

A sejtes mikro környezet szerepe a follicularis lymphoma csontvelői terjedésében

Doktori értekezés

Dr. Rajnai Hajnalka

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Matolcsy András egyetemi tanár, Ph.D., D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Erdélyi Dániel egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Kajtár Béla egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina egyetemi tanár, Ph.D.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Csóka Mónika egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Mikala Gábor, főorvos, Ph.D.

Budapest
2013

I. BEVEZETÉS

A follicularis lymphoma egy indolens, alacsony malignitású B-sejtes non-Hodgkin lymphoma (NHL), mely Európában és Észak-Amerikában az összes NHL körülbelül 20%-át teszi ki. Az esetek megközelítőleg 85-90%-ban kimutatható a t(14;18)(q32;q21) transzlokáció, amely során a 18-as kromoszómán elhelyezkedő BCL2 gén a 14-es kromoszómán található Ig nehézlánc génhez kapcsolódik. A follicularis lymphoma kialakulásának hátterében álló t(14;18) Bcl-2/IgH transzlokáció a VDJ rekombináció hibájának a következménye, melynek következtében a Bcl-2 antiapoptotikus protein overexpressziója jön létre. A follicularis lymphoma morfológiai, fenotípusos és molekuláris sajátosságai emlékeztetnek a secunder lymphoid folliculusok normál centrum germinativumaira, amely a felveti a lymphoma sejtek centrum germinativum B-sejt eredetét. A neoplasticus folliculusok a normál centrum germinativumokhoz hasonlóan számos reaktív sejtípust tartalmaznak, úgymint különböző T-lymphocyta szubtypusokat, macrophágokat és follicularis dendritikus sejteket (FDC). In vitro vizsgálatok alapján az apoptózis jelátviteli útvonalának károsodása ellenére a lymphoma sejtek nem tenyészthetőek. A lymphoma sejtek proliferációjához szükséges sejt-sejt kapcsolat a T-sejtekkel és az FDC-vel. IL-2 illetve IL-4 szekretáló CD4+ helper T-sejtekkel együtt tenyésztve a lymphoma sejtek fokozott proliferációt mutatnak. Dave és munkatársai prognosztikai markereket keresve génexpressziós vizsgálatot végeztek follicularis lymphomában szenvedő betegek nyirokcsomó mintáin, amely megerősítette a mikrokörnyezet prognosztikai szerepét a betegségben. A génexpresszió alapján két eltérő prognosztikai csoportot különböztettek meg. A kedvező prognózisú „Immun válasz 1” génexpressziós mintázatot mutató csoportba T-lymphocytákra jellemző és macrophágokra jellemző gének overexpressziója volt jellemző. Míg a kedvezőtlen prognózisú

„Immun válasz 2” génexpressziós mintázatú csoportban macrophágokra és dendritikus sejtekre jellemző gének overexpressziója volt megfigyelhető. Ezen a megfigyelésen alapulva számos immunhisztokémiai vizsgálaton alapuló vizsgálat indult, melyek a mikrokörnyezet sejtösszetételét összefüggésbe hozták a betegség prognózisával és a túléléssel.

A 21 humán connexin legősibb és legszélesebb körben kimutatató izotípusa a connexin 43 (Cx43), melynek kitüntetett szerepe van a lymphoid sejtek és a stromalis sejtek kommunikációjában. Lymphoid folliculusokban igazolták, hogy az FDC hálózatsejtek a gap junctionokon keresztül mind a szomszédos FDC sejttel, mind a környező B-sejtekkel képesek kapcsolatot teremteni. A direkt sejt-sejt kapcsolaton keresztül a sejtek proliferációját és migrációját befolyásoló szignálok juthatnak a B-sejtekbe.

