

A neuroendokrin tüdődaganatok heterogenitása

Doktori értekezés

Dr. Csende Kristóf

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola

Rácz Károly Konzervatív Orvostudományi Tagozat



Témavezető: Dr. Megyesfalvi Zsolt, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Piros László Ph.D.
Dr. Buzás András Ph.D.

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Müller Veronika D.Sc.

Tagok: Prof. Dr. Szabó Attila D.Sc

Prof. Dr. Lakatos Péter D.Sc

Budapest
2025

1. Bevezetés

2022-ben is a tüdőrák vezette a daganatos halálozási okokat, világszerte összesen 1,8 millió halálesettel. Ez a betegség az összes daganattípus halálozásának 18,7%-át teszi ki. Kevesen tudják, hogy Európában a daganatos megbetegedések az anyai árvaság második leggyakoribb okai közé tartoznak (11–18%). Egy szülő elvesztése mély és maradandó hatással van mind a gyermekre, mind a társadalomra. A tüdő neuroendokrin neopláziái heterogén csoportot alkotnak, altípusaik számos patológiai jellemzőben különböznek. Egyik típusuk, a kissejtes tüdőrák (SCLC), neuroendokrin (NE) malignitásként ismert. Ötéves túlélési aránya alig éri el a 10%-ot, így az egyik legrosszabb prognózisú rosszindulatú betegségnek számít. A klinikai gyakorlatban az SCLC-t jelenleg többnyire egységes betegségként kezelik. Ugyanakkor a legújabb preklinikai eredmények rámutattak, hogy a mögöttes molekuláris heterogenitás alapján több fő típus különíthető el: a High-NE (magas NE) és Low-NE (alacsony NE) fenotípusok. A további biológiai altípusok transzkripciós faktorok expresszióján alapulnak: az Achaete-Scute Homologue 1 (ASCL1) által meghatározott SCLC-A altípus, a Neurogenic Differentiation Factor 1 (NEUROD1) által meghatározott SCLC-N altípus, a

POU class 2 homeobox 3 (POU2F3) által meghatározott
SCLC-P altípus, valamint egy negyedik, SCLC-I altípus.

2. Célkitűzések

Első

vizsgálat:

A SCLC térbeli heterogenitásának vizsgálata a primer tumorok (PT) és a hozzájuk tartozó nyirokcsomó-metasztázisok (NyM-ok) molekuláris és sejtszintű eltéréseinek feltérképezésével.

Etikai engedély: ETT-TUKEB; 7214-1/2016/EKU.

Második

vizsgálat:

A neuroendokrin tüdődaganatok (SCLC, nagysejtes neuroendokrin carcinoma LCNEC, atípusos karcinoid AC) immunológiai mintázatának feltárása immunhisztokémiai módszerekkel.

Etikai engedélyek: ETT-TUKEB: 39249–2/2019/EKU és 52614–4/

3. Módszerek

Első fázisban a molekuláris vizsgálatokhoz feldolgoztuk a PT-ból és a hozzájuk tartozó NyM-ból származó szövetmintákat. Az RNS-expresszió meghatározására a HTG EdgeSeq Targeted Oncology Biomarker Panelt használtuk (HTG Molecular Diagnostics Inc., Tucson, AZ, USA), amely a daganat biológiához kapcsolódó 2 560 gén egyidejű, kvantitatív detektálását teszi lehetővé. A vizsgálat érvényességét megfelelő pozitív és negatív kontrollokkal igazoltuk. A beválasztást megelőzően minden hematoxinil-eozinnal (H&E) festett metszetet egy szakképzett patológus revideálta. A régebbi blokkok minőségbiztosítását korábbi vizsgálatok keretében, diagnosztikus antitestekkel végzett megerősítő IHC-festésekkel biztosítottuk. A szöveti microarray (TMA)-ket a Coloradói Egyetemen (Denver/Aurora, CO, USA) készítették. Minden donorblokkból két, 1 mm átmérőjű szövethengert vettünk, és orientáltan paraffin-fogadó blokkokba helyeztük (MP10 1,0 mm-es punch, manuális TMA-instrumentum; Beecher Instruments). A hengereket a H&E-n kijelölt, legéletképesebb tumorterületekből emeltük ki. Az altípus jelölők (ASCL1, NEUROD1, POU2F3, YAP1) mellett a következő, klinikailag releváns fehérjék expresszióját is értékeltük: CD47, c-MYC, L-MYC, DLL3 (delta-like ligand 3), EZH2, LSD1, mTOR, PD-L1

