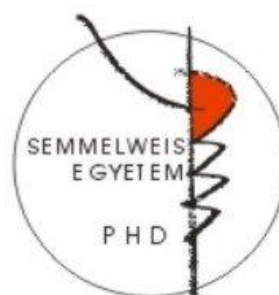


BIOMARKEREK SZOLID DAGANATOKBAN

Doktori értekezés

DR. NAGY ZSUZSANNA

**Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskolája**



Témavezető

Dr. Tímár József, egyetemi tanár, MTA doktora

Hivatalos bírálók

Dr. Horváth Ákos, főorvos, PhD

Dr. Szánthó András, egyetemi docens, PhD

Szigorlati Bizottság elnöke

Dr. Sótonyi Péter, professzor emeritus, akadémikus

Szigorlati Bizottság tagjai

Dr. Csóka Mónika, egyetemi docens, PhD

Dr. Lóvey József, főorvos, PhD

Budapest, 2012

| | |
|--|-----------|
| TARTALOMJEGYZÉK | 2 |
| RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK | 3 |
| 1. BIOMARKEREKRŐL – ÁLTALÁBAN | 5 |
| 1.1 Markerek a daganatokban | 6 |
| 1.2 Markerek a keringésben | 8 |
| 1.3 A beteg markerei | 9 |
| CÉLKITŰZÉSEK | 10 |
| 2. KRAS MUTÁCIÓK A VASTAGBÉLRÁKOKBAN | 11 |
| 2.1. KRAS – normális és hibás funkciók (vad és mutáns formák) | 11 |
| 2.2. KRAS mutáció a vastagbélrákokban | 13 |
| 2.3. Vastagbélrák célzott terápiája | 13 |
| 2.4. Saját vizsgálatok | 16 |
| 2.5. Eredmények | 22 |
| 3. JELÁTVITELI UTAK VIZSGÁLATA | 24 |
| 3.1. Saját vizsgálatok | 25 |
| 3.1.1. Módszerek | 25 |
| 3.1.2. Eredmények | 28 |
| 3.2. Megbeszélés | 31 |
| 4. VÉRALVADÁS ÉS A DAGANATOS PROGRESSZIÓ | 34 |
| 4.1. Hemosztázis és a daganatok | 34 |
| 4.2. Tromboprofilaxis – heparin és LMWH | 38 |
| 4.3. Daganatgátlás – heparin és LMWH | 39 |
| 4.4. Saját vizsgálatok | 39 |
| 4.5. Megbeszélés | 51 |
| ZÁRÓ GONDOLATOK | 54 |
| ÖSSZEFOGLALÁS | 56 |
| SUMMARY | 57 |
| IRODALOM | 58 |
| SAJÁT KÖZLEMÉNYEK | 69 |
| KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS | 71 |

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

| | |
|------------|--|
| ALK | anaplastic lymphoma kinase |
| APC | adenomatous polyposis coli |
| ASCO | American Society of Clinical Oncologists |
| BRCA | breast cancer antigen |
| CEA | carcinoembryonic antigen |
| CP | cancer procoagulant |
| DD | D-dimer |
| DVT | deep vein thrombosis |
| EGFR | epidermal growth factor receptor |
| ESMO | European Society of Medical Oncologists |
| FACS | Fluorescens Activated Cell Sorter |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FISH | fluoreszcens in situ hibridizáció |
| FOLFOX | 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin |
| FOLFIRI | 5-fluorouracil, leucovorin, irinotecan |
| GAP | GTPase activating proteins |
| GEF | guanine nucleotide exchange factors |
| IHC | immunohistochemistry |
| LMWH | low molecular weight heparin |
| MAPK | mitogen activated protein kinase |
| MET | mesenchymal-epithelial transition |
| MMR | mismatch repair |
| mTOR | mammalian target of rapamycin |
| NSCLC | non-small-cell lung cancer |
| OS | overall survival |
| PA / I / R | plasminogen activator / inhibitor / receptor |
| PARP | poly-ADP-ribose-polymerase |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PDGFR | platelet derived growth factor receptor |
| PE | pulmonary embolism |
| PFS | progression free survival |
| PI3K | phosphatidil-inositol-3-kinase |

| | |
|--------|---|
| PIK3CA | PI3K 110 α alegységét kódoló gén |
| PSA | prostate specific antigen |
| PTEN | phosphatase and tensin homologue deleted in chromosome 10 |
| TF | tissue factor |
| TGFb | transforming growth factor b |
| TMA | tissue microassay |
| UFH | unfractionated heparin |
| VEGFR | vascular endothelial growth factor receptor |
| VTE | vein thromboembolism |

1. BIOMARKEREKRŐL – ÁLTALÁBAN

A daganatok az egyén és a társadalom számára az egyik, ha nem a legfélelmetesebb ellenséget jelentik a „nyugati világban”. A félelem csak nagyon lassan oldódik, hiszen a terápiás sikereket a nehezen átélhető sikertelenségek árnyékolják be. Ennek ellenére, ha kis lépésenként is, de érzékelhető a kezelések eredményességének javulása, ami azt jelenti, hogy egyre több közöttünk a daganatos beteg. A gyakoriság emelkedéséhez hozzájárul az életkor hosszabbodása és a korai felismerés.

Napjainkban egyre inkább előtérbe kerül a „személyre szabott” terápia, különösen a gyógyszeres kezelés területén. Ennek alapját elsősorban a molekuláris ismeretek bővülése jelenti, olyan génhibák és hibás termékek azonosítása, amelyek a daganatok keletkezésében, növekedésében és terjedésében kulcsszerepet játszanak. Ezek a hibák jelentik azokat a célpontokat, amelyek ellen újabb és újabb gyógyszerek jelennek meg a klinikai gyakorlatban. Az előrejelzések szerint a „konvencionális” vagy „tradicionális” és a „célzott” terápia néhány évvel ezelőtti kb. 70%-30%-os aránya néhány éven belül megfordul. Ezt a gyakorlatban és gondolkodásunkban bekövetkező változást sokan paradigma-váltásként emlegetik. Való igaz, hogy míg a tradicionális kemoterápia esetén a meghatározó a daganatok lokalizációja és szövettani megjelenése, addig a célzott kezelések akkor lehetnek eredményesek, ha a célpontot sikerül kimutatni. A célpont jelenléte természetesen távolról sem jelenti azt, hogy a kezelés biztosan eredményes lesz, de azt egyre inkább, hogy ki tudjuk választani azokat a betegeket, akik számára a kezelés hatékonyságának esélye a legnagyobb. Ezt az optimizmust az sem kérdőjelezheti meg, hogy tisztában vagyunk azzal, hogy a daganat molekuláris szinten is állandóan változó lehet, hogy a daganatokon belül, a primer és az áttéti daganatok között a hasonlóságokon kívül a terápia szempontjából fontos eltérések lehetnek, és nem utolsósorban az egyes betegek reakciói a kezeléssel szemben jelentős eltéréseket mutathatnak (gondolunk itt nem csak szomatikus, de pszichés eltérésekre is).

A fentiek több feladatot jelölnek ki a ma és a holnap kutatói és klinikusai, a diagnosztikát és a terápiát végzők számára. Szerencsére a laborasztal és a betegágy időbeli távolsága, megfelelő együttműködés esetén, jelentősen lecsökkent, ami nem kis mértékben annak köszönhető, hogy a molekuláris szintű változásokat kimutató technikák, a preklinikai tesztrendszerek, a klinikai vizsgálatok finomodnak, egyre több részletet tárnak fel, olyan összefüggéseket, információkat hordozó hálózatokat, amelyek egyre közelebb visznek a személyre (daganatra) szabott stratégia kialakításához. Ezek között az információk között igen

fontos szerep jut azoknak a molekuláknak, amelyek a biológiai/klinikai választ jelezni tudják – ezek a **biomarkerek**.

Biomarkerek (vagy ebben az esetben nevezhetjük tumormarkereknek) eddig is rendelkezésre álltak. Felosztásuk sokféle lehet. Megjelenhetnek a keringésben (zömmel ezek a labordiagnosztika klasszikus tumormarkerei), vagy kimutathatók a daganatsejtekben. Segíthetik a megelőzést, a korai felismerést, a patológus számára a diagnózist, jelezhetik a klinikusnak, hogy az a célpont jelen van-e, amelynek gátlása adott daganatban terápiás eséllyel kecsegtet, vagy éppen azt a hibát, amely kizárja adott szer(ek) hatását (predikció), nyomon követhetik a kezelés eredményességét (monitorozás), és nem utolsósorban utalhatnak a betegség lefolyására (prognosztika). (1-6). Ideálisnak mondható biomarker, amely kellően szenzitív és specifikus, tulajdonképpen nincs, de megfelelő kompromisszumokkal jól használhatóak vannak. Ma már több szer esetében törzskönyvi előírás lehet valamely, a terápiát meghatározó (legalábbis mai tudásunk szerint nagymértékben befolyásoló) biomarker kimutatása. Röviden, néhány példán keresztül mutatjuk be a biomarkerek alkalmazhatóságának szempontjait.

1.1 Markerek a daganatokban

A daganatsejtekben kimutatható markerek egyik legismertebb példáját az EGFR-ek (epidermal growth factor receptor) mutatják. (Csak emlékeztetőül: az értekezés csak bizonyos szolid daganatokkal foglalkozik, hematológiai rendszerből kiindulókkal nem!) Az EGFR-család 4 tagból áll: EGFR1 (ez jelenti általában az EGFR-t), EGFR2 (vagy HER2), EGFR3 és EGFR4. Ezek a receptorok normális körülmények között homo- vagy heterodimereket alkotva aktiválódnak a ligandok bekötődésekor, és ezzel válnak alkalmassá arra, hogy tovább aktiválják a jelátvivő utakat – legismertebben a RAS/RAF/MEK/ERK és a PI3K/AKT/mTOR utat. Az EGFR1 mutációja azt jelenti, hogy ligand nélkül is aktív, azaz függetlenedik a sejt normális szabályozásától. Mivel vastagbélrákban gyakran fokozottan expresszált, ezért feltételezték, hogy anti-EGFR szerrel klinikai hatást lehet elérni. Sikerült is, az anti-EGFR monoklonális antitestek (cetuximab, panitumumab) monoterápiában is hatékonyak mutatkoztak. Ezért látszott stratégiaileg az EGFR markerként való alkalmazása, remélve, hogy az amplifikáció kimutatása egyben jelzi a szerek használatának jogosságát. Kiderült azonban, hogy az immunhisztokémia alkalmazása (azaz az EGFR-fehérje kimutatása) ezt az összefüggést nem erősíti. (A dilemma változatlan: az anti-EGFR szerek a receptort „célozzák”, miért mond csődöt a receptor kimutatása?) Ebben az esetben az EGFR tehát pozitív markerként nem működik, de más tumortípusban, pl. tüdőrákban (NSCLC) igen.

Utóbbiakban, elsősorban az adenocarcinomákban, az EGFR-mutáció jól jelzi az anti-EGFR terápia alkalmazhatóságát, de nem a monoklonális antitestek, hanem a tirozin-kináz gátlókkal (erlotinib, gefitinib) szemben. Arra is fény derült, hogy pl. ezekben a daganatokban más génhibák is előfordulnak. (Ez itt az EGFR-rel kapcsolatban vastagbélrákokra és a tüdőrákokra vonatkozik, de más génhibák ezekben is, de minden malignus tumorban kimutathatók.) Ezek közül fontos szerep jut a KRAS-nak, amelynek mutációja megakadályozza az EGFR-gátlók sikerességét, ezért anti-EGFR szerek adását vastagbélrákok és a tüdő adenocarcinómája esetében is csak vad típusú RAS esetében ajánlják. (A „RAS-kérdést” részletesen lásd a 2. részben.)