Follicularis lymphomában az esetek 40-70%-ában diagnóziskor csontvelői érintettség észlelhető, mely rosszabb prognózissal társul. Szövettanilag a tumorsejtek a csontvelőben paratrabecularis lokalizációban helyezkednek el, azonban észlelhető interstitialis terjedés is. Ritkán follicularis növekedési mintázat is látható, azonban az esetek nagy részében az infiltrátum diffúz, centrocyta fenotípusú sejtekből áll, melyek CD10 és BCL-6 expressziót mutatna. Annak ellenére, hogy a tumorsejtek mind a nyirokcsomóban, mind a csontvelőben ugyanabból a neoplasticus klónból származnak számos morfológiai, fenotípusos és genetikai különbség fedezhető fel a két különböző lokalizációban észlelhető tumorsejtjek között. A cytologiai grade általában alacsonyabb a csontvelőben, mint a nyirokcsomóban. A follicularis lymphoma sejtek gyakran veszítik el a BCL-6 és CD10 expressziót a csontvelőben. Emellett az IgH gén mutációs mintázata is jelentős különbségeket mutat a két lokalizációban. Ezen eltérések felvetik a mikrokörnyezeti különbség fennállását, melyet eddig nem igazoltak.

Összehasonlító vizsgálatokat végeztünk az egy betegből származó nyirokcsomó és csontvelő mikrokörnyezetének és sejt-sejt kapcsolatainak vizsgálata céljából. Továbbá

vizsgálni kívántuk a nyirokcsomói mikrokörnyezet tumor progresszióra kifejtett hatását. Az immunhisztokémiai vizsgálatokat szöveti multiblokk technológia felhasználásával végeztük, melynek során vizsgáltuk a nyirokcsomói és csontvelői mikrokörnyezetben található lymphocytá alcsoportokat, machrophágokat és follicularis dendritikus sejteket, illetve a stromalis sejtek connexin 43 expresszióját.

II. Célkitűzések

Számos génexpressziós és immunhisztokémiai vizsgálatokon alapuló tanulmány számolt be a reaktív mikrokörnyezet prognosztikai szerepéről follicularis lymphomában. Munkánk során a következő kérdéseket vizsgáltuk:

- A nyirokcsomói és csontvelői tumorsejtek karakterizálása és összehasonlító vizsgálata
- Nodalis follicularis lymphoma reaktív mikrokörnyezeti különbségeinek és hasonlóságainak összehasonlító vizsgálata ugyanazon betegből származó csontvelői infiltrátum reaktív mikrokörnyezetével, a két lokalizációban észlelhető tumorsejtek fenotípusbeli különbségeinek vizsgálata szempontjából
- A csontvelői infiltrációval rendelkező illetve nem rendelkező esetek nyirokcsomói mikrokörnyezetének összehasonlító vizsgálata, a reaktív mikrokörnyezet tumor progressziót befolyásoló hatásának vizsgálata szempontjából
- Connexin 43 expresszió vizsgálata follicularis lymphomában

III. Módszerek

Beteganyag

Vizsgálataink kivitelezéséhez harmincöt kezeletlen beteg formalinban rögzített, paraffinba ágyazott nyirokcsomó és csontvelő biopsziás mintáit használtuk. A diagnózis a World Health Organisation (WHO) lymphoid tumorokra használt klasszifikációja alapján került megállapításra. A nyirokcsomói és csontvelői mintavétel minden esetben a diagnosztikus és staging eljárások részét képezte. Kontrollként 6 reaktív nyirokcsomót és 15 csontvelő mintát használtunk.

Szöveti microarray

A szöveti microarray blokkokat (TMA) egy számítógép vezérelt automatizált TMA készítő berendezéssel végeztük (TMA Master, 3D HISTECH Ltd, Budapest, Hungary). A reprezentatív területeket Hematoxillin-eosin festett metszeteken jelöltük be, melynek segítségével relokálhatóvá váltak ezen területek a formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintákon. A nyirokcsomó mintákból legalább kettő 2 mm átmérőjű szövethengert (core) helyeztünk át a befogadó blokkba. Csontvelő biopsziák esetén egy vagy kettő hengert transzferáltunk a befogadó blokkba.