és PI3K. Az IHC-festés során az antitest protokollnak megfelelően a 4 µm vastag metszeteket a paraffin tisztítása és rehidratálást követően 20 percig hevítettük 10 mM citrátpufferben (pH 6,0) vagy 10 mM Tris-EDTA pufferben (pH 9,0). A tárgylemezeket 0,3% H₂O₂ oldattal inkubáltuk. A jel erősítését a gyártó ajánlása szerint a Novolink™ Polymer Detection System kittel végeztük (Leica Biosystems, RE7150-K; Wetzlar, Germany), ezt követte az elsődleges antitesttel való, 1 órás szobahőmérsékletű inkubálás. A kötődést az ImmPACT DAB (3,3'-diaminobenzidin) szubsztrátkittel detektáltuk (Vector Laboratories, NC9567138; Newark, CA, USA), a magfestést hematoxilinnel végeztük. Valamennyi antitestet megfelelő szöveti kontrollokkal validáltunk. A H&E-festett és IHC-jelölt metszeteket PANNORAMIC 250 Flash III szkennelvel digitalizáltuk (3DHISTECH Ltd., Budapest, Magyarország), az értékelést CaseViewer 2.4 szoftverrel végeztük (3DHISTECH Ltd.). Az egyes markerek expresszióját klinikai adatok ismerete nélkül két gyakorlott, egymástól független patológus bírálta el. Továbbá festődési indexet határoztunk meg (a pozitív tumorsejtek aránya az összes tumorsejthez viszonyítva). Második fázisban sebészi úton eltávolított tüdő eredetű neuroendokrin tumorszöveteket vizsgáltunk. Az értékelést rutin diagnosztikai protokoll szerint

végeztük, kiegészítve (IHC) az alábbi markerekre: Chromogranin A, Szinaptofizin (Synaptophysin), CD56, Szintaxin (Syntaxin) és Ki-67. A diagnosztikai pontosság biztosítására és a kevert hisztológiai esetek kizárása érdekében valamennyi H&E-metszet független újraértékelésen esett át a beválasztás előtt. A szövettani metszeteket 15 potenciális immunterápiás célpontra alkalmas immunológiai markerre elemeztük: PD-L1, PD-1, CD3, CD4, CD8, CD27, CD47, indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO), inducible T-cell co-stimulator (ICOS), CD70, CD137, CD40, CD94/NK-csoport 2A (NKG2A), lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3) és OX40 (tumornekrózisfaktor-receptor szupercsalád, 4. tag). A metszetek paraffin tisztítása és rehidratálása után 20 percig 3% H₂O₂ oldattal kezeltük. Ezt követően a mintákat a gyártói útmutatónak megfelelően 40 percre 98 °C-ra hevítettük 10 mM citrátpufferben (pH 6,0) vagy 10 mM Tris-EDTA pufferben (pH 9,0). A tárgylemezeket elsőnek 5 percig inkubáltuk Ultra V reagenssel. Ezt követően az elsődleges antitestek hozzáadása után 4 °C-on még egy éjszakát kellett inkubálnunk. Az immunreakciók vizualizálását UltraVision LP detekciós rendszerrel végeztük, DAB kifejtéssel, amit H&E ellenfestés követett. A patológiai kiértékelés során két patológus egymástól függetlenül, 20× és 40× nagyításon, tíz véletlenszerűen

kiválasztott látómező átlagos pozitívsejt-arányát számította. Amennyiben a pontszámok >20%-kal eltértek, a metszeteket egy harmadik patológus bírálta felül. A pontozást külön végeztük a tumor- és immunsejt-kompartmentre. A pozitív sejtek arányát a teljes tumorsejt-, illetve immunsejt-populációhoz viszonyítva is kiszámítottuk, beleértve az egyes minták teljes immuninfiltrátumának mértékét.

4. Eredmények

Az első vizsgálatban 32, sebészi úton eltávolított, hisztológiailag igazolt SCLC-os beteget vontunk be. A betegek medián életkora 58 év volt (tartomány: 34–78 év), közülük 22 férfi. A betegpopuláció mind kaukázusi származású volt. A medián teljes túlélés 20,7 hónap, míg a medián betegségmentes túlélés 14,9 hónap volt. A fehérjeszintű expressziós mintázatok vizsgálatát IHC módszerrel végeztük. A DLL3 expressziója szignifikánsan magasabb volt a primer PT-ban, mint a hozzátartozó NyM-ban ($p = 0,008$). Ezzel szemben a NEUROD1 expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a PT-ban a NyM-hoz viszonyítva ($p < 0,001$). Továbbá, szignifikánsnak nem tekinthető eredményként elmondható, hogy a CD47, LSD1, mTOR és POU2F3 expressziója magasabb, míg a c-MYC expressziója csökkent volt a PT-ban. A szubtypus-meghatározó fehérjék differenciális expressziója alapján összesen öt fő SCLC-altípust sikerült azonosítani: SCLC-A; SCLC-AN; SCLC-N; SCLC-P; SCLC-QN. A minták 61%-a NE fenotípust mutatott, amely a SCLC-A, SCLC-AN és SCLC-N altípusokat foglalta magában. Ezután megvizsgáltuk, hogy a PT-ok altípusa megegyezik-e a hozzájuk tartozó NyM-ok altípusával, vagy kimutathatók-e eltérések az altípust