Az EGFR-család másik tagja, a HER2 elsőként az emlőrákokban bizonyult fontos markernek. A HER2 amplifikációja, fokozott expressziója az emlőrákok kb. 25%-ában kimutatható, és egyben rossz prognózisra utal. Az említett hibák rajtengedélyt jelentenek anti-HER2 szerek alkalmazására, azaz prediktív markernek tekinthetők. (7,8) Az első ilyen terápiás eszköz a trastuzumab (monoklonális antitest) volt, látványos klinikai javulással, de azzal a tapasztalattal is, hogy terápiás válasz a betegeknek csak kb. 30%-ában alakul ki, és hogy igen gyakran, rendszerint a kezelés elkezdése után egy éven belül, rezisztencia jelentkezik. A rezisztencia okainak megismerése, a rezisztens esetek kezelése igen fontos kihívás. (9) Egyik megoldás lehet más anti-EGFR szerek adása, ilyen pl. a lapatinib. A HER2 kimutatása hívta fel a figyelmet a diagnosztika problémáira (immunhisztokémia kérdésessége esetén FISH használatára), és arra, hogy ezeket a molekuláris módszereket standardizálni kell, végzésükre csak arra engedéllyel rendelkező laborban kerüljön sor. (10,11)

A harmadik tag az EGFR3, amelyről sokáig igen keveset tudtunk (az EGFR4-ről még most is), viszont az utóbbi időben kiderült, hogy igen fontos szerepe lehet az anti-EGFR-ekkel szembeni rezisztenciában. A rezisztens esetekben nem ritka, kb. az esetek 20%-a, egy másik transzmembrán receptor, a MET aktiválása. A MET képes dimert képezni és ezzel aktiválni az EGFR3-at (amelynek különben önálló foszforilációs képessége, így az üzenetet hordozó képessége nagyon csekély). A lényeg az, hogy ez a receptorkomplex a PI3K jelátvivő úton keresztül küldi a proliferációs üzenetet, „kikerülve” az EGFR1 gátlását – vad típusú KRAS esetén is. A MET-hiba kimutatása tehát fontos információ az anti-EGFR1 szerekkel szembeni rezisztencia esetén (pl. anti-MET alkalmazásához).

A szolid tumorokkal kapcsolatban az említetteken kívül kevés marker bizonyult klinikailag prediktívnek. Ilyen pl. az ösztrogén- és progeszteronreceptor emlőrákban (tulajdonképpen a hormonreceptorok pozitivitása jelentette az első célpont alapján történő kezelést), ugyancsak emlőrákban a BRCA1/2 gének mutációja (lehetőséget jelent PARP-

gátlók alkalmazására) (12,13,14), ALK gén átrendeződése NSCLC-ben (anti-ALK terápiához) (15), és a BRAF mutációja (V600E) melanomában (16).

Az egyes markerek mellett egyre több multigénes vizsgálattal találkozunk, amelyek még pontosabban próbálják jellemezni az adott tumor molekuláris profilját prognosztikai vagy predikciós célból (pl. Oncotype DX - 21 génnel - emlőrákban). (17) A néhány génből álló jellemzések mellett egyesek már a daganatok teljes genomjának szekvenálását gondolják a legmegfelelőbb útnak, bár minden pozitív költséghatékonysági értékelés mellett a napi klinikai gyakorlatba ez még nehezen valósítható meg.

1.2 Markerek a keringésben

A jelenleg használt tumormarkerek jelentős része a keringésből mutatható ki. Nagy előnyük, hogy nem-invazív eljárások (hacsak a vérvételt nem tekintjük annak), hátrányuk az alacsony specificitás és szenzitivitás. Ezért csak korlátozottan alkalmasak a korai felismerésre, és még bizonytalanabb a jó- és a rosszindulatú léziók elkülönítése. Ennek ellenére pl. a CA125 (cancer antigen 125), a CA19-9 (carboanhydrate antigen 19-9), a CA15-3, a CEA vagy a PSA sokszor hasznosak a felismerésben, és a kezelés utáni monitorizálásban. A metodika fejlődésével egyre több lehetőség nyílik arra, hogy a keringésből a tumor vagy a mikrokörnyezete, vagy a szervezet válaszaként, ezek egymásra hatásaként keletkező molekulákat azonosítsunk. Ezek között lehetnek fehérjék, nukleinsavak (DNS, miRNS), amelyek akkor jelenthetnek fontos információt, ha hordozzák a daganatsejtekben kialakult molekuláris hibákat. A proteomika változatos módszerei mellett a nukleinsavak esetében főleg a legújabb szekvenálási technikák említhetők. Reményeket fűznek a keringésben megjelenő és onnan kinyerhető daganatsejtekhez, amelyek érthetően a metasztatizálásra potenciálisan képes sejteket jelenthetik. (19-22) Kétségtelen tény, hogy mindezek segíthetnek a daganatok jobb jellemzésében, a terápiás válasz megítélésében (vagy éppen a rezisztencia okának azonosításában), de nem szabad elfelejteni, hogy az egyre finomodó módszerek, az egyre kisebb mintákból történő meghatározások „mögött” igen heterogén daganatok húzódnak meg, ami az értékelést jelentősen megnehezítheti. Mindez aláhúzza az ezzel a területtel foglalkozó vizsgálatok egyik leggyakoribb következtetését: több adatra, standardizált és validált módszerekre van szükség. Nem kétséges, hogy újabb, akár a jelenlegieket kiegészítő prediktív és/vagy prognosztikai markerekre nagy az igény. Ennek jele, hogy nem olyan régen petefészekrákban a CA125 mellett a követésre is alkalmas markernek fogadta el napjainkban az FDA a HE4/WFDC2-t. (23) Munkánk során több

szabályozó molekula aktivitása és a daganatos betegek klinikai adatai között kerestünk kapcsolatot (lásd a 3. részben).

Itt említhető, hogy természetesen markereket ma már nem csak a keringésből lehet kimutatni, hanem szinte bárhonnan. Szaporodnak az esetek, amikor pl. székletből, vizeletből vagy köpetből kimutatott marker hívta fel a figyelmet a daganat jelenlétére. Ma még ezek a klinikum napi gyakorlatában nem terjedtek el, de a közeli jövőben egyre gyakoribbá válhatnak.

1.3 A beteg markerei

Tapasztalt klinikus a beteg általános állapota és panaszai alapján már gyanakodhat daganatos betegségre. Mindezek a beteg és a daganat kölcsönhatása révén keletkeznek, amelyek között az egyik jól ismert jelenség a trombózis és az embolia kialakulásával veszélyeztető hemosztázis-zavar. Erről részletesebben a 4. részben szólnunk. A tünetek között találkozhatunk olyanokkal, amelyek egyrészt mellékhatásként értékelhetők, másrészt kapcsolatba hozhatók a kezelés hatékonyságával, azaz „markerként” viselkedhetnek. Ilyennek gondolják anti-EGFR szerekkel történő kezelésnél a bőrtünetek súlyosságát, vagy angiogenezis elleni szerekkel (VEGF-gátlók) a hipertonia kialakulását.

A fentiek is jelzik, hogy a molekuláris éra visszafordíthatatlanul megérkezett az onkológiába. A cél a minél hatékonyabb egyénre „szabott” kezelés, pontos célpontokkal és a célpontok elleni szerekkel. A terápiás stratégia kialakításában kulcsszereplők már és lesznek egyre inkább a célpontokat jelző (bio)markerek.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink három különböző témára irányultak, amelyeket a biomarkerek daganatos betegségekkel kapcsolatos szerepe köt össze. Az első kettő a daganatsejtekben található szabályozási zavarokkal foglalkozik, a harmadik pedig a keringésben megjelenő markerek aktivitását hasonlítja össze. Az egyes témák fontosabb kérdései és célkitűzései a következők:

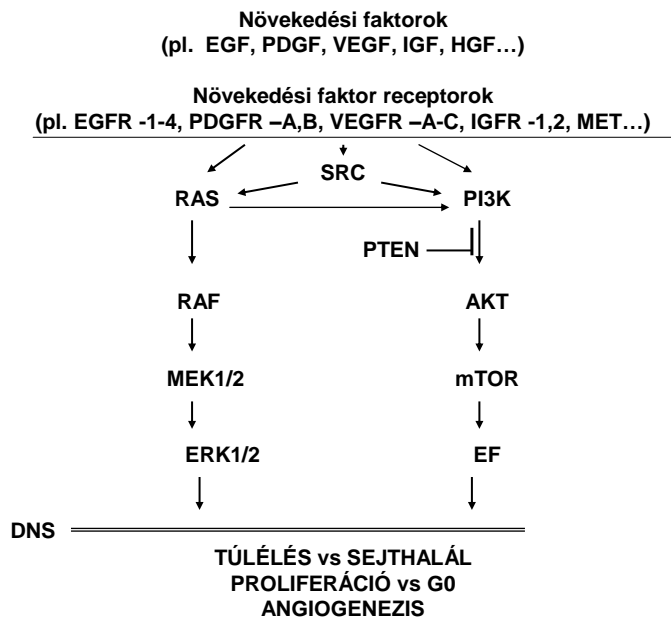
1. Mennyire tükröződik beteganyagunkban (vastagbélrákok) a KRAS anti-EGFR kezeléssel kapcsolatos prediktív szerepe?
2. Milyen összefüggés található a különböző szabályozási zavarok és a betegek túlélése között, azaz melyik marker vagy markercsoport rendelkezik prognosztikai szereppel?
3. A daganatokhoz gyakran társuló véralvadási zavar kapcsán keletkező szabályozók/tényezők képesek-e jelezni – legalább a jelenlegi biomarkerek hatékonyságával - a betegség prognózisát?

