuk, hogy eredetét, pontosabban a differenciációt illetően semmi köze sincs a synovialis sejtekhez, valójában egy tisztázatlan hisztogenezisű daganatról van szó, legméltóbb neve talán a „lágyrészek carcinosarcomája” lehetne. A synovialis sarcoma leggyakrabban adolescens korban és fiatal felnőtt korban fordul elő 15 és 40 év között. Az átlagéletkor 31.3 év, a betegek 83.6%-a 10 és 50 év között van. A tumor jelentkezhethet 10 éves gyermekkorban, de néhány tanulmány szerint az irodalomban, újszülött korban is előfordulhat. A tumor kialakulásának ideje az esetek legnagyobb részében 2-4 év, de néhány esetben a tumor helyén kialakuló fájdalom, a tumor lassú növekedése miatt, az operációt megelőzően 20 évvel korábban is megjelenhet. Nem ritkán ezen esetekben hibás, fals diagnózist adnak meg, mint például arthritis, synovitis, vagy bursitis.



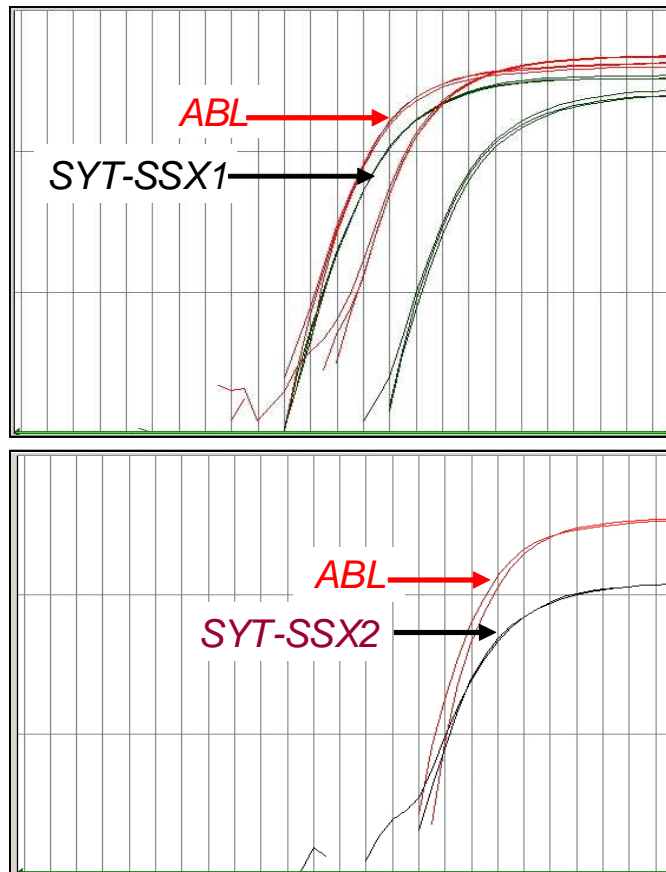
47. ábra Típusos bifázisos synovialis sarcoma szöveti képe megnyúlt orsósejtes és glanduláris komponensekkel (bal oldali kép). Monofázisos synoviális sarcoma, kötegekbe rendeződő, megnyúlt monomorph daganatsejtekkel, változó mértékű, de többnyire sok osztódással (jobb oldali kép).

Szövettani megjelenését illetően (47. ábra) megkülönböztetünk 1; bifázisos típust, amelyet jól kivehető epithelialis sejtek és orsó sejtek alkotnak különböző arányban, 2; monofázisos fibrozus típust, 3; ritka monofázisos epithelialis típust és 4; gyengén differenciált, kerek sejtes

típust. A leggyakoribb a monofázisos fibrozus típus, majd a bifázisos, ritka a gyengén differenciált típus, melyet illik molekuláris vizsgálattal megerősíteni. Irodalmi ritkaság a monofázisos epitheliális típus. A synoviális sarcoma jellegzetes, bár egyáltalán nem specifikus immunfenotípust mutat, amennyiben koexpresszió jelentkezik vimentin keratin és EMA reakciókkal. Az esetek egy részében S100 pozitívítás is jelentkezhet, ami többnyire csak inkább differenciáldiagnosztikai problémákat okoz. Ugyanakkor újabban egy meglehetősen specifikus immunreakciót is használunk, a TLE1-et (transdusin like enhancer of split). Molekuláris szinten viszont igen jellemző a specifikus translocatio, leggyakrabban a kiegyensúlyozott reciprok translocatio (X;18) (p11.2;q11.2), mely a synovialis sarcomák több mint 90 %-ára jellemző (165) (48. ábra). Ez a translocatio magában foglalja a 18-as kromoszómán elhelyezkedő SYT gént, és az X kromoszómán elhelyezkedő SSX1, SSX2 igen ritkán az SSX4 gént (49. ábra). Transzlokációt nem mutató synovialis sarcoma diagnózis csak akkor fogadható el, ha egyébként a daganat jellegzetes lokalizációban és relatíve fiatal korban jelentkezik és metasztázis lehetősége kizárható (207). A jellegzetes transzlokáció kimutatása mind PCR mind FISH módszerrel lehetséges, melyet rutinszerűen végzünk (196).



48. ábra FISH reakció 18q11.2 break apart próbával. A szignálszétválás szinte minden sejtben jól látható.



49. ábra RT-PCR reakció, mely a felső esetben a SYT-SSX1, míg az alsó esetben a SYT-SSX2 transzlokációt igazolja.

A synoviális sarcoma prognózisa jobb mint az egyéb magas malignitású lágyrész daganatoké, az 5 éves túlélés 50-80%-ra tehető, mely függ alapvetően a beteg korától, a tumor nagyságától, a gyengén differenciált területek arányától és a rezekabilitástól (15,125,223,224). Mindezek mellett számos más prognosztikai faktornak is jelentősége lehet, így a DNS tartalom (ploiditás) valamint a Her-2 státusz már a korábbiakban is vizsgált (3,13) de ellentmondásos eredményeket mutató prognosztikai faktornak tartható. Ez vezetett bennünket, hogy 20 synoviális sarcoma esetén DNS tartalom és Her-2 státusz meghatározást végezzünk az esetleges prognosztikai összefüggések felderítésére (208). Az összefoglaló táblázatban (9. táblázat) tüntettük fel a fontosabb klinikai adatokat és a kapott eredményeket.

## 9. Táblázat Klinikai adatok, Her-2 státusz, és DNA ploiditás a 20 synoviális sarcoma esetén

	Kor, nem	Diagnózis	Lokalizáció	Her-2 kópiák száma	Her-2 protein	DI	Recidiva, metasztázis
1	M;26	bifázisos syn. sc.	b. lábszár	2	-	1,03	lokális recidiva, metasztázis, mehalt
2	M;58	monofázisos syn. sc.	j. comb	2	focal+	1,03	metasztázis, tüdő
3	F;29	monofázisos syn. sc.	j. comb	2	focal+	0,99	metasztázis, tüdő
4	F;52	monofázisos syn. sc.	j. lábszár	2	-	0,89	metasztázis, tüdő
5	F;68	monofázisos syn. sc.	j. lábszár	2	-	1,01	lokális recidiva
6	M;67	bifázisos syn. sc.	j. popliteális régió	2	focal+	1,05	metasztázis tüdő, meghalt
7	F;41	monofázisos syn. sc.	b. comb	2	-	0,98	lokális recidiva, metasztázis, mehalt
8	M;48	monofázisos syn. sc.	j. alkar	2	-	0,96	lokális recidiva
9	M;42	monofázisos syn. sc.	b. alkar	>10%; 5,4 amplifikáció	++	0,98	Nincs
10	M;29	monofázisos syn. sc.	medence	2	-	0,98	lokális recidiva, metasztázis, mehalt
11	F;13	bifázisos syn. sc.	j. csípő	>10%; 4,8 amplifikáció	++	1,23	Nincs
12	M;41	monofázisos syn. sc.	j. alkar	2	focal+	1,01	metasztázis tüdő, meghalt
13	M;37	bifázisos syn. sc.	j. lábszár	3, chr 17 trisómia	-	1,74	Nincs
14	M;40	monofázisos syn. sc.	j. lábszár	2	-	1,06	lokális recidiva
15	M;33	bifázisos syn. sc.	j. comb	>10%; 5,8 amplifikáció	++	1,00	lokális recidiva
16	F;28	monofázisos syn. sc.	b. comb	2	-	1,19	lokális recidiva lokális
17	F;35	monofázisos syn. sc.	j. csípő	4, chr 17 tetraszómia	-	2,12	recidiva, metasztázis tüdő
18	M;41	monofázisos syn. sc.	retroperitoneum	2	-	1,09	Nincs
19	F;41	monofázisos syn. sc.	j. comb	2	-	1,08	Nincs
20	F;25	monofázisos syn. sc.	j. lábszár	2	-	1,16	lokális recidiva

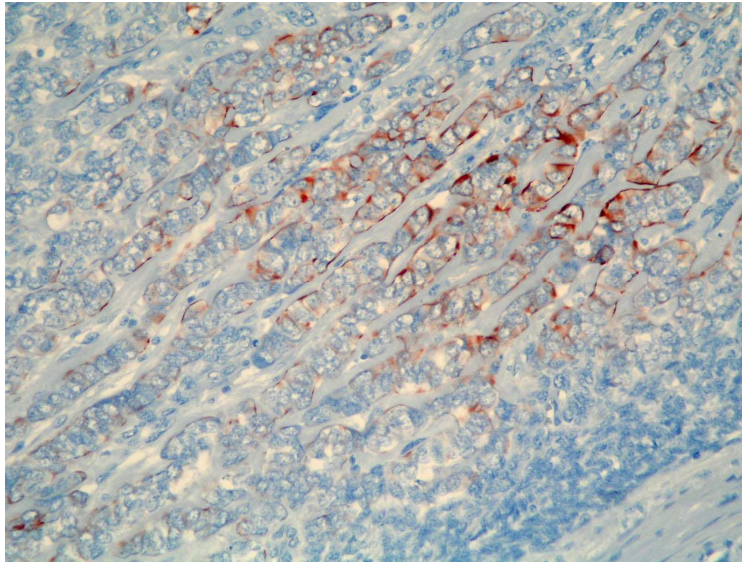
Her-2 kópiák számát FISH technikával, a Her-2 proteint immunhisztokémiával határoztuk meg, DI: DNA index

*HER2 protein expressziója synovialis sarcomában immunhisztokémiai vizsgálattal*

20 esetből 4 esetben volt gyenge fokális cytoplasma pozitivitás (1+), 20 esetből 3 esetben figyeltünk meg erős pozitivitást mind a plasmamembránban és mind a cytoplasmában (2+) (49. ábra). Erős pozitivitást (3+) nem figyeltünk meg. Nem volt látható különbség a festés

dc\_59\_10<sup>2</sup>-

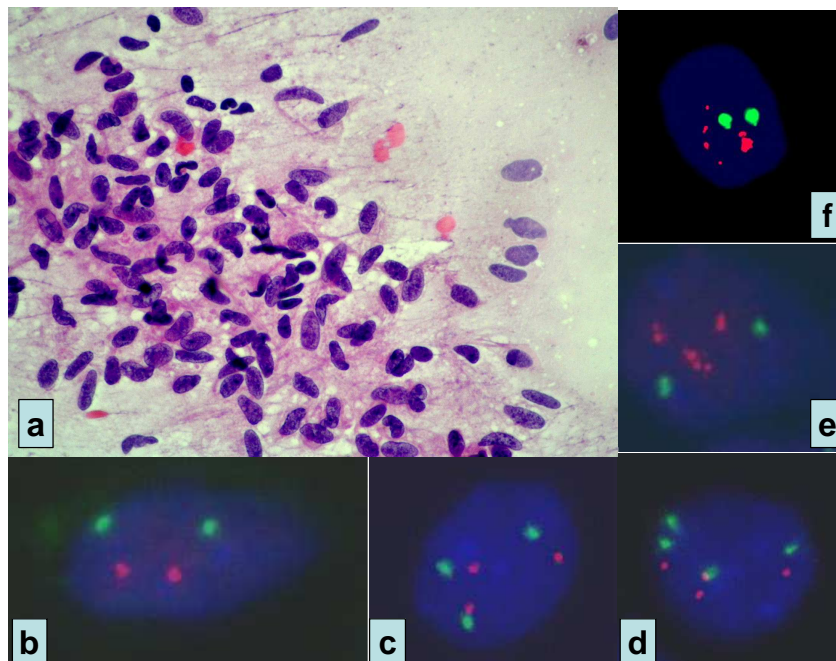
minőségét illetően az epitheloid és az orsósejtes régió között. Egészében véve a 7 pozitív eset a synovialis sarcomák 35 %-át representálta.



49. ábra 2+ membranosus pozitivitás monofázisos synovialis sarcomában CB-11 (Her2) ellenes antitesttel

*HER2 génamplifikáció vizsgálata synovialis sarcomában fluorescens in situ hibridizációval.*

FISH analízist végezve a HER2 gén amplifikációját 3 esetben találtuk (15%). Az amplifikációs ráta 2-3-szoros volt minden esetben, a kiértékelt sejtek több mint 10 %-ában (50. ábra). Masszív amplifikációt nem figyeltünk meg.



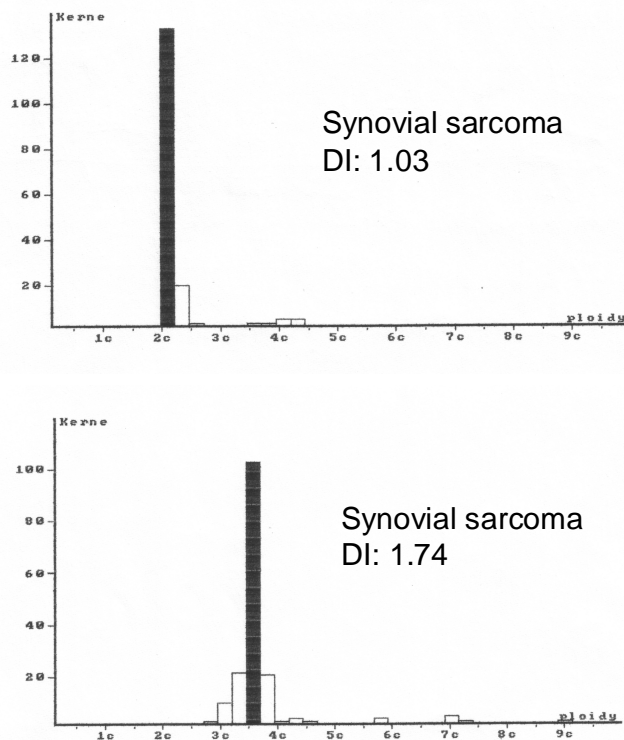
50. ábra FISH reakció Her2 és 17-es chromoszóma próbákkal a, A kenetek lenyomati cytologiai képe b, Normális diploid megjelenés mind a Her2-t mind a 17-es kromoszómát illetően c-d, Tri- és tetraszómia a 17-es kromoszómát illetően (zöld szignál) és ennek megfelelő Her-2 szignál szám (piros jel) ami jelzi, hogy nincs amplifikáció e-f, 2-3x-os amplifikáció igazolható



A HER-2 oncogén amplifikált esetek ugyanazok voltak, mint amelyeknél immunhisztokémiával 2+ pozitivitást találtunk. Az 1+ pozitívítású esetekben amplifikáció nem volt megfigyelhető. Egy esetben a 17-es kromoszóma triszómiáját figyeltük meg, míg egy másik esetben a 17-es kromoszóma poliszómiáját találtuk, de ezek a tények nem befolyásolták a HER-2 protein expressziójának státuszát.

#### *DNS cytometria*

A 20 synovialis sarcoma közül 6 aneuploid esetet találtunk (30%), két bifázisos és négy monofázisos esetet. Az aneuploid esetek közül egy hypodiploid volt, ebben az esetben a DNS index 0.89 volt. Továbbá 11 monofázisos és 3 bifázisos eset volt diploid (51. ábra). A 3 HER-2 gén amplifikációt mutató esetből egy aneuploid volt, míg a másik kettő diploidnak bizonyult.



51. ábra Diploid és aneuploid synovialis sarcoma DNS histogrammja (2-es és 13-as esetek)

Az aneuploid esetek közül egy hypodiploid volt, ebben az esetben a DNS index 0.89 volt. Továbbá 11 monofázisos és 3 bifázisos eset volt diploid. A 3 HER-2 gén amplifikációt mutató esetből egy aneuploid volt, míg a másik kettő diploidnak bizonyult.

*Korreláció a HER-2 status, a DNS ploeditás és a prognózis között*

A HER-2 oncogén amplifikációja szignifikáns összefüggést mutatott az alacsonyabb metasztázis képzés rizikójával ( $p < 0.05$ ).

A három amplifikált eset közül egyik sem adott metasztázist, ez szignifikáns összefüggést jelentett, viszont nem találtunk szignifikáns összefüggést a recidiva képzés és az amplifikációt illetően. Nem találtunk továbbá összefüggést a HER2 gén amplifikációs statusa és a ploeditás között. Ugyancsak nem találtunk összefüggést a ploeditási status, a metasztázis képzés vagy a recidiva kialakulása között.

*Megbeszélés*

A saját 20 synovialis sarcomáink esetén a tumor mérete 5 cm-nél nagyobb volt, a betegek átlag életkora 39.8 év volt, és hiányoztak a gyengén differenciált területek minden esetben. Úgy tűnik, hogy ez a csoport ideális annak tesztelésére, hogy a Her-2 oncogén amplifikáció mint prognosztikai faktor használható-e. Emlőrákos betegeknél a chemotherápiára és endocrin therápiára adott választ, a kezelést, és a betegség kimenetelét meghatározza a Her-2 gén amplifikációja, és a protein overexpressziója, mint prognosztikai faktor. Saját eredményeink lényegében megegyeznek mások eredményével (3,156,235), mivel a Her2 oncogén amplifikáció szignifikáns összefüggést mutatott az alacsonyabb metasztázis képzés rizikójával, amely összességében jobb prognózist jelent. Másrészről azonban mi nem találtunk összefüggést a recidiva képzést illetően, ellentétben Nuciforo és munkatársainak eredményével. (156)

Saját eredményeink hangsúlyozzák és megerősítik a már eddig részben megfigyelt eredményeket, hogy egy mérsékelt szintű Her-2 génamplifikáció valóban megtalálható egyes synovialis sarcomák esetében és ezen génamplifikáció és protein overexpresszió prognosztikai faktorként tekinthető. Mi voltunk az elsők, akik FISH technika alkalmazásával igazoltuk a Her2 génamplifikációt synovialis sarcomáknál. Tekintettel arra, hogy a korábbi vizsgálok nem találtak Her2 amplifikációt FISH vizsgálattal, ezen eredményünk mindenképpen magyarázatra szorul. Mindenekelőtt fontos, hogy az amplifikáció mértéke a mi esetünkben gyenge volt (2-3-szoros, és egyáltalán nem volt megfigyelhető olyan masszív amplifikáció mely az emlőcarcinoma egyes eseteinél karakterisztikus). Továbbá a Her-2 amplifikáció csak a tumorsejtek kis arányában fordult elő. Másrészt fő különbség a módszertanban van, amely lényegében megmagyarázza a különbséget.

Barbashina és munkatársai (13), illetve Thomas és munkatársai (235) 4 mikrométer vastag szövetmetszetet használtak a fluorescens és chromogenikus in situ hibridizációhoz, mi pedig kenetet alkalmaztunk. A 4 mikrométer vastag szövetmetszetekben a magok metszve, elvágva

vannak, ellentétben a keneteinkkel, ahol a magok intaktak, érintetlenek. Teoretikusan és praktikusán is, a metszett, vágott magoknál gyakran van, hogy nem tartalmazzák az összes szignált, így az eredmény (a Her-2 szignálok kis száma miatt) fals lehet. Továbbá a fluorescens in situ hibridizáció és a chromogenikus in situ hibridizáció eredményeinek kiértékelése a szövetszöveteken sokkal nehezebb, mint a keneteken (különösen akkor, ha a kiértékelés automatikus). Valószínűsíthető ilyen módon, hogy a szövetszöveteken kiértékelt Her-2 és 17-es kromoszóma szignálarány (hányados) nem érte el a 2 vagy annál nagyobb értéket, és emiatt nem sikerült az idézett szerzőknek az amplifikációt igazolni.

További érdekesség, hogy az amplifikált eseteink 2+ pozitivitást mutattak immunhisztokémiával, míg a nem amplifikált esetekben 1+ pozitívitas volt megfigyelhető. Ez kihangsúlyozza azt, hogy az erősebb 2+ pozitívitas jelenthet igazi amplifikációt, amelyet igazolni lehet fluorescens in situ hibridizációval, vagy más molekuláris módszerrel. Hasonló a helyzet, mint az emlőcarcinomák esetén, mikor is a bizonytalan immunhisztokémiai eredményt (emőcarcinoma esetén 2+) megerősíteni vagy kizárni kell molekuláris módszerekkel, általában FISH vizsgálattal. A Her2 fehérje overexpressziója általában összefügg a kevésbé kedvező prognózissal (mint például emlőtumor, hólyagtumor, vastagbél tumor, nasopharyngealis carcinoma esetén) (32,101,102,185). Viszont az is érdekes, hogy néhány tumor esetén a Her-2 fehérje overexpressziója kapcsolatba hozható a kedvezőbb prognózissal (mint például pajzsmirigy tumor vagy osteosarcoma esetén) (103,228), és úgy tűnik, hogy ez a synovialis sarcomák esetében is igaz.

El-Naggar és munkatársai (55), azt találták, hogy a ploeditási státusz (az aneuploiditás) szignifikánsan korrelál a synovialis sarcománál a betegek csökkent túlélési esélyével. Flowcytometriás vizsgálatokat végeztek viszonylag nagy anyagon (41 és 45 eset egyenként), és a szignifikáns negatív összefüggés a rövidebb kiújulási időt és a rövidebb 5 éves túlélést jelentette.

Ugyanakkor Dreinhofer és munkatársai (42) 93 lágyszövet tumor (ebből 22 synovialis sarcoma) esetén a DNS ploeditást nem találták independens prognosztikai faktornak. A mi 20 esetünkben nem volt összefüggés a ploeditási státusz és a metasztázis képződés vagy a recidiva képződés között, és nem volt szignifikáns összefüggés a Her-2 génamplifikációja és a ploeditás között. A ploeditást illetően feltételezhető, hogy saját eseteink, hasonlóan Dreinhofer eseteihez nem elég nagy számúak ahhoz, hogy szignifikáns összefüggést találjunk, és valószínű, hogy szignifikancia esetén is a ploeditási státusz nem lesz valódi independens prognosztikai faktor. Mindezen feltételezés igazolására folyamatosan mérjük az újabb és újabb synovialis sarcomás esetek DNS tartalmát, és kellően nagy szám elérése során a kiértékelést újra elvégezzük.

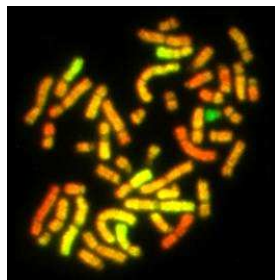
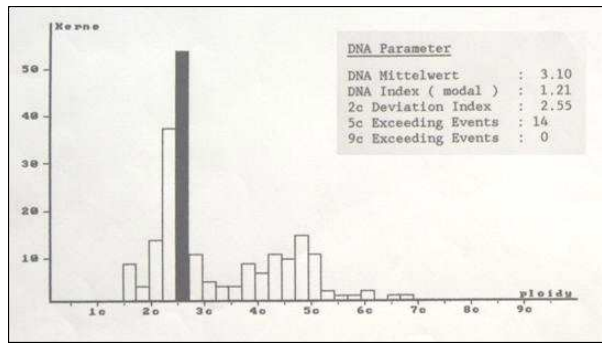
Két esetben találtuk a 17-es kromoszóma poliszómiáját (egyik esetben triszómia, másik esetben tetraszómia volt) de ezek egyik esetben se társultak amplifikációval, se semmilyen fokú immunpozitivitással. Úgy tűnik, a 17-es poliszómiának önmagában nincs különösebb jelentősége, csupán annyi, hogy az értékelés során a 17-es kromoszómát és a Her-2 gént együtt kell vizsgálni, hiszen ha csak a Her-2 gén számát vizsgáljuk, úgy fals pozitivitást kaphatunk amplifikáció tekintetében.

Összefoglalva, eredményeink hangsúlyozzák és megerősítik azt, hogy a HER-2 oncogén amplifikációja ritkán fordul elő a synovialis sarcomáknál, de a synovialis sarcomák azon kis csoportjánál, ahol ez megfigyelhető, ott kedvezőbb prognózist jelent. Ugyanezen célcsoportnál a Her2 amplifikáció igazolása lehetőséget ad egy újabb kezelésre nevezetesen Herceptinre (Trastuzumab), ami igen nagy jelentőségű, hiszen általában a lágyszöveti sarcomák kezelése beleértve a synovialis sarcomát is meglehetősen szegényes és problematikus.