Immunhisztokémiai vizsgálatok

A TMA blokkokból 3 µm vastagságú metszeteket metszettünk adhézios szilánnal bevont felszínű SuperFros Ultra Plus tárgylemezekre. Az immunhisztokémiai és fluoreccens immunhisztokémiai reakciókat deparaffinált metszeteken végeztük.

Immunhisztokémiai metszetek értékelése a különböző T-sejt csoportok és macrophágok esetén

Az immunhisztokémiai reakció elvégzését követően a lemezeket 20X nagyítású nagy látószögű Zeiss objektívet alkalmazva (Carl Zeiss MicroImaging Inc, Jena, Germany) teljes metszet digitalizálással scannel-tük Panoramic scan berendezéssel (3DHISTECH). A pozitívan festődő sejteket a Panoramic Viewer HistoQuant modulja segítségével határoztuk meg vizuális felügyelet mellett. Az immunfestett nyirokcsomó mintákon a follicularis és interfollicularis területeket, a csontvelői mintákon a csontvelői tumoros infiltráció területét jelöltük permanens annotációkat alkalmazva a digitális metszeteken. Az értékelés során minimálisan 6 follicularis és interfollicularis területet, vagy minimum 1mm² nagyságú területet vizsgáltunk. Citoplazmatikus festés esetén, ha a pozitív sejtek klaszterekben helyezkedtek el, a szoftver nem volt képes az egyes sejtek biztos elkülönítésére, emiatt a citoplazmatikus festések esetén a pozitívan festődő sejtek által elfoglalt terület százalékos arányát számszerűsítettük az összes sejtre vonatkoztatva.

Immunhisztokémiai metszetek értékelése az FDC markerek és Connexin 43 esetén

Az értékelésnél 4 lépcsős score rendszert használtunk, melynek alapján külön értékeltük az FDC hálózat CD21, CD23, CXCL13 és LNGFR expresszióját, illetve a Connexin 43, nyirokcsomóban a follicularis területeket, illetve a csontvelői infiltráció területeit.

Statisztikai analízis

A klinikopatológiai és az immunhisztokémiai jellemzők közötti összefüggések vizsgálata esetén a normál eloszlás fennállásának vizsgálatát követően a normál eloszlást mutató független és függő változókat Student-féle kétmintás t-próbával vizsgáltuk. A normál eloszlástól eltérő eloszlást mutató változók vizsgálata során Mann-Whitney U-próbát és

Wilcoxon próbát alkalmaztunk. Ordinális változók esetén Fisher egzakt próbát alkalmaztunk. Statisztikailag szignifikánsnak a <0.05 p értéket tekintettük. A statisztikai analízis során Statistica 9.1 szoftvert alkalmaztunk (StatSoft. Inc., Tulsa, OK, USA).

IV. Eredmények

A malignus sejtek fenotípusa a nyirokcsomó és csontvelő mintákban

A 20 kezeletlen beteg nyirokcsomó és csontvelő mintapárjainak vizsgálata során összehasonlítottuk a tumorsejtek citológiai grade-jét, proliferációs rátáját, illetve immunfenotípusát a WHO kritériumoknak megfelelően. 12 esetben volt megfigyelhető „downgrade”-ing a csontvelőben a nyirokcsomóhoz képest. Egy esetben mindkét minta grade 1 volt. 16 esetben a nyirokcsomó grade 2 volt, míg a megfelelő csontvelőpárok 9 esetben grade 1, 7 esetben grade 2. Három esetben a nyirokcsomóban grade 3 tumor volt azonosítható, míg a hozzájuk tartozó csontvelők mindhárom esetben alacsonyabb grade-t mutattak (1 esetben grade 2, két esetben grade 1). Nem találtunk olyan esetet ahol a csontvelői grade magasabbnak bizonyult volna a nyirokcsomói grade-nél. A tumorsejtek mind a csontvelőben, mind a nyirokcsomóban BCL2, BCL6 és CD10 pozitívnak bizonyultak. Ki67 immunhisztokémiai vizsgálattal szignifikáns különbség mutatkozott a nyirokcsomók és a hozzájuk tartozó csontvelői minta tumorsejtjeinek proliferációs rátája között ($21.08 \pm 6.19\%$ versus $6.23 \pm 4.61\%$; Wilcoxon próba; $p < 0.0001$).