2. KRAS MUTÁCIÓK VASTAGBÉLRÁKOKBAN

A vastagbélrákok klinikai ellátásának alapjául napjainkban is olyan klinikopatológiai tényezők szolgálnak, mint a TNM stádium, a szövettan, a sebészi szél épsége és a beteg állapota. Ehhez csatlakozhat még a szövettan alapján a lymphoid invázió jelenléte, a peritoneum érintettsége, és a differenciáltság foka, olyan klinikai eseményekkel, mint az elzáródás vagy a perforáció a diagnózis idején. (ASCO rizikótényezők, 1) Az utóbbi időben számos olyan fehérjét és genomikai biomarkert írtak le, amelyek finomíthatják prognosztikai információinkat és pontosabbá tehetik azoknak a betegeknek a kiválasztását, akik adott szisztémás kezelésből a legtöbb előnyt élvezhetik. (2) Ezek közé a markerek közé tartozik vastagbélrákok esetében a KRAS (Kirsten RAS). (3)

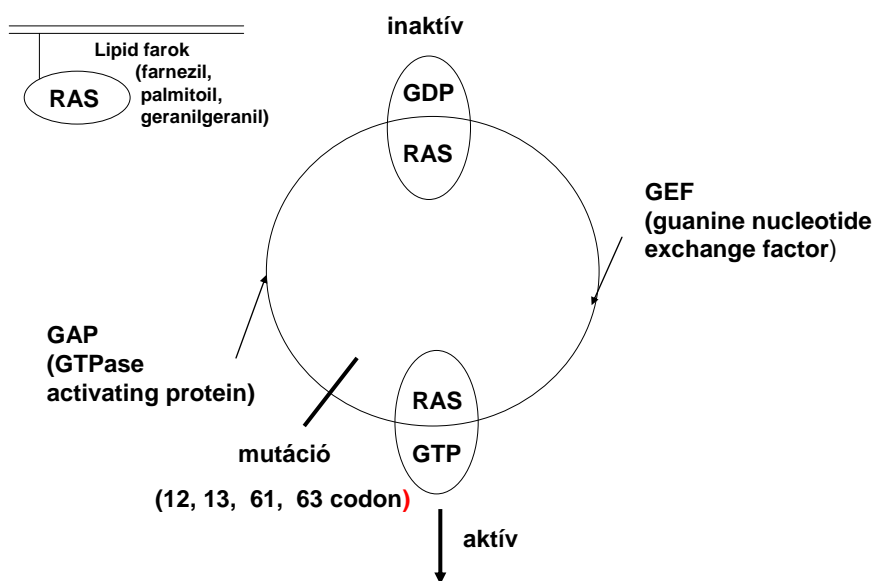
2.1. KRAS – normális és hibás funkciók (vad és mutáns formák)

A sejtműködések molekuláris szintű szabályozásában kulcsszerepet játszanak a RAS fehérjék. A RAS családba három gén tartozik, amelyek négy igen hasonló fehérjét kódolnak: HRAS, KRAS4A, KRAS4B és NRAS (a két KRAS a KRAS gén hasítási variánsait jelenti). A RAS fehérjéket elsősorban receptorok aktiválják, majd az aktivált RAS-tól az információ további jelátvivőkön keresztül jut el a sejt működését eldöntő „fórumok” felé. (2.1. ábra) A proliferációs jelek továbbítása során a RAF, a PI3K, és a RAL jelenti a fontosabb kapcsolatot, míg az apoptózis esetén a RAF és a PI3K mellett a RASSF1, a JNK (serkentve vagy gátolva a sejthalált). A sejtmetabolizmus szabályozásában partner a HIF1, az ERK és az AKT, de a RAS részt vesz, több ponton is, a környezettel való kapcsolat alakításában (befolyásolhatja az angiogenezist, a proteázok felszabadulását pl. a makrofágokból, stb.) A RAS ezt a sokrétű feladatot nyilván az adott sejtben rendelkezésre álló szabályozó tényezőkkel együtt látja el, hiszen a működése igen „egyszerű”, aktív (azaz jeltovábbító) és inaktív állapotokban létezhet, amit foszforiláció (GTP-kötés) vagy defoszforiláció (GDP-kötés) határoz meg. Előbbi szabályozásában a GEF-ek (guanine nucleotide exchange factors), utóbbiban a GAP-ok (GTPase activating proteins) vesznek részt elsősorban. Hiba következhet be, ha pl. a RAS és a GAP közötti kapcsolat nem jön létre (a RAS génben bekövetkező mutáció miatt), aminek az a következménye, hogy állandóan GTP-t kötő, azaz bekapcsolt állapotban levő RAS fehérje keletkezik, ez pedig autonom módon adja a proliferációt serkentő üzenetet a sejt döntéshozói felé. (2.1. és 2.2. ábra) (4)



2.1. ábra – A jelátvitel vázlata a leggyakoribb szereplőkkel. Az auto- para- vagy endokrin szabályozók, mint ligandok kapcsolódnak a receptorokhoz, ezeket aktiválják, a receptorok pedig azt a láncreakciót (zömmel a fehérjék foszforilációja segítségével), amelyek elviszik az üzenetet a döntést hozó szintekhez. A sejt funkcionális válasza lehet túlélés vagy sejthalál, előbbi esetben proliferáció vagy differenciáció. Daganatokban a szabályozók hibái miatt válik uralkodóvá a sejtek proliferációja.

RAS funkciója és hibái



2.2. ábra. A RAS aktiválását normálisan a GDP-GTP átalakulás jelenti, az inaktiválást pedig a fordítottja. Mutációk esetén utóbbi nem következik be, azaz a RAS állandóan „bekapcsolt” állapotban működik.

A RAS gén a human daganatok 15-20%-ában mutáns. A család egyes tagjainak mutációi eltérő gyakorisággal fordulnak elő az egyes daganatokban, így a KRAS mutációi főleg a pancreasrákban, a vastagbélrákban, és a tüdőrákban (elsősorban NSCLC-ben) mutathatók ki, a HRAS mutációi a bőr és a fej-nyak daganataiban, az NRAS mutációi pedig a hemopoetikus rendszer daganataiban. (5) Ezek a mutációk pontmutációk, aktiválók, forró pontjaik közel vannak a kötődő nukleotid foszfátcsoportjához. A leggyakrabban érintett mutációk a 2. exon (első átíródó exon) 12. és 13. kodonjában (ritkábban a 3. exonban – 61. kodon, 4. exonban – 146. kodon), mint aminosavcserék fordulnak elő. Mivel az itt előforduló mutációk közül 7 a mutációk több mint 90%-át lefedi (elsősorban a 12. kodonban megjelenők), ezért a gyakorlatban ezek meghatározását ajánlják annak megállapítására, hogy az adott daganat hordoz-e mutáns RAS gént, és így fehérjét vagy nem. (6,7) A 7 ajánlott mutáció: Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Asp, Gly12Ser, Gly12Cys, Gly12Val, Gly13Asp. A meghatározásra általában PCR-technikát vagy direkt szekvenálást használnak.

2.2. KRAS mutáció a vastagbélrákokban

Vastagbélrák kb. 35-45%-ában mutatható ki az aktiváló mutáció. Más – részben a KRAS-sal szoros kapcsolatban levő, és a sejtműködés szabályozásában ugyancsak fontos szerepet játszó – gének is lehetnek mutánsak, pl. PIK3CA ~20%, BRAF ~10%, NRAS ~3%. Ezek a génhibák zömmel kizárják egymást. A vastagbél egyes szakaszaiban a vastagbélrákok génhibái eltérő gyakorisággal jelenhetnek meg: pl. jobb colon – bal colon – rectum sorrendben az MMR (mismatch repair) hibái 26-3-1%, a KRAS hibái 40-28-36%, BRAF 17-2-2%. Önmagában a KRAS mutáció előfordulásának prognosztikai szerepe kérdéses. Találkozunk olyan adattal (pl. RASCAL vizsgálat), amely szerint a KRAS mutáció rossz prognózisra utal, de olyannal is, amely nem talált kapcsolatot. (8-12)

2.3. Vastagbélrák célzott terápiája

Az EGFR fokozott termelését sok tumor esetében rossz prognosztikai jelnek találták. (13-15) Részben ennek alapján feltételezték, hogy az EGFR hibái (mutáció, amplifikáció, génkópiaszám változás) miatt a vastagbélrákok reagálhatnak EGFR-t gátló szerekre. (16) A klinikai hatékonyság elsősorban a receptor extracelluláris része ellen ható monoklonális antitestek esetében (cetuximab, panitumumab), főleg kombinációban – előrehaladt, metasztatikus esetekben – be is következett, míg a kis molekulású, a receptor tirozin-kináz részét gátló szerek esetében nem. Az anti-EGFR monoklonális antitestek megakadályozzák, hogy a ligandok aktiválják a receptorokat, mert azoknál nagyobb affinitással kötődnek a

receptorokhoz. A klinikai hatás magyarázata azonban még várat magára, mert kiderült, hogy az immunhisztokémiailag kimutatott EGFR-mennyiség nem megfelelő markere az elképzelt klinikai hatásnak. Várható lenne, hogy az EGFR elleni szer esetében a szer hatására utalni fog az EGFR mennyisége, pl. az immunhisztokémia alapján. Ez azonban nincs így. Számos okot feltételeznek: pl. a módszer standardizációjának elégtelensége, az értékelési eltérések mellett azt is, hogy más epitopot ismer fel a diagnosztikára és a terápiára használt antitest, vagy a receptorok affinitása, foszforiláltsága közötti különbségeket a diagnosztikai antitestek általában nem érzékelik. (17-22) Néhány esetben kapcsolatot találtak az EGFR gén kópiaszáma, az EGFR ligandjainak (amphiregulin, epiregulin), vagy a HER2 fokozott termelése és a várható klinikai hatás között. A fentiekkel ellenétben prediktívnek bizonyult a KRAS aktiváló mutációja, mert ennek jelenlétében az EGFR gátlása eredménytelen, a mutáns KRAS ugyanis függetleníti magát a jelút felsőbb részeitől, így az EGFR-től is. (23-29) (2.2. ábra) Napjainkban az anti-EGFR monoklonális antitestek adásának feltétele az EGFR jelenlétének kimutatása mellett az, hogy a daganat vad típusú KRAS-t hordozzon. (30) (Vizsgálatunkba bevont esetekben még nem ezek az indikációk voltak érvényben.) A mai indikációk:

- *Cetuximab* (Erbix, egér-human kiméra monoklonális antitest): EGFR-t expresszáló, vad-típusú KRAS-t hordozó metasztatikus vastagbélrák kezelésére javallott; (a) irinotekán alapú kemoterápiával vagy FOLFOX4 kezeléssel kombinálva, (b) monoterápiában olyan betegek esetén, akiknél az előzetesen alkalmazott oxaliplatin- és irinotekán-alapú kezelés sikertelennek bizonyult, és akiknél irinotekánnal szemben intolerancia alakult ki. (Érdekes, hogy pl. a cetuximab fej-nyak laphámrák elleni indikációjában sem EGFR-re, sem KRAS-ra történő utalás nem szerepel.)
- *Panitumumab* (Vectibix, teljesen human monoklonális antitest): javasolt vad-típusú KRAS-t hordozó metasztatikus vastagbélrák kezelésére; (a) első vonalban FOLFOX-szal kombinálva, (b) második vonalban FOLFIRI-vel kombinálva azoknál a betegeknél, akik az első vonalban fluoropirimidin-alapú kemoterápiát kaptak (az irinotekán kivételével), (c) monoterápiaként fluoropirimidin-, oxaliplatin- és irinotekán-tartalmú kemoterápiás kezelések sikertelenségét követően.

A klinikai vizsgálatok során nemcsak azt mutatták ki, hogy a KRAS vad típusa esetén érvényesül(het) az anti-EGFR antitestek terápiás hatása, hanem azt is, hogy mutánsok esetében az anti-EGFR antitestek nem javítanak, hanem rontanak a betegek állapotán. (31-34)

Bonyolíthatja a helyzetet, hogy találtak olyan KRAS mutációt (Gly13Asp vagy G13D), amely nem jár cetuximabbal szembeni rezisztenciával, azaz a KRAS mutánsok nem

egyforma biológiai hatással rendelkeznek. (Bizonyos értelemben erre utal a mutációk változó gyakorisága tumoronként.) A G13D a leggyakoribb mutáció a 13. kodonban és in vitro gyengébb transzformáló képességű, mint a 12. kodonban levő mutációk. 579 vastagbélrákos beteg adatait és mintáit értékelték, akiket 2001 és 2008 között kemoterápia-rezisztencia miatt kezeltek cetuximabbal. Kiderült, hogy a G13D mutációt hordozók progressziómentes és teljes élettartamra kifejtett hatása hasonlított a vad típusú KRAS-t hordozókéhoz, és jobb volt, mint amit a többi KRAS mutáció esetén értek el. Ezek alapján felvetik a prospektív klinikai vizsgálat szükségességét. (35)

Arról nincs meggyőző adat, hogy a KRAS mutációi az anti-EGFR kezelés mellett más kemoterápiás szer(ek) hatását előre jeleznék.