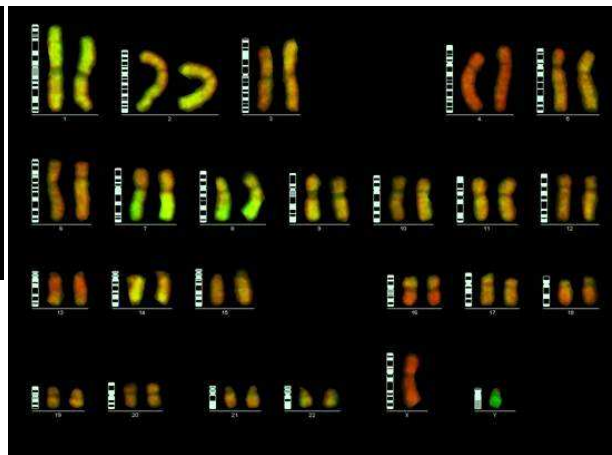
Tovább folytatva ezen munkát újabb 52 synoviális sarcoma esetén meghatároztuk a DNS tartalmat valamint 9 esetben magas felbontású CGH vizsgálatot is végeztünk, megvizsgálva, hogy a komplex és szimpla cytogenetikai sarcomás esetek (az előbbieket szinte CGH eltérés nélkül az utóbbiak jelentős CGH eltérést mutatva) hogyan korrelálnak a tovább finomított DNS tartalom mérés eredményeivel (207). A tovább finomított ploiditás vizsgálat azt jelentette, hogy figyelembe véve az 5c értéket meghaladó daganatsejtek jelenlétét vagy hiányát, komplex (5c értéket meghaladó sejtek jelenléte) vagy szimpla (5c értéket meghaladó sejtek nincsenek) diploid csoportot képeztünk. Az 52 tumorból 11 volt aneuploid, 26 eset volt szimpla diploid és 15 eset volt komplex diploid. Az aneuploid tumorok jelentős genetikai eltérést mutattak CGH-val, és legalább összegzett két kromoszómányi többlettel voltak jellemezhetőek. A szimpla diploid esetek alig mutattak genetikai eltérést, míg a komplex diploid tumorok esetén számos aberráció volt igazolható. Mindez rámutat arra, hogy egyszerűbb mérési formákkal (DNS meghatározás citofotométerrel) is lehet adott esetben mélyebb genetikai információkat szerezni. További vizsgálatok szükségesek ugyanakkor, hogy ezen további finomításnak van-e klinikopatológiai jelentősége. Az alábbiakban néhány képpel illusztráljuk a leírtakat. (52.ábra)

dc\_59\_1077-

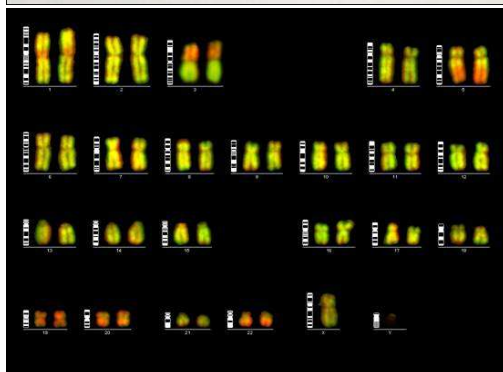
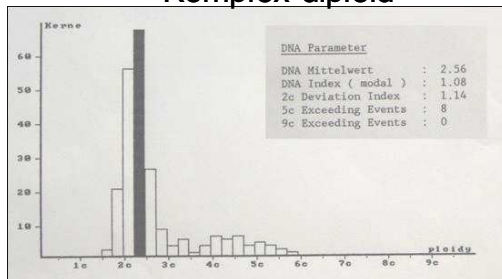
### Aneuploid tumor



1p gain, 2q24-37 gain,  
3p14-26 loss, -4,  
5p14 loss, 7q11.2-36 gain,  
+8, 8q23-24 ampl,  
13q12-22 loss, 16q loss,  
18q12-22 loss

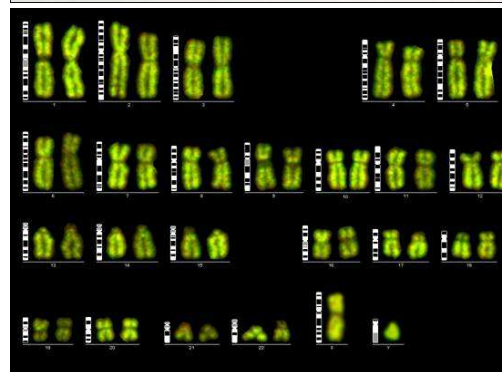
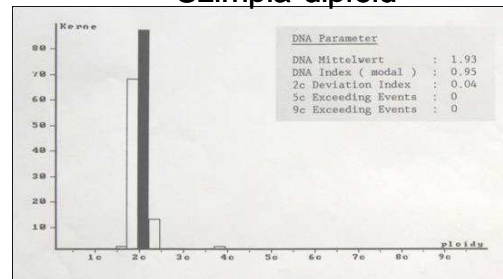


### „Komplex-diploid”



1p12-22 loss, 3p loss,  
3q gain, 5q15-35 loss,  
-19, -20, -22

### „Szimpla-diploid”

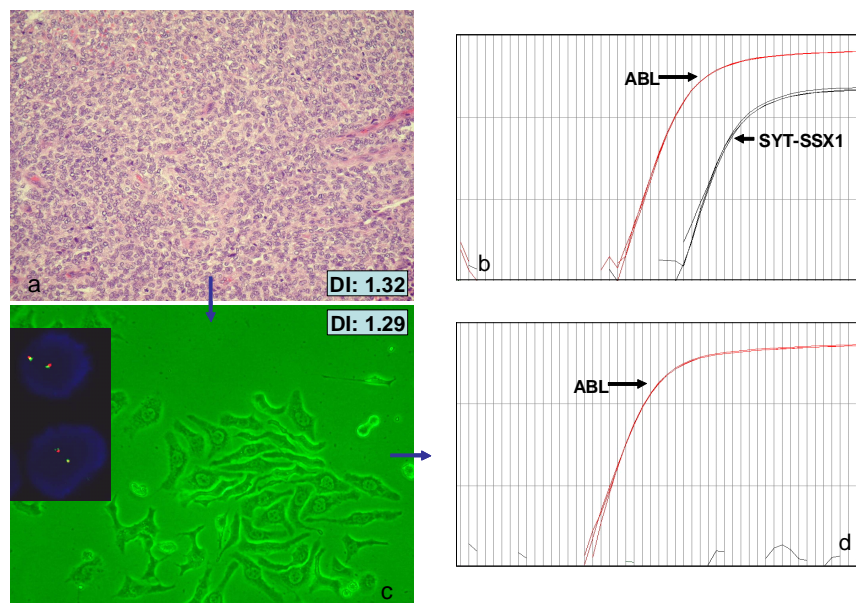


HR-CGH-val nincs eltérés

52. ábra Az aneuploid, komplex és szimpla diploid csoportra jellemző CGH eltérések. Míg az aneuploid csoport számos, „durva” eltéréseket mutat, addig a komplex diploid csoportra kevesebb eltérés jellemző, a szimpla diploid csoport pedig szinte nem is mutat eltérést (megjegyzendő, hogy a CGH nem alkalmas transzlokáció kimutatására).

*A synoviális sarcomák jelút rendszereinek vizsgálata*

A synoviális sarcomákra ahogy már említettük is jellemző a specifikus t(X;18)(p11.2;q11.2) transzlokáció. Ennek gyakorisága az egyes tumorokban a publikációs adatok szerint egyre növekedett, hiszen kezdetben 70-80% körüli gyakoriságról beszéltek, de a legújabb WHO „több mint 90%”-ot mond. Saját megfigyeléseink szerint is ez az arány 80% körül mozog, különösen ha figyelembe vesszük a konzultációs anyagok viszonylag negy számát, melyekben a transzlokáció negatív esetek gyakoribbak. Itt is szeretnénk azonban hangsúlyozni, hogy csak a korábban említett szigorú kritériumok mellett állítható fel a transzlokáció negatív synovialis sarcoma diagnózisa (207). Viszont vannak egyes nemzetközi lágyrész szakértők, akik állítják, hogy gyakorlatilag nincs transzlokáció negatív synovialis sarcoma, amit számos esetben cáfolni tudunk, egy esetben pedig ennek esetleges mehanizmusára is magyarázatot találtunk. Elképzelhető ugyanis, hogy minden synoviális sarcoma keletkezéséhez szükséges a transzlokáció, de a tumor progresszió és/vagy a recidívák során ez el is „veszhet”. Az alábbi példa szépen demonstrálja mindezt, hiszen az egyik esetünkben a primer tumorban a transzlokáció könnyen kimutatható volt mind PCR-el mind FISH vizsgálattal és a daganatsejtek döntő többségében látszottak a szignál-szétválások (break apart próba). A recidív tumorban már csak PCR-el volt kimutatható a transzlokáció és csak egy-egy daganatsejt mutatott szignál szétvállást, míg a recidív tumorból kialakított primer szövettényészeten már egyáltalán nem volt kimutatható semmilyen módszerrel a transzlokáció (53. ábra).



53. ábra a, Recidív synoviális sarcoma, mely esetén még PCR-el a transzlokáció kimutatható (b); és a DNS index (DI) 1.32. Ezen daganatból származó szövettényészet (c), melynek DI-je lényegében megegyezik a recidív tumoréval, jelezve, hogy valóban daganatsejtekről és nem fibroblaszt tenyésztéről van szó. Ugyanakkor se FISH reakcióval (c inzert) se PCR-el (d) transzlokáció nem igazolható

A SYT-SSX chimericus fehérje tartalmazza feltehetően a SYT területen a transkripció aktivációs régiót, és a repressziós domaint az SSX részben. A chimericus fehérje transzkripció onkogén szabályzó szerepe transzkripció alulszabályozásban nyilvánul meg. Számos tanulmány foglalkozott ezzel az effektussal és azt találták, hogy alul szabályozza a sejt proliferációt szabályzó COM1-t, beta-catenin akkumulációt hoz létre a magban, elősegíti a p53 ubiquitinációt és lebontást, újrendezi a cytoskeletont az ephrin jelút rendszeren keresztül, és stabilizálja a cyclin D1-et. A tanulmányok többnyire sejt vonalakat használtak, de kevés vizsgálat történt nagyobb paraffinos anyagon a chimericus fehérje és a jelútrendszerek összefüggéseit vizsgálva. Tanulmányunkban (207) 50 synovialis sarcomát vizsgáltunk TMA-val (tissue micro array), hogy van-e vajon olyan kitüntetett jelút rendszer, mely lényegében felelős lehet a tumor progresszióért. A synovialis sarcomák többsége a receptor tyrosin kinázok (EGFR, VEGFR, PDGFR de nem az IGFR) overexpressióját mutatta, tovább aktiválva a RAS-AKT-mTOR jelút rendszert. Mindezekről függetlenül, a WNT-beta-catenin jelút rendszer szintén aktív volt (csak  $\beta$ -catenin magi pozitívítást vettük figyelembe). Az apoptózis szabályozók mint a NFkB és MDM2 szintén aktívak voltak. A p21 kivételével minden vizsgált sejt ciklus szabályzó aktív volt. Ugyanakkor érdekes az előbb említett szabályzók aktivitása tekintetében nem volt különbség a transzlokáció negatív és transzlokációt tartalmazó csoport között, kivéve a p4EBP1-t, a PTEN-t és a beta-catenint. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a synovialis sarcomák proliferációjában számos jelút rendszernek szerepe van, de úgy tűnik, mégis a legfontosabbak egyike lehet az AKT-mTOR jelút rendszer. Minthogy a transzlokáció negatív és pozitív esetekben igen hasonló volt a jelút rendszerek aktivitása, ez arra enged következtetni, hogy a transzlokációnak igen fontos szerepe van magának a daganatnak a kialakulásában, de valószínű, hogy a további tumor progresszióban már kevésbé lényeges, sőt néha el is „veszhet”. Eredményeink fényesen igazolták és erősítették meg a korábban szövettényészetekben talált eredményt, miszerint a fúziós fehérje béta katenin magi accumulációt eredményez (függetlenül a kanonikus Wnt jelút rendszertől), ami a transzlokáció pozitív és negatív esetek különbsége (az előzőek javára) alapján demonstrálható volt.

Az alábbi ábrán (54. ábra) foglaljuk össze a különböző jelút rendszerek százalékos megoszlását a vizsgált 50 synovialis sarcomában.

		Positiv esetek (%)	Erős positiv esetek(%)	Positivitás az t(X;18) negatív esetekben (n=12/50) (%)	Positivitás az t(X;18) positiv esetekben (n=38/50) (%)
<b>Tyrosine Kinase Receptorok</b>	EGFR	86	50	75	90
	FGFR	66	6	50	70
	IGFR	30	2	25	32
	FLT (VEGFR)	100	38	100	100
	PDGFR-A	100	62	100	100
<b>RAS</b>	RAS (H-, K-, N)	100	62	100	100
<b>AKT-mTOR-pathway</b>	PTEN	88	48	67	95
	Pakt	64	0	50	68
	P4EBP1	52	4	91	40
	PP70S6K	100	76	100	100
	PS6	58	0	73	54
<b>MAP kinase</b>	RAF	52	20	50	52
	MAPK	34	0	33	34
<b>WNT</b>	WNT	100	49	100	100
	APC	72	0	75	71
	B-CAT	74	17	58	80
<b>Apoptosis regulatorok</b>	NFKB	92	27	92	92
	MDM2	100	18	100	100
<b>Sejt-ciklus regulatorok</b>	CYA	74	2	83	71
	CYD1	84	37	83	84
	P21	62	6	42	68
	P27	90	54	83	92
	CDK2	96	28	100	95
	P16	88	33	90	87

54. ábra. Az egyes jelútrendszerek aktivitásainak százalékos megoszlása transzlokáció pozitív és negatív synovialis sarcomák esetén. Jelentős különbség csak néhány esetben pl. a béta katenin esetén figyelhető meg.

## 5. A perifériás idegtumorok genetikai instabilitásának vizsgálata

A perifériás idegtumorok (PNST) meglehetősen heterogén csoportot képeznek, több mint 20 entitással. Bár a leggyakoribbak a konvencionális Schwannomák és neurofibrómák, melyek nem okoznak differenciáldiagnosztikai problémát, azonban számos altípust már jóval nehezebb malignus lágyrésztumoroktól (elsősorban MPNST-től) elkülöníteni, ilyenek pl. az anciant, celluláris, neuroblastoma like és a multiplex Schwannoma (2,21,45,132). Mindezt figyelembe véve kerestük azokat az objektív kapaszkodókat, melyek segítenek az elkülönítésben. Ilyen objektív kapaszkodó lehet a ploiditás és a kromoszomális instabilitás vizsgálata. Mind a mai napig az irodalmi adatok ellentmondásosak abban a tekintetben, hogy a benignus Schwannomák vajon euploidak (24,31,79,116,127,131,175,195,201) vagy aneuploid benignus daganatok (178,191,192,193) is léteznek. Meglehetősen sok cytogenetikai adat ismert a PNST-k tekintetében, de ezek többnyire a jól ismert 17q és 22q eltérésekre



koncentrálnak (NF1 és NF2), mint a neurofibromák és a Schwannomák kezdő patogenetikai történéseire (9,141,174,180). Sokkal kevesebb vizsgálat történt a számbeli kromoszóma eltérések feltérképezésére (FISH vizsgálat) (174), különösen nem megfelelő számú interfázisos sejtet analizálva. Három kromoszómát választottunk ki – 7-es, 17-es, és 18-as – FISH vizsgálatra, minthogy ezen kromoszómák veszteségei és többletei már korábbi munkákban szerepeltek (74,141,217). A 22-es kromoszóma értelemszerűen szintén szerepelhetne, de a keresztreakciót adó 14/22-es centromerikus próba miatt ezt kihagytuk a vizsgálatból. Célkitűzésünk volt annak vizsgálata, hogy a benignus Schwannomák euploid-poliploid tulajdonságot mutatnak-e, illetve finomabb elemzéssel, FISH analízissel az euszómiás-poliszómiás jellemvonás megfigyelhető-e, továbbá betekintést nyerhessünk ezen tumorok esetén a malignus transzformáció mechanizmusának mikéntjébe. Vizsgáltuk azt is, hogy ezen jellemzők segítséget jelentenek-e a helyes diagnózis felállításában.

A 44 perifériás ideghüvely tumor a Semmelweis Egyetem Oncopathológiai Tanszékéről származott, amelynek helye a Fővárosi Önkormányzat Szent János Kórháza volt. 27 benignus Schwannomát választottunk ki, amelyek között 5 ancient, 2 cellularis (pseudosarcomatosus), 2 neuroblastoma like, és 1 multiplex variáns volt (55,56. ábra). A kiválasztott 9 neurofibroma egy atípusos-cellularis szubtypust foglalt magában. A 8 malignus perifériás ideghüvely tumorból 2 malignus epithelioid tumor volt. A nyomkövetési idő legalább 5 év volt.

A histológia, a magizolálás, a DNS mérés a Semmelweis Egyetem Oncopathológiai Tanszékén történt, míg a FISH analízis automatikus képanalizáló rendszerrel egybekötve (Metafer 4) Németországban a Bonni Pathológiai Intézetben történt.

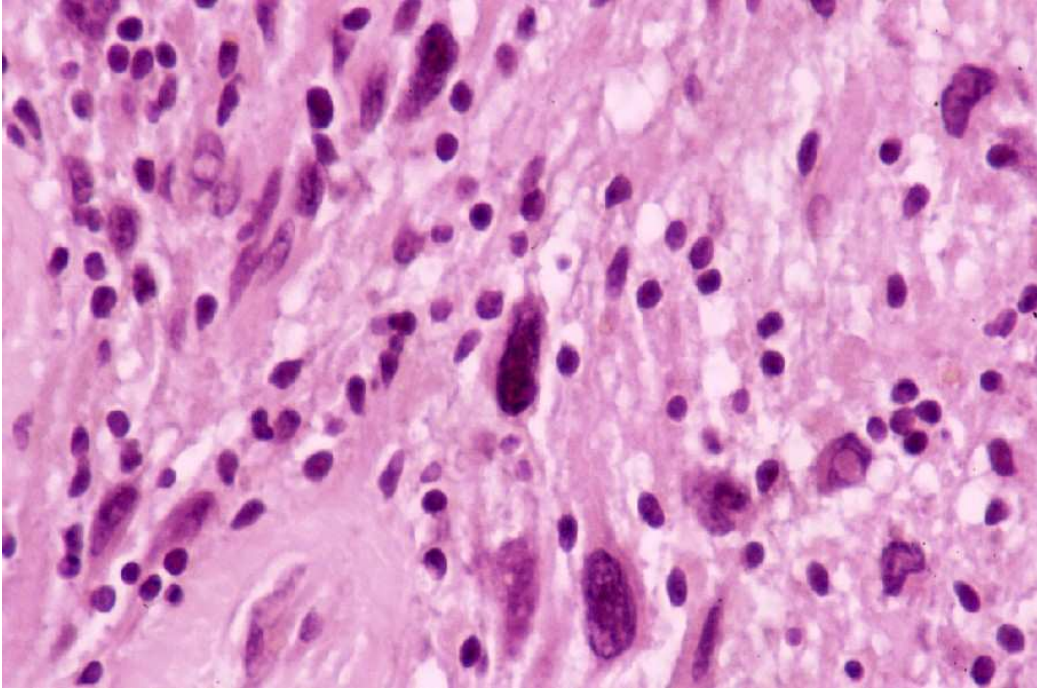
#### *Adszorpciós cytofotometriás DNS vizsgálat*

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

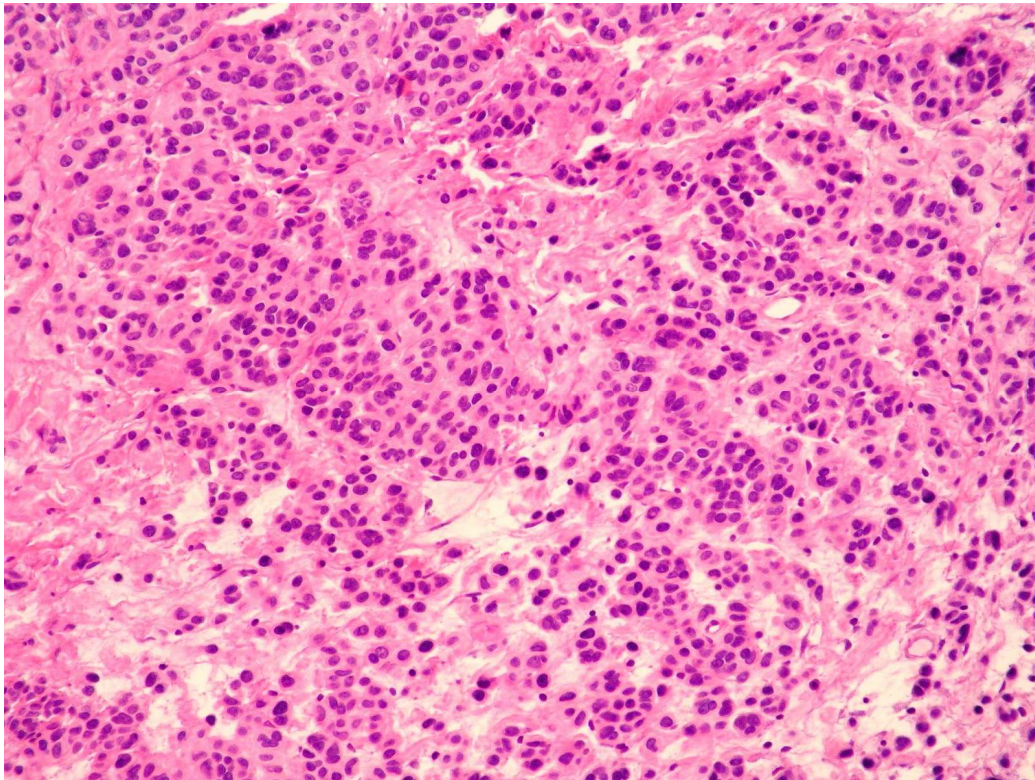
8 esetből 1 esetben volt megfigyelhető 10 %-nál nagyobb 4c csúcsérték, de ezen sejtek 4c régióját valószínűleg G2 fázisú sejtek alkotják, minthogy ezen sejtek nem valódi tetraploid-tetraszómiás sejtek, amit a FISH analízis is igazolt (57,58. ábra).

10. Táblázat DNS ploeditási és klinikai adatok perifériás ideghüvelytumorok esetén.

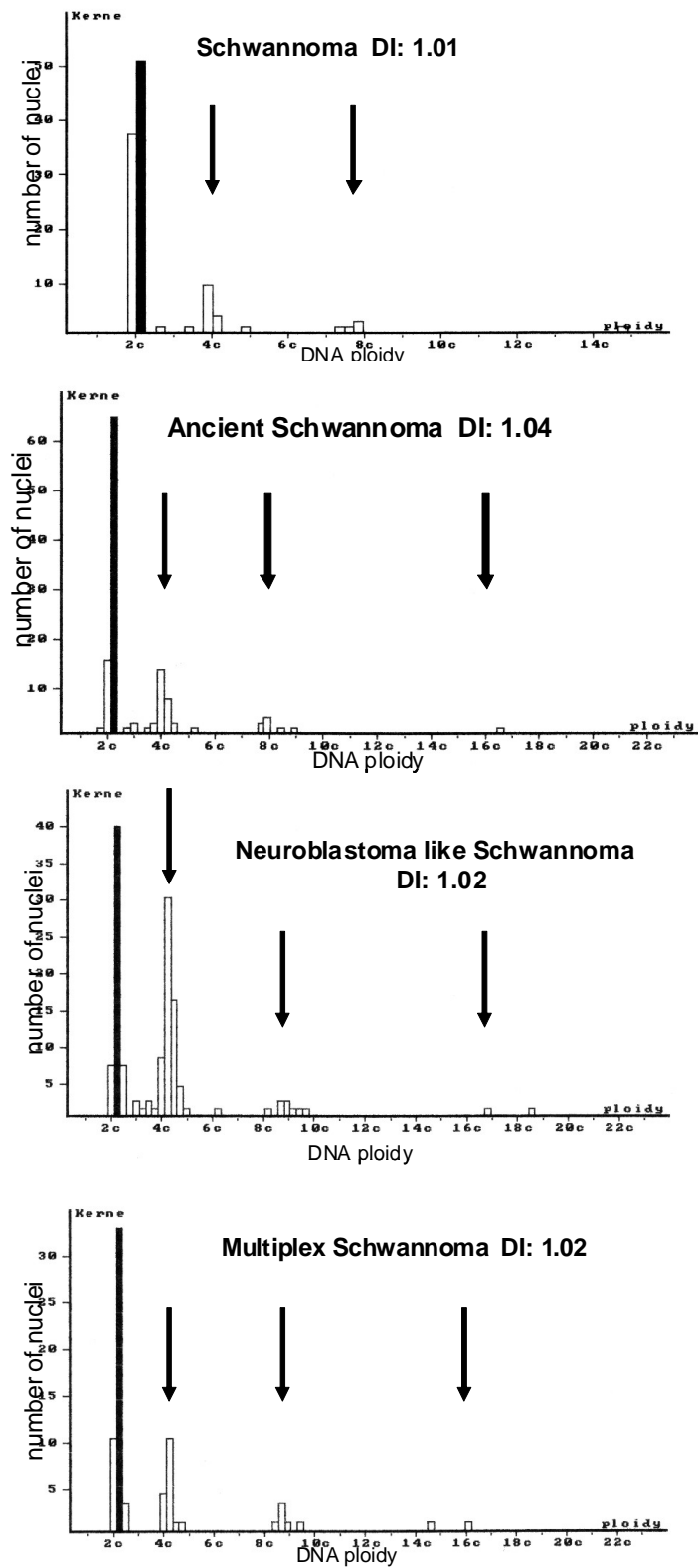
Diagnózis	Kor, nem	Anatómiai lokalizáció	DI	4c csúcsérték több, mint 10 %	Euploid- polyploidizáció
1 Ben. Schwannoma	46F	b. boka	0,95	igen	igen
2 Ben. Schwannoma	49F	nyelőcső	1,05	igen	igen
3 Ben. Schwannoma	34M	b. comb	0,95	nem	igen
4 Ben. Schwannoma	31M	j. gluteális régió	1,07	nem	nem
5 Ben. Schwannoma	71F	b. mellkas	0,95	nem	igen
6 Ben. Schwannoma	82M	nasopharynx	0,92	nem	igen
7 Ben. Schwannoma	53F	b. csípő	0,93	nem	igen
8 Ben. Schwannoma	57F	j. mellkas	0,92	nem	nem
9 Ben. Schwannoma	42M	j. alkar	0,98	igen	igen
10 Ben. Schwannoma	52F	j. felkar	0,98	igen	igen
11 Ben. Schwannoma	38M	nyak	0,99	igen	igen
12 Ben. Schwannoma	59M	j. inguinalis régió	0,97	igen	igen
13 Ben. Schwannoma	61F	nyak	0,98	igen	igen
14 Ben. Schwannoma	29M	j. lábszár	0,96	igen	igen
15 Ben. Schwannoma	61F	b. kar	0,95	igen	igen
16 Ben. Schwannoma	24F	b. alkar	1,01	igen	igen
17 Ben. Schwannoma	48M	retroperitoneum	0,94	igen	igen
18 Ancient schwannoma	60F	retroperitoneum	1,04	igen	igen
19 Ancient schwannoma	72F	b. lábszár	0,98	igen	igen
20 Ancient schwannoma	42M	b. comb	0,96	igen	igen
21 Ancient schwannoma	34F	hát	1,01	igen	igen
22 Ancient schwannoma	71F	retroperitoneum	1	igen	igen
23 Cellularis schwannoma	58F	j. mellkas	0,99	igen	igen
24 Cellularis schwannoma	62M	retroperitoneum	0,92	nem	igen
25 Neuroblast like schwannoma	66F	b. inguinalis régió	1,02	igen	igen
26 Neuroblast like schwannoma	42M	b. talp	0,96	igen	igen
27 Multiplex schwannoma	55F	b. kar	1,02	igen	igen
28 Neurofibroma	27M	fej	0,98	nem	nem
29 Pl. neurofibroma	31F	b. váll	0,99	nem	igen
30 Neurofibroma	33F	j. popliteális régió	0,96	nem	nem
31 Neurofibroma	50M	j. lábszár	0,98	nem	nem
32 Neurofibroma	79F	nyak	0,98	nem	nem
33 Neurofibroma	56M	fej	0,97	nem	nem
34 Neurofibroma	76M	fej	0,98	nem	nem
35 Neurofibroma	36M	j. alkar	0,99	nem	nem
36 Cell.atípusos neurofibroma	80F	j. alkar	1,01	nem	igen
37 Superficial.mal. Epith. Schwann.	71M	has, bőr	1	nem	nem
38 Alacsony mal. Epith.schwann.	65F	mediastinum	1,27	nem	nem
39 MPNST	45M	retroperitoneum	1,52	nem	nem
40 MPNST	51M	j. kar	1	nem	nem
41 MPNST	25F	j. kar	1,49	nem	nem
42 MPNST	19M	retroperitoneum	1,21	nem	nem
43 MPNST	18	b. lábszár	1,58	nem	nem
44 MPNST	23	j. boka-talp	0,97	igen	nem



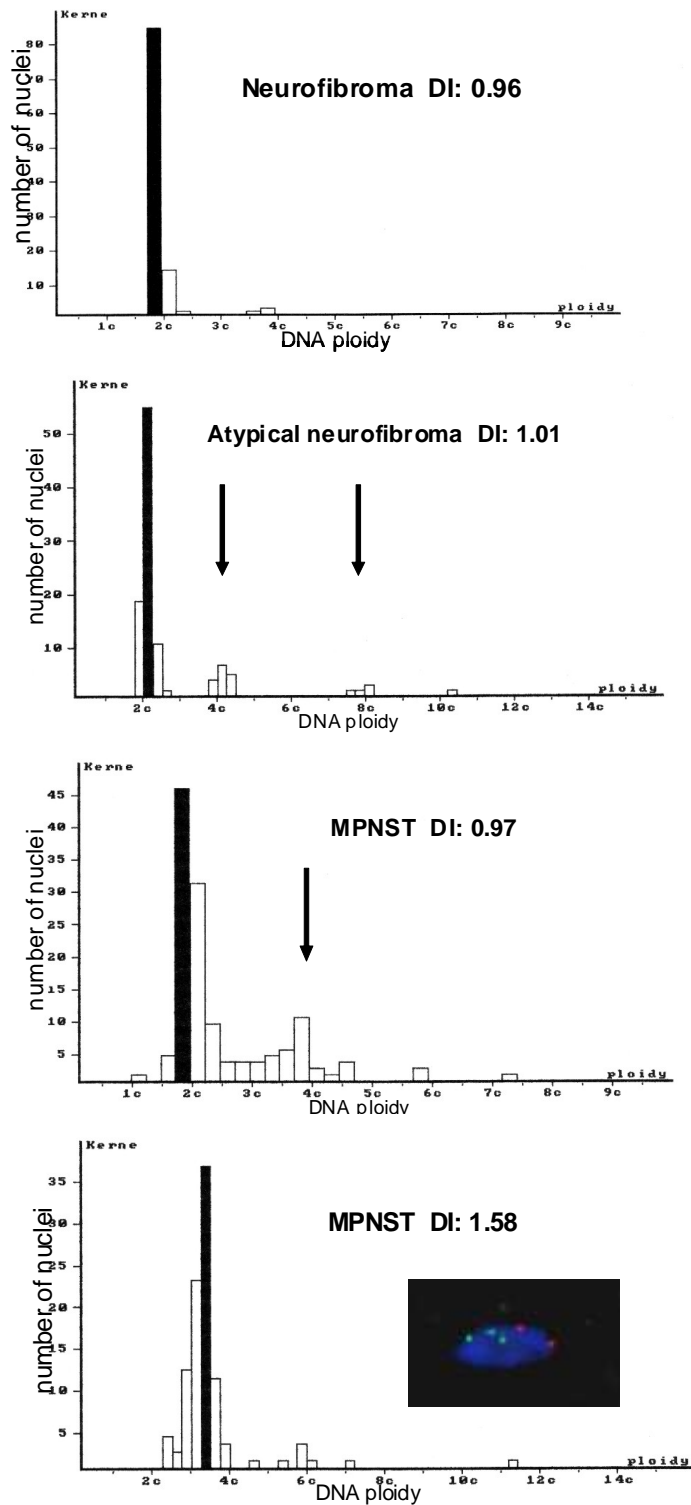
55. ábra A 22. eset, ancient Schwannoma szöveti képe bizarr daganatsejtekkel.