A nyirokcsomóban és a hozzá tartozó csontvelő mintában észlelt tumoros infiltráció reaktív mikrokörnyezeti sejtjeinek vizsgálata

A HistoQuant programmal végzett képanalízissel, vizsgáltuk a csontvelői és nyirokcsomói tumoros komponens reaktív mikrokörnyezetének összetételét vizsgáltuk a különböző T-lymphocytá szubcsoportokra és macrophágokra koncentrálva. Eredményeink alapján a nyirokcsomóban észlelt malignus follicularis területek mikrokörnyezetének sejtösszetétele és

mértéke jelentős különbségeket mutatott a csontvelői infiltráció mikrokörnyezetéhez képest. Szignifikánsan alacsonyabb PD1+ T-lymphocyták számát ($5.89 \pm 3.15\%$ vs $18.59 \pm 8.64\%$; Wilcoxon próba; $p=0.002$) észleltünk a csontvelői infiltrációban a nyirokcsomó follicularis területeihez viszonyítva. Továbbá szignifikánsan magasabb CD8+ T-lymphocyták ($11.02 \pm 7.61\%$ vs $5.51 \pm 2.41\%$; Wilcoxon próba; $p=0.004$), FOXP3+ regulatoros T-lymphocyták (151.00 ± 86.39 cells/ 0.1 mm^2 vs 76.85 ± 39.64 cells/ 0.1 mm^2 ; Student-féle t-próba; $p=0.005$) és CD68+ macrophag (131.41 ± 52.59 cells/ 0.1 mm^2 vs 38.77 ± 15.28 cells/ 0.1 mm^2 ; Wilcoxon próba; $p < 0.0001$) számát észleltünk a csontvelőben a nyirokcsomóhoz képest. A CD4+ T-lymphocyták és CD57+ T-lymphocyták szám nem különbözött a két tumoros komponensben. Az összehasonlító elemzést az interfollicularis területeket vizsgálva is elvégeztük, azonban különbség a sejtes komponensek között nem volt megfigyelhető.

A csontvelői tumoros infiltráció FDC hálózatának és Cx43 expressziójának vizsgálata

A csontvelői infiltrátum stromalis sejt-komponensének vizsgálata során értékeltük a normál, tumormentes csontvelőben észlelt mesenchymalis stromalis sejtes hálózatot. Az LNGFR expresszió alapján tumoros infiltrátum területén a reticularis sejtes hálózat a normál csontvelőhöz képest kifejezetten hyperplasticus volt. Az infiltrált csontvelőkben megfigyelhető volt CD21+ vagy CD23+, és CXCL13+ FDC hálózat. A legintenzívebb Cx43 expressziót a CD21+ FDC hálózat megjelenése esetén észleltük a csontvelői infiltrátumban, mely legkifejezettebben diffúz infiltrátumban megjelenő follicularis mintázat esetén volt látható.

A nyirokcsomó reaktív mikrokörnyezetének vizsgálata csontvelő infiltrációval társuló és csontvelői infiltrációt nem mutató esetekben

A reaktív nyirokcsomói mikrokörnyezet csontvelői terjedést befolyásoló hatásának meghatározása céljából összehasonlítottuk a csontvelő infiltrációval rendelkező, illetve csontvelő infiltrációt nem mutató esetek mikrokörnyezeti összetételét. A vizsgálat során külön értékeltük a nyirokcsomó follicularis és interfollicularis területeit. A follicularis területek mikrokörnyezeti összetételét vizsgálva szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a CD8+ T-lymphocyták ($5.57 \pm 2.36\%$ vs $10.02 \pm 9.6\%$; Mann-Whitney U teszt; $p=0.04$) és a CD68+ macrophágok (38.15 ± 15.03 cells/ 0.1 mm^2 vs 62.59 ± 30.62 cells/ 0.1 mm^2 ; Student félé t-próba $p= 0.004$) száma a csontvelői infiltrációt mutató csoportban. Az interfollicularis területek reaktív sejtösszetételét vizsgálva nem észleltünk különbséget a két csoportban.