meghatározó fehérjék expressziójában. Az elemzés kimutatta, hogy az áttétek gyakran különböznek a kiindulási tumoroktól. Molekuláris altípusváltás 21 esetben volt megfigyelhető: SCLC-QN $\rightarrow$ SCLC-AN (n = 5) vagy SCLC-N (n = 5) SCLC-A $\rightarrow$ SCLC-AN (n = 4), SCLC-N (n = 1), vagy SCLC-QN (n = 3). A SCLC-AN altípusú primer tumorok többsége megtartotta altípusát az áttétképzés során, mindössze egy eset váltott SCLC-N-re. Érdekeség, hogy egyik PT sem volt SCLC-N altípusú, ugyanakkor ez az altípus volt a második leggyakoribb a NyM-ok között. Mindkét SCLC-P altípusú PT SCLC-N altípusra váltott a NyM-ban. A második vizsgálat során az egyes immunmarkerek esetében a betegek két csoportba kerültek besorolásra a tumorszöveti expresszió medián értéke alapján: alacsony és magas expressziós csoportba soroltuk be őket. A Kaplan–Meier-analízis a tumorsejtek esetében magas CD47-expressziónál rosszabb prognózist mutatott, míg a magas CD40-expressziónál jobb túlélési eredményeket láttunk. Az immunsejtekben mért immunmarkerek közül a CD137 magas expressziója szignifikáns összefüggést mutatott a hosszabb túléléssel. Ezzel szemben a magas ICOS-expresszió esetén a túlélés rosszabbnak bizonyult. A CD8 és LAG3 markerek esetében szignifikáns eltérést nem találtunk. Amikor külön elemeztük a SCLC- és a LCNEC-eseteket, a daganatsejtekben

mért immunmarker-expressziók egyike sem befolyásolta szignifikánsan a túlélést. Ugyanakkor az immunsejtekben mért expressziók esetén több marker is szignifikáns összefüggést mutatott a túléléssel. Ezek közé tartozott a PD-1 ($p = 0,048$), CD27 ($p = 0,0043$), LAG3 ($p = 0,023$), CD4 ($p = 0,059$), CD137 ($p = 0,064$), valamint az immunsejt-infiltráció mértéke ($p = 0,021$).

5. Következtetések

Első vizsgálat:

-Az RNA-profilok nem mutattak lényeges különbséget a primer tumorok és a nyirokcsomó-áttétek között, viszont az IHC-vizsgálat jelentős eltéréseket tárt fel.

-A DLL3-expresszió szignifikánsan magasabb volt a primer tumorokban, míg a NEUROD1-expresszió szignifikánsan alacsonyabb volt a nyirokcsomó metasztázisokban.

-A primer tumorok és a hozzájuk tartozó nyirokcsomó metasztázisok között 21 esetben történt molekuláris altípus váltást.

Második vizsgálat:

-Magas CD40- és CD137-expresszió jobb túléléssel társult.

-Magas CD47- és ICOS-expresszió rosszabb prognózt jelentett.

-Az LCNEC és SCLC alcsoportokra fókuszálva az idősebb életkor és a vaszkuláris invázió jelenléte szignifikánsan rosszabb túléléssel járt együtt.

-Elemzéseink megerősítették az életkor kulcsfontosságú szerepét a prognózisban.

6. Saját publikációk jegyzéke

Disszertációhoz kapcsolódó publikációk

Csende K, Ferencz B, Boettiger K, Pozonec M D, Lantos A, Ferenczy A, Pipek O, Solta A, Ernhofer B, Laszlo V, Megyesfalvi E, Schelch K, Pozonec V, Skarda J, Skopelidou V, Lohinai Z, Lang C, Horvath Lilla, Dezso K, Fillinger J, Renyi-Vamos F, Aigner C, Dome B, Megyesfalvi Z

Comparative profiling of surgically resected primary tumors and their lymph node metastases in small-cell lung cancer

ESMO OPEN 10 : 4 Paper: 104514 , 10 p. (2025)

IF: 8,3

Ferencz Bence, Megyesfalvi Zsolt, **Csende Kristóf**, Fillinger János, Poór Valentin, Lantos András, Pipek Orsolya, Sólyom-Tisza Anna, Rényi-Vámos Ferenc, Schelch Karin, Lang Christian, Schwndenwein Anna, Boettiger Kristiina, László Viktória, Hoetzenecker Konrad, Döme Balázs, Berta Judit

Comparative expression analysis of immune-related markers in surgically resected lung neuroendocrine neoplasms

LUNG CANCER 181 Paper: 107263, 14 p. (2023)

IF: 4,5