56. ábra A 25. eset, neuroblastoma szerű Schwannoma szöveti képe kis, kerek daganatsejtekkel.



57. ábra DNS hisztogram, a nyilak jelzik az euploid poliploidizációt, mely mind a konvencionális Schwannomában, mind a subtípusokban egyformán jellemző.



58. ábra A felső két hisztogramm neurofibroma és atypusos neurofibroma DNS histogrammja. Mindkét eset diploid, egyiknél sincs 10%-nál magasabb G2 csúcs, de az atypusos neurofibroma euploid poliploidizációt mutat. Az alsó két hisztogramm MPNST-k DNS histogrammja. Nincs euploid poliploidizáció. A 4c csúcsérték csupán egy esetben haladta meg a 10%-ot (nyíl, 55-ös eset), de itt is a sejtek G2 fázisban vannak és nem valódi tetraploid sejtek. Az inzert a 41-es eset triszómiáját mutatja (zöld szignál), míg a 17-es kromoszóma diszómias (piros szignál).

*Interfázisos cytogenetika, FISH analízis*

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

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

A poliszómia szignifikánsan nagyobb volt az ancient Schwannoma esetében (30.1 %), amely összhangban van azzal, hogy a tumorsejtek nagy számú megnagyobbodott, hyperchromatikus, multilobulált magokat tartalmaznak, a Schwannomák ezen típusánál. A poliszómia megfigyelhető volt az atípusos neurofibrománál (4.3%), de nem találtunk poliszómiát a malignus perifériás ideghüvely tumor esetén. Tetraszómiát találtunk a 44-es eset számú malignus perifériás ideghüvely tumor esetén, de igen alacsony számban (0.7%). Ugyanebben a tumorban a 4c csúcsérték több mint 10% volt. A 4c csúcsértéket mutató sejtek valójában G2 fázisú sejtek, (dupla DNS mennyiséget tartalmaznak), és nem igazi tetraszómiás sejtek. Ezen G2 fázisú sejtek kromoszóma páryainak centromerikus régiója összefügg, mert a mitózis alatt a kromoszómák nem válnak szét, és mi centromerikus DNS próbákat alkalmaztunk, amelyek normálisan minden kromoszómára 2 jelet adtak. Valódi tetraszómia esetén a kromoszómák 4 jelet adnának.

Nagyon érdekes az a megfigyelés, hogy néhány benignus Schwannoma kis százalékban aneuszómiát mutatott, az aneuszómiás sejtek az összes sejtek a 2.58%-a, az intervallum 1.33-3.44 volt.

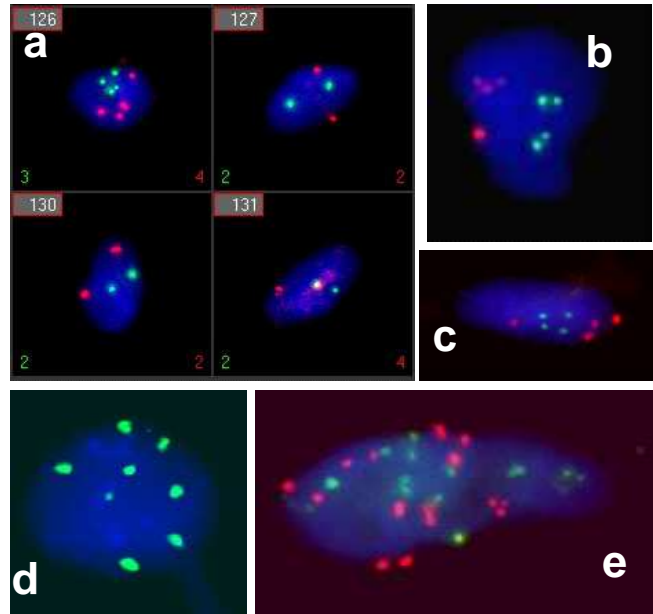
Ezzel ellentétben az atípusos neurofibroma, markáns aneuszómiát mutatott, (18.44 %), de a neurofibromák 4.3%-ban poliszómiát is prezentáltak. Fontos, hogy ha a monoszómia és a triszómia azonos számú, akkor az aneuszómiát „balanced”, kiegyensúlyozott aneuszómiának nevezzük, amely a teljes DNS tartalomra vonatkozik, és ebben az esetben a DNS index diploid. Két diploid MPNST mutatott egyértelmű aneuszómiát, az egyik a 17-es kromoszóma volt (89.6%, 44-es eset, triszómia), másik pedig a 18-as kromoszóma (91.6%, 40-es eset, monoszómia) (12. táblázat és 59,60. ábra).

Azokat az eseteket, amikor nem tudtunk lemérni megfelelő 300 sejtet (technikai okok miatt), kihagytuk az értékelésből, (összesen 5 benignus eset), bár ezek a tumorok teljesen hasonló eredményt mutattak, mint a másik lemért 6 benignus Schwannoma.

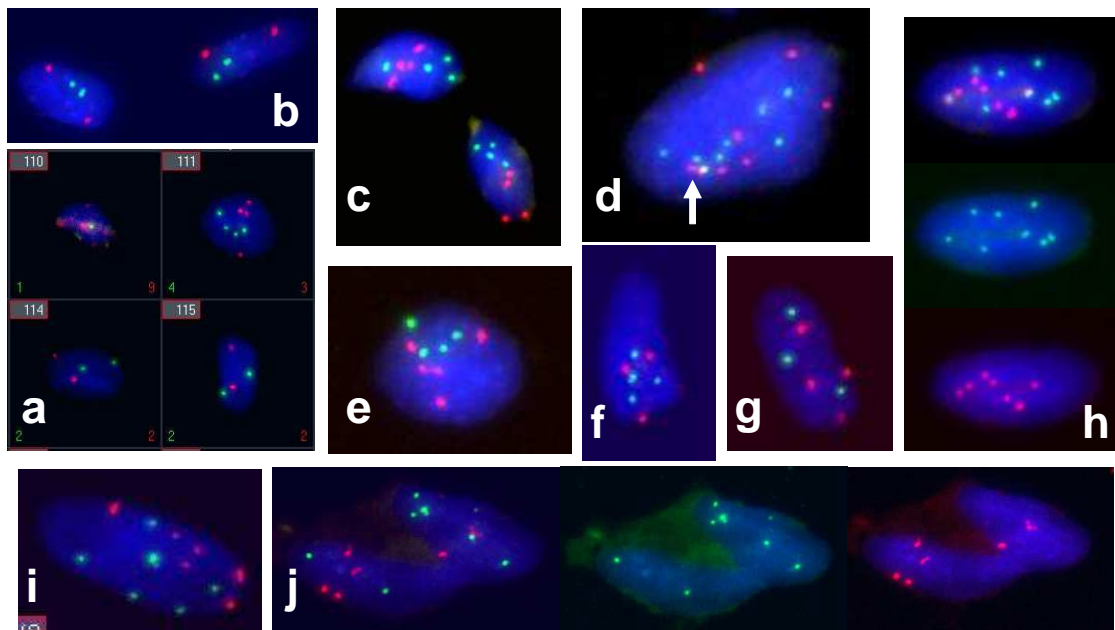
## 12. Táblázat FISH jelek PNST-ben.

Diagnózis	Euszómiás-poliszómiás jelek				Aneuszómiás jelek					IA
	2	4	8	16	1	3	5	6	7	
Schwannoma No.5										
Chr. 18	249	24	2	0	1	3	0	0	0	21
Chr. 17	242	29	2	0	2	4	0	0	0	21
Chr. 7	251	26	3	0	0	2	0	0	0	18
Schwannoma No.7										
Chr. 18	242	26	1	0	3	8	3	0	0	17
Chr. 17	255	22	1	0	1	4	0	0	0	17
Chr. 7	252	27	0	0	1	5	0	0	0	15
Schwannoma No.10										
Chr. 18	242	41	2	0	3	3	0	0	0	9
Chr. 17	239	40	2	0	2	7	0	1	0	9
Chr. 7	243	37	3	0	1	4	1	1	0	10
Schwannoma No.16										
Chr. 18	238	35	4	0	2	2	3	3	1	12
Chr. 17	236	37	3	0	2	2	4	2	2	12
Chr. 7	233	39	5	0	1	3	2	2	0	15
Schwannoma No.24										
Chr. 18	258	23	2	0	1	3	3	1	0	9
Chr. 17	259	22	2	0	0	4	2	2	0	9
Chr. 7	257	19	3	0	2	5	1	1	1	11
Ancient schwannoma No.18										
Chr. 18	188	82	8	2	1	2	2	0	0	15
Chr. 17	185	81	8	2	2	4	2	0	1	15
Chr. 7	190	78	9	1	2	4	2	1	0	13
Atípusos neurofibroma No.36										
Chr. 18	217	12	1	0	14	29	4	4	1	18
Chr. 17	210	14	1	0	15	31	5	4	2	18
Chr. 7	211	11	0	0	26	29	1	1	0	21
MPNST No. 44										
Chr. 18	277	4	0	0	1	3	0	0	0	15
Chr. 17	12	2	0	0	0	269	2	0	0	15
Chr. 7	282	1	0	0	0	1	0	0	0	16
MPNST No. 43										
Chr. 18	11	2	0	0	0	281	0	0	0	6
Chr. 17	289	0	0	0	3	2	0	0	0	6
Chr. 7	15	243	0	0	0	16	18	0	0	8
MPNST No. 41										
Chr. 18	1	48	0	0	0	17	205	9	7	13
Chr. 17	0	257	0	0	0	11	19	0	0	13
Chr. 7	7	11	0	0	0	270	0	0	0	12
MPNST No. 40										
Chr. 18	21	0	0	0	275	0	0	0	0	4
Chr. 17	291	0	0	0	5	0	0	0	0	4
Chr. 7	289	0	0	0	7	0	0	0	0	4
MPNST No. 37										
Chr. 18	272	0	0	0	9	12	0	0	0	7
Chr. 17	6	0	0	0	5	282	0	0	0	7
Chr. 7	276	0	0	0	7	11	0	0	0	6

IA: alkalmatlan a kiértékelésre; Chr: kromoszóma



59. ábra FISH szignálok ancient Schwannomában karakterisztikus euszómiás poliszómiával. a, Metafer-4 monitorkép 3 diszómiás és egy tetraszómiás daganatsejttel b-c, bizarr és „normál” daganatsejt tetraszómiával d, octaszómiás tumorsejt e, erősen megnagyobbodott daganatsejt 16 piros és zöld szignállal a, b, c, e, kettős színes FISH technika, a piros jelek a 18-as, míg a zöld jelek a 17-es kromoszómának felelnek meg. D, FISH technika, a zöld jelek a 7-es kromoszómának felelnek meg.



60. ábra FISH szignálok atypusos neurofibromában euszómiás-poliszómiás és aneuszómiás sejtekkel a, Metafer-4 monitorkép két diszómiás és egy tetraszómiás tumor sejttel. A negyedik sejt kiértékelésre alkalmatlan b, Diszómiás daganatsejt c, Tetraszómiás tumorsejt d, Oktaszómiás daganatsejt, a nyíl kettő piros és egy zöld szignált mutat e, Tetraszómia a 17-es kromoszómára és pentaszómia a 18-as kromoszómára f, Tetraszómia a 17-es és triszómia a 18-as kromoszómára g, Tetraszómia a 18-as és triszómia a 17-es kromoszómára h, Oktaszómia a 17-es és heptaszómia a 18-as chromoszómára i, hexaszómiás tumorsejt.



Megbeszélés: munkánk során adszorpciós citofotometriás DNS tartalom meghatározást alkalmaztunk FISH analízissel kiegészítve. A DNS citometria áttekintő képet ad, míg a FISH technika még több részlet információt szolgáltat. Mindkét technika alkalmazása elősegíti, hogy megismerjük és megértsük a különböző tumor típusok oncogenesise során bekövetkező kromoszomális változásokat. Célunk az volt, hogy feltérképezzük a perifériás ideghüvely tumorok ploiditását, és a kromoszomális ploiditást, melyeknek ismerete segítségünkre lehet a differenciál diagnózis során, másrészt tisztázzuk azokat az irodalomban megjelenő ellentmondó adatokat, amelyek a perifériás ideghüvely tumorok DNS ploiditására vonatkoznak.

Saját vizsgálataink eredménye megerősítette, hogy a benignus Schwannomák euploid tumorok poliploidizációval, a szubtypustól függetlenül.

Ez a tény nagy segítséget nyújt, hogy ezen tumorokat megkülönböztessük a malignus lágyrésztumoroktól, aspirációs cytologiai és/vagy histológiai vizsgálat körülményei között.

A Schwannomák esetén a 4c csúcsérték több mint 10 % volt, de ezt a karakterisztikus jellemvonást a neurofibrómák, és a malignus Schwannomák nem mutatták. Ez a karakterisztikus tulajdonság segít megkülönböztetni a Schwannomákat a neurofibrómáktól, segít differenciálni a Schwannomák speciális eseteit, mint például a multiplex Schwannoma, Antoni B Schwannoma, plexiform Schwannoma, orrüregi Schwannoma, amely utóbbi nem rendelkezik tokkal (2,82).

A 4c csúcsérték magyarázatot adhat számos kiértékelési problémára, amelyet korábbi szerzők találtak, hogy a benignus schwannomák aneuploid, vagy nem diploid tumorok.

Agarwal és munkatársai (1) sejtszuspenziót használva 11 benignus és 27 malignus orsósejtes lágyrésztumor ploiditás vizsgálatát végezték el, részben flowcytometriával, részben adszorpciós cytofotometriás DNS vizsgálattal. 27 malignus laesióból 10 alacsony, vagy intermedier malignitású sarcoma volt, és 17 magas malignitású. A malignus Schwannomáknál a DNS vizsgálat összefüggést mutatott a hisztológiai grade-del és a klinikai lefolyással. A 11 benignus tumorból hat diploid laesió volt, és 5 nondiploid tumor volt. Az összes benignus eset kedvező kimenetelű volt a ploiditásra tekintet nélkül. A 10 alacsony-intermedier malignitású tumorból 8 diploid volt, míg 2 nondiploid volt, mind a két metódus szerint. A 10 diploid malignus tumor kedvezőtlen klinikai kimenetelű volt. A 17 malignus laesio nondiploid volt, belőle 5 nem recidiváló tumor volt, 3 beteg esetén recidiva jelent meg, míg 8 beteg belehalt a betegségbe. A fentiek alapján azt a következtetést vonták le, hogy a ploiditás nem tesz különbséget a benignus és malignus orsósejtes lágyrésztumorok esetén. A nondiploid DNS minta gyakrabban fordul elő a high grade sarcománál, mint a low- intermedier grade

sarcomáknál. Mindezek alapján sarcomák esetén statisztikailag szignifikáns összefüggést talált a nondiploiditás és a rosszabb klinikai kimenetel között.

Részletesen megvizsgálva az eseteket, Agarwal (1) mind a 4 Schwannománál (a 11 benignus tumorból) „non diploid” állapotot talált, de a következő kritériumot adta meg az értékeléshez: „az a hisztogramm, amelyik több mint 20 % -os tetraploid csúcsot tartalmaz azt „non diploid” daganatnak kell tekinteni”. Minthogy Agarwal ezen tumoroknál nem adott meg precíz DNS indexet, így könnyű elképzelni, hogy ezek a tumorok valójában euploid-poliploid tumorok voltak, és a 4c csúcsérték (G2 fázis) több mint 20% volt, mint ahogy ez eseteinkben is előfordult.

Más a helyzet Salmon és munkatársai által megjelentetett cikkekben (191,192). Ők valódi aneuploiditást találtak, de ha részletesen analizáljuk az ő adataikat, akkor 2 %-ban találtak igazi aneuploiditást (triploid hisztogramm  $1.40 < DI < 1.6$ ), 2%-ban tetraploiditást, és 15 %-ban hypertriploiditást (közel tetraploiditást) a Schwannomák között, (az esetszám 64 volt). A 15 % magasnak tűnik, de ők se adtak meg precíz DNS indexet, így nem tudjuk, hogy igazi aneuploid tumorok voltak-e, vagy euploid-poliploid tumorok tetraploid értékkel.

Ugyanebben a cikkben közölték, hogy 5 neurofibromát (20%) találtak, amelyek hyperdiploidok voltak, vagyis aneuploidok, de DNS index-et itt sem adtak meg.

Hasonló eredményeket publikáltak Salmon és munkatársai még egy másik cikkben, (193) ahol 75 benignus Schwannomát vizsgáltak, ezek között 1 tetraploid és 10 hypertriploid tumor volt (melyet közel tetraploid daganatnak lehet tekinteni!), de itt se adtak egyértelmű DNS indexet, tehát valódi aneuploiditást lényegében nem tudtak igazolni. Valójában Salmon és munkatársai hangsúlyozták leginkább, hogy a benignus perifériás ideghüvely tumorok között magas százalékban aneuploiditás mutatkozik, és lényegében ezen munkacsoport cikkei alapozták meg azt a feltevést, hogy a benignus tumorok között (főként a Schwannomák között) lehetnek aneuploidok is. Mindez hosszú időre bizonytalanná tette a ploiditás használhatóságát a benignitás-malignitás kérdésének eldöntésében.

Viszont, flowcytometriás vizsgálatok arról adtak számot, (24,31,79) hogy a benignus perifériás ideghüvely tumorok többségének természete diploid, és csak alacsony százalékban találtak közöttük aneuploiditást. Sok más adszorpciós cytofotometriás vizsgálat, beleértve a mi korábbi adatainkat is, azt találta, hogy a benignus perifériás ideghüvely tumorok diploid természetűek, és ezek a cikkek arról tesznek említést, hogy ezekben a tumorokban euploid-poliploidizáció mutatható ki (195,199,233,236).

Részleteiben: Tsuji és munkatársai (236) benignus és malignus perifériás ideghüvely tumorokat vizsgálták flowcytometriával, és meghatározták a ploiditás és pathológiai kép

közötti kapcsolatot. A benignus perifériás ideghüvely tumorok (Schwannomák, és neurofibromák) diploid tumoroknak bizonyultak, és nem ritkán euploid- poliploidizációs tulajdonságot mutattak. Ha a polyploid sejtek száma növekedett, akkor a histológiai képen ugyancsak növekvő gyakorisággal fordultak elő nagy, atípusos sejtek. A malignus Schwannomáknál mind polyploid mind aneuploid sejteket is találtak, általában magas proliferációs (S) fázissal. A benignus perifériás ideghüvely tumoroknál alacsony proliferációs arányt találtak, mely segítséget jelenthet az elkülönítésben a benignus és malignus perifériás ideghüvely tumorok között. Érdekes, hogy Takeshita (233) diszkussziójában megjegyzi, hogy nehéz kideríteni, hogy a neurogén tumorok miért mutatnak euploid- poliploidizációs tulajdonságot. Saját DNS ploeditás vizsgálatunk eredményeire alapozva, tekintetbe véve az irodalmi adatokat is, úgy tűnik, hogy a benignus perifériás ideghüvely tumorok messze döntő többsége diploid, (a benignus Schwannomák euploid-poliploidizációs tulajdonságot mutatnak), de nagyon kis arányban aneuploid daganatok is előfordulhatnak, legalább is régebbi irodalmi adatok szerint. Azok a nagyon kis számú valódi aneuploid Schwannomák feltehetően magasabb arányban kell, hogy tartalmazzanak aneuszómiát, és ezen aneuszómiának feltétlenül kiegyensúlyozatlannak kell lennie, hogy valódi aneuploid értéket kapjunk. Saját eseteinkben csupán kis százalékban találtunk aneuszómiát és az is kiegyensúlyozott volt. Viszont az atípusos neurofibrománál magas százalékban találtunk kiegyensúlyozott aneuszómiát mely felveti a kérdést, hogy a nagy százalékban aneuszómiás benignus perifériás ideghüvely tumorok valóban igazán benignus tumorok-e? Természetesen a morfológiai kép alapján benignus tumoroknak tekinthetők, de a genetikai kép alapján a lágyrész tumorok között „dysplasiásnak” minősíthetők. Természetes, hogy ez a dysplasia nem eredményez se recidivát, se metasztázist, mint ahogy ez hám eredetű dysplasiák esetén se figyelhető meg.

A kérdés különösen érdekes, ugyanis azonos problémát vet fel Menamin és Fletcher (138), akik leírtak Schwannomákban epitheloid malignus átalakulást, és egyben ezt az epitheloid malignus ideghüvely tumorok precursor laesiójaként tekintették. Bár ez csupán morfológiai megfigyelés volt, úgy tűnik, hogy a precursor dysplasiás sejtek mind morfológiai, mind genetikai szinten kifejeződnek.

A normál szöveteknél (vesicula seminalis epitheliuma) és a benignus tumorok néhány típusánál nem világos az euploid-poliploidizációs folyamat kialakulásának magyarázata. A neurofibromin 2 gén módosulása a kezdeti, első lépés a Schwannoma pathogenesisében, és talán ez lehet felelős az euploid-poliploidizációs folyamat kialakulásáért, és ennek eredményeként az euszómiás-poliszómiás sejtek megjelenéséért is. Ez alatt a folyamat alatt további károsodások keletkezhetnek, pl. kromoszóma vesztések és többletek alakulhatnak ki,

amelyek további euszómiás- poliszómiás, aneuszómiás sejtek kialakulásához vezetnek. Az aneuszómia lehet kiegyensúlyozott vagy kiegyensúlyozatlan, és lehet kis vagy nagy arányú. Úgy tűnik, hogy addig ameddig az aneuszómia százaléka alacsony és kiegyensúlyozott addig a tumor teljesen benignus, mint az általunk vizsgált Schwannomák eseteiben is. Ha a kiegyensúlyozott aneuszómia aránya emelkedik, a tumor atípusossá válik, mint ahogy a mi atípusos neurofibrománknál is ez megfigyelhető volt. Ez azt jelenti, hogy sokkal nagyobb az esélye így a malignus transzformációnak, a malignus tumor kialakulásának. Természetesen teljesen tudatában vagyunk annak, hogy a malignus perifériás ideghüvely tumor malignus tulajdonságának kialakulása komplex folyamat, (neurofibromin 1, p53 károsodás, INK4A gén deléciója, p27 abnormalitás), de az euszómia-poliszómia megjelenése szerepet játszhat a malignitás kialakulásában (112,113,124).

Teóriánkat alátámasztja az a tény, hogy a malignus perifériás ideghüvely tumorok nem mutatnak karakterisztikus cytogenetikai eltéréseket, nincsenek specifikus translokációk és nincsenek specifikus numericus eltérések, hanem valójában komplex karyotípust mutatnak számos strukturális és számbeli eltéréssel, és a számbeli eltérések véletlenszerűen alakulnak ki (16). Saját eseteinkben 17-es kromoszóma triszómiát és 18-as kromoszóma monoszómiát találtunk, míg mások 7-es triszómiát, és 22-es monoszómiát mutattak ki, mint egyedüli számbeli eltérést (141).

Jól ismert az a tény, hogy legalább három vagy több kromoszóma többlet szükséges más kromoszómák vesztese nélkül, hogy az aneuploiditás mérhető értékét elérjük, és így a DNS index nagyobb legyen, mint 1.10, vagy fordítva, ugyanennyi veszteség szükséges, hogy a DNS index kisebb legyen, mint 0.90.

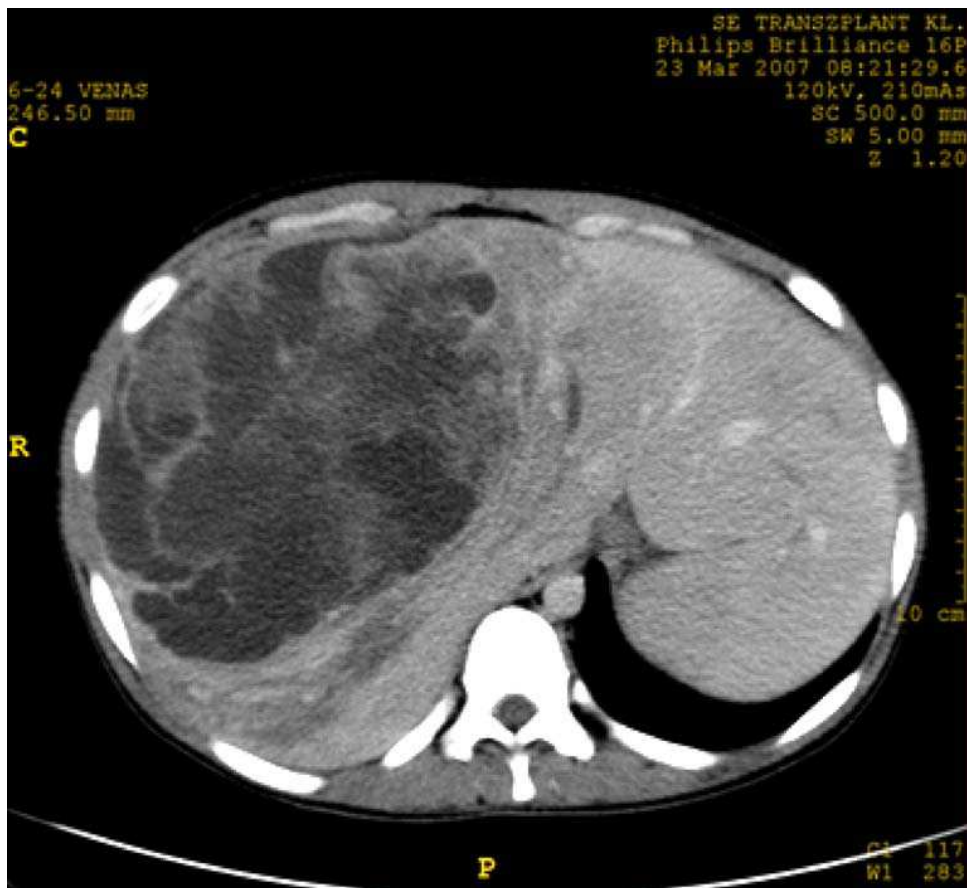
A FISH technika, mint kiegészítő analízis fontossága, lényege az, hogy meg tudjuk különböztetni, hogy vajon igazán tetraploid-e a tumor, vagy csak G2 fázisú sejtek magas arányáról van szó. A G2 fázisú sejtek kromoszómái mivel kettős DNS tartalommal rendelkeznek, a FISH technika során minden kromoszómára két jelet adnak, mivel a mitózis folyamata során ebben a fázisban a kromoszómák szétválása elmarad. Ez a tény teljesen világos a 44-es számú eset esetében. E tumornál a 4c csúcserték több mint 10 %, (pontosan 12%), ugyanakkor FISH vizsgálattal csupán 0.7%-ban találtunk kromoszóma tetraszómiát.