A nyirokcsomó FDC hálózatának és CX43 expressziójának vizsgálata

Nem észleltünk szignifikáns különbséget a LNGFR+ stromalis sejtek, CD21+, CD23+ FDC és a CXCL13 antigén expressziójának intenzitásában a csontvelői terjedést mutató, illetve a csontvelői infiltrációval nem járó csoportok között. Nem találtunk szignifikáns összefüggést a Cx43 expresszió és a betegség csontvelői progressziója, illetve a tumor grade között.

V. MEGBESZÉLÉS

Follicularis lymphomában a reaktív mikrokörnyezet kiemelkedő szerepet játszik a tumorsejtek fenotípusának formálásában és a tumorsejtek terjedésében. Munkánk során jelentős különbségeket tártunk fel a nyirokcsomói és csontvelői tumorsejtek fenotípusa, a reaktív mikrokörnyezet összetétele, illetve az FDC hálózat jellege és a sejtek connexin expressziója között. Emellett a tumorsejtek terjedésének vizsgálata során jelentős különbségeket észleltünk azon nyirokcsomó minták reaktív mikrokörnyezete között melyeknél észlelhető volt a csontvelő érintettsége, a csontvelő infiltrációt nem mutató mintákhoz képest.

Az azonos betegből származó nyirokcsomói és csontvelői mintáinak összehasonlító vizsgálata során mind hasonlóságokat, mind különbségeket észleltünk a reaktív mikrokörnyezet szempontjából. A CD4+ T-sejtek és a CD57+ T-sejtek aránya megegyezett mind a két lokalizációban. Emellett a csontvelői tumoros infiltráció területén minden mintában észlelhető volt specifikus FDC hálózat, amely a normál csontvelőben nincs jelen. Ghia és munkatársai által leírt *'importing'* hipotézis alapján a csontvelőben fellelhető malignus tumorsejtek a nyirokcsomóban fellelhető mikrokörnyezethez hasonló sejtes környezetet alakítanak ki maguk körül, ezzel biztosítva növekedésüket és túlélésüket a csontvelőben. A mikrokörnyezet fontosságát a B-lymphocyta fejlődés szempontjából számos *in vitro* vizsgálat igazolta, melynek során azt észlelték, hogy a follicularis lymphoma sejtek stromalis sejtek, CD40 receptor illetve CD4+ T-lymphocyták együttes jelenléte nélkül nem képesek a proliferációra.

A nyirokcsomó és csontvelő összehasonlító vizsgálata során jelentős különbségeket észleltünk, mind a tumoros, mind a reaktív sejtösszetétel tekintetében. A mikrokörnyezetet

vizsgálva a csontvelőben szignifikánsan nagyobb arányban voltak jelent CD8+ cytotoxicus T-lymphocyták, FOXP3+ regulatoros T-lymphocyták, CD68+ macrophágok valamint jelentősen kevesebb PD1+ T-lymphocytát észleltünk, a vele párosított nyirokcsomói mintákhoz képest. Eredményeink megerősítették a korábbi megfigyelést, miszerint a malignus B-lymphocyták alacsonyabb grade-el és proliferációs rátával rendelkeznek a csontvelőben. Ezen eltérések magyarázhatóak a mikrokörnyezet sejtösszetételének különbségeivel, amely a csontvelőben elősegítheti a magasabb Ki67 indexel és éretlen fenotípusú B-lymphocyták eliminációját a csontvelőben. A CD8+ cytotoxicus T-lymphocyták, illetve a CD68+ macrophágok képesek közvetlen antitumoralis immunválasz segítségével illetve kemokinek termelésével eliminálni a B-lymphocytákat. A magasabb T_{reg}-lymphocytá szám és a magasabb T_{reg}- és PD1+ T_{FH}-lymphocytá arány a csontvelőben ugyancsak szelektív daganatgátló tényezőként jelenhet meg, mivel a T_{reg}-lymphocyták közvetlenül is gátolhatják a B-sejt proliferációt. A T_{reg}-lymphocyták közvetve is hatással vannak a tumorsejtek proliferációs aktivitására, mivel gátolhatják a T_{FH}-lymphocyták funkcióját.