A vastagbélrákos betegek kb. 20%-ánál már a felismeréskor áttétek vannak és a kuratívnak tekintett műtétek harmadában jelentkezik áttét, gyakran 3 éven belül főleg a májban, a tüdőben és a hashártyán (36) Ezért javasolják (ESMO), hogy 3 évig évente történjen a betegeknél hasi és mellkasi CT, bár a követés optimális stratégiája még bizonytalan (37). Jelenleg vastagbélrákoknál a célzott kezelés az előrehaladt, metasztatikus esetekben lehetséges. Kérdés, hogy a metasztázisok milyen mutációs profillal rendelkeznek, hiszen kezelésükre rendszerint a primer tumorban történt vizsgálat eredményei alapján kerül sor. Ezt a kérdést a legkorszerűbb szekvenálási programmal elemezték primer tumorok (148) és rezezált áttétek (161 – 65 máj-, 50 tüdő- és 46 agyi metasztázis) mintáin. (38) A 19 onkogénből az áttétekben azok voltak a leggyakoribbak, mint amelyeket már a primer tumorok esetében meghatároztak: KRAS mutáció 48.4%, PIK3CA mutáció 16.1%, NRAS mutáció 6.2%, BRAF 3.1% gyakorisággal. (Az azonos jelátviteli úton szereplők – KRAS, NRAS, BRAF – kölcsönösen kizárták egymást, a PIK3CA mutációi előfordultak másokkal is.) Az összes metasztázist figyelembe véve 63.4%-uknál mutattak ki legalább egy típusú mutációt, 11.2%-uknál többet is. Egyezően más, kisebb mintaszámon történt megfigyeléssel, ezekben az esetekben a primer tumorok és metasztázisaik mutációinak típusa igen nagy egyezést mutatott (a már említett négy onkogénnél 90% felett – KRAS-nál 91.8%), ami azzal a fontos gyakorlati következménnyel jár, hogy vastagbélráknál a primer tumor vizsgálati eredményére lehet támaszkodni a célzott terápia stratégiájának tervezésekor. Ami szintén figyelemre méltó, hogy a mutációk gyakorisága az áttétek lokalizációja szerint eltérőnek mutatkozott. A májmetasztázisokban a KRAS mutáció 32.3%-ban, a tüdőmetasztázisokban 62.0%-ban, az agyi metasztázisokban 56.5%-ban, míg a primer tumorokban 34.9%-ban fordult elő. Egy másik vizsgálat is megerősítette, hogy tüdőmetasztázisok esetén a primer

tumorokban gyakrabban lehetett kimutatni KRAS mutációt, mint a vad-típusúaknál (57% vs 35%) (39).

2.4. Saját vizsgálatok

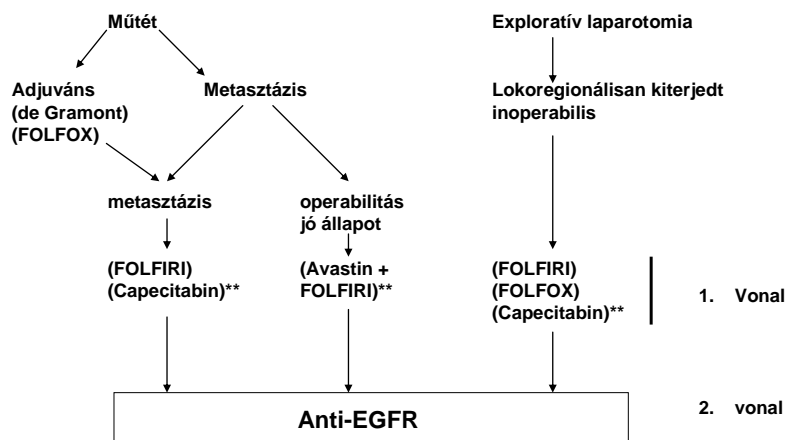
47 beteg adatai és mintái álltak rendelkezésre. A markerek meghatározása vagy a primer tumorból vagy a metasztázisból történt (ugyanazon beteg primer és metasztatikus tumora három esetben állt rendelkezésre). Az EGFR-aktivitást immunhisztokémiával (Szent Imre kórház, Patológiai Osztály), a RAS-mutációt szekvenálással (KPS Kft) határozták meg. Két esetben a vizsgálat a mintában levő kevés daganatsejt miatt eredménytelen volt. (Az első minta vizsgálatára KRAS mutáció irányába 2010. március 4-én került sor.)

KRAS-mutáció meghatározása (KPS Kft) - A paraffinos blokkokból metszetek készültek, majd a megfelelő, 30%-os tumorarány ellenőrzését követően, proteináz K emésztés után történt a DNS kivonása. A KRAS gén 2. exonját PCR-rel amplifikálták. A PCR-termék szekvenálhatóságát gélfuttatással ellenőrizték. A megfelelő PCR terméket Montage PCR Centrifugal Filter Device-val szűrték. BigDye Terminator v3.1 Sequencing Kittel (Applied Biosystems) végzett Sanger-reakciót követően a terméket DyeEx 2.0 Spin Kittel (Qiagen) tisztították. Formamidos elegyítést és denaturálást követően, az elektroforézist ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (ABI) készüléken végezték.

A betegek klinikai jellemzői. 45 értékelt beteg közül 29 férfi (életkor: median 66 év, szélső értékek 37-73), 16 nő (59 év, 47-76). Az operábilis betegek először adjuváns, a metasztázissal rendelkezők palliatív terápiában részesültek. A leggyakrabban alkalmazott protokollok: de Gramont, FOLFOX, FOLFIRI, capecitabin, bevacizumab + FOLFIRI (3. ábra).

Anti-EGFR kezelés. Anti-EGFR kezelésre szinte kivétel nélkül többszörös kemoterápiás ciklus után került sor ECOG 0-2 állapotú betegeken, EGFR és KRAS meghatározás után. A

Vastagbélrák kezelési algoritmus (vázlatosan)



2.3. *ábra.* Kezelési alternatívák. (a) Ha a műtétnél daganatmentességet lehetett elérni, akkor adjuváns kezelés: de Gramont vagy FOLFOX, (b) ha a műtétnél már metasztázist találtak, de remény van az operabilitás elérésére kemoterápiával, és a beteg jó állapotban van, akkor bevacizumab + FOLFIRI, csak az első vonalban, (c) ha az adjuváns kezelés előtt vagy után, vagy a műtétnél metasztázist találnak, de a beteg rossz állapotban van, így az operabilitás elérése nem valószínű, akkor FOLFIRI, vagy capecitabin (monoterápia, csak első vonalban), (d) ha az exploratív laparotomiánál már lokálisan kiterjedt, inoperabilis a tumor, akkor FOLFIRI vagy FOLFOX vagy capecitabin, (e) ha progrediál a tumor, akkor a 2.vonalban lehet adni anti-EGFR kezelést (cetuximab + FOLFIRI, panitumumab) (!A vizsgálatok idején 2. vonalban lehetett adni, de ma már az 1. vonalban is, előrehaladt, metasztatikus tumoroknál)

betegeknél anti-EGFR kezelés csak vad típusú KRAS-t hordozó tumor és kimutatott metasztázisok esetén került sor, cetuximab + FOLFIRI kombinációval, vagy panitumumab monoterápiával. A cetuximab alkalmazott dózisa: 400 mg/m² testfelület telítő dózis, majd 250 mg/m² testfelület fenntartó dózis, hetente; a panitumumab alkalmazott dózisa: 6 mg/tskg, 2 hetente, volt. (2.3. *ábra*) A kezelés progresszióig vagy nem kívánatos mellékhatások jelentkezéséig történt. Utóbbiak esetén a kezelésmentes időszak hosszabbodott meg. A leggyakoribb grade 3/4-es melléktünetként acne-szerű bőrtünetek (4 eset), és neutropenia (6 eset) jelentkeztek.

A primer tumorból származó vad KRAS esetén a 11 betegből 5-nél történt anti-EGFR kezelés (4 cetuximab és 1 panitumumab). (2.1. *Táblázat*) Két esetben a 6 hónapos cetuximab kezelés során regresszió alakult ki, egy esetben progresszió, két esetben a kezelés most (1-2 hó)

kezdődött. Ebben a csoportban a median élettartam (teljes túlélés: a diagnózis és a halál beállta vagy az utolsó vizsgálat között eltelt idő) 21 hónap volt (12-72 hónap). A metasztázisokból történt vizsgálat esetén 9 betegből 8 részesült anti-EGFR kezelésben (2.2. *Táblázat*). Egy betegnél cetuximab adása után a májmetasztázisok operabilissá váltak, egy másik esetben a 6 hónapos cetuximab kezelés során kialakult progressziót panitumumab követte, és 6 hónap után (jelenleg) a tumor regrediált. Ez a beteg mutatta a leghosszabb túlélést (108 hó), de az anti-EGFR kezeléskor már kiterjedt áttétei (tüdő, mellékvese) voltak. Ebben a csoportban a median teljes túlélés 45 hó (21-108) volt. Összességében a 13 anti-EGFR-rel kezelt betegből 11-nél lehetett a kezelést értékelni (2 esetben túl rövid az idő): a 6 hónapos kezelés után klinikai előny 4 esetben mutatkozott (36.3%). Ez az eredmény igen pozitívnak mondható, két megjegyzéssel: egyrészt a betegszám igen alacsony, másrészt azonban a pozitivitást támogatja, hogy nem egyszer több kemoterápiás ciklus, átmeneti regressziók után bekövetkező progresszióknál (2.-3. vonalban) történt az anti-EGFR kezelés.