Összefoglalva, a ploiditás vizsgálat kiegészítve FISH analízissel, nagy segítséget nyújthat a helyes diagnózis felállításában, és betekintést enged a perifériás ideghüvely tumorok malignus transzformációs folyamatába. Lényegében elsők között számoltunk be arról, hogy a benignus Schwannomák kis százalékban kiegyensúlyozott aneuszomiát mutatnak, valamint arról, hogy

dc\_59\_10<sup>3</sup>-

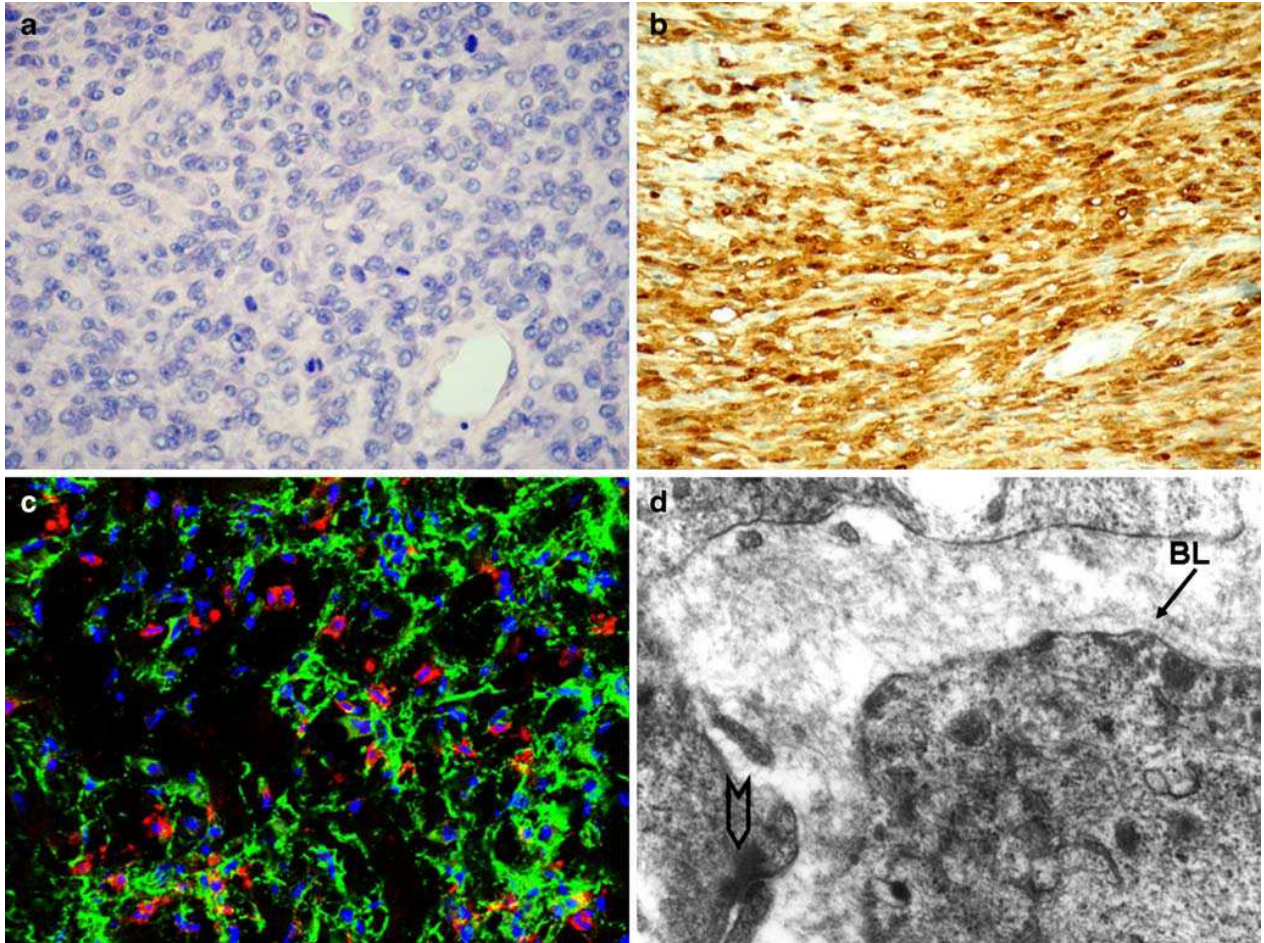
az atypusos perifériás ideghüvely tumorokban mindez jóval nagyobb százalékban fordulhat elő, ami alapján a daganat „dysplastikus – precursor” léziónak tekinthető.

További két MPNST esetében (111,122) találtunk aneuploid DNS tartalmat, mely megerősítette a malignus diagnózist. Mindkét esetben az MPNST igen ritka primer lokalizációjáról volt szó: máj és ovárium. A máj MPNST esetén elsőként közöltünk (111) egyértelműen igazolt „de novo” a májban keletkezett MPNST-t, mely nem Recklinghausen betegség részjelensége volt. Az alábbi képekkel illusztráljuk ezt az igen ritka esetet (61,62. ábra).



61. ábra 22 éves nő esetében, akinek korábbi betegségei nem voltak, meglehetősen gyorsan jobb oldali hasi fájdalmak és kifejezett vizenyő alakult ki. Post contrastos axialis CT nagy inhomogén tumoros masszát mutatott a máj bal lebenyében.

dc\_59\_10<sup>4</sup>-



62. ábra a, meglehetősen monoton ugyanakkor atypusos tumor sejtek számos osztódással (H&E,  $\times 200$ ). b, erős, diffúz citoplazmatikus S100 pozitivitás (immunoperoxidáz festés  $\times 100$ ). c diffúz, intenzív laminin (zöld) és sporadikus S100 (piros) pozitivitás a daganat sejtekben; néhány sejtben kettős pozitivitás is megfigyelhető, mely sárga színben tűnik fel (kettős jelölésű fluoreszcens festés,  $\times 200$ ). d, amorf, bazális membrán szerű anyag (nyíl), és dezmoszóma szerű junkcionális komplexusok (nyílhegy) megtalálhatók voltak ultrastruktúráisan.

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

A gastrointestinális stromális tumorok az emésztő rendszer leggyakoribb mesenchymalis tumorai, ugyanakkor igen változatos biológiai viselkedést mutatnak (144-146). A daganat patogenezisében a KIT és PDGFRA tirozin kináz receptor fehérjék aktivációs mutációi centrális szerepet játszanak: KIT mutáció igazolható az esetek mintegy 75-80%-ában, PDGFRA mutáció mintegy 5-8%-ban, és nincs mutáció az esetek mintegy 12-15%-ában (vad típus) (186). A tirozin kináz gátlók forradalmi változást hoztak számos tumor kezelésében, nevezetesen az imatinib szelektíven gátolja a BCR-ABL fúziós fehérjét CML-ben és a KIT és PDGFRA kináz aktivitást GIST-ben (83). Metasztatikus GIST esetén mintegy 80%-os klinikai válasz érhető el. Mindazonáltal mintegy 10-20%-ban a betegek primer rezisztenciát mutatnak az imatinibbel szemben, és másodlagos rezisztencia pedig jóval nagyobb százaléokban is kifejlődhet azokban a betegekben akik priméren jól reagáltak (10,14,44). A mutációs státusz általában jól megadja a terápiás válasz mértékét, viszont a PDGFRA 18-as exon leggyakoribb mutációja (D842V) gyakorlatilag primer rezisztenciát jelez (34,225). A kezelés során detektálható új mutációk pedig gyakorlatilag a szekunder rezisztencia kialakulásáért felelősek. A tirozin kináz receptor szignálok a foszfatidil-inozitol-3-kináz(PI3 K)/Akt/mTOR jelút rendszeren keresztül futnak (többek között), mely jelút részben a fehérje translációon keresztül fokozott sejtproliferációhoz és gátolt apoptózishoz vezet (28,93). Az mTOR foszforilizálja mint közvetlen cél molekulákat a 4EBP1 és p70S6 kináz foszfo-4ebp1 release iniciációs faktort, és a foszfo-p70S6K foszforilizálja az S6 riboszómális fehérjét ami végül is a transláció beindítását eredményezi. Azok a jelutak melyek szabályozzák az mTOR aktivitást igen gyakran aktívak a humán rosszindulatú daganatokban, és a szövet tenyészeteken végzett vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy az Akt/mammalian target of rapamicin (mTOR) jelút rendszer fontos szerepet játszhat a GIST-ekben (51).

Az imatinib rezisztencia problémájának megoldása érdekében új tirozin kináz gátlókat fejlesztettek ki. A SU11248 (szelektíven gátolja az FLT3-at, KIT-et, PDGFRA-t és a VEGFR-t) (89) és a ZD6474(VEGFR-2, EGFR és RET gátló) egyaránt csökkenti az Akt/mTOR tengely jeleit és gátolja GIST sejtvonalakban a sejtek növekedését (171,244). Érdekes, hogy a rapamicin (mTOR gátló) növelni tudta a SU11248 hatását (90). Minthogy azonban az új gátlók ellenére is kialakulhat rezisztencia, az mTOR gátlók potenciális lehetőségként szerepelnek a kezelési „fegyvertárban”. Bár GIST sejtvonalakon történtek vizsgálatok az mTOR jelútrendszer szerepét illetően, mindeközéig nincs adat nagyobb számú klinikai GIST

szöveti elemzését tekintve, pedig nagyon fontos lenne megtalálni azt a beteg csoportot akik számára hasznos lehet az mTOR gátlók terápiás használata. Munkánkban célul tűztük ki a GIST-es betegek mTOR jelútrendszerének aktivitási fokának vizsgálatát összehasonlítva a KIT és PDGFRA mutációs státusszal (203).

108 paraffinos blockot vizsgáltunk 108 GIST-es betegből, beleértve a konzultációs anyagokat is. A 2006 és 2009 közötti három éves periódusban a 108 vizsgált beteg klinikai adatai a következők voltak: 63 férfi és 45 nő. Az átlag életkor 60 év volt, a legfiatalabb 27 éves, míg a legidősebb 86 éves volt. A daganat elhelyezkedését illetően 46 gyomor, 33 vékonybél, 12 vastagbél, 4 májástét, 4 retroperitoneális, 4 mesenterialis, 2 Meckel diverticulum, 1 nyelöcsői és két hasi tumort vizsgáltunk. Szövettenilag orsósejtes GIST 69 esetben, epithelialis 12 és kevert orsósejtes-epithelialis GIST pedig 23 esetben volt, valamint 4 bizonyított anaplasztikus jellegűnek. A rizikó csoportot illetően 79 magas rizikójú, 17 intermediér és 12 alacsony rizikójú GIST-et vizsgáltunk. A konzultációs anyag magas számával magyarázzuk, hogy miért volt kicsit magasabb a PDGFRA mutált és a vad típusú GIST-ek száma az irodalmi átlaghoz képest. Minden esetünk diagnosztikus eset volt (beleértve a metasztázisokat is), ennek megfelelően korábban nem kezelt primer GIST. A rizikó csoportba sorolást Miettinen és Lasotta javaslata szerint végeztük (143). Az egyes metodikai tevékenységek leírása a módszer fejezetben megtalálható, idetartozóan csupán az immunhisztokémiai kiértékelésre szeretnék kitérni. Két független patológus vizsgálta az immunfestett metszeteket (TMA) pontozásos rendszert használva. A pozitív intenzívitasát (negatív, mérsékelt vagy erős), a pozitív sejtek mennyiségét (elszórt: <5%, fokális: 5%-30%, kiterjedten fokális: 30%-70%, és diffúz: >70%) vettük figyelembe. Ezen kritériumok alapján az egyes antitestek festődését a következőképpen értékeltük: erős pozitívitas (kiterjedten fokális vagy diffúz erős pozitívitas vagy diffúz mérsékelt pozitívitas; ++), részben pozitív (elszórt vagy fokális erős festődés vagy kiterjedten fokális mérsékelt festődés; +), és negatív (-). A három antitest komplex kiértékelése után az mTOR jelút aktivitásának mértékét az alábbiak szerint határoztuk meg: *aktív* (mind a három immunreakció erősen pozitív, vagy 2 erősen pozitív és 1 fokálisan), *inaktív* (mind a 3 festés negatív vagy 2 negatív és egy fokálisan pozitív) vagy *részlegesen aktív* (minden további kombináció).

A klinikai, patológiai jellegzetességeket, a mutáció státuszt, valamint az mTOR aktivitásának mértékét az alábbi részletes táblázatban (13. táblázat) mutatjuk be.



13. Táblázat 108 GIST összefoglaló klinikopatológiai adatai, mutációs státusza és mTOR aktivitása.

Ese#	Sex	Kor	Localizatio	Histológia	Rizikó	CD117	CD34	Gén- Exon	Mutatio	Méret (bp)	Aminosav-változás	p4EBP1	pp70S6K	pS6	mTOR jelüt
01	n	55	ileum	GIST S	inter	+++	+++	c-kit - ex11	deletio	6	Ex11 QW556-557del	-	-	+	inactiv
02	n	77	gyomor	GIST M	magas	++	+	c-kit - ex11	deletio	6	Ex11 KV558-559del	-	-	-	inactiv
03	f	61	rectum	GIST S	inter	f+	f+	c-kit - ex11	deletio	21	Ex11 MYEQWVK552-558del	++	+	++	activ
04	f	54	jejunum	GIST M	alacsony	+++	+++	c-kit - ex11	deletio	48 (+CTTins)	Ex11 EINGNNYYIDPTQLPY562-578del; DF562-563ins	-	-	-	inactiv
05	n	50	ileum	GIST S	magas	f+/-	f+/-	c-kit - ex11	transitio	T-C	Ex11 L576P	-	-	+	inactiv
06	n	72	gyomor	GIST S	magas	++	++	c-kit - ex13	transitio	G-A	Ex13 G663E	-	-	-	inactiv
07	f	60	gyomor	GIST S	magas	+++	++	c-kit - ex11	transversio	T-A	Ex11 W557R	-	-	-	inactiv
08	n	61	rectum	GIST M	magas	f+/-	+	c-kit - ex09	duplicatio	6	Ex9 AY502-503dup	+	-	-	inactiv
09	f	68	colon	GIST S	magas	+	-	c-kit - ex09	duplicatio	6	Ex9 AY502-503dup	++	+	-	part. act.
10	n	73	gyomor	GIST E	magas	f+/-	++	c-kit - ex11	transversio	T-A	Ex11 V560D	-	-	-	inactiv
11	n	53	duodenum	GIST S	magas	++	+++	c-kit - ex11	transversio	T-G	Ex11 W557G	++	++	+	activ
12	n	64	gyomor	GIST S	inter	++	+++	c-kit - ex11	deletio	6	Ex11 V559-560del	-	-	-	inactiv
13	f	62	rectum	GIST S	magas	-	++	c-kit - ex11	deletio	9	Ex11 KV558-560del	-	-	-	inactiv
14	f	68	gyomor	GIST S	magas	f+/-	++	c-kit - ex17	transitio	C-T	Ex17 H802T	-	-	-	inactiv
15	f	48	gyomor	GIST M	magas	++	+	c-kit - ex11	deletio	18	Ex11 YEYQWK553-558del	+	++	-	part. act.
16	n	67	gyomor	GIST S	magas	++	++	c-kit - ex11	deletio	6	Ex11 WK557-558del	-	++	-	part. act.
17	f	65	gyomor	GIST S	magas	+++	+++	c-kit - ex11	deletio	6	Ex11 KV558-559	-	-	-	inactiv
18	f	75	gyomor	GIST S	magas	+++	-	c-kit - ex11	deletio	40	Ex11 INGNYYIDPTQL563-575del; F563ins	-	-	-	inactiv
19	f	52	duodenum	GIST M	magas	+	f+	c-kit - ex11	deletio	48	Ex11 QWKXVEEINGNNYYID 556-572 del	++	+	++	activ
20	n	32	jejunum	GIST S	magas	f+	f++	c-kit - ex11	deletio	48	Ex11 QWKXVEEINGNNYYID 556-572del; H556ins	-	-	-	inactiv
21	f	67	gyomor	GIST S	magas	++	++	c-kit - ex11	deletio	3	Ex11 D579del	++	++	++	activ
22	n	57	gyomor	GIST M	magas	+++	+++	c-kit - ex11	deletio	6	Ex11 WK557-558del	-	-	-	inactiv
23	n	62	gyomor	GIST S	magas	+	+++	c-kit - ex11	báziscsere	2	Ex11 W557R; K558E	-	-	-	inactiv
24	n	44	gyomor	GIST M	alacsony	+	+++	c-kit - ex11	deletio	48	Ex11 QWKXVEEINGNNYYID 556-572del; H556ins	-	-	-	inactiv
25	f	71	gyomor	GIST E	inter	f+/-	+++	c-kit - ex11	transversio	T-A	Ex11 V559D	-	-	-	inactiv
26	f	73	gyomor	GIST S	magas	+++	+++	c-kit - ex11	transversio	T-A	Ex11 QWKXVEEINGNNYYID 556-572del; H556ins	-	++	++	part. act.
27	n	61	mesenterium	GIST S	magas	++	-	c-kit - ex11	deletio	48	Ex11 QWKXVEEINGNNYYID 556-572del; H556ins	-	-	-	inactiv
28	f	62	ileum	GIST M	magas	+++	+	c-kit - ex11	báziscsere	T-C	Ex11 W557R	-	+	-	inactiv
29	n	68	máj	GIST M	magas	++	++	c-kit - ex11	deletio	15	Ex11 VVEEIN 559-564del; D559ins	-	-	-	inactiv
30	f	47	gyomor	GIST S	magas	++	++	c-kit - ex11	deletio	18	Ex11 MYEQWVK552-557del	++	+	++	activ
31	f	77	gyomor	GIST S	magas	++	+	c-kit - ex09	deletio	12	Ex9 KHNG484-487 del	-	-	+	inactiv
32	n	86	Meckel diverticulum	GIST S	inter	++	+++	c-kit - ex11	deletio	6	Ex11 MY552-553del	-	+	+	part. act.
33	f	67	gyomor	GIST S	alacsony	+++	+++	c-kit - ex11	báziscsere	T-A	Ex11 W557R	+	++	-	part. act.
34	f	34	jejunum	GIST S	magas	+++	+++	c-kit - ex11	báziscsere	4	Ex11 WK557-558KE	+	-	-	inactiv
35	f	39	gyomor	GIST M	magas	+++	-	c-kit - ex11	deletio	15	Ex11 KPMYE560-554del	++	+	-	part. act.
36	f	47	duodenum	GIST S	inter	+++	++	c-kit - ex09	transitio	C-T	Ex9 T500I	++	-	-	inactiv
37	f	76	retroperitoneum	GIST S	magas	+	+	c-kit - ex09	transitio	G-A	Ex9 D458N	++	-	++	part. act.
38	f	54	ileum	GIST S	magas	+	++	c-kit - ex11	inserto	3	Ex11 K558N; + P559ins	++	+	++	activ
39	f	50	máj	GIST M	magas	+++	+++	c-kit - ex09	duplicatio	6	Ex9 AY502-503dup	-	-	-	inactiv
40	f	53	Meckel diverticulum	GIST S	magas	+++	f+	c-kit - ex11	transversio	T-A	Ex11 V559N	+	+	+	part. act.
41	f	70	gyomor	GIST S	magas	+	+++	c-kit - ex11	deletio	18	Ex11 YEYQWK553-558del	-	-	-	inactiv
42	n	54	gyomor	GIST S	magas	+	+	c-kit - ex11	deletio	31	Ex11 KPMYEVQWKXVE560-561del; RLLS560-563 ins	-	-	-	inactiv
43	f	56	máj	GIST S	magas	+++	+	c-kit - ex11	deletio	3	Ex11 P577del	++	-	-	part. act.
44	n	41	gyomor	GIST S	magas	+++	+++	c-kit - ex11	deletio	28	Ex11 KPMYEVQWKXVE560-559del; L560 ins	-	-	-	inactiv

Ese#	Sex	Kor	Localizatio	Histológia	Rizikó	CD117	CD34	Gén - Exon	Mutatio	Méret (bp)	Aminosav változás	p4EBP1	pp70S6K	pS6	mTOR Jelút
44	n	41	gyomor	GIST S	magas	+++	+++	c-kit - ex11	deletio	28	Ex11 KPMYEVQWKV550-559del; L550 ins	-	-	-	inactiv
45	f	49	gyomor	GIST S	magas	+++	+++	c-kit - ex11	transitio	T-C	Ex11 L576P	-	-	-	inactiv
46	n	41	jejunum	GIST S	magas	+++	++	c-kit - ex11	deletio	18	Ex11 EVQWKVY554-560del; D554 ins	-	-	-	inactiv
47	f	29	jejunum	GIST S	magas	+++	-	c-kit - ex11	deletio	21	Ex11 VVEEINGN559-567del; D559-560 ins	++	-	-	part. act.
48	f	54	jejunum	GIST S	magas	+	+++	c-kit - ex11	deletio	3 (+2ins)	Ex11 WK557-558del; S557ins	+	-	-	part. act.
49	f	46	ileum	GIST S	inter	+++	+++	c-kit - ex09	duplicatio	6	Ex9 AY502-503dup	-	-	-	inactiv
50	f	74	gyomor	GIST M	magas	+++	+++	c-kit - ex11	deletio	17	Ex11 YEYWK553-558del; F553 ins	-	-	-	inactiv
51	f	72	mesenterium	GIST S	inter	++	++	c-kit - ex11	deletio	40 (T+ ins)	Ex11 INGNNYYIDPTQL 563-576del; F563 ins	++	-	+	part. act.
52	f	71	esophagus	GIST M	magas	+++	-	c-kit - ex09	transitio	G-A	Ex9 G610D	-	+	+	part. act.
53	f	67	colon	GIST S	magas	++	+	c-kit - ex11	deletio	18	Ex11 MYEQW552-557del	-	-	-	inactiv
54	f	67	rectum	GIST A	magas	+	+++	c-kit - ex11	deletio	3 (+2ins)	Ex11 WK557-558del; S557ins	++	-	-	part. act.
55	f	74	ileum	GIST S	magas	++	+	c-kit - ex11	transitio	T-C	Ex11 W557R	-	-	-	inactiv
56	f	56	gyomor	GIST A	magas	+++	+++	c-kit - ex11	inserto	3	Ex11 K558N; + P559ins	++	++	+	activ
57	n	56	rectum	GIST S	magas	+++	+++	c-kit - ex11	deletio	6	Ex11 WK557-558del	-	-	-	inactiv
58	n	69	jejunum	GIST S	magas	++	-	c-kit - ex11	báziscsere	G-C	Ex11 W557C	-	-	-	inactiv
59	f	58	jejunum	GIST S	magas	+	-	c-kit - ex11	deletio	6	Ex11 WK557-558 del	-	+	-	inactiv
60	f	78	gyomor	GIST S	magas	+++	+++	c-kit - ex11	báziscsere	G-C; T-G	Ex11 K558N; V580G	++	++	+	activ
61	f	54	jejunum	GIST S	magas	++	-	c-kit - ex11	báziscsere	G-A	Ex11 R586K	-	-	-	inactiv
62	f	66	jejunum	GIST S	magas	++	++	c-kit - ex11	báziscsere	T-C	Ex11 W557R	-	-	-	inactiv
63	n	58	ileum	GIST S	inter	++	++	c-kit - ex11	deletio	6	Ex11 WK557-558 del	+	++	+	part. act.
64	f	57	gyomor	GIST S	magas	+++	+++	c-kit - ex11	deletio	6	Ex11 WK557-558 del	++	+	-	part. act.
65	n	80	gyomor	GIST S	inter	+++	+++	c-kit - ex11	deletio	3	Ex11 E562 del	++	-	-	part. act.
66	n	42	ileum	GIST S	inter	+++	+	c-kit - ex11	deletio	6	Ex11 WK557-558 del	-	-	-	inactiv
67	n	45	gyomor	GIST S	alacsony	++	++	c-kit - ex11	duplicatio	19 (+45 ins)	Ex11 TQLPYD 562-567 dup; LN 588-589 ins	-	+	-	inactiv
68	f	41	jejunum	GIST S	magas	++	f+	c-kit - ex11	deletio	18	Ex11 YEYQWK553-556del	-	-	-	inactiv
69	n	73	rectum	GIST M	magas	+	+	c-kit - ex11	deletio	6	Ex11 WK557-558 del	+	+	+	part. act.
70	n	60	jejunum	GIST S	alacsony	++	-	c-kit - ex11	deletio	6	Ex11 WK557-558 del	-	-	+	inactiv
71	n	67	rectum	GIST E	magas	+++	f++	c-kit - ex11	deletio	21 (+3 ins)	Ex11 KAVEEING 556-566 del; RR 558-559 ins	-	-	-	inactiv
72	f	46	ileum	GIST S	magas	++	-	c-kit - ex11	deletio	21	Ex11 MYEQWK 552-559 del	-	-	-	inactiv
73	n	68	hasi	GIST S	magas	+++	+++	c-kit - ex13	báziscsere	A-G	Ex13 K642E	+	++	+	part. act.
74	f	66	gyomor	GIST E	alacsony	-	+++	PDGFRA - ex18	transversio	A-T	Ex18 D842V	-	++	+	part. act.
75	f	27	colon	GIST A	magas	-	f++	PDGFRA - ex18	transversio	A-T	Ex18 D842V	++	+	++	activ
76	f	39	retroperitoneum	GIST A	magas	-	f++	PDGFRA - ex18	transversio	A-T	Ex18 D842V	+	++	++	activ
77	n	81	gyomor	GIST E	magas	+/-	+	PDGFRA - ex18	transversio	A-T	Ex18 D842V	++	++	+	activ
78	n	58	jejunum	GIST M	magas	-	-	PDGFRA - ex18	transversio	A-T	Ex18 D842V	+	++	++	activ
79	n	68	gyomor	GIST M	magas	-	+	PDGFRA - ex18	báziscsere	A-T	Ex18 D842V	++	+	++	activ
80	n	44	gyomor	GIST E	alacsony	-	+	PDGFRA - ex18	báziscsere	A-T	Ex18 D842V	-	-	+	inactiv
81	f	79	gyomor	GIST E	alacsony	-	++	PDGFRA - ex18	deletio	12	Ex18 IMHD 843-846 del	+	++	++	part. act.
82	n	66	gyomor	GIST S	alacsony	-	f+	PDGFRA - ex18	báziscsere	A-T	Ex18 D842V	-	-	-	inactiv
83	f	78	gyomor	GIST E	alacsony	-	+++	PDGFRA - ex18	deletio	12	Ex18 IMHD 843-846 del	-	+	+	part. act.
84	f	46	gyomor	GIST E	alacsony	-	f++	PDGFRA - ex18	transversio	A-T	Ex18 D842V	+	++	++	activ
85	n	80	mesenterium	GIST M	magas	-	f++	PDGFRA - ex18	deletio	12	Ex18 IMHD 843-846 del	++	++	+	activ
86	f	71	gyomor	GIST M	inter	+++	+++	WT	nincs	nincs	nincs	-	-	-	inactiv
87	f	71	gyomor	GIST M	magas	++	-	WT	nincs	nincs	nincs	++	+	++	activ

Eset#	Sex	Kor	Localizatio	Histológia	Rizikó	CD117	CD34	Gen - Exon	Mutatio	Méret (bp)	Aminosav változás	p4EBP1	pp70S6K	pS6	mTOR jelrit
88	f	62	jejunum	GIST S	inter	+++	-	WT	nincs	nincs	nincs	-	-	-	inactiv
89	f	61	rectum	GIST S	magas	++	-	WT	nincs	nincs	nincs	++	++	++	activ
90	n	60	jejunum	GIST S	magas	++	+++	WT	nincs	nincs	nincs	++	+	+	part. act.
91	f	55	jejunum	GIST S	magas	+++	+	WT	nincs	nincs	nincs	-	++	-	part. act.
92	n	68	retroperitoneum	GIST M	magas	++	-	WT	nincs	nincs	nincs	-	++	-	part. act.
93	f	71	ileum	GIST S	inter	+++	-	WT	nincs	nincs	nincs	++	++	++	activ
94	f	45	duodenum	GIST S	magas	+++	++	WT	nincs	nincs	nincs	-	-	-	inactiv
95	n	58	colon	GIST M	magas	+++	-	WT	nincs	nincs	nincs	++	++	++	activ
96	f	54	jejunum	GIST S	magas	++	+++	WT	nincs	nincs	nincs	-	-	-	inactiv
97	n	52	gyomor	GIST S	magas	++	+++	WT	nincs	nincs	nincs	++	-	-	part. act.
98	f	65	gyomor	GIST M	magas	++	++	WT	nincs	nincs	nincs	-	-	-	inactiv
99	f	67	mesenterium	GIST S	magas	+++	++	WT	nincs	nincs	nincs	++	-	-	part. act.
100	f	46	gyomor	GIST E	magas	++	-	WT	nincs	nincs	nincs	-	-	-	inactiv
101	n	65	nyél	GIST S	magas	++	+++	WT	nincs	nincs	nincs	++	-	-	part. act.
102	f	67	jejunum	GIST M	magas	++	+++	WT	nincs	nincs	nincs	-	-	++	part. act.
103	n	34	csipő	GIST S	magas	+++	+++	WT	nincs	nincs	nincs	+	+	-	part. act.
104	n	55	retroperitoneum	GIST S	magas	++	++	WT	nincs	nincs	nincs	-	+	-	part. act.
105	n	76	gyomor	GIST S	alacsony	++	++	WT	nincs	nincs	nincs	+	-	+	part. act.
106	f	43	duodenum	GIST E	magas	++	-	WT	nincs	nincs	nincs	+	+	+	part. act.
107	f	73	gyomor	GIST E	inter	+	+	WT-SNP	transition	T-C	PDGFRA - Ex10 S478P	++	+	-	part. act.
108	n	64	gyomor	GIST S	inter	+	+++	WT-SNP	transition	T-C	PDGFRA - Ex10 S478P	-	++	++	part. act.