A csontvelői és a nyirokcsomói mikrokörnyezetben észlelt különbségek azonban szekunder eltérésként is felfoghatóak, melyet a tumoros sejtpopulációban észlelt eltérések is magyarázhatnak. Munkacsoportunk illetve más kutatócsoportok is leírták, hogy a nyirokcsomóból a csontvelőbe kerülő tumorsejtek mellett egy olyan follicularis lymphoma tumorsejt populáció is kimutatható a csontvelőben, amely nem a nyirokcsomóból származik. Ez a megfigyelés felveti azt a lehetőséget, hogy a nyirokcsomói mikrokörnyezettel korábban nem érintkező klónok más mikrokörnyezeti jeleket igényelnek a túléléshez. Ezt a hipotézist az is alátámaszthatja, hogy a PD1+ TFH-sejtek - melyek normálisan a nyirokcsomó centrum germinatívumainak alkotói és a B-lymphocyták immunglobulin szekretáló B-sejtekké történő

differentiációjában játszanak fontos szerepet - alacsonyabb arányban fordulnak elő a csontvelői mikrokörnyezetben

A csontvelői infiltrációt mutató, illetve a csontvelőt nem infiltráló esetek nyirokcsomói mikrokörnyezetének összehasonlító vizsgálata során szignifikáns eltéréseket észleltünk. A csontvelői terjedést nem mutató esetekben jelentősen alacsonyabb arányú CD8+ lymphocytákból és CD68+ macrophágokból álló infiltráció volt megfigyelhető, mely felveti a mikrokörnyezet befolyásoló szerepét a tumorsejtek csontvelőbe történő migrációja szempontjából.

Ezen megfigyelés összhangban áll azon vizsgálati eredményekkel, melyek szerint a CD8+ T-lymphocyták jelenléte összefügg a kedvezőbb túléléssel. Ennek háttérében a CD8+ T-lymphocyták direkt cytotoxicus hatása, illetve citokin szekréción (IFN- γ) keresztül kiváltott hatása állhat. Az éretlen B-sejtek migrációját az IFN- γ szabályozza, mivel részese az IFN- γ – PI3K – PKC α kemokin jelátviteli útvonalnak, mely gátolja a cytoskeleton átrendeződését (actin polimerizáció), az adhéziót és így a B-sejtek migrációját.

Az infiltráló macrophágok aránya szintén szignifikánsan különbözött a két csoportban. Eredményeink alapján a magasabb arányú macrophag infiltráció megakadályozza a betegség progresszióját és a csontvelői infiltráció kialakulását. Az irodalomban a macrophágok szerepe follicularis lymphomában a prognózis és a progresszió tekintetében vitatott. Dave és munkatársai génexpressziós vizsgálatuk alapján két mintázatot határozott meg, az „Immun válasz 1” mintázatot jó prognózisú FL esetekben volt megfigyelhető, mely csoportban különböző T-sejtekre és macrophágokra jellemző gének overexpresszióját mutatták ki, míg az „Immun válasz 2” mintázat a rossz prognózisú esetekben volt észlelhető, mely esetekre macrophágokra illetve dendritikus sejtekre karakterisztikus gének overexpressziója volt jellemző. Farinha és munkatársai megfigyelése alapján a CD68+ macrophágok mennyisége a