A KRAS mutációt hordozó esetekről. A primer tumorból történt meghatározásnál 19 beteg hordozott KRAS mutációt, ami az összes eset 63.3%-a (19/30 eset). Az arány még magasabb a vastagbélrákból (táblázatban: colon) származó mintáknál (13/18, 72.1%). Feltűnő, hogy a 19 mutáns beteg között 15 a férfi és 4 a nő. A metasztázisokból történő meghatározásnál a mutánsok aránya alacsonyabb (6/15, 40%), a májmetasztázisok esetében még alacsonyabb (2/7, 28.6%). (2.3. *Táblázat*)

Az aktiváló mutációk típusai megoszlanak. A kis mintaszám ellenére azonban az megállapítható, hogy gyakori a G13D, amiről az irodalom azt feltételezi, hogy anti-EGFR monoklonális antitestekre reagál. (2.4. *Táblázat*)

2.1. Táblázat - KRAS mutáció vizsgálata

| Név | Kor | Mintaeredet | Mintavétel | KRAS | Metasztázis helye | Kezelés | Túlélés (hó) |
|--------|-------|-------------|--------------|---------------|--------------------|-------------------------------|--------------|
| 1 nő | 72 év | primer/meta | coecum/nycs | vad típusú. | nycs | kemo | 33 |
| 2 ffi | 47 év | primer | colon | vad típusú. | máj | kemo Eribitux (6 hó→regr) | 19 |
| 3 nő | 55 év | primer | colon | vad típusú. | máj | kemo Eribitux (6 hó→regr) | 21 |
| 4 ffi | 73 év | primer | colon | vad típusú. | máj | kemo (rohamos progresszió) | 23 meghalt |
| 5 ffi | 77 év | primer | colon | vad típusú. | máj | (idős) | 30 meghalt |
| 6 ffi | 73 év | primer | colon | vad típusú. | nycs, máj | kemo | 26 |
| 7 nő | 53 év | primer/meta | rectum/nycs | vad típusú. | nycs | kemo | 17 |
| 8 nő | 58 év | primer | sigma | vad típusú. | máj | Vectibix (2 hó→) | 17 |
| 9 nő | 60 év | primer | rectum | vad típusú. | nycs, csont | | 72 meghalt |
| 10 ffi | 62 év | primer | rectum-sigma | vad típusú. | nycs, máj | kemo Eribitux (9 hó→progr) | 12 |
| 11 ffi | 72 év | primer | rectum | vad típusú. | máj, lokális progr | kemo Eribitux (1 hó →) | 18 |
| 12 nő | 53 év | primer | colon | G12A mutáció. | máj | kemo | 13 meghalt |
| 13 ffi | 65 év | primer | colon | G12A mutáció | máj, tüdő | kemo | 22 meghalt |
| 14 nő | 66 év | primer | colon | G12C mutáció. | lokális progr | kemo | 17 meghalt |
| 15 nő | 69 év | primer | colon | G12C mutáció | | kemo | 50 |
| 16 ffi | 59 év | primer | colon | G12D mutáció | máj, peritoneum | kemo | 12 |
| 17 ffi | 58 év | primer | colon | G12D mutáció | máj, tüdő | kemo | 11 |
| 18 nő | 49 év | primer | colon | G12D mutáció. | hasfal | kemo | 11 |
| 19 ffi | 48 év | primer | rectum | G12D mutáció | máj | kemo | 15 meghalt |
| 20 ffi | 72 év | primer | colon | G12S mutáció | máj, tüdő | kemo | 30 |
| 21 ffi | 79 év | primer | sigma | G12S mutáció | lokális progr | kemo | 53 |
| 22 ffi | 47 év | primer | rectum-sigma | G12S mutáció. | máj | kemo | 9 meghalt |
| 23 ffi | 59 év | primer | sigma | G12S mutáció. | tüdő, agy | kemo | 40 meghalt |
| 24 ffi | 62 év | primer | coecum | G12V mutáció. | nycs, peritoneum | kemo | 24 meghalt |
| 25 ffi | 70 év | primer | colon | G12V mutáció. | máj | kemo | 25 meghalt |
| 26 ffi | 67 év | primer | colon | G12V mutáció. | máj | kemo | 20 |
| 27 ffi | 56 év | primer | colon | G13D mutáció | máj | kemo | 33 meghalt |
| 28 ffi | 65 év | primer | colon | G13D mutáció | húgyhólyagfal | kemo | 14 meghalt |
| 29 ffi | 73 év | primer | colon | G13D mutáció | máj | kemo | 5 |
| 30 ffi | 66 év | primer | rectum | G13D mutáció. | lokális progr | kemo | 18 meghalt |

2.2. Táblázat - KRAS mutáció vizsgálata

| Név | Kor | Mintaeredet | Mintavétel | KRAS | Metasztázis helye | Kezelés | Túlélés (hó) |
|--------|-------|-------------|-------------|-----------------|------------------------|-------------------------|--------------|
| 31 ffi | 65 év | meta | máj | vad típusú. | nycs, peritoneum | TACE | 24 meghalt |
| 32 ffi | 68 év | meta | máj | vad típusú. | tüdő | kemo | 72 |
| 33 ffi | 52 év | meta | máj | vad típusú. | | Erbitux (6 hó→progr) | 21 |
| 35 ffi | 66 év | meta | máj | vad típus | | Erbitux (12 hó →op) | 58 meghalt |
| 37 nő | 50 év | meta | peritoneum | vad típusú. | máj | kemo | 18 meghalt |
| 38 nő | 47 év | meta | Douglas-tér | vad típusú. | | Erbitux (1 hó→progr) | 45 meghalt |
| 39 nő | 55 év | meta | hasfal | vad típusú. | | Vectibix (12 hó→stabil) | 81 meghalt |
| 40 ffi | 57 év | meta | máj | vad típusú. | | Vectibix (3 hó→progr) | 30 |
| 41 ffi | 62 év | meta | melékvese | vad típusú. | tüdő | Erbitux (6 hó → progr) | 108 |
| | | | | | | Vectibix (6 hó→regr) | |
| 42 nő | 62 év | meta | máj | G13R mutáció**. | | kemo | 24 |
| 43 nő | 64 év | meta | máj | G12V mutáció. | peritoneum, csont, agy | kemo | 84 meghalt |
| 44 ffi | 62 év | meta | nycs | G13D mutáció. | | kemo | 22 |
| 45 ffi | 37 év | meta | peritoneum | G12D mutáció | | kemo | 11 |
| 46 nő | 76 év | meta | hasfali | G12S mutáció | peritoneum, tüdő | kemo | 60 |
| 47 nő | 62 év | meta | uterus | G13D mutáció | | kemo | 35 |

** a G13R mutáció nem tartozik a vizsgálatra javasolt 7 mutáció közé

2.3. Táblázat – KRAS vizsgálatok eredményei

| | <i>KRAS vad típus</i> | <i>KRAS mutáns</i> |
|--------------------------------|-----------------------|--------------------|
| <i>Primer tumor (férfi/nő)</i> | 11 (6/5) | 19 (15/4) |
| Coecum | 1 | 1 |
| Colon | 5 | 13 |
| Sigma/Rectum | 5 | 5 |
| <i>Metasztázis</i> | 9 (6/3) | 6 (2/4) |
| Máj | 5 (4/1) | 2 |
| Nyirokcsomó | 0 | 1 |
| Peritoneum | 1 | 1 |
| Douglas | 1 | 0 |
| Méh | 0 | 1 |
| Hasfal | 1 | 1 |
| Mellékvese | 1 | 0 |

2.4. Táblázat – A KRAS mutációk típusai

| | <i>Primer tumor</i> | <i>Metasztázis</i> |
|------|---------------------|--------------------|
| G12A | 2 | 0 |
| G12C | 2 | 0 |
| G12D | 4 | 1 |
| G12S | 4 | 1 |
| G12V | 3 | 1 |
| G13D | 4 | 2 |

G13R 1 esetben (májmetasztázisban – nem szerepel a 7 vizsgálandó aktiváló mutáció között – klinikai jelentősége nem ismert)

2.5. Megbeszélés

Bár a KRAS vizsgálata alapján meglehetősen csekély az értékelhető esetszám, néhány megfigyelés említést érdemel:

- (a) A túlélők aránya (a vizsgált időpontban) a vad típusú KRAS-t hordozóknál 60% (12/20), a mutánsoknál 52% (13/25). A közeli értékek arra utalnának, hogy a KRAS status nem befolyásolja a túlélést (azaz önmagában nincs prognosztikai szerepe), azonban prediktív jelentősége miatt éppen az anti-EGFR-rel történt kezelés befolyásolhatja az arányokat.
- (b) A 45 értékelt betegből feltűnően magas a mutánsok aránya (55.5 %, 25/45), mások tapasztalatai 35-45% között mozognak. (A KPS Kft 2011-re vonatkozó adatai alapján közel 250 vastagbélrák esetében 39%-ban mutattak ki mutációt – szóbeli közlés, Peták I.) Az arányt emelhetik a tüdőmetasztázisok, mert ezeknél a betegeknél gyakoribb a mutáció. Utóbbi arra utal, hogy KRAS-mutáns primer tumornál még nagyobb figyelmet kell fordítani az esetleges tüdőáttétek korai felismerésére. Némileg fordított a helyzet a májmetasztázisoknál, ahol gyakoribb a vad típusúak aránya (71.5%). A vizsgált esetek közül háromnál értékeltük a primer tumort és a metasztázisait, és mindhárom esetben egyezést mutattunk ki.
- (c) A FOLFIRI-vel kombinációban az anti-EGFR kezelés második – sokszor többedik - vonalban is klinikai előnyt (regresszió, operabilitás) ért el a vad típusú KRAS-t hordozó betegek 36.3%-ában. Bár megfelelő kontroll-csoport nem áll rendelkezésre, az valószínűsíthető, hogy az eredmények első vonalbeli kezelés esetén, szelektált betegeken, még jobbak lehetnek.
- (d) A mutánsok között a legtöbb a G13D mutációt hordozta, amely az újabb tapasztalat szerint érzékeny lehet anti-EGFR kezelésre. Erre vonatkozóan követhető nemzetközi ajánlás még nincs.

A KRAS biomarker története több szempontból is egyedülálló. Ez az első olyan biomarker, amelyet a vastagbélrák kezelésének stratégiájába be lehetett illeszteni. A KRAS mutációk gyakorisága a vastagbélrákokban és az anti-EGFR kezeléssel szembeni erős negatív prediktív értéke oda vezetett, hogy több terápiás stratégiát meghatározó intézmény (EMEA, FDA, ASCO) minden olyan metasztatikus vastagbélrákban szenvedő betegen javasolják a mutációs vizsgálat elvégzését, akiknél anti-EGFR kezelést terveznek. Mutáció esetén (2. exon, 12. és 13. kodonban) ettől a kezeléstől el kell állni. Több preklinikai vizsgálat szerint a KRAS-mutáns sejtek függenek a CRAF aktivitásától, ezért igen érzékenyek a CRAF gátlókra, vagy

olyan RAF-gátlókra, mint a sorafenib, de felmerült PI3K- vagy NRAS-gátlók alkalmazása is. Mindez arra utal, hogy adott beteg mintájából a gyakoribbnak bizonyult, és klinikai szempontból hasznosítható információt mutató mutációkat lehetőleg egyszerre (mutációs panelként, multiplex mutációs assay-vel) kell kimutatni, a kezelés optimálisabb tervezéséhez (40). Vizsgálatunk tapasztalatai – ha csekélyek is - hozzájárulnak ahhoz, hogy a növekvő ismereteket minél jobban tudjuk hasznosítani a klinikai gyakorlatban.

3. JELÁTVITELI UTAK VIZSGÁLATA

A molekuláris szinten célzott terápiában alapvető a célpontok azonosítása. A célpontok kiválasztása rendszerint retrospektív vizsgálatok alapján történik, amikor kapcsolatot keresnek a molekuláris változások (az egyes nukleotida eltérésektől a nagyobb kromoszómahiányig – leggyakrabban pontmutáció, amplifikáció, mikrodeleció, transzlokáció, vagy a genom működését szabályzó mikroRNS-ek vagy epigenetikai/epigenomiális változások) és valamilyen klinikai jellegzetesség (mint pl. kezelésre adott válasz, kiújulásig eltelt idő, túlélés hossza) között. Ugyanígy kereshetők különbségek a daganatok kialakulásának egyes állomásainál, a normális szövetektől a daganatelőtti állapotokon keresztül az invazív, majd metasztatikus tumorok összehasonlításakor. A célpontokat hitelesítő markerek azonban kevesen vannak (az egyik legelterjedtebb az EGFR-kezelés elégtelenségét jelző KRAS mutáció, lásd az előző részt), aminek hátterében a szabályozás zavarainak bonyolultsága mellett a kimutatásukhoz használt módszerek különbözőségei, az értékelés változó szempontjai, nem egyszer pedig az értékelők (hacsak nem automatákról van szó) véleménykülönbségei állnak.