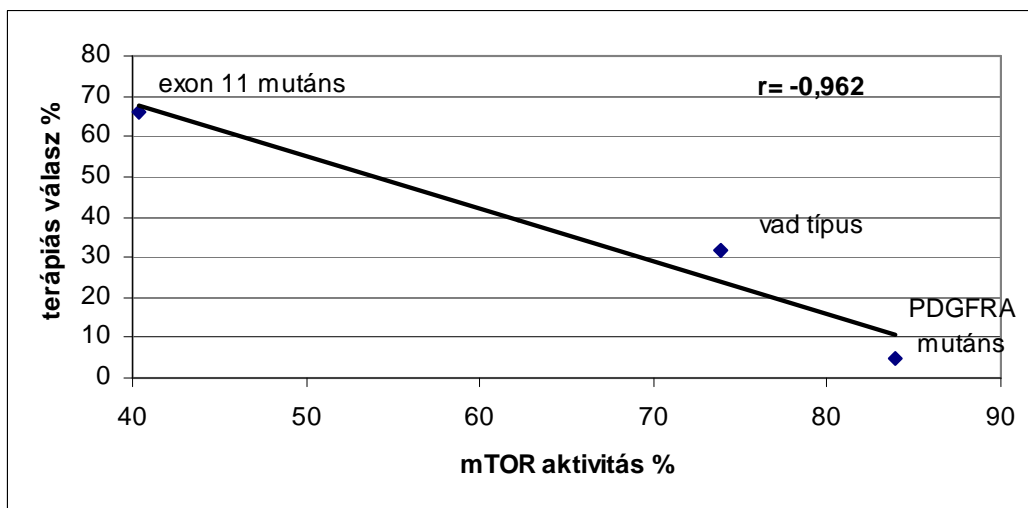
A DNS szekvenálás részben diagnosztikus célból történt, többségben azonban (magas rizikójú csoport) a terápás kezelés miatt. KIT mutációt találtunk 73 esetben (exon 11, 62; exon 9, 8; exon 13, 2 és exon 17,1). 12 PDGFRA mutációt találtunk, melyek közül 9 esetben a leggyakoribb 18-as exont érintő D842V mutációt igazoltuk, továbbá 3 esetben 18-as exon delétiót mutattunk ki (12 bázispár vesztése a 843-846 aminosav régióban). Összesen 23 vad típusú esetet találtunk egyértelmű CD117 pozitívitás mellett. Ebből 21 esetben nem volt mutáció, míg 2 esetben ún. „single nukleotide polymorphism” volt megfigyelhető (SNP) a PDGFRA 10-es exonjában mely S478P tranzicót eredményezett. Ezen mutáció a National Center for Biotechnology Information SNP adatbázisa szerint (SNP rs35597368 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=35597368](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=35597368)) nem bizonyult valódi funkciónyerő mutációnak.

A TMA metszeteket foszfo-4EBP1, foszfo-p70S6K és foszfo-S6 ellenes antitestekkel festettük melyek „downstream” célfehérjéi az mTOR kináznak. Mind a 3 antitest számos, (de nem mindegyik) GIST esetben mutatott pozitívitást. Ha egyenként vizsgáljuk az antitesteket a p4EBP1 esetén (mérsékelt és erős pozitívitás) 73 KIT mutáltból 27 esetben, 12 PDGFRA mutáltból 8 esetben és a 23 vad típusból 12 esetben találtunk pozitívitást (65. ábra). A p70S6K tekintetében 73 KIT mutáltból 29 eset, 12 PDGFRA mutáltból 10 eset és a 23 vad típusból 13 eset volt pozitív (66. ábra). Pozitív pS6-ot találtunk a 73 KIT mutáltból 26, 12 PDGFRA mutáltból 11 és a 23 vad típusból 10 esetben (67. ábra). Az mTOR jelút aktivitásának komplexebb vizsgálatához a 3 antitest együttes analízisét végeztük a korábban leírtak szerint. Mindezen igen részletes eredmény alapján azt találtuk, hogy a 73 KIT mutáltból 45 esetben volt az mTOR jelút *inaktív* és csupán 28 esetben mutatott funkcionális aktivitást (részlegesen aktív és aktív). Ezzel szemben a PDGFRA mutált esetekben funkcionálisan 10 eset volt *aktív* a 12-ből és csak 2 inaktív valamint a vad típusú eseteknél is 17 *aktív* és 6 inaktív eset mutatkozott a 23-ból. Ha külön bontottuk az aktív részlegesen, aktív és inaktív eseteket akkor a következő eredményt kaptuk: a 73 KIT mutált esetből 45 volt inaktív, 20 részlegesen aktív és 8 aktív. A 12 PDGFRA mutáns eseteket illetően 2 volt inaktív, 3 részlegesen volt aktív és 7 aktív eset volt. A 23 vad típusból 6 inaktív, 13 részlegesen aktív és 4 aktív találtunk. Szignifikáns különbséget találtunk az egyes csoportok (KIT mutált 38.4%, vad típus 73.9% és PDGFRA mutált 83.3%) között az aktivitás mértékét illetően:  $P=0.000621$  (63. ábra).

	Fisher egzakt teszt		összesen			
	pozitív	negatív				
Ckit	28	45	73			
Vad	17	6	23		p=0.000621645531	
PDGFRA	10	2	12			
összesen	55	53	108			

63. ábra Fisher egzakt teszt a mutációs státusz és az mTOR aktivitás közötti összefüggés tekintetében.

A statisztikai adatokat kombinálva az általunk talált eredményekkel erős fordított összefüggést tudunk kimutatni az imatinibre adott terápiás válasz és az egyes csoportok mTOR jelút aktivitásai között:  $r = -0.962$ . Az exon 11 mutáltak esetén a terápiás válasz 65-67% míg az mTOR aktivitás 38.4%, a vad típus esetén a terápiás válasz 23-40%, míg az mTOR aktivitás 73.9% és a PDGFRA mutáltak esetén a terápiás válasz minimális (5-8%) viszont az mTOR aktivitás 83.3% (64. ábra).

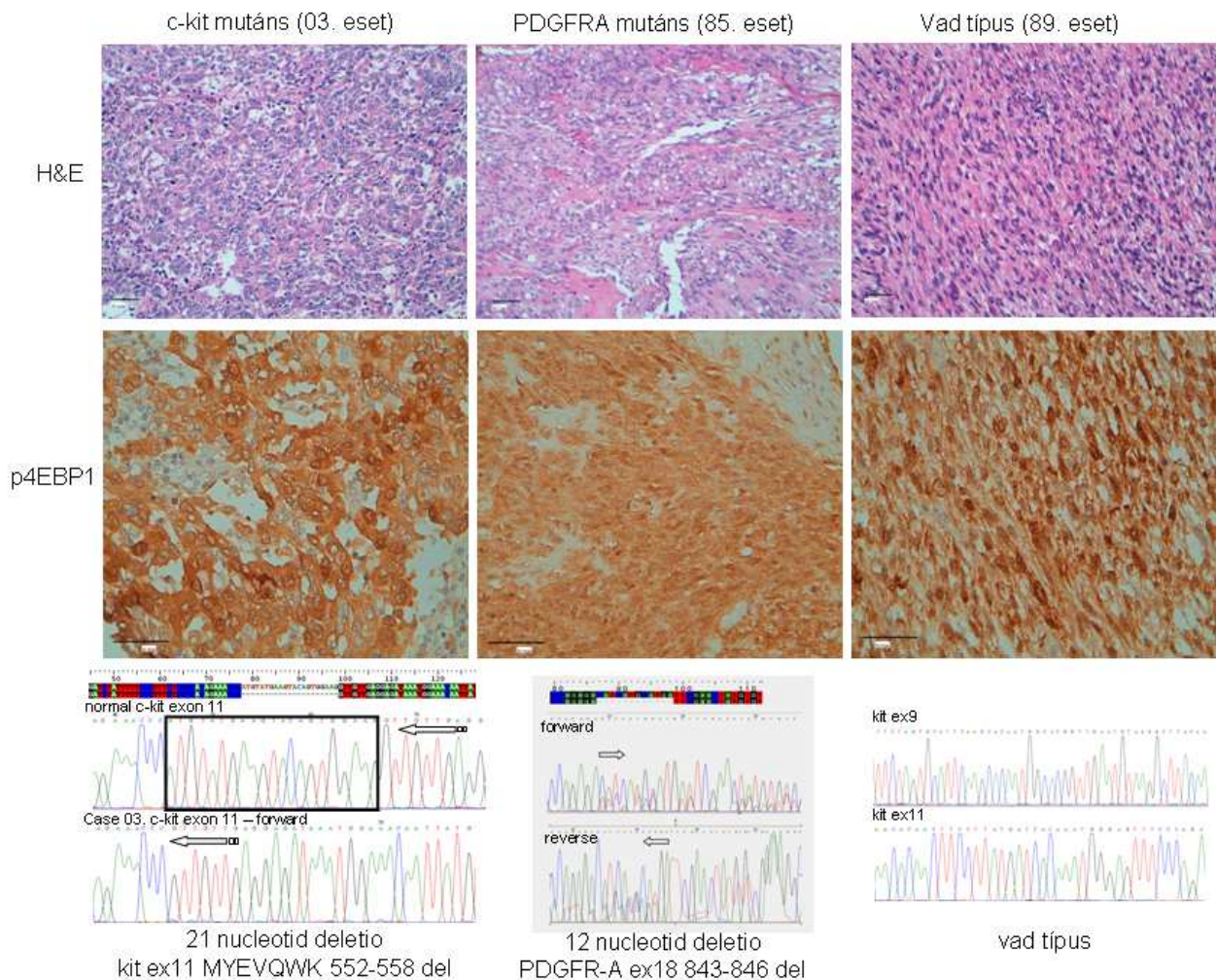


64. ábra Lineáris regressziós diagramm, mely szoros inverz összefüggést mutat az mTOR aktivitás és a terápiás válasz között.

## Megbeszélés

Napjainkban az imatinib mesylate kezelés standard formának számít az előrehaladott GIST-ek kezelésében. A magas terápiás válasz ellenére (75-90%) vannak olyan GIST-es alcsoportok melyek primer rezisztenciát mutatnak, és bár a másodlagos rezisztencia kialakulásának mechanizmusa ma már ismert (126,168,169) az elsődleges rezisztencia kérdését még ezidáig nem nagyon vizsgálták. Ugyanakkor szinte mindegy, hogy a rezisztencia primer vagy szekunder abból a szempontból, hogy hatékony kezelés csak akkor képzelhető el, ha ismerjük

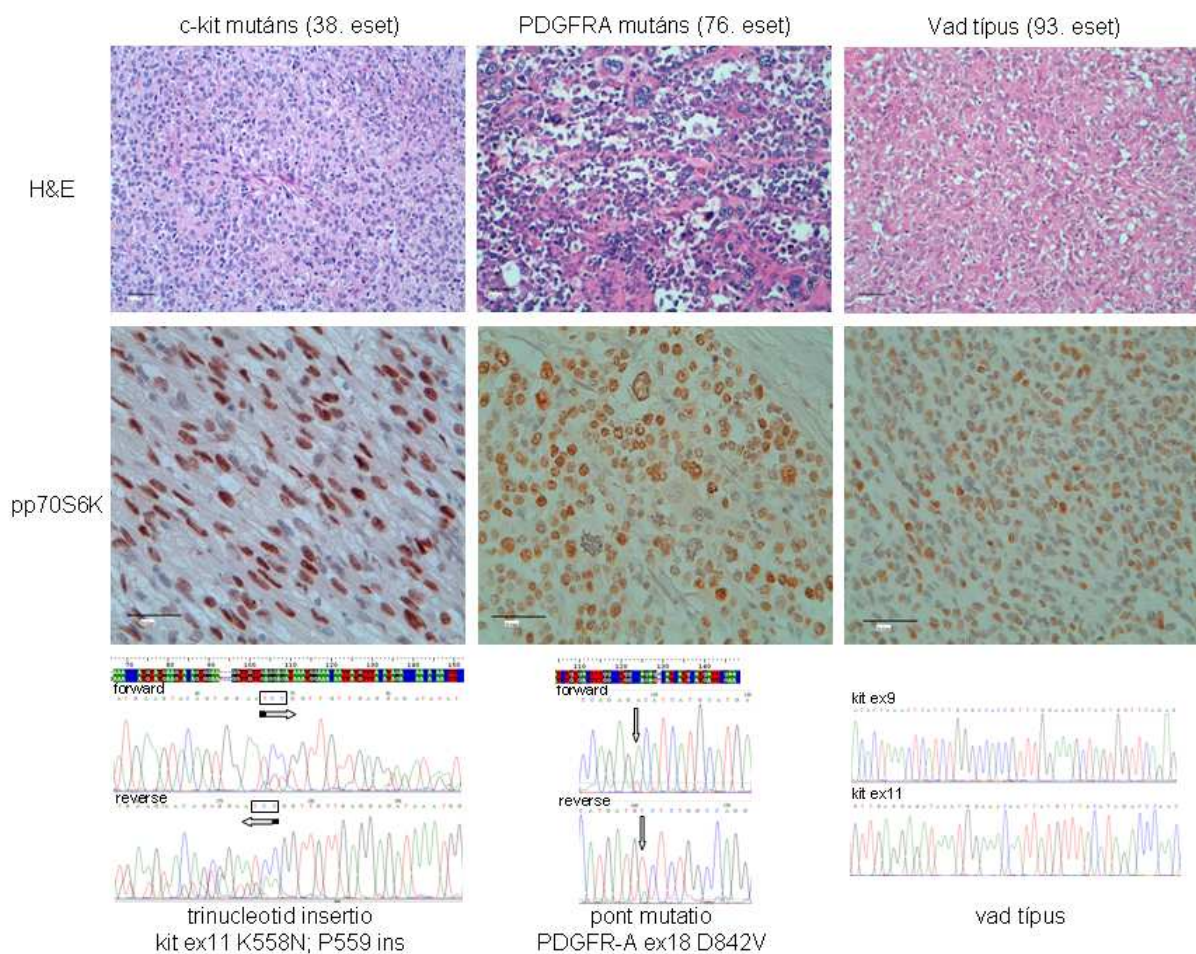
a tirozin kináz receptorok jelútrendszerait, azokat a centrális lépéseket melyekkel hatékony gátlás képzelhető el. A szignálok komplexitása, a részben paralell futó és részben egymásba kapcsolódó jelutak azonban nem mindig adnak egyértelmű választ a mechanizmusra, illetve így érthető, hogy a túlélő, terápia rezisztens sejtek számára megkerülő, „menekülő” útvonalak is léteznek (140,167,184).



65. ábra KIT mutáns, PDGFRA mutáns és vad típusú gastrointestinalis stromális tumor esetek reprezentatív hematoxylin-eosin képe, p4EBP1 immunreakciója és szekvenogramja. Mérsékelt-erős p4EBP1 pozitivitás 27/73 KIT mutáns esetben, 8/12 PDGFRA mutáns esetben, és 12/23 vad típusú esetben volt. A bar 50 mikrométert jelez.

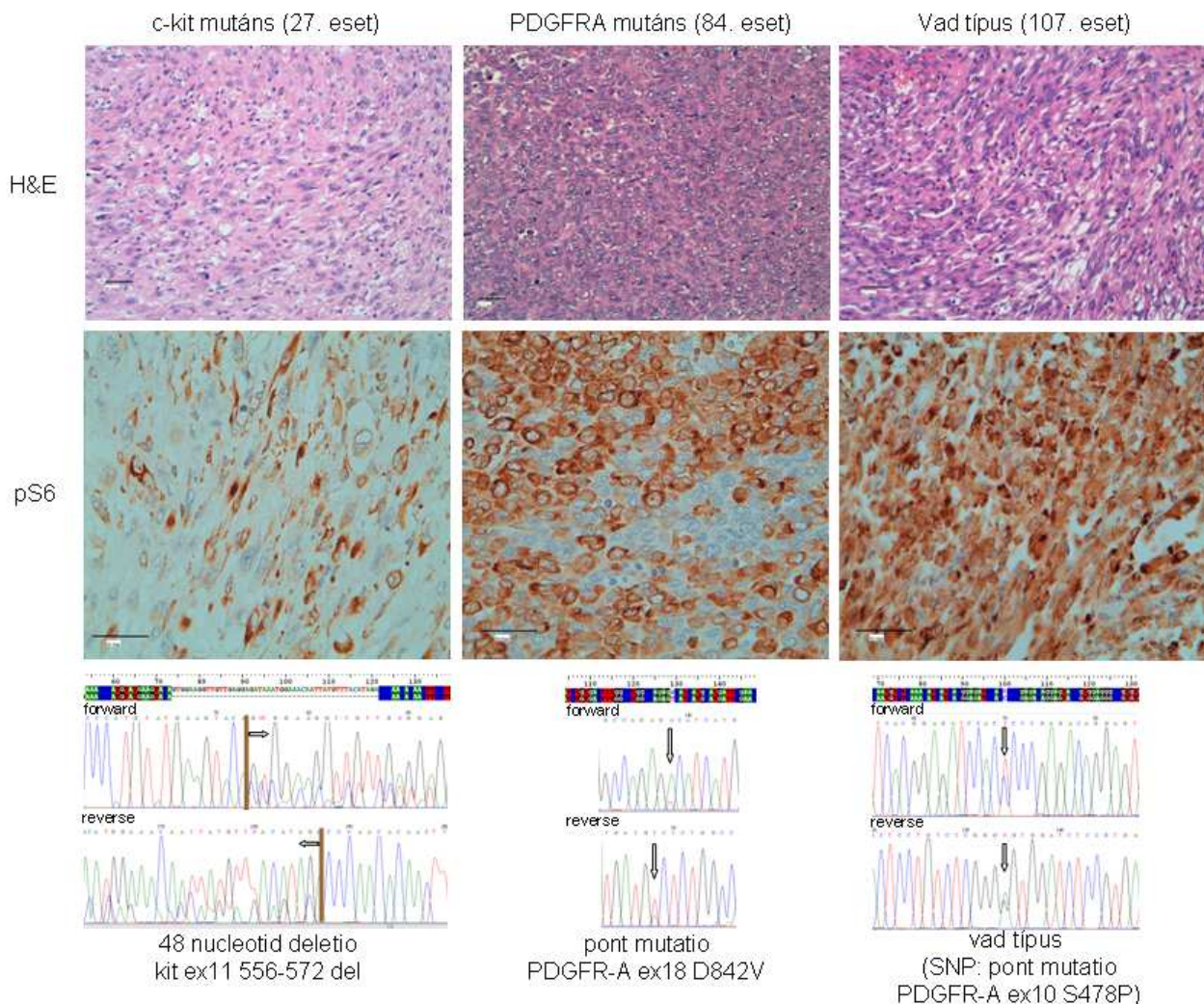
Általánosságban 3 fő jelútrendszer ismert a tirozin kinázok esetén: a RAS-RAF-MEK-ERK, a PI3K-Akt-mTOR, és a JAK/STAT3 jelút, az utóbbiról úgy gondolják, hogy a SCF-től független mechanizmussal aktiválódik (166). Korábbi publikációk szerint a PI3K-Akt-mTOR jelút fontos lehet a GIST-ben és egy igen fontos túlélési jelút az imatinib rezisztens GIST-ek esetén. Ugyanakkor ebben a tekintetben ezidáig csupán szövet tenyésztési adatok álltak

rendelkezésre (összesen 6 KIT mutált sejtvonal, de nincs vizsgálható vad típusú és PDGFRA mutált sejtvonal) (164,166). Nagyobb szériájú klinikai mintákat illetve paraffinos anyagot mindezidáig nem vizsgáltak és különösen nem a 3 foszforilált mTOR cél fehérjéit illetően (pp70S6K, p4EBP1 és pS6). Munkánkban 73 KIT mutált, 12 PDGFRA mutált és 23 vad típusú esetet vizsgáltunk, melyek elégségesek egy részletes elemzéshez. Fontos hangsúlyozni, hogy a vad típusú esetekben a diagnózis a jellegzetes szöveti képen és a CD117 pozitivitáson alapult, míg az S100 és a desmin negatív volt. Továbbá ezen esetekben nem volt mutáció a PDGFRA 10, 12, 14 és 18-as exonjaiban, kivéve a 2 SNP mutációs esetet. A 3 antitest kombinált kiértékelése egy sokkal szélesebb áttekintésre adott lehetőséget a reális mTOR aktivitást illetően mint a korábbi tanulmányok, ahol vagy csak a p70S6K-t (225), vagy a pp70S6K és/vagy a p4EBP1-et vizsgálták (23,164). Eredményeink világosan mutatják, hogy az mTOR jelút aktivitás nem általánosan jellemző a KIT mutált GIST-ekre, bár körülbelül egyharmadukban megjelenik.



66. ábra KIT mutáns, PDGFRA mutáns és vad típusú gastrointestinalis stromális tumor esetek reprezentatív hematoxylin-eosin képe, pp70S6K immunreakciója és szekvenogramja. pp70S6K pozitívitas 29/73 KIT mutáns esetben, 10/12 PDGFRA mutáns esetben, és 13/23 vad típusú esetben volt. A bar 50 mikrométert jelez.

Az is nyilvánvaló, hogy szignifikáns különbség van az mTOR aktivitást illetően a különböző csoportokban ( $P < 0.005$ ). Ha figyelembe vesszük, hogy irodalmi adatok szerint az Akt-mTOR jelút kritikusán fontos túlélési jelút a GIST-ben és felelős lehet a primer rezisztenciáért, akkor igen érdekes, hogy eredményeink igen csak alátámasztják ezen elképzelést. Ahogy már az eredményekben is mutattuk, meglehetősen szoros negatív korrelációt ( $r = -0.96$ ) találtunk az imatinibre adott terápiás válasz (186) és az mTOR aktivitás között, figyelembe véve a mutációs státuszokat. Mindezen eredmények alapján feltételezhetjük, hogy azok a KIT mutált esetek amelyekben aktív az mTOR jelút, nagyobb valószínűséggel válnak rezisztenssé, bár nyilvánvalóan ez a feltételezés klinikai megerősítést igényel.



67. ábra KIT mutáns, PDGFRA mutáns és vad típusú gastrointestinalis stromális tumor esetek reprezentatív hematoxylin-eosin képe, pS6 immunreakciója és szekvenogramja. pS6 pozitivitás 21/73 KIT mutáns esetben, 11/12 PDGFRA mutáns esetben, és 10/23 vad típusú esetben volt. A bar 50 mikrométert jelez.



A korábbi mTOR vizsgálatok jó összhangban vannak eredményeinkkel, melyekben többek között azt találták, hogy az mTOR aktív GIST-ek agresszívebben viselkednek (25,181,182,232). Eredményeink alapján felmerül az is, hogy a PDGFRA mutált és a vad típusú GIST-ek rosszabb prognózisa részben azzal magyarázható, hogy ezekben az esetekben KIT és PDGFRA független regulátorok aktiválják az mTOR jelutat. Irodalmi adatok utalnak arra, hogy IGF1R, IGF-1 és IGF-2 expresszió erősen emelkedett rossz prognózisú GIST-eknél (86,170). Feltételezhető, hogy az előbbieket abberáns expressziója az aktivált mTOR jelútrendszerrel a GIST-ek egy kisebb csoportjánál onkogén faktor lehet, ami egyben újabb lehetőséget jelent ezen tumorok nyilvánvalóan effektív, de nem mindig kuratív kezelésében (234). A legtöbb cikk eredménye lényegében egyezik a mi eredményeinkkel (14,84,106,247), egy kivételt azonban meg kell említeni. Subramanian (225) és munkatársai azt találták, hogy p70S6K dektálható és jellemző volt a KIT mutált GIST-re, de nem találtak expressziót PDGFRA mutált eseteknél. Az eltérés a következőkkel magyarázható: Subramanian és munkatársai csupán 3 PDGFRA és 8 KIT mutált esetet vizsgáltak, valamint eseteikben csak a p70S6K-t és nem ennek foszforilált formáját nézték és nem vizsgálták a másik 2 célfehérjét. Más módszert használtak, western blot analízist és nem immunhisztokémiát. Ugyanakkor érdekes, hogy a 12 PDGFRA eseteink közül kettőben mi sem találtunk p70S6K aktivitást.

Az individuális onkológiai kezelés nagy kihívás napjainkban az onkológia számára és ennek tervezésében nagy segítséget jelent az egyes daganatok jelútrendszerének feltérképezése, megismerése. A molekuláris alapokon történő klasszifikáció, a kináz gátlók rezisztencia mechanizmusának és azoknak a jelútrendszernek az ismerete melyek elősegítik a primer rezisztenciát mind-mind nagyfokban megkönnyítik az individuális kezelés tervezését. Munkánkban feltártuk az mTOR jelútrendszer előfordulását és gyakoriságát a különböző KIT és PDGFRA mutált GIST-ekben, és további információkkal szolgáltunk egy esetleges mTOR gátló racionális használatához.

## Válasz a célkitűzésekre, új megállapítások

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

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

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

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

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

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

## Irodalomjegyzék

1. Agarwal V, Greenebaum E, Wersto R, Koss LG. DNA ploidy of spindle cell soft tissue tumors and its relationship to histology and clinical outcome. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115: 558-62.
2. Ahn JY, Kwon SO, Shin MS, Shim JY, Kim O-K. A case of multiple schwannomas of the trigeminal nerves, acoustic nerves, lower cranial nerves, brachial plexuses and spinal canal: schwannomatosis or neurofibromatosis? *Yonsei Medical Journal* 2002; (43(1)): 109-13.
3. Allander SV, Illei PB, Chen Y, et al. Expression profiling of synovial sarcoma by cDNA microarrays: association of ERBB2, IGF2BP2, and ELF3 with epithelial differentiation. *Am J Pathol* 161:1587-1595, 2002.
4. Al-Romaih K, Bayani J, Vorobyova J, et al. Chromosomal instability in osteosarcoma and its association with centrosome abnormalities. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;144:91-99.
5. Antal I, Sápi Z, Szendrői M Malignant transformation of a giant-cell tumor in the distal radius. The prognostic value of the DNA-cytophotometry.: Die maligne entartung eines riesenzelltumors am distalen radiusende. Wertigkeit der DNS-zytophotometrie. *ORTHOPAEDIE* 29:(7) pp. 677-683. (2000)
6. Antal I, Sápi Z, Szendrői M Radius distalis végéből kiinduló osteoclastoma malignus transzformációja. *MAGYAR TRAUMATOLOGIA ORTHOPAEDIA ÉS HELYREÁLLÍTÓ SEBÉSZET* 2: pp. 181-188. (1998)
7. Antal I, Sápi Z, Szendrői M The prognostic significance of DNA cytophotometry and proliferation index (Ki-67) in giant cell tumors of bone. *INTERNATIONAL ORTHOPAEDICS* 23:(6) pp. 315-319. (1999)
8. Antal I, Sápi Z, Szendrői M. 2000. Malignant transformation of giant cell tumor in the distal radius. Value of the DNA cytophotometry. *Orthopade.* 29(7):677-83
9. Antinheimo J, Sallinen SL, Sallinen P, Haaspasalo H, Helin H, Horelli-Kuitunen N, Wessman M, Sainio M, Jaaskelainen J, Carpen O. Genetic aberrations in sporadic and neurofibromatosis 2 (NF2) associated schwannomas studied by comparative genomic hybridization (CGH). *Acta Neurochir* 2000; 142(10): 1099-104.
10. Armbrust T, Sobotta M, Gunawan B, et al: Does imatinib turn recurrent and/or metastasized gastrointestinal stromal tumors into a chronic disease? - single center experience. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:819-23.