túlélés független prediktora és a betegség rossz kimenetelét jelzi előre. Ezzel ellentétben más vizsgálat alapján a kifejezettebb CD68+ macrophag infiltráció megakadályozza a betegség progresszióját és ezáltal az “immunsurveillance mintázat” részét képezik. A macrophagok prognosztikus jelentőségének felderítését célzó vizsgálatok ellentétes megfigyeléseinek háttérében a különböző kezelési protokollok állhatnak. Ismert tumorprogresszió gátló mechanizmus a CD68+ macrophagok által termelt reaktív oxigén és nitrogén (nitrogén-monoxid, NO) gyökök hatása. Ezenfelül a magas NO koncentráció gátolja a matrix metalloproteinázok (MMP) aktivitását, mely enzimek fontos szerepet játszanak az extracelluláris mátrix átépítésében és ezáltal a metasztázisok kialakulásának mechanizmusában. A csontvelői infiltrációt mutató, illetve a csontvelőt nem infiltráló follicularis lymphoma esetek nyirokcsomói mikrokörnyezetének összehasonlító vizsgálata feltárta, hogy a cytotoxikus T-lymphocyták és a macrophagok kiemelkedő szerepet játszanak a tumorsejtek terjedésének és migrációjának megakadályozásában, emiatt a nyirokcsomói tumoros komponensben észlelhető alacsony arányuk a csontvelői érintettség prognosztikus markere lehet.

A follicularis dendritikus sejtek alapvető szerepe ismert normál B-lymphocyták túlélésének és proliferációjának szabályozásában. Az FDC hálózat szerepét a tumor prognózisának meghatározásában már az első génexpressziós vizsgálatok felvetették, melyek során az FDC-re jellemző gének a rossz prognózist jelentő „Immun válasz 2” csoportban jelentek meg. Az FDC hálózat CD21 negativitását rossz prognosztikai tényezőként állapították meg, illetve a CD21 expresszió eltűnését összefüggésbe hozták a betegség diffúz nagy B-sejtes lymphomába történő transzformációjával.

A follicularis dendritikus sejtes hálózat és a B-lymphocyták közvetlen kapcsolatát biztosító gap junctionokat alkotó fehérjék fontos szerepet töltenek be a normál B-lymphocyták fejlődésében. A Cx43 csatornákon keresztüli direkt sejt-sejt kommunikáció FDC sejt-hálózat

funkcióinak összehangolásában is szerepet játszhat. A Cx43 csatornákon keresztüli közvetlen sejt-sejt kapcsolatot a B-sejtek és az FDC hálózat közötti funkcionális festék transzfer vizsgálatokkal bizonyították. Vizsgálataink során a csontvelőben a tumoros infiltrátum területén Cx43 expresszió fokozódás volt megfigyelhető, mely legkifejezettebb az FDC markereket expresszáló sejtes hálózat sejtjein volt. Azonban vizsgálataink során nem észleltünk összefüggést a nyirokcsomóban megfigyelhető tumoros folliculusok területén azonosítható Cx43 expresszió, illetve a tumoros B-sejtek csontvelői terjedése között.

VI. Következtetések

A Dolgozat fő megállapításai és új megfigyelései a következők:

- A csontvelői lokalizációban észlelhető tumorsejtek alacsonyabb proliferációs rátája és down grading-je figyelhető meg a nyirokcsomói tumoros komponenshez képest.
- A csontvelőt infiltráló tumorsejtek kialakítják a túlélésüket biztosító mikrokörnyezetet, úgymint a proliferációs stimulust biztosító follicularis dendriticus sejthálózatot, illetve a follicularis helper T-lymphocyta sejtes környezetet, valamint a tumorsejtek proliferációját és terjedését reguláló, cytotoxikus T-lymphocyta, regulatoros T-lymphocyta továbbá macrophag tartalmú sejtes környezet, illetve sejt-sejt kapcsolatokat a mikrokörnyezetben található sejtekkel, melyek azonban a tumorsejtekre visszahatva befolyásolják fenotípusukat.
- A csontvelői terjedést mutató és a csontvelőt nem infiltráló esetek mikrokörnyezetének összehasonlítása során megállapítottuk, hogy a cytotoxikus T-lymphocyták és a macrophagok kiemelkedő szerepet játszanak a tumorsejtek terjedésének és migrációjának megakadályozásában, emiatt a nyirokcsomói tumoros komponensben észlelhető alacsony arányuk a csontvelői érintettség prognosztikus markere lehet.
- A nyirokcsomó follicularis dendritikus sejtjeinek és a B-lymphocytáknak a közvetlen kapcsolatát biztosító CX43 fehérje expressziója nem mutat összefüggést a tumor grade-jével, illetve a betegség csontvelői progressziójával.