A biomarkerek azonosítását nehezíti a daganatok növekedésével párhuzamosan felhalmozódó szabályozási zavarok sokasága (ma kb. 100 gént tesznek „felelőssé” a daganatok kialakulásáért), a heterogenitást elősegítő szubklónok megjelenése, és a szabályozási utak sokszínűsége, egymás aktivitását befolyásoló képességük. A fentiek is indokolják, hogy igen intenzíven folyik újabb biomarkerek, biomarker „panelek” keresése, részben a már ismertek kapcsolatrendszerének figyelembevételével (ez általában kevés gént vagy génterméket érint), részben a sok száz vagy éppen ezer génből a valamilyen szempont alapján a „leggyanúsabbak kihalászásával”. A módszerek igen sokfélék lehetnek. A génszinten kimutatott változásokat sokszor a fehérjeszinten végzett igazolások (validálás) igyekeznek közelebb hozni az alkalmazhatósághoz. Utóbbiak között találjuk az immunhisztokémiai módszereket is, amelyek számos előnnyel (a kimutatáshoz alkalmazott antitestek sokszor elég specifikusak és szenzitívek) és hátránnyal (a minták igen változó „előkészítése” – formalin-fixálás, antigén-feltárás, vagy a kiértékelés szubjektivitása miatt) rendelkeznek. De ekkor még nem szóltunk olyan „ismeretlenekről”, mint pl. a diagnosztikához használt antitestek kötődési képessége (affinitása). Elvileg minden lépést optimalizálni kellene, amire a gyakorlatban csak korlátozottan nyílik lehetőség (sokszor a gyári ajánlások elfogadása a legegyszerűbben járható út). Némileg segít a problémákon a szöveti mikroarray (tissue microarray, TMA), amelynél sok mintán azonos blokkba ágyazva

lehet elvégezni az immunhisztokémiai reakciót. Ezt a módszert először 1998-ban írták le, azóta igen népszerűvé vált a biomarkerek kutatásában (1-8).

Vizsgálatunk tárgyai a vastagbélrákokból származó minták voltak. A vastagbélrák kialakulásának „menetrendje” elég jól ismert (9). A csírasejtes mutációktól és daganatszindrómáktól eltekintve – de azokhoz rendkívül hasonlóan - a sporadikus vastagbélrákok kialakulásában az egyik első génhiba az APC funkciókiesése. (Az APC a gyomor-bél rendszer épségét biztosító egyik legfontosabb szabályzó, „gate-keeper” gén.) Sok adat alapján feltételezhető, hogy az EGFR, amely a vastagbélrákok kb. 80%-ában fokozottan termelődik, igen fontos a daganat kialakulásában és terjedésében. Ennek oka sokszor amplifikáció, a mutáció ritka. Igen gyakori viszont a KRAS mutációja (35-45%) (a KRAS közel 3000 mutációját írták le), melyek közül – ahogy már említettük - a legfontosabbak a 2. exon 12. és 13. kodonjában találhatók. A RAS úton nem ritka a RAF mutációja, míg a PI3K-úton a PI3KCA (katalitikus alegység) lehet mutáns, és kieshet a PTEN funkciója is. Utóbbiak fokozzák az AKT és az mTOR aktivitását, a külső jelektől független proliferációt. Fontos szerepet játszik még a TGFb-úton a TGFbR2 és a SMAD4 változása, illetve a mikroszatellita instabilitás (azaz a mismatch-repair rendszer elégtelensége) (15-20%). Mindezek (másokkal, zömmel ismeretlen tényezőkkel együtt) jelezhetik a célzott kezelés – egyes esetekben a kemoterápiás szerek - várható sikerességét.

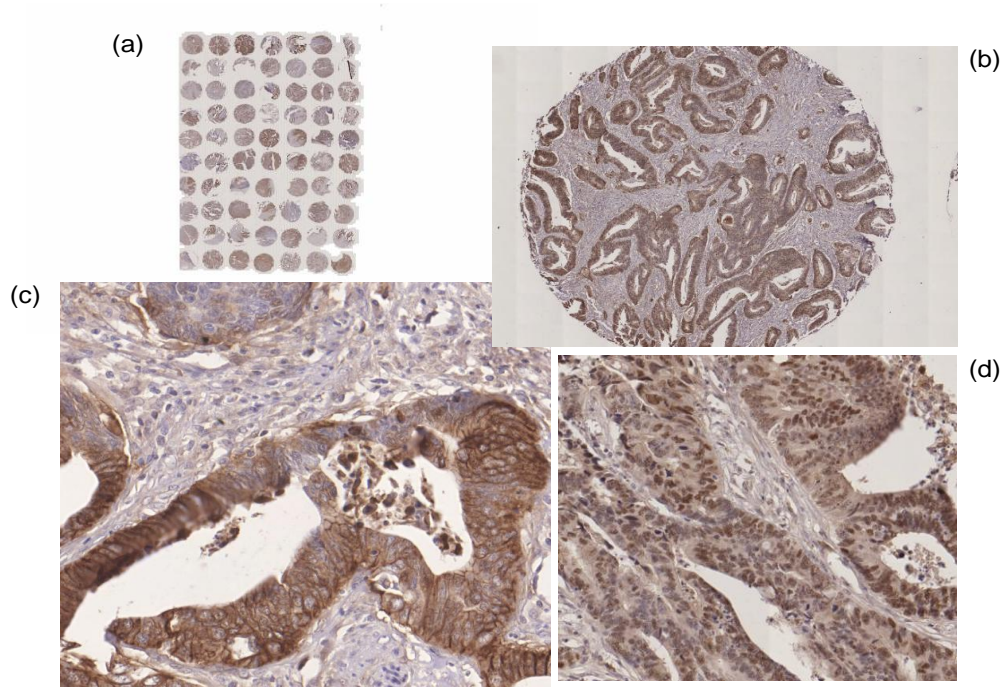
3.1. Saját vizsgálatok

Saját vizsgálataink során - immunhisztokémiai módszert alkalmazva TMA-blokkokon - próbáltunk olyan szabályzót vagy szabályzó családot találni, amelyeknek a jelenléte/aktivitása (mert a jelenlét – sajnos – nem mindig jelent aktivitást is, ennek áthidalására használtunk foszforilált formák elleni antitesteket) összefügg a vastagbélrákok progressziójával, a betegek túlélésével. A cél tehát ebben az esetben elsősorban a prognózissal összefüggő biomarker(ek) azonosítása volt.

3.1.1. Módszerek

TMA - A vizsgálatokhoz vastagbélrákok (1996-2004) formalinban fixált és paraffinba ágyazott mintáit használtuk, amelyekből 3 szöveti mikroarray-t (TMA) készítettünk. A TMA-hoz Panoramic TMA Master-t használtunk (3D Histech, Budapest). Minden TMA-blokk 70 db 2 mm átmérőjű hengert tartalmazott (3.1. ábra), amelyből 1 cirrhotikus májból származott a tájékozódás céljára, a többi pedig a vastagbélrákokból (nem egyszer több minta egy tumorból). Az eredeti blokkokból először hematoxin-eozinnal festett metszeteket

készítettünk és ennek alapján határoztuk meg a TMA-ba kerülő henger helyét (azaz hogy megfelelő mennyiségű és minőségű szövetet tartalmazzon).



3.1. ábra – A 70 mintát tartalmazó TMA blokk (a) és egy minta (b) átnézeti képe. Utóbbin jól látható az adenocarcinoma típusos, mirigyes szerkezete. Nagyobb nagyítás mutatja az EGFR-reakció gyakori képét, azaz a membránfestődést (hiszen az EGFR transzmembránreceptor) (c). Az azonban ritkaság, hogy az EGFR a sejtmagban helyezkedjen el (d). Feltételezik, hogy a sejtmagba bekerülő EGFR funkciója nem azonos a membránban elhelyezkedővel, más szabályozókkal lép kapcsolatba, ezért a sejtműködésre gyakorolt hatása is eltérő.

Betegek - Összesen 95 betegből származtak a minták (52.6% férfi és 47.4% nő), a median életkor 62 év (34-78 év). A betegek kemoterápiás kezelésére, valamint a követésükre a Szt Imre Kórház Onkológiai Profilján került sor. Az átlagos követési idő 76 hónap volt (8-181 hónap). A klinikai lefolyás jellemzésére a következő adatokat használtuk: a betegség stádiuma, teljes túlélés (a diagnózistól az utolsó ellenőrzésig vagy a beteg haláláig eltelt idő; overall survival, OS), és progressziómentes túlélés (PFS: progression-free survival). Ha a beteg nem a daganatos betegsége miatt halt meg, akkor a statisztikai értékelésnél nem vettük az adatait figyelembe.

Immunhisztokémia - Az immunhisztokémiai (IHC) vizsgálathoz 5 mikron vastag metszeteket készítettünk a TMA-blokkokból. A következő fehérjékkel szembeni antitesteket használtuk:

| | |
|---------------------------|--|
| EGFR/RAS/PI3K út | <i>EGFR</i> (DX, Ventana, Zymed, NC384, pY1068, pY1173), <i>HER2</i> (SP3), <i>RAS</i> (AB1), <i>RAF</i> (pRAF-9421), <i>MAPK</i> (4376), <i>ERK1/2</i> (pMEK1/2-2338), <i>AKT</i> (pAKT, panAKT), <i>mTOR</i> , <i>PTEN</i> (Ab-6) |
| Egyéb ligandok/receptorok | <i>MET</i> (NCL-cMET-S), <i>PDGFRa</i> , <i>PDGFRb</i> , <i>STAT2</i> (RB-10458-P0), <i>STAT3</i> (RB-9237-P0), <i>IGFR</i> |
| Sejtciklus szabályzók | <i>ciklin D1</i> (RM-9104-S0), <i>ciklin D3</i> (MS-215-P0), <i>Ki67</i> (N1633) |
| Apoptózis-szabályzók | <i>p53</i> (DO7, FP2-3, SP5), <i>Bax</i> (Ab-1), <i>Bad</i> (75, RB10376-P19; 99, RB10377-P1), <i>Bcl-2</i> (Ab-3), <i>citokróm C</i> (Ab-2), <i>kaspáz 8</i> (Ab-4), <i>FLIP</i> (Ab4042), <i>survivin</i> , <i>NFkB</i> (p50, Ab-2; p65, RB-1648-PO) |
| Adhézió/invázió | <i>E-kadherin</i> (MS-1479-S0). <i>β-katenin</i> (MS-1763-S0), <i>CD44v6</i> (Ab-1), <i>CD138</i> (syndecan-1), <i>MMP2</i> (RB-9233-PO) |
| Egyéb | <i>CD10</i> (CALLA, Ab-2, MS.728-S0), <i>Cox2</i> , <i>HLA-DR</i> , <i>timidilát-szintáz</i> (MAB4130) |

(Főbb beszerzési források: Cell Sign. Tech, Chemicon, DAKO, Epitomics, LabVision, Novocastra, Zymed).