11. Balla P, Moskovszky L, Sapi Z, Forsyth R, Knowles H, Athanasou Szendroi M, Kopper L, Rajnai H, Pinter F, Petak I, Benassi MS, Pizzi P, Krenacs T Receptor tyrosine kinases in giant cell tumor of bone: Epidermal growth factor receptor signaling contributes to osteoclastogenesis, osteoblastic stromal cell proliferation and disease progression. HISTOPATHOLOGY Paper HISTOP-01-10-0012.R3. (2010) In press
12. Balogh Z, Deák L, Sági Z Malignant myoepithelioma of soft tissue: a case report with cytogenetic findings. *CANCER GENETICS AND CYTOGENETICS* 183:(2) pp. 121-124. (2008)
13. Barbashina V, Benevenia J, Aviv H, et al. Oncoproteins and proliferation markers in synovial sarcomas: a clinicopathologic study of 19 cases. *J Cancer Res Clin Oncol* 128:610-616, 2002.
14. Bauer S, Duensing A, Demetri GB, Fletcher JA: KIT oncogenesis signaling mechanisms in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor: PI3- kinase/AKT is a crucial survival pathway. *Oncogene* 2007;26:7560-68.
15. Bergh P, Meis-Kindblom JM, Gherlinzoni F, et al. Synovial sarcoma: identification of low and high risk groups. *Cancer* 85:2596-2607, 1999.
16. Böcking A. DNA Zytometrie und Automatisierung in der klinischen Diagnostik. In: Bonk U (Ed) *Aktuelle Klinische Zytologie*, 1991; pp. 298-347. Karger, Germering.
17. Bodó M, Sági Z, Szerján E Cytological differential diagnostic possibilities in soft tissue tumours. *ACTA ONCOLOGICA* 12: pp. 433-435. (1991)
18. Bridge JA, Neff JR, Mouron BJ. 1992. Giant cell tumor of bone. Chromosomal analysis of 48 specimens and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet.* 58:2-13
19. Campanacci M, Baldini N, Boriani S et al. 1987. Giant-cell tumor of bone. *J Bone Joint Surg Am.* 69: 106-14
20. Carey FA. 1994. Measurement of nuclear DNA content in histological and cytological specimens: principles and applications. *J Pathol.* 172:307-312
21. Casadei GP, Scheithauer BW, Hirose T, Manfrini M, Van Houton C, Wood MB. Cellular schwannoma. A clinicopathologic, DNA flow cytometric and proliferation marker study of 70 patients. *Cancer* 1995; 75: 1109-19.
22. Castagné C, Mühlematter D, Beyer V, Parlier V, van Melle G, Jotterand M. 2003. Determination of cutoff values to detect small aneuploid clones by interphase fluorescence in situ hybridization: the Poisson model is a more appropriate approach. Should single-cell trisomy 8 be considered a clonal defect? *Cancer Genet Cytogenet.* 147(2):99-109.

23. Chang BS, Yang T, Cibas ES et al: An in vitro cytologic assay for evaluation of the KIT signaling pathway in gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol* 2007;20:579–583.
24. Charabi S, Engel P, Charabi B, Jacobsen GK, Overgaard J, Thomsen J, Tos M. Growth of vestibular schwannomas: in situ model employing the monoclonal antibody Ki-67 and DNA flow cytometry. *Am J Otol* 1996; 17(2): 692.
25. Chen WT, Huang CJ, Wu MT, et al: Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with risk of aggressive behavior and tumor angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor. *Jpn J Clin Oncol* 2005;35:207-13.
26. Choong PF, Akerman M, Willen H, et al. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 in soft tissue sarcoma. Is prognostic significance histotype-specific? *APMIS* 1995;103:797–805.
27. Choong PF, Akerman M, Willen H, et al. Prognostic value of Ki-67 expression in 182 soft tissue sarcomas. Proliferation — a marker of metastasis? *APMIS* 1994;102:915–924.
28. Chung J, Grammer TC, Lemon KP, et al: PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 1994;370:71-75.
29. Coindre JM, Trojani M, et al. Reproducibility of a histopathologic grading system for adult soft tissue sarcoma. *Cancer* 1986;58:306– 309.
30. Cole P, Ladanyi M, Gerald WL, et al. Synovial sarcoma mimicking desmoplastic small round-cell tumor: critical role for molecular diagnosis. *Med Pediatr Oncol* 1999;32:97–101.
31. Collin F, Chassevent A, Bonichon F, Bertrand G, Terrier P, Coindra JM. Flow cytometric DNA content analysis of 185 soft tissue neoplasms indicates that S-phase fraction is a prognostic factor for sarcomas. French Federation of Cancer Centers (FNCLCC) sarcoma group. *Cancer* 1997; 79(12): 2371-9.
32. Coombs LM, Pigott DA, Sweeney E, et al. Amplification and over-expression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Cancer* 63:601-608, 1991.
33. Cordoba JC, Parham DM, Meyer WH, Douglass EC. A new cytogenetic finding in an epithelioid sarcoma, t(8;22(q22;q11)). *Cancer Genet Cytogenet* 1994;72:151–154.
34. Corless CL, Schroeder A, Griffith D, et al: PDGFRA Mutations in Gastrointestinal Stromal Tumors: Frequency, Spectrum and In Vitro Sensitivity to Imatinib. *J Clin Oncol* 2005;23:5357-64.
35. Cremer C, Sapi Z, Hruska A DNA ploidy and chromosome (FISH) pattern analysis of peripheral nerve sheath tumors [2] (multiple letters). *CELLULAR ONCOLOGY* 27:(5-6) pp. 359-361. (2005)

36. D'Assoro AB, Lingle WL, Salisbury JL. Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene* 2002;21:6146–6153.
37. Dabbs DJ. The bridge uniting cytopathology and surgical pathology. Fine-needle aspiration biopsy as the keystone. *Am J Clin Pathol* 1997;108(Suppl 1):S6–11.
38. Dabbs DJ. The surgical pathologist's approach to fine needle aspiration. *Clin Lab Med* 1998;18:357–372.
39. Dal Cin P. Cytogenetics of soft tissue tumours. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1998;82:47–58.
40. Dal Din P, Sciò R, De Smet L, van den Berghe H. Translocation 2;11 in a fibroma of tendon sheath. *Histopathology* 1998;32:433–435.
41. de Souza PE, Paim JF, Carvalhais JN, et al. Immunohistochemical expression of p53, MDM2, ki-67 and PCNA in central giant cell granuloma and giant cell tumor. *J Oral Pathol Med* 1999;28:54–58.
42. Dreinhöfer KE, Baldetorp B, Akerman M, Fernö M, Rydholm A, Gustafson P. DNA ploidy in soft tissue sarcoma: comparison of flow and image cytometry with clinical follow-up in 93 patients. *Cytometry*. 2002 Feb 15;50(1):19-24.
43. Dei Tos AP, Dal Cin P. The role of cytogenetics in the classification of soft tissue tumours. *Virchows Arch* 1997;431:83–94.
44. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, et al: Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002;347:472-80.
45. Dodd LG, Marom EM, Dash RC, Matthews MR, McLendon RE. Fine-needle aspiration cytology of “ancient” schwannoma. *Diagn Cytopathol* 1999; 20: 307-11.
46. Dominkus M, Ruggieri P, Bertoni F et al. 2006. Histologically verified lung metastases in benign giant cell tumours – 14 cases from a single institution. *Int. Orthop.* 30: 499-504
47. Dow N, Giblen G, Sobin LH, et al. Gastrointestinal stromal tumors: differential diagnosis. *Semin Diagn Pathol.* 2006; 23(2):111-9.
48. Doxsey S. Duplicating dangerously: linking centrosome duplication and aneuploidy. *Mol Cell* 2002;10:439–440.
49. Doxsey S. Re-evaluating centrosome function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:688–698.

50. Doxsey S. The centrosome—a tiny organelle with big potential. *Nat Genet* 1998;20:104–106.
51. Duensing A, Medeiros F, McConarty B, et al: Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Oncogene* 2004;23:3999-2006.
52. Eckhardt S, Pápai Z, Bodoky G, Horti J, Tamás K, Nagy T, Orosz Z, Sápi Z, Gödény M, Jakab K, Esik O, Trón L, Besznyák I Az imatinibkezelés hatása gastrointestinalis stroma eredetű daganatokban. *ORVOSI HETILAP* 144:(45) pp. 2207-2212. (2003)
53. Eilber FR, Eckardt J. Surgical management of soft tissue sarcomas. *Semin Oncol* 1997;24:526–533.
54. Eilber FR, Huth JF, Mirra J, Rosen G. Progress in the recognition and treatment of soft tissue sarcomas. *Cancer* 1990;65:660–666.
55. El-Naggar AK, Ayala AG, Abdul-Karim FW, et al. Synovial sarcoma. A DNA flow cytometric study. *Cancer* 65(10):2295-300, 1990.
56. Enneking WF. 1983. In *Musculoskeletal Tumor Surgery*. Churchill Livingstone, New York.
57. Farkas E, Köves I, Besznyák I, Sápi Z, Sulyok Z *Leiomyosarcoma férfi emlőben.* *ORVOSI HETILAP* 132:(27) pp. 1489-1491. (1991)
58. Felsher DW, Bishop JM. Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3940–3944.
59. Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol*. 2002; 33(5):459-65.
60. Fletcher CD, Dal Cin P, de Wever I, et al. Correlation between clinicopathological features and karyotype in spindle cell sarcomas. A report of 130 cases from the CHAMP study group. *Am J Pathol* 1999;154:1841–1847.
61. Fletcher CD. Soft tissue tumours: the impact of cytogenetics and molecular genetics. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1997;81:318–326.
62. Forsyth R G, De Boeck G, Baelde J J, Taminau A H, Uyttendaele D, Roels H R, Praet M M, Hogendoorn PCW. 2008. CD33(+) CD14(-) Phenotype is Characteristic of Multinuclear Osteoclast-Like Cells in Giant Cell Tumor of Bone. *J Bone Mineral Res.* ,in press, manuscript number: J0711670R2
63. Forsyth RG, De Boeck G, Bekaert S, et al. Telomere biology in giant cell tumour of bone. *J Pathol* 2008;214:555–563.
64. Fukasawa K. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett* 2005;230:6–19.

65. Fukasawa K. Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes. *Nat Rev Cancer* 2007;7:911–924.
66. Gábor Zs, Sápi Z, Szloboda J Ossificalo fibromyxoid tumor esete. *ORVOSI HETILAP* 138:(27) pp. 1755-1757. (1997)
67. Gamberi G, Benassi MS, Böhling T et al. 1998. Prognostic relevance of c-myc gene expression in giant-cell tumor of bone. *J Orthop Res.* 16(1):1-7
68. Gamberi G, Benassi MS, Bohling T, et al. Prognostic relevance of C-myc gene expression in giant-cell tumor of bone. *J Orthop Res* 1998;16:1–7.
69. Gamberi G, Benassi MS, Ragazzini P, Pazzaglia L, Ponticelli F, Ferrari C, Balladelli A, Mercuri M, Gigli M, Bertoni F, Picci P. 2004. Proteases and interleukin-6 gene analysis in 92 giant cell tumors of bone. *Ann Oncol.*15:498–503
70. Ghadimi BM, Sackett DL, Difilippantonio MJ, et al. Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;27:183–190.
71. Gisselsson D, Palsson E, Yu C, et al. Mitotic instability associated with late genomic changes in bone and soft tissue tumours. *Cancer Lett* 2004;206:69–76.
72. Gisselsson D, Pettersson L, Hoglund M, et al. Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:5357–5362.
73. Gonda G, Sápi Z, Köves I, Péter I Cutaneous meningioma. *ACTA ONCOLOGICA* 16: pp. 107-112. (1995)
74. Gorunova K, Dawiskiba S, Andren-Sandberg A, Hoglund M, Johansson B. Extensive cytogenetic heterogeneity in a benign retroperitoneal schwannoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 127(2):148-54.
75. Guiter GE, Gamboni MM, Zakowski MF. The cytology of extraskkeletal Ewing sarcoma. *Cancer* 1999;87:141–148
76. Guo HQ, Gao M, Ma J. et al. Analysis of the cellular centrosome in fine-needle aspirations of the breast. *Breast Cancer Res* 2007;9:R48.
77. Gustafson LM, Gleich LL, Fukasawa K, et al. Centrosome hyperamplification in head and neck squamous cell carcinoma: a potential phenotypic marker of tumor aggressiveness. *Laryngoscope* 2000;110:1798–1801.
78. H Monaghan, V J Bubb, I R Sirimujalin, S J Millward-Sadler & D M Salter 2001. Adenomatous polyposis coli (APC), b-catenin, and cadherin are expressed in human bone and cartilage. *Histopathology.* 39: 611-619
79. Han X. Flow cytometric analysis of peripheral nerve tumors. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 1990; 19(3): 200-3.



80. Haroske G, Baak JPA, Danielsen H, et al. Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. *Analyt Cell Pathol* 23:89-95, 2001.
81. Haroske G, Baak JPA, Danielsen H, Giroud F, Gschwendtner A, Oberholzer M, Reith A, Spieler P, Böcking A. Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. *Analytical Cellular Pathology* 2001; 23: 89-95.
82. Hasegawa SL, Mentzel T, Fletcher CDM. Schwannomas of the sinonasal tract and nasopharynx. *Mod Pathol* 1997; 10(8): 777-84.
83. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, et al: PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003;299:708-10.
84. Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, et al: Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* 2000;6:925-32.
85. Herzberg AJ, Kerns BJ, Honkanen FA, et al. DNA ploidy and proliferation index of soft tissue sarcomas determined by image cytometry of fresh frozen tissue. *Am J Clin Pathol* 1992;97(Suppl 1):S29–37.
86. Hewish M, Chau I, Cunningham D: Insulin-like growth factor 1 receptor targeted therapeutics: novel compounds and novel treatment strategies for cancer medicine. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2009;4:54-72.
87. Hruska A, Bollmann R, Kovács R B, Bollmann M, Bodó M, Sági Z DNA ploidy and chromosome (FISH) pattern analysis of peripheral nerve sheath tumors. *CELLULAR ONCOLOGY* 26:(5-6) pp. 335-345. (2004)
88. Huuhtanen RL, Blomqvist CP, Winklund TA, et al. Comparison of the Ki-67 score and S-phase fraction as prognostic variables in soft-tissue sarcoma. *Br J Cancer* 1999;79:945–951.
89. Ikezoe T, Nishioka N, Tasaka T, et al: The antitumor effects of sunitinib (formerly SU11248) against a variety of human hematologic malignancies: enhancement of growth inhibition via inhibition of mammalian target of rapamycin signaling. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2522-30.
90. Ikezoe T, Yang Y, Nishioka C, et al: Effect of SU11248 on gastrointestinal stromal tumor-T1 cells: Enhancement of growth inhibition via inhibition of 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling. *Cancer Sci* 2006;97:945-51.
91. Ishikubo T, Akagi K, Kurosimi M, et al. Immunohistochemical and mutational analysis of c-kit in gastrointestinal neuroendocrine cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2006; 36(8): 494-8.
92. Jensen V, Sorensen FB, Bentzen SM, et al. Proliferative activity (MIB-1 index) is an independent prognostic parameter in patients with high-grade soft tissue sarcomas of subtypes other than malignant fibrous histiocytomas: a retrospective

immunohistological study including 216 soft tissue sarcomas. *Histopathology* 1998;32:536–546.

93. Jiang BH, Liu LZ: Role of mTOR in anticancer drug resistance: Perspectives for improved drug treatment. *Drug Resistance Updates* 2008;11:63-76.
94. Joyner CJ, Quinn JM, Triffitt JT, et al. Phenotypic characterisation of mononuclear and multinucleated cells of giant cell tumour of bone. *Bone Miner* 1992;16:37–48.
95. Kandel R, Li SQ, Bell R et al. 2006. Cyclin D1 and p21 is elevated in the giant cells of giant cell tumors. *J Orthop Res.* 24(3):428-37
96. Kandel R, Li SQ, Bell R, et al. Cyclin D1 and p21 is elevated in the giant cells of giant cell tumors. *J Orthop Res* 2006;24:428–437.
97. Katsetos CD, Reddy G, Draberova E, et al. Altered cellular distribution and subcellular sorting of gamma-tubulin in diffuse astrocytic gliomas and human glioblastoma cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65:465–477.
98. Kauzman A, Li SQ, Bradley G et al. 2003. Cyclin alterations in giant cell tumor of bone. *Mod Pathol.* 16(3):210-218
99. Kauzman A, Li SQ, Bradley G, et al. Cyclin alterations in giant cell tumor of bone. *Mod Pathol* 2003;16: 210–218.
100. Kawaguchi KI, Oda Y, Saito T et al. 2004. Decreased expression of transforming growth factor- $\beta$  II receptor is associated with that of p27KIP1 in giant cell tumor of bone: a possible link between transforming growth factor- $\beta$  and cell cycle-related protein. *Human Pathology.* 35(1):61-68
101. Kay EW, Mulcaby H, Walsh CB, et al. Cytoplasmic c-erbB-2 protein expression correlates with survival in Dukes' B colorectal carcinoma. *Histopathology* 25:455-461, 1996.
102. Keshgegian AA, Cnaan A. erbB-2 oncoprotein expression in breast carcinoma. poor prognosis associated with high degree of cytoplasmic positivity using CB-11 antibody. *Am J Clin Pathol* 108:456-463, 1997.
103. Kilpatrick SE, Geisinger KR, King TS, et al. Clinicopathologic analysis of HER-2/neu immunoexpression among various histologic subtypes and grades of osteosarcoma. *Mod Pathol* 14:1277-1283, 2001.
104. Kilpatrick SE, Ward WG, Cappellari JO, Bod GD. Fine-needle aspiration biopsy of soft tissue sarcomas. A cytomorphic analysis with emphasis on histologic subtyping, grading and therapeutic significance. *Am J Clin Pathol* 1999;112:179–188.
105. Kilpatrick SE, Ward WG, Chauvenet AR, Pettenati MJ. The role of fine-needle aspiration biopsy in the initial diagnosis of pediatric bone and soft tissue tumors: an institutional experience. *Mod Pathol* 1998;11:923–928.

106. Kim SJ, Kahn CR: Insulin Stimulates p70 S6 Kinase in the Nucleus of Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:681-85.
107. Kindermann D, Hilgers CH. Glare corrections in DNA image cytometry. *Anal Cell Pathol* 1994; 6:165-180.
108. Knijnenburg J, Szuhai K, Giltay J, et al. 2005. Insights From Genomic Microarrays Into Structural Chromosome Rearrangements. *Am J of Med Genetics*.132A:36-40
109. Knijnenburg J, van der Burg M, Tanke HJ, Szuhai K. 2007. Optimized amplification and fluorescent labeling of small cell samples for genomic array-CGH. *Cytometry*. 71(8):585-91.
110. Knowles H, Athanasou N. 2008. Hypoxia-inducible factor is expressed in giant cell tumour of bone and mediates paracrine effects of hypoxia on monocyte-osteoclast differentiation via induction of VEGF. *J Pathol*. 215(1):56-66
111. Kóbori L, Nagy P, Máthé Z, Hartmann E, Doros A, Paku S, Dezso K, Sági Z Malignant peripheral nerve sheath tumor of the liver: A case report. *PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH* 14:(3) pp. 329-332. (2008)
112. Kourea HP, Cordon-Cardo C, Dudas M, Leung D, Woodruff JM. Expression of p27 (kip) and other cell cycle regulators in malignant peripheral nerve sheath tumors and neurofibromas: the emerging role of p27 (kip) in malignant transformation of neurofibromas. *Am J Pathol* 1999;155(6):1885-91.
113. Kourea HP, Orlov I, Scheithauer BW, Cordon-Cardo C, Woodruff JM. Deletions of the INK4A gene occur in malignant peripheral nerve sheath tumors but not in neurofibromas. *Am J Pathol* 1999;155(6):1855-60.
114. Kovács R B, Bollmann M, Speich N, Bollmann R, Bodó M, Sági Z Measuring telomerase activity in various human tumors in routine histology and cytology. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE* 13:(2) pp. 303-309. (2004)
115. Kovács R B, Sattar H A, Krausz T, Kas J, Berta M, Sági Z Primary follicular dendritic cell sarcoma of the lung [4]. *HISTOPATHOLOGY* 49:(4) pp. 431-433. (2006)
116. Kreicbergs A, Tribukait B, Willems J, Bauer HCF. DNA flow analysis of soft tissue tumors. *Cancer* 1987; 59: 128-133.
117. Krivacsy G, Bosze P, Krasznai G, Sapi Z, Keller E, Ungar L, Bodo M A HUVELY ELSODLEGES RHABDOMYOSARCOMAJA. *MAGYAR NŐRVOSOK LAPJA* 58:(4) pp. 317-319. (1995)

118. Kroese MC, Rutgers DH, Wils IS, et al. The relevance of the DNA index and proliferation rate in the grading of benign and malignant soft tissue tumors. *Cancer* 1990;15;65:1782–1788.
119. Kumta SM, Huang L, Cheng YY et al. 2003. Expression of VEGF and MMP-9 in giant cell tumor of bone and other osteolytic lesions. *Life Sciences*. 73:1427-36
120. Labs k, Perka C, Schmidt GR. 2001. Treatment of stages 2 and 3 giant-cell tumor. *Arch Orthop Traum Surg*. 121:83-6
121. Ladanyi M, Tragano F, Huvos A. 1989. Benign metastatizing giant cell tumours of bone. *Cancer*. 64: 1521-1526
122. László Á, Ivaskevics K, Sápi Z Malignant epithelioid ovarian schwannoma: A case report. *INTERNATIONAL JOURNAL OF GYNECOLOGICAL CANCER* 16:(SUPPL. 1) pp. 360-362. (2006)
123. Lausten GS, Jensen PK, Schiodt T et al 1996. Local recurrences in giant cell tumour of bone: long-term follow up of 31 cases. *Int Orthop*. 20:172-6
124. Leroy K, Dumas V, Martin-Garcia N, Falzone MC, Voisin MC, Wechsler J, Revuz J, Creange A, Levy E, Lantieri L, Zeller J, Wolkenstein P. Malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1: a clinicopathologic and molecular study of 17 patients. *Arch Dermatol* 2001;137(7):908-13.
125. Lewis JJ, Antonescu CR, Leung DHY, et al. Synovial sarcoma: a multivariate analysis of prognostic factors in 112 patients with primary localized tumors of the extremity. *J Clin Oncol* 18:2087-2094, 2000.
126. Liegl B, Kepten I, Le C, et al: J Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST. *Pathol* 2008;216:64-74.
127. Lin BTY, Weiss ML, Medeiros LJ. Neurofibroma and cellular neurofibroma with atypia. A report of 14 tumors. *Am J Surg Pathol* 1997; 21(12): 1443-9.
128. Linehan DC, Bowne WB, Lewis JJ. Immunotherapeutic approaches to sarcoma. *Semin Surg Oncol* 1999;17:72–77.
129. Lingle WL, Barrett SL, Negron VC, et al. Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:1978–1983.
130. Lippai N, Füle T, Németh T, Benedek G, Mályi I, Pádi É, Sápi Z Keratin-positive gastrointestinal stromal tumor of the stomach mimicking gastric carcinoma: Diagnosis confirmed by c-kit mutation analysis. *DIAGNOSTIC MOLECULAR PATHOLOGY* 17:(4) pp. 241-244. (2008)

131. Mandahl N, Baldetorp B, Fernó M, Akerman M, Rydholm A, Heim S, Willén H, Killander D, Mitelman F. Comparative cytogenetic and DNA flow cytometric analysis of 150 bone and soft-tissue tumors. *Int J Cancer* 1993; 53: 358-64.
132. Maneschg C, Rogatsch H, Bartsch G, Stenzl A. Treatment of giant ancient pelvic schwannoma. *Tech Urol* 2001 7(4): 296-8.
133. Mankin HJ, Connor JF, Schiller AL, Perlmutter N, Alho A, McGuire M. 1985. Grading of bone tumors by analysis of nuclear DNA content using flow cytometry. *J Bone Joint Surg Am.* 67:404-413
134. Mastik MF, Molenaar WM, Plaat BE, et al. Translocation (11;22)(q24;q12) in a small cell tumor of the thigh in a 2-year-old boy: immunohistology, cytogenetics, molecular genetics and review of the literature. *Hum Pathol* 1999;30:352-355.
135. Masui F, Ushigome S, Fujii K. 1998. Giant cell tumor of bone: an immunohistochemical comparative study. *Pathol Int.* 48:355-61
136. Masui F, Ushigome S, Fujii K. 1998. Giant cell tumor of bone: A clinicopathologic study of prognostic factors. *Path Int.* 48: 723-729
137. Masui F, Ushigome S, Fujii K. Giant cell tumor of bone: an immunohistochemical comparative study. *Pathol Int* 1998;48:355-361.
138. McMenamin ME, Fletcher CDM. Expanding the spectrum of malignant change in schwannomas. Epithelioid malignant change, epithelioid malignant peripheral nerve sheath tumor, and epithelioid angiosarcoma: a study of 17 cases. *Am J Surg Pathol* 2001;25(1):13-25.
139. Mentzel T, Dei Tos A P, Sapi Z, Kutzner H Myopericytoma of skin and soft tissues: Clinicopathologic and immunohistochemical study of 54 cases. *AMERICAN JOURNAL OF SURGICAL PATHOLOGY* 30:(1) pp. 104-113. (2006)
140. Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM: Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2009;27:2278-87.
141. Mertens F, Dal Cin P, De Wever I, Fletcher CD, Mandahl N, Mitelman F, Rosai J, Rydholm A, Sciot R, Tallini G, Van Den Berghe H, Vanni R, Willen H. Cytogenetic characterization of peripheral nerve sheath tumours: a report of the CHAMP study group. *J Pathol* 2000; 190(1): 31-8.
142. Michie BA, Black C, Reid RP, et al. Image analysis derived ploidy and proliferation indices in soft tissue sarcomas: comparison with clinical outcome. *J Clin Pathol* 1994;47:443-447.
143. Miettinen M, Lasota J: Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol* 2006;23: 70-83.
144. Miettinen M, Furlong M, Sarlomo-Rikala M, et al. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the rectum and anus: a

clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 144 cases. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(9):1121-33.

145. Miettinen M, Lasota J: Gastrointestinal Stromal Tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:1466-78.
146. Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29(1):52-68.
147. Mohamed AN, Zalupski MM, Ryan JR, et al. Cytogenetic aberrations and DNA ploidy in soft tissue sarcoma. A Southwest Oncology Group Study. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;99:45–53.
148. Molenaar WM, van den Berg E, Dolfin AC et al. Cytogenetics of fine needle aspiration biopsies of sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;1;84:27–31.
149. Monaghan H, Bubb VJ, Sirimujalin R, et al. Adenomatous polyposis coli (APC), beta-catenin, and cadherin are expressed in human bone and cartilage. *Histopathology* 2001;39:611–619.
150. Moskovszky L, Dezsö K, Athanasou N, Szendrői M, Kopper L, Kliskey K, Picci P, Sápi Z Centrosome abnormalities in giant cell tumour of bone: Possible association with chromosomal instability. *MODERN PATHOLOGY* 23:(3) pp. 359-366. (2010)
151. Moskovszky L, Szuhai K, Krenács T, Hogendoorn P C W, Szendroi M, Benassi M S, Kopper L, Füle T, Sápi Z Genomic instability in giant cell tumor of bone. A study of 52 cases using DNA ploidy, relocalization FISH, and array-CGH analysis. *GENES CHROMOSOMES & CANCER* 48:(6) pp. 468-479. (2009)
152. Murata H, Kusuzaki K, Takeshita H, Hirata M, Hashiguchi S, Ashihara T, Hirasawa Y. 1999. Cytofluorometric DNA ploidy analysis in giant cell tumor of bone: histologic and prognostic value. *Cancer Lett.* 136:223–229
153. Nascimento AG, Huvos AG, Marcove RC. 1979. Primary malignant giant cell tumor of bone: a study of eight cases and review of the literature. *Cancer.* 44: 1393-1402
154. Nga ME, Wong AS, Wee A, et al. Cytokeratin expression in gastrointestinal stromal tumours: a word of caution. *Histopathology.* 2002; 40(5):480-1.
155. Nilbert M. Molecular and cytogenetics of soft tissue sarcomas. *Acta Orthop Scand (Suppl 273)* 1997;68:60–67.
156. Nuciforo PG, Pellegrini C, Fasani R, et al. Molecular and immunohistochemical analysis of HER-2/neu oncogene in synovial sarcoma. *Hum Pathol* 34:639-645, 2003.