VII. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

VII. I. Az értekezés témájában megjelent közlemények

Rajnai H, Bodor C, Balogh Z, Gagy E, Csomor J, Krenacs T, Toth E, Matolcsy A
Impact of the reactive microenvironment on the bone marrow involvement of follicular
lymphoma. *Histopathology* 60:(6B) pp. E66-E75. (2012)

IF: 2.857

Balogh Z, Reiniger L, Rajnai H, Csomor J, Szepesi A, Balogh A, Deak L, Gagy E, Bodor C,
Matolcsy A. High rate of neoplastic cells with genetic abnormalities in proliferation centers of
chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia and lymphoma* 52:(6) pp. 1080-1084. (2011)

IF: 2.580

Rajnai H, Heyning FH, Koens L, Sebestyén A, Andrikovics H, Hogendoorn PCW, Matolcsy
A, Szepesi A. The Density of CD8+ T-Cell Infiltration And Expression of BCL2 Predicts
Outcome Of Primary Diffuse Large B-Cell Lymphoma Of Bone. *Virchows Archive* DOI
10.1007/s00428-013-1519-9

IF: 2.676

VII. II. Egyéb témában megjelent közlemények

Bodor C, Grossmann V, Popov N, Okosun J, O'Riain C, Tan K, Marzec J, Araf S, Wang J,
Lee AM, Montono S, Matthews J, Iqbal S, Rajnai H, Rosenwald A, Ott G, Campo E, Rimsza
LM, Smeland EB, Chan WC, Braziel RM, Staudt LM, Wright G, Lister TA, Elemento O,
Hills R, Gribben J, Chelala C, Matolcsy A, Kohlmann A, Haferlach T Gascoyne RD,
Fitzgibbon J. EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular
lymphoma. *Blood* 122:(18) pp. 3165-3168. (2013)

IF: 9.060

Szepesi Agota, Csomor Judit, Rajnai Hajnalka, Eros Nora, Wikonkal Norbert, Karpati Sarolta, Matolcsy Andras, Marschalko Marta. Primary cutaneous aggressive epidermotropic CD8+T-cell lymphoma: report of two cases with no evidence of systemic disease. *European journal of dermatology* 22:(5) pp. 690-691. (2012)

IF: 1.756

Balla P, Moskovszky L, Sapi Z, Forsyth R, Knowles H, Athanasou N, Szendroi M, Kopper L, Rajnai H, Pinter F, Petak I, Benassi MS, Picci P, Conti A, Krenacs T. Epidermal growth factor receptor signalling contributes to osteoblastic stromal cell proliferation, osteoclastogenesis and disease progression in giant cell tumour of bone *Histopathology* 59:(3) pp. 376-389. (2011)

IF: 3.082

Bödör Cs, Rajnai H, Tímár B, Csomor J, Matolcsy A. BCR-ABL mRNS expressziós szintek valós idejű kvantitatív PCR-rel történő követése krónikus myeloid leukaemiás betegek esetében. *Hematológia-Transzfuziológia* 40: pp. 7-14. (2007)

IF: -

Bodor C, Schmidt O, Csernus B, Rajnai H, Szende B. DNA and RNA isolated from tissues processed by microwave-accelerated apparatus MFX-800-3 are suitable for subsequent PCR and Q-RT-PCR amplification. *Pathology And Oncology Research* 13:(2) pp. 149-152. (2007)

IF: 1.272

Rajnai H, Bödör C, Reiniger L, Tímár B, Csernus B, Szepesi Á, Csomor J, Matolcsy A. Új lehetőség a krónikus myeloproliferatív betegségek diagnosztikájában: a JAK2 mutáció kimutatása. *Orvosi hetilap* 147:(45) pp. 2175-2179. (2006)

IF: -