Minden IHC-reakciót először más mintákon ellenőriztünk, és ennek alapján a TMA-blokkokon a reakciókat egyedileg (az egyes antitestekre optimalizáltan) végeztük (feltárás, festékkoncentráció, festési és előhívási feltételek). Az IHC-reakciók és a háttérfestés után minden TMA-lemezt szkenneltünk Panoramic SCAN programmal (3DHitech, Budapest), ami lehetővé tette a képernyőn való kiértékelést. A kiértékelést 3 patológus végezte, egymástól függetlenül, egyeztetett szempontok szerint. Jelentős eltérés esetén konzultatív értékelésre került sor. Minden mintát és reakciót részben a pozitívnak ítélt sejtek aránya, részben a reakció erőssége alapján egy számmal jelöltünk (0-9), amit egyben a reakció aktivitásának tekintettünk. (3.1. Táblázat) Előfordult, hogy a kiértékeléskor, elsősorban a klinikai jellemzőkkel való összehasonlításkor, a 7-9 értékek esetén tekintettük a reakciót pozitívnak, 0-3 esetében negatívnak, míg a 4-6 értékeket köztes zónának (utóbbiak az értékelések „nehéz emberei”, a hibalehetőségek legtöbbször itt jelentkeznek – legtípusabb

példa erre emlőrákoknál a HER2 amplifikációjának IHC-vel történő meghatározásakor a 2+ értékek, de hasonlóan „szürke zóna” több gént tartalmazó assay-k esetében is előfordul).

3.1. Táblázat – Az IHC reakciók aktivitása

| <i>Reakció erőssége</i> | <i>Pozitív sejtek aránya (%)</i> | | |
|-------------------------|----------------------------------|------------------------|--------------------|
| | <i>Alacsony (0-10)</i> | <i>Közepes (11-50)</i> | <i>Magas (51-)</i> |
| Gyenge | 1 | 2 | 3 |
| Közepes | 4 | 5 | 6 |
| Erős | 7 | 8 | 9 |

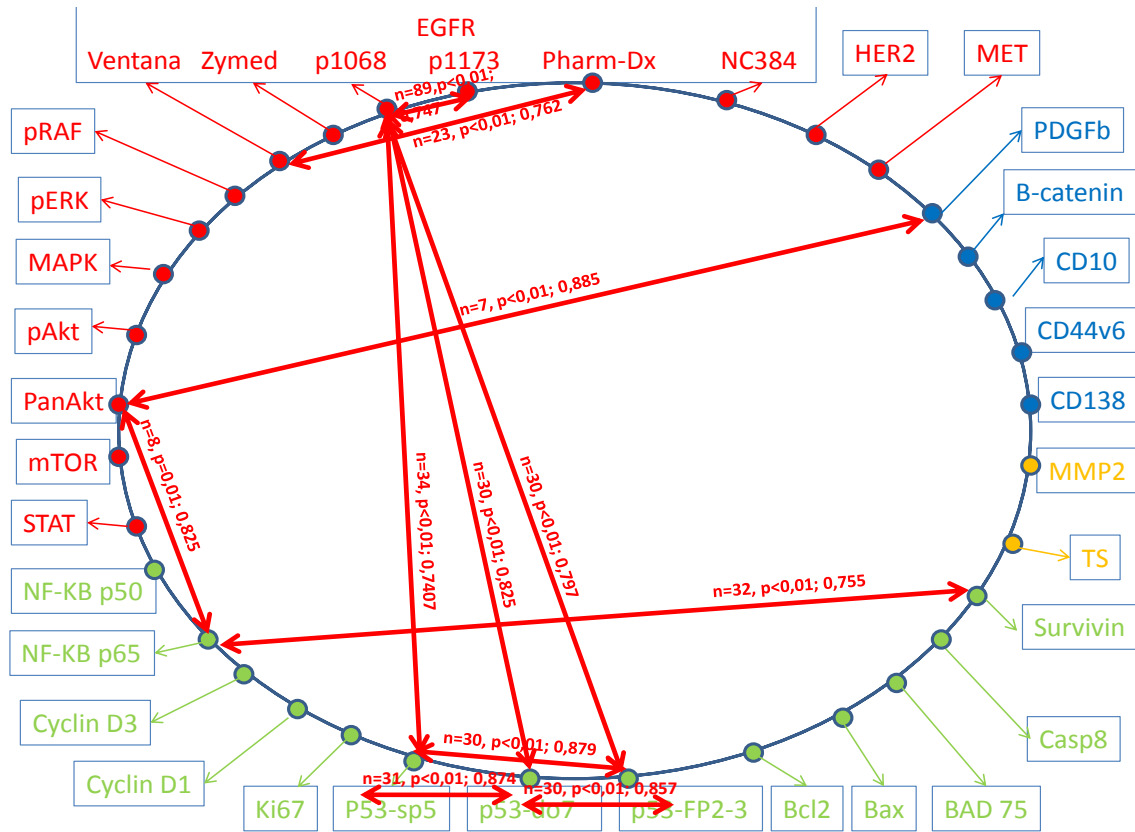
A TMA-blokkon előfordultak technikai hibák, vagy a metszések következtében a minta a blokkból „kifaragódhatott”, emiatt adott minta értékelhetetlenné vált. Mivel azonban egy esetből több TMA-henger (néha több paraffin-blokkból) állt rendelkezésre, ez nem jelentette feltétlenül azt, hogy az esetet sem lehetett értékelni (ilyen összesen 3 alkalommal történt).

Statisztikai értékelés - Mind a klinikai adatok, mind az immunhisztokémiai eredmények kiértékeléséhez a Statistica 9.1 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) és MedCalc (1.2.1.0. (MediCals Software, Mariakerke, Belgium) szoftvereket használtuk.

A TMA-készítés, az immunhisztokémia végzése és értékelése a Semmelweis Egyetem I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében történt (dr. Micsik Tamás, dr. Fónyad László, dr. Krenács Tibor). Az eredményekről közös cikkben számolunk be – jelenleg kéziratban: „Signaling pathways in colorectal cancer. A TMA-IHC study. Micsik T, Nagy Zs, Horváth O, Fónyad L, Krenács T, Pogány P, Simon K.”

3.1.2. Eredmények

Összefüggést kerestünk a vizsgált szabályozók egymás közötti aktivitása, valamint az aktivitások és a klinikai jellemzők között. Ha a reakciók kiértékelésekor nyert adatok nem mutattak normális eloszlást, a Spearman Rank Order Correlation-t használtuk (R-érték) (Statistica szoftver).



3.2 ábra – Erős korrelációt ($R > 0.7$) mutató szabályzók

Összefüggés azonos szabályzók aktivitása között különböző antitestek esetén (3.2 ábra)

Erősen szignifikáns összefüggést ($R > 0.7$) a következők között találtunk:

- az EGFR két foszforilált formáját kimutató antitestek között (89 eset alapján, 0.74),
- a p53-at kimutató három antitest között (30 eset, 0.85-0.87),
- a fenti két csoport között (30 eset, 0.74-0.82),
- az EGFR-t kimutató Pharm-DX és Ventana antitestek között (23 eset, 0.76),

Összefüggés az egyes szabályzók aktivitása között

Erősen szignifikáns összefüggést ($R > 0.7$) a következők között találtunk:

- a p53 és a pEGFR között,
 - az NF κ B p65 és a survivin aktivitása között (32 eset, 0.76),
 - a panAKT és NF κ B vagy PDGFb közötti erős összefüggés (0.88) azonban csak néhány esetre (8 és 7 eset) szorítkozott
- (a kevés esetet érintő összefüggéseket kivéve a p érték mindenhol < 0.001 -nél)

Mérsékelt szignifikáns összefüggést ($R \geq 0.50$) a következők között találtunk (csak a legalább 30 esetre vonatkozóakat soroljuk fel):

| | |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| BAD75 és MAPK (31 eset, 0.52) | BAD75 és RAF1 (32, 0.52) |
| BAX és PDGFRb (31, 0.69) | b-katenin és EGFR (Zymed) (34, 0.50) |
| kaspáz 8 és PDGFRb (32, 0.67) | kaspáz 8 és survivin (33, 0.51) |
| CD44v6 és MAPK (33, 0.50) | CD44v6 és MET (33, 0.52) |
| Ciklin D3 és pAKT (34, 0.50) | HER2 és PDGFRb (30, 0.52) |
| mTOR és MET (30, 0.62) | p53 és pERK1/2 (31 eset, 0.69) |
| pRAF és MET (63, 0.50) | pEGFR és pERK (88, 0.58) |

(a fentiek esetében a p-érték < 0.05)

Összefüggés a klinikai adatok és az IHC aktivitások között

Minden IHC értéket figyelembe véve a túléléssel csak néhány mutatott szignifikáns kapcsolatot. Ilyen, gyenge, fordított összefüggés mutatkozott a BAD75 reakció és a teljes túlélés között. Hasonló erejű, de egyenes összefüggés látszott a BAX és a túlélés („daganatos betegség miatt meghaltak” esetében) között. Ugyanez a betegcsoport erősebb korrelációt mutatott a STAT3-mal, valamint - negatív összefüggést mutatva - a Ki67 reakcióval.

Az adatokat értékeltük úgy is, hogy az IHC reakciók aktivitása alapján két csoportot képeztünk: erős aktivitású minták (megfelel a 7-9 értékkel jellemezetteknek) és gyenge aktivitás (0-3), míg az átmeneti értékeket (4-6) nem vettük figyelembe. Kritériumként szabtuk meg, hogy még ezen belül is csak azokat a mintákat vesszük figyelembe, amelyeknél legalább 8 eset értékelhető volt, és az értékelés alapján legalább 70%-uk tartozott az erősen vagy gyengén aktív csoportba. (3.2. Táblázat)

3.2. Megbeszélés

A vastagbélrákokkal kapcsolatban, TMA-t alkalmazva hazai szerzők is végeztek vizsgálatot. Az egyik ilyen vizsgálat során 16 betegnél hasonlították össze a sebészi mintában a daganatos és a normális szöveteket, és 67 szignifikáns, fehérjeszinten eltérő expressziót mutató gént azonosítottak. Immunhisztokémiára alapozott TMA-val 12-nél igazolták az eltéréseket, valamint sikerült olyan 6 génből (CycA, Ar, Top1, TGFb, Hsp60, ERK) álló markerkombinációt meghatározniuk, amely a korai és a késői daganatok közötti elkülönítést teheti lehetővé. (10) Ugyanez a munkacsoport egy másik vizsgálatában a vastagbélrák „klasszikus útján” (adenoma-dysplasia-carcinoma sorrend) az emelkedett

proliferációs/apoptotikus sejtarány és az osteopontin expresszió mutatott összefüggést a daganatok progressziójával. (11) TMA-val kerestek kapcsolatot – 130 eset kapcsán - az nm23 expressziója és a vastagbélrákok klinikai viselkedése között, mivel az eddigi eredmények igen ellentmondásosak az nm23 prognosztikai szerepét illetően, vastagbélrákban. Míg a betegségmentes túlélés és az nm23 intenzív termelése között találtak párhuzamot, a teljes túlélés esetében nem (12). Műtét előtt kemoirradiációban részesült betegeknél a szövettani anyagon végzett TMA-immunhisztokémia a MIB, a p53, a BCL-2 és a BAX expresszióját találták leginkább összefüggésben a patológiai válasszal (38 eset) Ezen belül a legérzékenyebb tényezőnek a BAX mutatkozott, míg a MIB a többi szabályzótól függetlenül jelezte a kemoirradiációval szemben várható választ. (13)