157. Oda Y, Sakamoto A, Saito T, et al. Secondary malignant giant-cell tumour of bone: molecular abnormalities of p53 and H-ras gene correlated with malignant transformation. *Histopathology* 2001;39:629–637.
158. Orndal C, Carlen B, Akerman M, et al. Chromosomal abnormality t(9;22) (q22;q12) in an extraskeletal myxoid chondrosarcoma characterized by fine needle aspiration cytology, electron microscopy, immunohistochemistry and DNA flow cytometry. *Cytopathology* 1991; 2:261–270.
159. Orndal C, Tydholm A, Willen H, et al. Cytogenetic intratumor heterogeneity in soft tissue tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1994;78:127–137.
160. Orosz Z, Balázs D, Sági Z, Tiszlavicz L, Tornóczy T Gastrointestinalis mesenchymalis daganatok újraosztályozása. *MAGYAR ONKOLÓGIA* 50:(4) pp. 287-292. (2006)
161. Orosz Z, Sapi Z, Szentirmay Z, Timar J, Toth J Paradigmaváltás a daganatok patológiai diagnosztikájában: molekuláris alapú differenciáldiagnosztika, prognosztikus és prediktív patológia. *MAGYAR ONKOLÓGIA* 51:(2) pp. 103-112. (2007)
162. Orosz Z, Tornóczy T, Sági Z Gastrointestinal stromal tumors: A clinicopathologic and immunohistochemical study of 136 cases. *PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH* 11:(1) pp. 11-21. (2005)
163. Orosz Zs, Sapi Z, Szentirmay Z Unusual benign neurogenic soft tissue tumour: Epithelioid schwannoma or an ossifying fibromyxoid tumour? *PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE* 189:(5) pp. 601-607. (1993)
164. Ou WB, Zhu MJ, Demetri GD, et al: Protein kinase C-theta regulates KIT expression and proliferation in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene*. 2008;27:5624-34.
165. Panagopoulos I, Mertens F, Isaksson M, et al. Clinical impact of molecular and cytogenetic findings in synovial sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 31:362-372, 2001.
166. Paner GP, Silberman S, Hartman G, et al: Analysis of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in gastrointestinal stromal tumors. *Anticancer Res* 2003;23:2253-60.
167. Pawson T, Linding R: Network medicine. *FEBS Lett* 2008;582:1266-70.
168. Penzel R, Aulmann S, Moock M, et al. The location of KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated. *J Clin Pathol*. 2005; 58(6):634-9.

169. Penzel R, Aulmann S, Moock M, et al: The location of KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated. *J Clin Pathol* 2005;58:634-9.
170. Pollak M: Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2008;8:915-28.
171. Prenen H, Cools J, Mentens N, et al: Efficacy of the Kinase Inhibitor SU11248 against Gastrointestinal Stromal Tumor Mutants Refractory to Imatinib Mesylate. *Clin Cancer Res* 2006;12:2622-27.
172. Qian J, Bostwick DG, Takahashi S, Borell TJ, Brown JA, Lieber MM, Jenkins RB. 1996. Comparison of fluorescence in situ hybridization analysis of isolated nuclei and routine histological sections from paraffin-embedded prostatic adenocarcinoma specimens. *Am J Pathol.* 149:1193-9
173. Quintyne NJ, Reing JE, Hoffelder DR, et al. Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science* 2005;307:127–129.
174. Rao UN, Surti U, Hoffner L, Yaw K. Cytogenetic and histologic correlation of peripheral nerve sheath tumors of soft tissue. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; 88(1): 17-25.
175. Rasmussen M, Tribukait B, Thomsen J, Holm LE, Tos M. Implications of DNA characterization of human acoustic neuromas. *Acta Otolaryngol Suppl* 1984;406:278-81.
176. Reid R, Banerjee S, Sciort R. Giant cell tumour. In: Fletcher C, Unni K, Mertens F, (eds). *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone.* IARC: Lyon, 2002, pp 310–312.
177. Reid R, Banerjee SS, Sciort R. 2002. Giant cell tumour. In *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*, Fletcher CD, Unni KK, Mertens F (eds). IARC Press: Lyon. pp 310–312
178. Rummelink M, Salmon I, Petein M, Gras T, Zandonna C, Pasteels JL, Kiss R. Determination of DNA ploidy, nuclear size and proliferative activity by means of the computer-assisted image analysis of Feulgen-stained nuclei in 68 soft tissue tumors of adults. *Hum Pathol* 1994; 25: 694-701.
179. Renshaw AA, Peres-Atayde AR, et al. Cytology of typical and atypical Ewing's sarcoma/PNET. *Am J Clin Pathol* 1996;106:620–624.
180. Rey JA, Pestana A, Bello MJ. Cytogenetics and molecular genetics of nervous system tumors. *Oncol Res* 1992; 4(8-9): 321-31.
181. Ricci R, Maggiano N, Castri F, et al: Role of PTEN in gastrointestinal stromal tumor progression. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:421-5.



182. Romeo S, Debiec-Rychter M, Van Glabbeke M, et al: European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. Cell cycle/apoptosis molecule expression correlates with imatinib response in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2009;15:4191-8.
183. Rossi G, Sartori G, Valli R, et al. The value of c-kit mutational analysis in a cytokeratin positive gastrointestinal stromal tumour. *J Clin Pathol*. 2005; 58(9):991-3.
184. Roukos DH: Innovative genomic-based model for personalized treatment of gastric cancer: integrating current standards and new technologies. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8:29-39.
185. Roychowdhury DF, Tseng A Jr, Fu KK, et al. New prognostic factors in nasopharyngeal carcinoma. Tumor angiogenesis and c-erbB-2 expression. *Cancer* 77:1419-1426, 1994.
186. Rubin BP, Heinrich MC, Corless CL. Gastrointestinal stromal tumour. *Lancet* 2007; 19;369(9574):1731-41.
187. Ryan M. Cytology and mesenchymal pathology: how far will we go. *Am J Clin Pathol* 1996;106:561–564.
188. Saboorian MH, Ashfaq R, Vandersteenhoven JJ, Schneider NR. Cytogenetics as an adjunct in establishing a definitive diagnosis of synovial sarcoma by fine-needle aspiration. *Cancer* 1997;81:187–192.
189. Sainati L, Scapinello A, Montaldi, A et al. A mesenchymal chondrosarcoma of a child with the reciprocal translocation (11;22)(q24;q12). *Cancer Genet Cytogenet* 1993;71:144–147.
190. Sakkars RJB, Van der Heul RO, Kroon HM, Taminiou AHM, Hogendoorn PCW. 1997. Late malignant transformation of a benign giant-cell tumor of bone. A case report. *J Bone Joint Surg Am*. 79:259-62.
191. Salmon I, Kiss R, Segers V, Carroyer JM, Levivier M, Pasteels JL, Brotchi J, Flament-Durand J. Characterization of nuclear size, ploidy, DNA histogram type and proliferation index in 79 nerve sheath tumors. *Anticancer Res* 1992; 12(6): 2277-83.
192. Salmon I, Kiss R. Relationship between proliferative activity and ploidy level in a series of 530 human brain tumors, including astrocytomas, meningiomas, schwannomas and metastases. *Hum Pathol* 1993; 24: 329-35.
193. Salmon I, Kruczynski A, Camby I, Levivier M, Pasteels JL, Brotchi J, Kiss R. DNA histogram typing in a series of 707 tumors of the central and peripheral nervous system. *Am J Surg Pathol* 1993;17(10): 1020-8.
194. Sanerkin NG. 1980. Malignancy, aggressiveness and recurrence in giant cell tumor of bone. *Cancer*. 46:1641–1649

195. Sápi Z, Antal I, Pápai Z, Szendrői M, Mayer Á, Jakab K, Pajor L, Bodó M  
Diagnosis of soft tissue tumors by fine-needle aspiration with combined cytopathology  
and ancillary techniques. *DIAGNOSTIC CYTOPATHOLOGY* 26:(4) pp. 232-242.  
(2002)
196. Sápi Z, Antal I, Túri A, Szendrői M, Bodó M Synovialis sarcoma kettős  
jelölésű fluorescens in situ hibridizációs vizsgálata. *ORVOSI HETILAP* 140:(48) pp.  
2691-2694. (1999)
197. Sápi Z, Bodó M FISH diagnosztika. *MAGYAR ONKOLÓGIA* 46:(1) pp. 25-  
32. (2002)
198. Sapi Z, Bodo M, Megyesi J, Rahoty P Fine needle aspiration cytology of  
biphasic synovial sarcoma of soft tissue. Report of a case with ultrastructural,  
immunohistologic and cytophotometric studies. *ACTA CYTOLOGICA* 34:(1) pp. 69-  
73. (1990)
199. Sápi Z, Bodó M, Sugár J 69 lágyrésztumor DNS-tartalmának mérése Robotron  
TV képanalizátorral. *MAGYAR ONKOLÓGIA* 33: pp. 61-67. (1989)
200. Sápi Z, Bodó M, Sugár J Nucleolar organizer regions in soft tissue tumours.  
*ACTA MORPHOLOGICA HUNGARICA* 39:(1) pp. 59-70. (1991)
201. Sapi Z, Bodo M, Sugar JDNA cytometry of soft tissue tumours with TV  
image-analysis system. *PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE* 185:(3) pp.  
363-367. (1989)
202. Sápi Z, Csanaky Gy, Kálmán A A gyomor plexosarcomája. Esetismertetés  
immunhisztokémiai, DNS-tartalom és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal.  
*MAGYAR ONKOLÓGIA* 36: pp. 31-36. (1992)
203. Sapi Z, Fule T, Hajdu M, Matolcsy A, Moskovszky L, Mark A, Sebestyen A,  
Bodoky G  
The activated targets of mTOR signaling pathway are characteristic for PDGFRA  
mutant and wild-type rather than KIT mutant GISTs. *DIAGNOSTIC MOLECULAR  
PATHOLOGY* Paper DMP10-495R1. (2010) In press
204. Sápi Z, Kovács R B, Bodó M Gastrointestinalis stromalis tumorok. Saját  
tapasztalatok 29 eset kapcsán. *ORVOSI HETILAP* 142:(45) pp. 2479-2485. (2001)
205. Sápi Z, Kovács R B, Bodó M Gastrointestinalis stromalis tumorok. Saját  
tapasztalatok 29 eset kapcsán. *ORVOSI HETILAP* 146:(18 SUPPL.1) pp. 916-922.  
(2005)
206. Sapi Z, Megyesi J, Besznyak I, Sugar J Extraspinal ependymoma in the  
sacroccygeal region. A case report with ultrastructural, immunohistochemical and  
cytophotometric studies.  
*VIRCHOWS ARCHIV A-PATHOLOGICAL ANATOMY AND HISTOLOGY*  
415:(3) pp. 293-296. (1989)

207. Sápi Z, Orosz Zs, Schaff Zs (szerk.)  
Soft Tissue and Bone Pathology.: Technology Transfer In Diagnostic Pathology 4th  
Central European Regional Meeting. Eger, Magyarország, 2009.04.19-2009.04.21.  
IAP, 2009. 192 p.
208. Sápi Z, Pápai Z, Hruska A, Antal I, Bodó M, Orosz Z Her-2 oncogene  
amplification, chromosome 17 and DNA ploidy status in synovial sarcoma.  
PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 11:(3) pp. 133-138. (2005)
209. Sapi Z, Papp I, Bodo M Malignant fibrous histiocytoma of the esophagus:  
Report of a case with cytologic, immunohistologic and ultrastructural studies. ACTA  
CYTOLOGICA 36:(2) pp. 121-125. (1992)
210. Sápi Z, Péter I The significance of immunocytochemistry and image analysis in  
the histological diagnosis of soft tissue tumours. ACTA ONCOLOGICA 12: pp. 417-  
422. (1991)
211. Sapi Z, Sugar J, Koves I Malignant giant cell tumour of soft tissues. A case  
report.  
ARCHIV FÜR GESCHWULSTFORSCHUNG 58:(6) pp. 455-459. (1988)
212. Sapi Z, Sugar J, Szentirmay Z Nodular fasciitis. A case report with  
cytophotometric study.  
ARCHIV FÜR GESCHWULSTFORSCHUNG 58:(6) pp. 449-453. (1988)
213. Sápi Z, Szentirmay Z, Orosz Z Desmoplastic small round cell tumour of the  
pleura: A case report with further cytogenetic and ultrastructural evidence of  
'mesothelioblastic' origin.  
EJSO-EUROPEAN JOURNAL OF SURGICAL ONCOLOGY 25:(6) pp. 633-634.  
(1999)
214. Sara AS, Ayala AG, el Naggar A, Ro JY, Raymond AK, Murray JA. 1990.  
Giant cell tumor of bone a clinicopathologic and DNA flow cytometric analysis.  
Cancer. 66:2186-2190
215. Sato K, Shimode Y, Itoi A, et al. Salivary duct carcinoma of the parotid gland  
presenting KIT (CD117) overexpression. Histopathology. 2007; 51(1):114-5.
216. Sawyer JR, Goosen LS, Binz RL et al. 2005. Evidence for telomeric fusions as  
a mechanism for recurring structural aberrations of chromosome 11 in giant cell tumor  
of bone. Cancer Gen Cytogen. 159:32-36
217. Schmidt H, Taubert H, Wurl P, Bache M, Bartel F, Holzhausen HJ, Hinze R.  
Cytogenetic characterization of six malignant peripheral nerve sheath tumors:  
comparison of karyotyping and comparative genomic hybridization. Cancer Genet  
Cytogenet 2001;128(1):14-23.
218. Schwartz HS, Eskew JD, Butler MG. 2002. Clonality studies in giant cell  
tumor of bone. J Orthop Res. 20: 387-390

219. Sciort R, Dorfman H, Brys P, Dal Cin P, DeWever I, Fletcher CD, et al. 2000. Cytogenetic–morphologic correlations in aneurysmal bone cyst, giant cell tumor of bone and combined lesions. A report from the CHAMP study group. *Mod Pathol.* 13:1206–1210
220. Shimomura A, Miyoshi Y, Taguchi T, et al. Association of loss of BRCA1 expression with centrosome aberration in human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135:421–430.
221. Siebenrock KA, Unni KK, Rock MG. 1998. Giant-cell tumour of bone metastasising to the lungs. A long-term follow-up. *J Bone Joint Surg.* 80-B: 43-47
222. Sihto H, Sarlomo-Rikalta M, Tynninen O, et al. KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha tyrosine kinase gene mutations and KIT amplifications in human solid tumors. *J Clin Oncol.* 2005; 23(1):49-57.
223. Spillane AJ, Ahern R, Judson IR, et al. Synovial sarcoma: a clinicopathologic, staging and prognostic assessment. *J Clin Oncol* 18:3794-3803, 2000.
224. Spurrell EL, Fisher C, Thomas JM, et al. Prognostic factors in advanced synovial sarcoma: an analysis of 104 patients treated at the Royal Marsden Hospital. *Ann Oncol* 16:437-444, 2005.
225. Subramanian S, West RB, Corless CL, et al: Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with KIT and PDGFRA mutations have distinct gene expression profiles. *Oncogene* 2004;23:7780-90.
226. Sugar J, Sapi Z Alveolar rhabdomyosarcoma. A case report. *ARCHIV FÜR GESCHWULSTFORSCHUNG* 58:(6) pp. 445-448. (1988)
227. Sugár J, Sági Z, Péter I The pathology of malignant fibrous histiocytoma. *ACTA ONCOLOGICA* 12: pp. 413-416. (1991)
228. Sugg SL, Ezzat S, Zheng L, et al. Cytoplasmic staining of erbB-2 but not mRNA levels correlates with differentiation in human thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49:629-637, 1998.
229. Sulyok Z, Sági Z, Rahóty P Malignus fibrosus histiocytoma az emlőben. *ORVOSI HETILAP* 130:(29) pp. 1557-1559. (1989)
230. Szendrői M, Kiss J, Antal I. 2003. Surgical treatment and prognostic factors in giant-cell tumor of bone. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 70(3): 142-150
231. Szendroi M. Giant-cell tumour of bone. *J Bone Joint Surg* 2004;86:5–12.
232. Takahashi R, Tanaka S, Hiyama T, et al: Hypoxia-inducible factor-1alpha expression and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach. *Oncol Rep* 2003;10:797-802.

233. Takeshita H, K. Kusuzaki, A. Kuzuhara, S. Ban, F. Yamashita, K. Sakakida, M. Kamachi and T. Ashihara, DNA cytofluorometric analysis of nerve sheath tumors, *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 59(8) (1985), 763–772.
234. Tarn C, Rink L, Merkel E, et al: Insulin-like growth factor 1 receptor is a potential therapeutic target for gastrointestinal stromal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:8387-92.
235. Thomas DG, Giordano TJ, Sanders D, et al. Expression of receptor tyrosine kinases epidermal growth factor receptor and HER-2/neu in synovial sarcoma. *Cancer* 103:830-838, 2005.
236. Tsuji Y, K. Kusuzaki, A. Kuzuhara, H. Murata, H. Takeshita, M. Hirata, S. Hashiguchi, Y. Hirasawa and T. Ashihara, DNA cytofluorometric analysis of benign and malignant nerve sheath tumors, *Anticancer Res.* 20(6C) (2000), 4691–4696.
237. Tomcsányi J, Papp L, Karlócai K, Naszlady A, Sápi Z Szokatlan manifesztációjú rhabdomyoma. *ORVOSI HETILAP* 133:(36) pp. 2297-2298. (1992)
238. Tornóczky T, Kálmán E, Hegedûs G, Horváth O P, Sápi Z, Antal L, Jáksó P, Pajor L High mitotic index associated with poor prognosis in gastrointestinal autonomic nerve tumour. *HISTOPATHOLOGY* 35:(2) pp. 121-128. (1999)
239. Tornóczky T, Kálmán E, Sápi Z, Orosz Z, Pajor L Cytogenetic abnormalities of alveolar soft-part sarcomas using interphase fluorescent in situ hybridization: Trisomy for chromosome 7 and monosomy for chromosomes 8 and 18 seem to be characteristic of the tumor. *VIRCHOWS ARCHIV-AN INTERNATIONAL JOURNAL OF PATHOLOGY* 438:(2) pp. 173-180. (2001)
240. Varanasi SS, Athanasou NA, Briceno I et al. 1999. Association of HLA-DRB1 alleles with giant cell tumour of bone. *J Clin Pathol.* 52(10):782-4.
241. Wakely PE, Kneisl JS. Soft tissue aspiration cytopathology. Diagnostic accuracy and limitations. *Cancer Cytopathol* 2000;90:292–298.
242. West RB, Corless CL, Chen X, et al. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol.* 2004;165(1):107-13.
243. Willen H, Akerman M, Carlen B. Fine needle aspiration (FNA) in the diagnosis of soft tissue tumours; a review of 22 years experience. *Cytopathology* 1995;6:236–247.
244. Yang Y, Ikezoe T, Nishioka C, et al: ZD6474 induces growth arrest and apoptosis of GIST-T1 cells, which is enhance by concomitant use of sunitinib. *Cancer Sci* 2006;97:1404-09.

245. Yang P, Hirose T, Hasegawa T, et al. Dual-color fluorescence in situ hybridization analysis of synovial sarcoma. *J Pathol* 1998;184:7–13.
246. Yang Y, Fruehauf J, Xiang S, et al. Genomic instability in precancerous lesions before inactivation of tumor suppressors p53 and APC in patients. *Cell Cycle* 2006;5:1443–1447.
247. Zhu MJ, Ou WB, Fletcher CD, et al: KIT oncoprotein interactions in gastrointestinal stromal tumors: therapeutic relevance. *Oncogene* 2007;26:6386-95.

## Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

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

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

## Sápi Zoltán közlemény jegyzéke (jóváhagyott MTMT szerint)

### 2010

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

### 2009

4. Zoltán Sápi, Zsolt Orosz, Zsuzsa Schaff (szerk.)  
Soft Tissue and Bone Pathology.: Technology Transfer In Diagnostic Pathology 4th Central European Regional Meeting.  
Eger, Magyarország, 2009.04.19-2009.04.21.  
IAP, 2009. 192 p.
5. Sápi Zoltán  
GIST Patológiai diagnosztika.  
In: Bodoky Gy, Kopper L (szerk.)  
Gasztroenterológiai onkológia.  
Budapest: Semmelweis Kiadó, 2009. pp. 387-391.  
(ISBN:978-963-06-7252-8)
6. Pápay J, Sápi Z, Egri G, Gyulai M, Szende B, Losonczy G, Tímár J, Moldvay J  
Platinum-based chemotherapy in lung cancer affects the expression of certain biomarkers including ERCC1.  
PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 15:(3) pp. 445-450. (2009)  
IF: 1.152



7. Moskovszky L, Szuhai K, Krenács T, Hogendoorn P C W, Szendroi M, Benassi M S, Kopper L, Füle T, Sápi Z  
Genomic instability in giant cell tumor of bone. A study of 52 cases using DNA ploidy, relocalization FISH, and array-CGH analysis.  
GENES CHROMOSOMES & CANCER 48:(6) pp. 468-479. (2009)  
IF: 3.858
8. Joó J G, Rigó J, Sápi Z, Timár B  
Foetal craniopharyngioma diagnosed by prenatal ultrasonography and confirmed by histopathological examination.  
PRENATAL DIAGNOSIS 29:(2) pp. 160-163. (2009)  
IF: 1.707

## 2008

9. Várkonyi J, Karádi I, Szocs K, Sugár I, Sápi Z, Marschalko M, Pállinger É, Darvas Z, Falus A  
Loss of histidine decarboxylase as a marker of malignant transformation and dedifferentiation of B-cells infiltrating the skin. A case report of a therapy-resistant multiple myeloma complicated by skin infiltration.  
ACTA ONCOLOGICA 47:(3) pp. 458-461. (2008)  
IF: 2.739
10. Pinter F, Papay J, Almasi A, Sapi Z, Szabo E, Kanya M, Tamasi A, Jori B, Varkondi E, Moldvay J, Szondy K, Keri G, Dominici M, Conte P, Eckhardt S, Kopper L, Schwab R, Petak I  
Epidermal growth factor receptor (EGFR) high gene copy number and activating mutations in lung adenocarcinomas are not consistently accompanied by positivity for EGFR protein by standard immunohistochemistry.  
JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS 10:(2) pp. 160-168. (2008)  
IF: 3.643
11. Molnár K, Karádi I, Sugár I, Sápi Z, Marschalkó M, Pállinger É, Darvas Z, Pócza P, Falus A, Vereczkei A, Várkonyi J  
Plasmacytic skin infiltration in multiple myeloma.: Myeloma multiplex kórlefolýása során megjelent plasmasejtes borinfiltráció.  
ORVOSI HETILAP 149:(19) pp. 877-881. (2008)
12. Lippai N, Füle T, Németh T, Benedek G, Mályi I, Pádi É, Sápi Z  
Keratin-positive gastrointestinal stromal tumor of the stomach mimicking gastric carcinoma: Diagnosis confirmed by c-kit mutation analysis.  
DIAGNOSTIC MOLECULAR PATHOLOGY 17:(4) pp. 241-244. (2008)  
IF: 1.770
13. Krenacs T, Balla P, Moskovszky L, Sapi Z, Ficsor L, Szendroi M, Kopper L, Benassi M, Picci P, Molnar B  
Digital microscopy-based TMA system for high-throughput biomarker analysis: EGFR

expression in giant cell tumor of bone (GCTB).  
HISTOPATHOLOGY 53: p. 976. (2008)

14. Kóbori L, Nagy P, Máthé Z, Hartmann E, Doros A, Paku S, Dezso K, Sági Z  
Malignant peripheral nerve sheath tumor of the liver: A case report.  
PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 14:(3) pp. 329-332. (2008)  
IF: 1.260
15. Balogh Z, Deák L, Sági Z  
Malignant myoepithelioma of soft tissue: a case report with cytogenetic findings.  
CANCER GENETICS AND CYTOGENETICS 183:(2) pp. 121-124. (2008)  
IF: 1.482

## 2007

16. Szendrői Miklós , Vízkeleti Tibor, Sági Zoltán (lektor) (szerk.)  
Csont-ízületi daganatok és daganatszerű elváltozások.  
pp. 1-367.  
Lektorok: Rahóty Pál, Sági Zoltán (2007)
17. Orosz Z, Sapi Z, Szentirmay Z, Timar J, Toth J  
Paradigmaváltás a daganatok patológiai diagnosztikájában: molekuláris alapú  
differenciáldiagnosztika, prognosztikus és prediktív patológia.: [Paradigm shift in surgical  
pathology of cancer: molecular diagnostics, prognosticators and predictive pathology]  
MAGYAR ONKOLÓGIA 51:(2) pp. 103-112. (2007)
18. Moskovszky L, Szendroi M, Sapi Z, Kopper L, Angeli V, Molnar B, Krenacs T  
EGFR signaling in giant cell tumor of bone (GCTB): An immunomorphological tissue  
microarray (TMA) study using digital slides and database management.  
VIRCHOWS ARCHIV-AN INTERNATIONAL JOURNAL OF PATHOLOGY 451:(2)  
p. 152. (2007)
19. Csomor J, Sinko J, Sapi Z, Rathonyi E, Timar B, Fekete S  
Mediastinal germ cell tumor and acute myeloid leukemia.  
BLOOD REVIEWS 21: p. S109. (2007)

## 2006

20. Sapi Z, Deak L, Balogh Z  
Myoepithelial carcinoma of soft tissue. A case report with cytogenetic findings.  
MODERN PATHOLOGY 19: p. 844. (2006)
21. Sági Z  
Langerhans-sejtes hisztiocytosis.  
In: Matolcsy A, Udvardy M, Kopper L (szerk.)  
Hematológiai betegségek atlasza: morfológia, citokémia, áramláscitometria,  
immunhisztokémia, citogenetika, molekuláris genetika.

Budapest: Medicina, 2006. pp. 350-352.  
(ISBN:963 226 026 0)

22. Sápi Z, Orosz Z  
Interdigitáló dendriticus sejtes sarcoma.  
In: Matolcsy A, Udvardy M, Kopper L (szerk.)  
Hematológiai betegségek atlasza: morfológia, citokémia, áramláscitometria, immunhisztokémia, citogenetika, molekuláris genetika.  
Budapest: Medicina, 2006. pp. 354-355.  
(ISBN:963 226 026 0)
23. Sápi Z  
Histiocytás sarcoma.  
In: Matolcsy A, Udvardy M, Kopper L (szerk.)  
Hematológiai betegségek atlasza: morfológia, citokémia, áramláscitometria, immunhisztokémia, citogenetika, molekuláris genetika.  
Budapest: Medicina, 2006. pp. 349-350.  
(ISBN:963 226 026 0)
24. Sápi Z, Orosz Z  
Follicularis dendriticus sejtes sarcoma.  
In: Matolcsy A, Udvardy M, Kopper L (szerk.)  
Hematológiai betegségek atlasza: morfológia, citokémia, áramláscitometria, immunhisztokémia, citogenetika, molekuláris genetika.  
Budapest: Medicina, 2006. pp. 352-354.  
(ISBN:963 226 026 0)
25. Orosz Z, Balázs D, Sápi Z, Tiszlavicz L, Tornóczky T  
Reclassification of gastrointestinal mesenchymal tumors.: Gastrointestinalis mesenchymalis daganatok újraosztályozása.  
MAGYAR ONKOLÓGIA 50:(4) pp. 287-292. (2006)
26. Mentzel T, Dei Tos A P, Sapi Z, Kutzner H  
Myopericytoma of skin and soft tissues: Clinicopathologic and immunohistochemical study of 54 cases.  
AMERICAN JOURNAL OF SURGICAL PATHOLOGY 30:(1) pp. 104-113. (2006)  
IF: 4.144
27. László Á, Ivaskevics K, Sápi Z  
Malignant epithelioid ovarian schwannoma: A case report.  
INTERNATIONAL JOURNAL OF GYNECOLOGICAL CANCER 16:(SUPPL. 1) pp. 360-362. (2006)  
IF: 1.469
28. Kovács R B, Sattar H A, Krausz T, Kas J, Berta M, Sápi Z  
Primary follicular dendritic cell sarcoma of the lung [4].  
HISTOPATHOLOGY 49:(4) pp. 431-433. (2006)  
IF: 3.216

29. Cserni G, Orosz Z, Kulka J, Sápi Z, Kálmán E, Bori R  
Divergences in diagnosing nodular breast lesions of noncarcinomatous nature.  
PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 12:(4) pp. 216-221. (2006)  
IF: 1.241

**2005**

30. Vas K, Hubay M, Tordai A, Andrikovics H, Sápi Z, Jánosi A  
Juvenile haemochromatosis presenting as intractable congestive heart failure.: Intractabilis szívélégtelenséget okozó juvenilis haemochromatosis.  
ORVOSI HETILAP 146:(51) pp. 2605-2608. (2005)
31. Sápi Z, Pápai Z, Hruska A, Antal I, Bodó M, Orosz Z  
Her-2 oncogene amplification, chromosome 17 and DNA ploidy status in synovial sarcoma.  
PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 11:(3) pp. 133-138. (2005)  
IF: 1.162
32. Sápi Z, Kovács R B, Bodó M  
Gastrointestinal tumors. Own observations on the basis of 29 cases.: Gastrointestinalis stromalis tumorok. Saját tapasztalatok 29 eset kapcsán.  
ORVOSI HETILAP 146:(18 SUPPL.1) pp. 916-922. (2005)
33. Orosz Z, Tornóczky T, Sápi Z  
Gastrointestinal stromal tumors: A clinicopathologic and immunohistochemical study of 136 cases.  
PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 11:(1) pp. 11-21. (2005)  
IF: 1.162
34. Mentzel T, Dei Tos AP, Sapi Z, Resnik K, Kutzner H  
Myopericytoma of skin and soft tissues: Clinicopathologic and immunohistochemical study of 52 cases.  
MODERN PATHOLOGY 18: p. 388. (2005)
35. Jánosi A, Andrikovics H, Vas K, Bors A, Hubay M, Sápi Z, Tordai A  
Homozygosity for a novel nonsense mutation (G66X) of the HJV gene causes severe juvenile hemochromatosis with fatal cardiomyopathy.  
BLOOD 105:(1) p. 432. (2005)  
IF: 10.131
36. Cremer C, Sapi Z, Hruska A  
DNA ploidy and chromosome (FISH) pattern analysis of peripheral nerve sheath tumors [2] (multiple letters).  
CELLULAR ONCOLOGY 27:(5-6) pp. 359-361. (2005)

**2004**

37. Tarján M, Sápi Z, Bentzik A, Cserni G  
Egy ritka uterus malignoma: adenosarcoma endometrii.  
LEGE ARTIS MEDICINAE 14:(8) pp. 598-600. (2004)
38. Sápi Z, Bodó M  
A férfi nemi szervek patológiája.  
In: Kopper L, Schaff Zs (szerk.)  
Patológia.  
Budapest: Medicina, 2004. pp. 1011-1038.  
1-2. kötet.  
(ISBN:963-242-920-6)
39. Orosz Zs, Vajda E, Sápi Z, Nagy A, Lantos Á, Appel J  
Desmoplasticus malignus mesothelioma esete.  
MEDICINA THORACALIS (BUDAPEST) 57:(2) pp. 62-67. (2004)
40. Kovács R B, Bollmann M, Speich N, Bollmann R, Bodó M, Sápi Z  
Measuring telomerase activity in various human tumors in routine histology and cytology.  
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE 13:(2) pp. 303-309.  
(2004)  
IF: 3.190
41. Hruska A, Bollmann R, Kovács R B, Bollmann M, Bodó M, Sápi Z  
DNA ploidy and chromosome (FISH) pattern analysis of peripheral nerve sheath tumors.  
CELLULAR ONCOLOGY 26:(5-6) pp. 335-345. (2004)  
IF: 3.053
42. Bohács A, Kocsis J, Somoskövi A, Mészáros Z, Sápi Z, Tamási L, Bártfai Z  
Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis in an immunocompromised patient.:  
Krónikus nekrotizáló pulmonalis aspergillosis csökkent immunitású betegben.  
ORVOSI HETILAP 145:(35) pp. 1811-1815. (2004)
43. Bohács A, Tamási L, Somoskövi Á, Mészáros Zs, Sápi Z, Bártfai Z  
A pleura benignus, szoliter, fibrosus tumora.  
LEGE ARTIS MEDICINAE 14:(11) pp. 780-785. (2004)
44. Bene L, Sapi Z, Bajtai A, Buzas E, Szentmihályi A, Arató A, Tulassay Z, Falus A  
Partial protection against dextran sodium sulphate induced colitis in histamine-deficient,  
histidine decarboxylase knockout mice.  
JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY AND NUTRITION 39: pp. 171-  
176. (2004)  
IF: 1.764

**2003**

45. Winkler G, Kiss S, Keszthelyi L, Sápi Z, Öry I, Salamon F, Kovács M, Vargha P,  
Szekeres O, Speer G, Karádi I, Sikter M, Kaszás E, Dworak O, Gerö G, Cseh K

Expression of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF- $\alpha$ , soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C-peptide level.

EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY 149:(2) pp. 129-135. (2003)

IF: 2.941

46. Révai T, Sápi Z, Benedek S, Kovács A, Kaszás I, Virányi M, Winkler G  
Súlyos fokú nephrosis szindróma kialakulása anabolikus szteroidot és kreatint tartósan szedő fiatal férfiban.

ORVOSI HETILAP 144:(49) pp. 2425-2427. (2003)

47. Kovács R B, Földes J, Winkler G, Bodó M, Sápi Z

The investigation of galectin-3 in diseases of the thyroid gland.

EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY 149:(5) pp. 449-453. (2003)

IF: 2.941

48. Eckhardt S, Pápai Z, Bodoky G, Horti J, Tamás K, Nagy T, Orosz Z, Sápi Z, Gödény M, Jakab K, Esik O, Trón L, Besznyák I

Az imatinibkezelés hatása gastrointestinalis stroma eredetű daganatokban.

ORVOSI HETILAP 144:(45) pp. 2207-2212. (2003)

## 2002

49. Sápi Z, Bodó M

FISH diagnostics.: FISH diagnosztika.

MAGYAR ONKOLÓGIA 46:(1) pp. 25-32. (2002)

50. Sápi Z, Antal I, Pápai Z, Szendrői M, Mayer Á, Jakab K, Pajor L, Bodó M

Diagnosis of soft tissue tumors by fine-needle aspiration with combined cytopathology and ancillary techniques.

DIAGNOSTIC CYTOPATHOLOGY 26:(4) pp. 232-242. (2002)

IF: 0.911

51. Sápi Z

Aspirációs citológia.

In: Eckhardt S (szerk.)

Tabularium oncologiae.

Budapest: Melania Kiadó, 2002. pp. 10-11.

(Tabularium,)

(ISBN:963-9106-45-3)

52. Pápai Z, Sapi Z, Antal I, Lang I, Szendroi M

The prognostic role of p53 supressor gene in the treatment of osteosarcomas.

INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER 16: p. 276. (2002)

53. Cserni G, Kovács R B, Tarján M, Sápi Z, Domján Z, Szabó Z

Sarcomatoid renal cell carcinoma with foci of chromophobe carcinoma.

PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 8:(2) pp. 142-144. (2002)

**2001**

54. Tornóczky T, Kálmán E, Sápi Z, Orosz Z, Pajor L  
Cytogenetic abnormalities of alveolar soft-part sarcomas using interphase fluorescent in situ hybridization: Trisomy for chromosome 7 and monosomy for chromosomes 8 and 18 seem to be characteristic of the tumor.  
VIRCHOWS ARCHIV-AN INTERNATIONAL JOURNAL OF PATHOLOGY 438:(2) pp. 173-180. (2001)  
IF: 1.709
55. Sike R, Székely G, Demeter P, Sápi Z  
Gastrointestinal manifestation of pyogenic granuloma.: A pyogen granuloma gastrointestinal megjelenése.  
LEGE ARTIS MEDICINAE 11:(5) pp. 356-359. (2001)
56. Sápi Z, Kovács R B, Bodó M  
Gastrointestinalis stromalis tumorok. Saját tapasztalatok 29 eset kapcsán.  
ORVOSI HETILAP 142:(45) pp. 2479-2485. (2001)
57. Márk Z, Sápi Z, Mészáros Z, Strausz J  
Ritka betegségek ritka társulása: Langerhans-sejtes histiocytosis és lymphangioliomyomatosis együttes előfordulása a tüdőben.  
ORVOSI HETILAP 142:(34) pp. 1851-1854. (2001)

**2000**

58. Zábó A, Bodó M, Sápi Z, Kovács R B, Baltschik M, Lintner F  
Életmentő (?) tubáris terhesség.  
MAGYAR NŐORVOSOK LAPJA 63: pp. 411-415. (2000)
59. Kovacs A, Sapi Z  
A prostata carcinoma korai diagnosisa es a prostata intraepithelialis neoplasia (PIN) gyakorisaga osztalyunk anyagaban.  
MAGYAR UROLÓGIA 12:(1) pp. 15-21. (2000)
60. Jermendy G, Nádás J, Sápi Z  
Humán inzulin okozta lipoatrophia.  
ORVOSI HETILAP 141:(44) pp. 2393-2396. (2000)
61. Jermendy G, Nadas J, Sapi Z  
'Lipoblastoma-like' lipoatrophy induced by human insulin: Morphological evidence for local dedifferentiation of adipocytes? [2].  
DIABETOLOGIA 43:(7) pp. 955-956. (2000)  
IF: 5.721
62. Herszenyi L, Farinati F, Plebani M, Istvan G, Carraro P, De Paoli M, Sapi Z, Cardin R, Naccarato R, Tulassay Z  
The prognostic impact of urokinase type plasminogen activator receptor in colorectal

cancer.

GASTROENTEROLOGY 118:(4) p. 2732. (2000)

63. Botos A, Sapi Z, Ostor G, Kovacs J  
Hugyholyag carcinosarcoma.  
MAGYAR UROLÓGIA 12:(2) pp. 145-148. (2000)
64. Bodó M, Sági Z, Kovács A, Romics I, Bostwick DG  
Új lehetőségek a prosztaták kórjóslatának morfológiai módszerek segítségével történő meghatározására.  
MAGYAR UROLÓGIA 3: pp. 249-254. (2000)
65. Antal I, Sági Z, Szendrői M  
Malignant transformation of a giant-cell tumor in the distal radius. The prognostic value of the DNA-cytophotometry.: Die maligne entartung eines riesenzelltumors am distalen radiusende. Wertigkeit der DNS-zytophotometrie.  
ORTHOPAED 29:(7) pp. 677-683. (2000)  
IF: 0.364
- 1999**
66. Tornóczky T, Kálmán E, Hegedűs G, Horváth O P, Sági Z, Antal L, Jáksó P, Pajor L  
High mitotic index associated with poor prognosis in gastrointestinal autonomic nerve tumour.  
HISTOPATHOLOGY 35:(2) pp. 121-128. (1999)  
IF: 1.900
67. Szilvás A, Székely G, Veress J, Sági Z, Bodó M, Blázovics A, Fehér J  
Helicobacter pylori előfordulása gastrooesophagealis daganatos megbetegedésekben.  
ORVOSI HETILAP 140:(19) pp. 1049-1052. (1999)
68. Sarkady E, Sági Z, Tóth V, Kiss S  
Warthin-like tumor of the thyroid- A case report.  
PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 5:(4) pp. 315-317. (1999)
69. Sági Z, Antal I, Túri A, Szendrői M, Bodó M  
Synovialis sarcoma kettős jelölésű fluorescens in situ hibridizációs vizsgálata.  
ORVOSI HETILAP 140:(48) pp. 2691-2694. (1999)
70. Sági Z, Szentirmay Z, Orosz Z  
Desmoplastic small round cell tumour of the pleura: A case report with further cytogenetic and ultrastructural evidence of 'mesothelioblastic' origin.  
EJSO-EUROPEAN JOURNAL OF SURGICAL ONCOLOGY 25:(6) pp. 633-634.(1999)  
IF: 1.098
71. Herszenyi L, Farinati F, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Istvan G, Sapi Z, Naccarato R, Tulassay Z



The role of urokinase type plasminogen activator receptor in colorectal cancer.  
GASTROENTEROLOGY 116:(4) p. G1846. (1999)

72. Herszényi L, Farinati F, Plebani M, István G, Sági Z, Carraro P, de Paoli M, Naccarato R, Tulassay Zs  
A cathepsinek és a plasminogen activator/inhibitor rendszer viselkedése colorectalis carcinomában.  
ORVOSI HETILAP 140:(33) pp. 1833-1836. (1999)
73. Bodó M, Sági Z, Kopper L  
Daganatpathologia.  
In: Szende B (szerk.)  
Pathológia.  
Budapest: Medicina Könyvkiadó, 1999. pp. 147-188.  
(ISBN:963-242-531-6)
74. Antal I, Sági Z, Szendrői M  
The prognostic significance of DNA cytophotometry and proliferation index (Ki-67) in giant cell tumors of bone.  
INTERNATIONAL ORTHOPAEDICS 23:(6) pp. 315-319. (1999)  
IF: 0.378

## 1998

75. Zábó A, Barócsai Gy, Bodó M, Sági Z, Siket F, Ondrejka P  
Három eset kapcsán az epecitológiáról.  
MAGYAR SEBÉSZET 51: pp. 207-210. (1998)
76. Tóth V, Szerján E, Sági Z, Bodó M  
Mammográfiás emlőszűrés pathológiája. Javaslat egységes szövettani leletező forma alkalmazására.  
MAGYAR ONKOLÓGIA 42: pp. 125-127. (1998)
77. Szerján E, Tóth V, Sági Z, Bodó M  
Mammográfiás emlőszűrés citopatológiája. Javaslat egységes citológiai besorolásra.  
MAGYAR ONKOLÓGIA 42: pp. 15-18. (1998)
78. Ondrejka P, Faller J, Sapi Z, Sugar I  
Mesenteric panniculitis spreading to the pancreas simulating pancreatic neoplasm.  
ENDOSCOPY 30:(8) pp. S94-S95. (1998)  
IF: 1.634 WoS link
79. Hertelendy A, Szigeti Z, Reichard L, Marek P, Sági Z  
Kearns-Sayre syndrome.: Kearns-Sayre-szindróma.  
ORVOSI HETILAP 139:(32) pp. 1913-1916. (1998)
80. Antal I, Sági Z, Szendrői M  
Radius distalis végéből kiinduló osteoclastoma malignus transzformációja.

MAGYAR TRAUMATOLÓGIA ORTHOPAEDIA ÉS HELYREÁLLÍTÓ SEBÉSZET 2:  
pp. 181-188. (1998)

**1997**

81. Winkler G, Sápi Z, Pál B, Molnár L  
Injection-site skin lesions following pen-injection treatment in a 59-year-old woman with insulin-treated type 2 diabetes mellitus.  
DIABETIC MEDICINE 14:(12) pp. 1078-1079. (1997)  
IF: 1.601
82. Vadász G, Sápi Z, Erdei M, Lövey Gy, Bodó M  
Spontaneously curing anaplastic carcinoma in lymph node.  
PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 3:(2) pp. 139-141. (1997)
83. Gábor Zs, Sápi Z, Szloboda J  
Ossificalo fibromyxoid tumor esete.  
ORVOSI HETILAP 138:(27) pp. 1755-1757. (1997)
84. Fónyad G, Rosta A, Tóth E K, Szaleczky E, Katona C, Sápi Z, Ungár L, Poller I  
Merkel-sejtes daganat.  
ORVOSI HETILAP 138:(26) pp. 1695-1697. (1997)
85. Cserhalmi P B, Horvath A, Boros V, Sapi Z, Kormendi M, Christiano A M, Karpati S  
Identification of the LAMB3 hotspot mutation R635X in a Hungarian case of Herlitz junctional epidermolysis bullosa.  
EXPERIMENTAL DERMATOLOGY 6:(2) pp. 70-74. (1997)
86. Bene L, Sápi Z, Székely G, Bodó M  
Aspirációs cytologia a gastroenterológiai endoscopyában.  
ORVOSI HETILAP 138:(5) pp. 277-279. (1997)

**1996**

87. Solymosi T, Tóth V, Sápi Z, Bodó M, Gál I, Csanádi L  
Diagnostic value of AgNOR method in thyroid cytopathology: Correlation with morphometric measurements.  
DIAGNOSTIC CYTOPATHOLOGY 14:(2) pp. 140-144. (1996)  
IF: 0.903
88. Kovacs T, Orosz Z, Sapi Z, Besznyak I  
A cseplez multiplex fibrosus pseudotumora.  
ORVOSI HETILAP 137:(42) pp. 2317-2319. (1996)

**1995**

89. Sági Z, Szapanidisz J, Tóth B, Bodrogi I  
DNA ploidy pattern in pure seminomas.  
PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 1:(1) pp. 71-74. (1995)
90. Sapi Z, Lukacs G, Sztan M, Papp J, Olah E  
Contribution of p53 gene alterations to development of metastatic forms of follicular thyroid carcinoma.  
DIAGNOSTIC MOLECULAR PATHOLOGY 4:(4) pp. 256-260. (1995)  
IF: 2.880
91. Krivacsy G, Bosze P, Krasznai G, Sapi Z, Keller E, Ungar L, Bodo M  
Primary rhabdomyosarcoma of the vagina.: A HUVELY ELSODLEGES  
RHABDOMYOSARCOMAJA  
MAGYAR NŐORVOSOK LAPJA 58:(4) pp. 317-319. (1995)
92. Gonda G, Sági Z, Köves I, Péter I  
Cutaneous meningioma.  
ACTA ONCOLOGICA 16: pp. 107-112. (1995)  
IF: 0.957
93. Baksa J, Sági Z, Kristóf M, Vadász G, Ferencz T  
An unusual case of doubly localized teratoma in childhood.  
PEDIATRIC SURGERY INTERNATIONAL 2: pp. 116-120. (1995)  
IF: 0.152

**1994**

94. Sapi Z, Bodo M, Vadasz G, Henson D E, Haas G P  
The increasing incidence of prostate cancer in Hungary.  
IN VIVO 8:(3) pp. 433-436. (1994)
95. Pete I, Sági Z, Gonda G  
A Langerhans-sejtek szerepe a méhnyakrák kialakulásában.  
LEGE ARTIS MEDICINAE 4:(8) pp. 710-717. (1994)
96. Hardt N S, Hendricks J B, Sapi Z, Tykochinsky G, Wilkinson E J, Epstein H B, Wajsman Z  
Ploidy results in prostatic carcinoma vary with sampling method and with cytometric technique.  
MODERN PATHOLOGY 7:(1) pp. 44-48. (1994)  
IF: 2.272

**1993**

97. Tóth J, Sági Z  
Az emlőrák prognózisát befolyásoló markerek.  
LEGE ARTIS MEDICINAE 3: pp. 220-223. (1993)
98. Sapi Z, Hendricks J B, Pharis P G, Wilkinson E J  
Tissue section image analysis of breast neoplasms: Evidence of false Aneuploidy.  
AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY 99:(6) pp. 714-720. (1993)  
IF: 2.318
99. Orosz Zs, Sapi Z, Szentirmay Z  
Unusual benign neurogenic soft tissue tumour: Epithelioid schwannoma or an ossifying fibromyxoid tumour?  
PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE 189:(5) pp. 601-607. (1993)  
IF: 0.731
100. Hendricks J B, Wilkinson E J, Pharis P G, Sapi Z, Braylan R C  
Quantitative morphologic assessment of nuclei extracted from paraffin for DNA flow cytometry.  
MODERN PATHOLOGY 6:(5) pp. 565-569. (1993)  
IF: 1.976
- 1992**
101. Tóth V, Kummert M, Bodó M, Sági Z, Bak M  
A képanalízis lehetősége a szövettani diagnosztikában.  
MAGYAR ONKOLÓGIA 41: pp. 65-70. (1992)
102. Tomcsányi J, Papp L, Karlócai K, Naszlady A, Sági Z  
Szokatlan manifesztációjú rhabdomyoma.  
ORVOSI HETILAP 133:(36) pp. 2297-2298. (1992)
103. Sapi Z, Papp I, Bodo M  
Malignant fibrous histiocytoma of the esophagus: Report of a case with cytologic, immunohistologic and ultrastructural studies.  
ACTA CYTOLOGICA 36:(2) pp. 121-125. (1992)  
IF: 0.720
104. Sági Z, Csanaky Gy, Kálmán A  
A gyomor plexosarcomája. Esetismertetés immunhisztokémiai, DNS-tartalom és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal.  
MAGYAR ONKOLÓGIA 36: pp. 31-36. (1992)
105. Molnár B, Sági Z, Meggyesi J, Sugár J, Bodó M, Fehér J  
Quantitativ morfo- és densitometriai paraméterek az emlő aspirációs citológiai keneteinek kiértékelésében.  
ORVOSI HETILAP 133:(8) pp. 487-491. (1992)
106. Bánfalvi T, Sági Z, Kiskőszegi A  
Spinaliomás betegeink kezelése-gondozása kapcsán szerzett tapasztalataink.  
MAGYAR ONKOLÓGIA 46: pp. 208-218. (1992)

107. Abonyi J, Juhasz E, Szaloky P, Halmos T, Besznyak I, Sapi Z, Bodo M  
Doege--Potter-syndroma. Multicentrikus lokalizációjú, hypoglycaemiát okozó fibrosus mesothelioma.  
ORVOSI HETILAP 133:(30) pp. 1899-1903. (1992)

**1991**

108. Takáts R, Albrecht M, Fosse G, Sápi Z, Bánóczy J  
A fogzománc keménységének vizsgálata in vivo módszerrel.  
FOGORVOSI SZEMLE 84:(5) pp. 145-148. (1991)
109. Sugár J, Sápi Z, Péter I  
The pathology of malignant fibrous histiocytoma.  
ACTA ONCOLOGICA 12: pp. 413-416. (1991)  
IF: 0.769
110. Sápi Zoltán  
Nyirokcsomó citológia.  
In: Bodó M (szerk.)  
Citodiagnosztika  
Budapest: ETI, 1991. pp. 285-287.  
1-2. kötet.
111. Sápi Zoltán  
Endometrium citológia.  
In: Bodó M (szerk.)  
Citodiagnosztika.  
Budapest: ETI, 1991. pp. 176-181.  
1-2. kötet.
112. Sápi Z, Péter I  
The significance of immunocytochemistry and image analysis in the histological diagnosis of soft tissue tumours.  
ACTA ONCOLOGICA 12: pp. 417-422. (1991)  
IF: 0.769
113. Sápi Z  
Szövettan.  
In: Bodó M (szerk.)  
Citodiagnosztika.  
Budapest: ETI, 1991. pp. 69-74.  
1-2. kötet.
114. Sápi Z, Bodó M, Sugár J  
Nucleolar organizer regions in soft tissue tumours.  
ACTA MORPHOLOGICA HUNGARICA 39:(1) pp. 59-70. (1991)

115. Gonda G, Sápi Z, Tóth L  
A pajzsmirigy adenolipomája.  
MAGYAR ONKOLÓGIA 35: pp. 169-171. (1991)
116. Farkas E, Köves I, Besznyák I, Sápi Z, Sulyok Z  
Leiomyosarcoma férfi emlőben.  
ORVOSI HETILAP 132:(27) pp. 1489-1491. (1991)
117. Bodó M, Sápi Z, Szerján E  
Cytological differential diagnostic possibilities in soft tissue tumours.  
ACTA ONCOLOGICA 12: pp. 433-435. (1991)  
IF: 0.769
118. Albrecht M, Takáts R, Fosse G, Sápi Z, Bánóczy J  
Diabetes mellitusos betegek fogzománckeménységének vizsgálata [Dental enamel hardness tests in diabetics].  
FOGORVOSI SZEMLE 84:(12) pp. 363-366. (1991)
- 1990**
119. Trizna Z, Radó J, Forrai G, Tóth B, Sápi Z, Bánhidly F  
Lipomatosis részjelenségeként észlelt gégelipoma.  
ORVOSI HETILAP 131:(38) pp. 2091-2092. (1990)
120. Sapi Z, Bodo M, Megyesi J, Rahoty P  
Fine needle aspiration cytology of biphasic synovial sarcoma of soft tissue. Report of a case with ultrastructural, immunohistologic and cytophotometric studies.  
ACTA CYTOLOGICA 34:(1) pp. 69-73. (1990)  
IF: 0.970
121. Sapi Z, Svastics E  
Adult Wilms' tumour. A case report with immunohistochemical studies.  
ACTA MORPHOLOGICA HUNGARICA 38:(1) pp. 55-60. (1990)
122. Gábor Zs, Szabó Gy, Sápi Z  
Kollisiós tumor neuroendokrin komponenssel: a colon rosszindulatú adenocarcinoid daganata.  
MAGYAR ONKOLÓGIA 34: pp. 131-135. (1990)
- 1989**
123. Sulyok Z, Sápi Z, Rahóty P  
Malignus fibrosus histiocytoma az emlőben. [Malignant fibrous histiocytoma of the breast].  
ORVOSI HETILAP 130:(29) pp. 1557-1559. (1989)

124. Sapi Z, Megyesi J, Besznyak I, Sugar J  
Extraspinal ependymoma in the sacrocygeal region. A case report with ultrastructural, immunohistochemical and cytophotometric studies.  
VIRCHOWS ARCHIV A-PATHOLOGICAL ANATOMY AND HISTOLOGY 415:(3) pp. 293-296. (1989)  
IF: 2.047
125. Sapi Z, Bodo M, Sugar J  
DNA cytometry of soft tissue tumours with TV image-analysis system.  
PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE 185:(3) pp. 363-367. (1989)  
IF: 0.948
126. Sapi Z, Bodo M, Sugár J  
69 lagyresztumor DNS-tartalmanak mérése Robotron TV kepanalizatorral.  
MAGYAR ONKOLOGIA 33: pp. 61-67. (1989)  
**1988**
127. Sugar J, Sapi Z  
Alveolar rhabdomyosarcoma. A case report.  
ARCHIV FÜR GESCHWULSTFORSCHUNG 58:(6) pp. 445-448. (1988)
128. Sapi Z, Péter I, Bodo M, Polus K, Sugár J  
Okkult pajzsmirigyrak aspirációs cytologiaval igazolt metasztazisa [Metastasis from a latent thyroid cancer diagnosed by aspiration cytology].  
MORPHOLOGIAI ÉS IGAZSAGUGYI ORVOSI SZEMLE 28:(2) pp. 111-115. (1988)
129. Sapi Z, Sugar J, Szentirmay Z  
Nodular fascitis. A case report with cytophotometric study.  
ARCHIV FÜR GESCHWULSTFORSCHUNG 58:(6) pp. 449-453. (1988)
130. Sapi Z, Sugar J, Koves I  
Malignant giant cell tumour of soft tissues. A case report.  
ARCHIV FÜR GESCHWULSTFORSCHUNG 58:(6) pp. 455-459. (1988)
131. Sapi Z, Péter I, Bodo M, Sugár J  
Immunoperoxidaz reakciók elozoleg hematoxilin-eozinnal festett aspirációs citológiai keneteken [Immunoperoxidase reactions in cytological aspiration smears previously stained with hematoxylin-eosin].  
MORPHOLOGIAI ÉS IGAZSAGUGYI ORVOSI SZEMLE 28:(4) pp. 308-311. (1988)
132. Nagy Cs, Hetényi G, Pahoki A, Krutsay G, Sápi Z  
Helyreállító ermuteteket követő heterotóp ossificatio.  
MAGYAR SEBÉSZET 41: pp. 317-321. (1988)
- 1986**
133. Sápi Z, Simon J, Király L  
Letális kimenetelű immunhiány-szindróma testverparban.  
GYERMEKGYOGYASZAT 37: pp. 540-544. (1986)

## Tudományos közlemények áttekintő adatai (jóváhagyott MTMT szerint)

	közlemény (független / összes idézet)	magyar nyelvű	első szerzőként	utolsó szerzőként	egyetlen szerzőként
<b>Összes tudományos közlemény</b>	<b>126 (423/453)</b>	<b>56</b>	<b>30</b>	<b>21</b>	<b>3</b>
Könyv szerzőként (monográfia, szakkönyv, lexikon vagy kézikönyv)	0 (0/0)	0	0	0	0
Könyvszerkesztés	1 (0/0)	0	1	0	0
Könyvrész, könyvfejezet (monográfia, szakkönyv, lexikon, kézikönyv vagy tanulmány)	5 (0/0)	5	2	0	3
Folyóiratcikk (teljes, IF-es vagy lektoráltnak jelzett cikk)	109 (422/452)	49	25	21	0
Konferenciacikk (min. 4 oldal)	0 (0/0)	0	0	0	0
Absztrakt	0 (0/0)	0	0	0	0
Szabadalom	0 (0/0)	0	0	0	0
További tudományos közlemények	11 (1/1)	2	2	0	0
<b>Összegzett impakt faktor (IF) /Teljes cikkek / hiányos cikkek / várható IF</b>	<b>98.362/88.522/5.434/4.406</b>				
Összes idézet tudományos közleményekre	453				
Független idézet tudományos közleményekre	423				
Hirsch-index: "klasszikus", a függő idézeteket beleszámolva / csak független idézetekből számolva	10/10				