3.2. Táblázat – Összefüggés az IHC minták aktivitása és a progresszió között

| | <i>Erős aktivitás</i> | <i>Gyenge aktivitás</i> |
|--|--|-------------------------|
| <i>Teljes túlélés</i> | | |
| >10 év | EGFR(V), BAX | --- |
| 6-10 év | EGFR(V), RAS, STAT3, NFkB | p53, CD44v6 |
| 3-5 év | EGFR(V), RAS, BAX kaspáz 8, E-kadherin survivin, p53 | CD44v6 |
| 0-2 év | EGFR(V), ERK, RAF | ---- |
| <i>PFR (progressziómentes túlélés)</i> | | |
| > 6év | EGFR(V), RAS, STAT3 | CD44v6 |
| 3-5 év | --- | |
| 1-2 év | EGFR(V), ERK, RAS | CD44v6 |
| 0-1 év | EGFR(V) | --- |
| <i>Stádium</i> | | |
| 2a | EGFR(V), RAS, STAT3, E-kadherin p53 | --- |
| 3b | EGFR(V), RAS, STAT3 | CD44v6 |

(a többi csoportban nem volt 8 értékelhető eset)

Ez a néhány adat is arra utal, hogy – legalábbis TMA-t alkalmazva – az eredmények eléggé esetlegesek, egymással alig, vagy nem függnek össze. Saját vizsgálataink annyiban

illenek a képbe, hogy ismert szabályzók aktivitásából próbáltunk következtetéseket levonni, a klinikum számára hasznosítható prognosztikai markereket találni. Ez a törekvés több fontos megfigyelést eredményezett.

A vizsgálatok első része a szabályzók (potenciális markerek) IHC-vel értékelt aktivitását egymással hasonlította össze. Nem kis probléma az IHC alkalmazásakor a megfelelő diagnosztikus antitest (reagens) kiválasztása. Tapasztalataink szerint a 6 EGFR-t kimutató antitest egymáshoz igen közeli aktivitást mutatott. A legszorosabb kapcsolatot a PharmDX és Ventana, valamint a foszforilált antitestek között találtuk. Mivel a foszforilált állapot a jelenlét mellett a funkcióra is utal, ezért ezek alkalmazása javasolható az EGFR meghatározására. Hasonlóan jó egyezést mutattak a p53-elleni antitestek. Bár az általánosításhoz kevés az adat, valószínű, hogy az IHC-nél alkalmazott reakciók elég megbízhatóan mutatják ki a kérdéses markereket. De nem szabad elfelejteni, hogy az egyedi aktivitásokat a sejten belül aktuálisan működő többi szabályzó igen intenzíven befolyásolhatja.

Az egyes szabályzók között kevés olyan összefüggés mutatkozott, amelyik a jelenlegi ismereteink szerint funkcionális kapcsolatot is teremt. Ilyennek ítélnélhető az erősen szignifikáns összefüggést mutatók között az EGFR és a p53 proliferációt támogató, valamint az NF κ B és survivin apoptózist gátló aktivitása. A mérsékelt szignifikáns csoportban néhány további vizsgálatot támogat a MET összefüggése a CD44v6-tal vagy az mTOR-ral, a pERK kapcsolata a pEGFR-rel és p53-mal, vagy az ugyancsak proproliferatív irányt mutató pAKT és ciklinD1, illetve PDGFRb és HER2, EGFR és β -katenin páros. Az apoptózist közvetlenül befolyásoló markerek (eltekintve a már említettől) mai ismereteink alapján értelmezhető összefüggésben nem vettek részt.

A minták IHC értékei és a klinikai jellemzők, elsősorban a progresszióval kapcsolatosak kevés összefüggést mutattak. Az EGFR (Ventana) antitesttel kapott eredmények azok, amelyek elég egyértelműen utalnak arra, hogy a diagnózishoz vett mintákban igen nagy arányban a normális bélhám proliferációjának szabályozási menetrendjének elemei ismerhetők fel. Ezt erősíti, hogy a teljes túlélés, és a progressziómentes túlélés esetén is az EGFR mellett az általa befolyásolt út résztvevői jelennek meg még gyakrabban (RAS, RAF, ERK). Önmagában tehát az EGFR expressziója nem jelent rossz prognózist (mint ahogy nem jelent pl. tüdőrák esetében az EGFR-mutáció sem.) Valószínű, hogy ebben az esetben a szabályozás normális gátlói (főleg a szuppresszor gének) mondanak csődöt. A STAT3 szerepének tisztázása – amely ugyancsak kapcsolatban van az EGFR-rel - további vizsgálatot igényel.

A daganatsejtek terjedését befolyásoló markerek közül az E-kadherin a hosszabb túléléssel, a CD44v6 a rosszabb prognózissal társult, ami egybehangzik az eddigi megfigyelésekkel. Az apoptózist jellemző markerek (pl. BAX, p53, kaszpáz-8, survivin, NFkB) ezekkel a kiértékelési szempontokkal sem mutattak jellemző képet a progresszióval kapcsolatban.

A vizsgált beteganyag konvencionális kemoterápiában résesült, és a daganatsejtek, a daganatok terápiára adott válaszában a jelek szerint nem „egyszerűen” az EGFR-út volt a meghatározó (legalábbis az egyetlen). Az a tény, hogy jelenleg a KRAS vad típusát hordozó esetekben az anti-EGFR monoklonális antitestekkel (cetuximab, panitumumab) végzett kezelések klinikai eredménye - az összes vastagbélrákot tekintve – csak 10-20%, jelzi egyéb terápiás választ befolyásoló események jelenlétét. Ezen a téren feltehető az esetek közötti jelentős heterogenitás az, ami magyarázhatja azt, hogy statisztikailag szignifikáns marker-család, a progresszió szempontjából nem jelölhető meg, mert egy-egy szabályozó ritkán éri el az értékelési küszöböt. Az ugyancsak valószínűsíthető, hogy a progresszióval járó heterogénné válás előtt, amikor még fekltehetően az EGFR-út a későbbiekénél jobban befolyásolja a tumor növekedését, az EGFR-út elleni terápiás támadás (nem feltétlenül csak anti-EGFR) eredményesebb lehet.

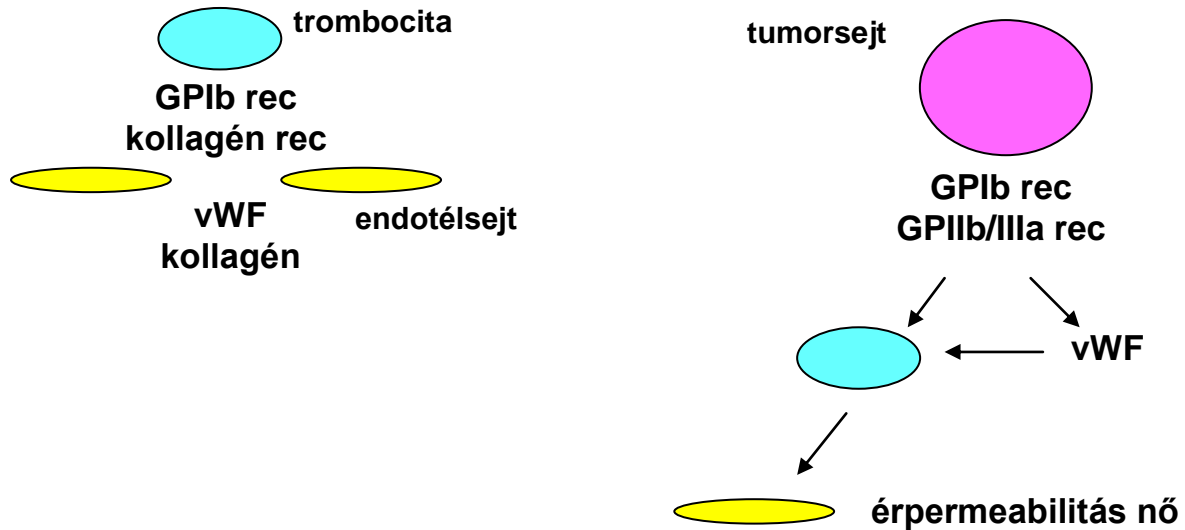
4. VÉRALVADÁS ÉS A DAGANATOS PROGRESSZIÓ

4.1. Hemosztázis és a daganatok

A hemosztázis és a daganatok kapcsolatáról elsőként Bouillard és Bouilland (1) számolt be, akik három tumoros betegnél figyeltek meg mélyvénás trombózist (DVT), az alsó végtag ödémájával, amit annak tulajdonítottak, hogy fibrinrög zárta el a vénát. Később Trousseau (2) írt le kapcsolatot a daganat és a vénás tromboemboliázis (VTE) között, a kialakult elváltozást phlegmasia alba dolensnek nevezte. A Trousseau-szindróma a Virchow-triász minden elemével rendelkezik: stasis (amelyet okozhat a tumoros kompresszió), endotélkárosodás (valószínűleg a tumorsejtek inváziója miatt) és fokozott véralvadás (amit főleg a tumorsejtek által a termelt, a hemosztázist, a véralvadási kaszkádot befolyásoló faktorok okoznak).

Az első leírások óta többszörösen megerősítették, hogy kétirányú kapcsolat áll fenn a VTE és a daganatok között. Egyrészt a daganatos betegekben fokozott a VTE rizikója (7-28-szoros), különösen a diagnózis utáni első néhány hónapban és távoli metasztázisok esetén (3); és fordítva, a daganat keletkezésének nagyobb az esélye az idiopátiás VTE első epizódját követő 2 éven belül (4). Hospitalizált daganatos betegeken a VTE a második leggyakoribb halálok, minden hetediknél tüdőembolia lép fel. A műtét ugyancsak emeli a rizikót. Az egyes szervek daganatait tekintve különbségek vannak a VTE gyakoriságában (itt csak az általunk részletesebben vizsgált lokalizációkat említve): emlőrák 22 DVT/PE (mélyvénás trombózis/tüdőembolia) per 10.000 beteg, vastagbélrák 76, pancreasrák 110, petefészekrák 120. (5) (US adatok, >65 év feletti hospitalizált betegek). A VTE epizódot túlélőknél gyakran fordul elő ismételt VTE, poszttrombotikus szindróma, pulmonális hipertenzió – melyek a betegek életminőségét is alapvetően befolyásolják. Az ilyen adatok ismeretében meglepőnek hangzik, hogy az egyik felmérés szerint az onkológusok 60%-a nem hisz abban, hogy a hormon- vagy kemoterápia fokozza a VTE rizikóját, és 80%-uk nem is alkalmaz tromboprofilaxist (6)

A hemosztatikus rendszer az ereket védő komplex mechanizmus, együttműködve a gyulladással és a károsítást helyreállító rendszerekkel. Normálisan a hemosztázis „nyugalomban” van és csak az endotél sérülése után aktiválódik. Kialakul a vazokonstrikció, a csökkenő vérátáramlással a trombociták a GP1b (platelet glycoprotein Ib) receptoraikon – pontosabban a GPIb-FV-FIX komplexen – keresztül kapcsolódnak az endotél alatti

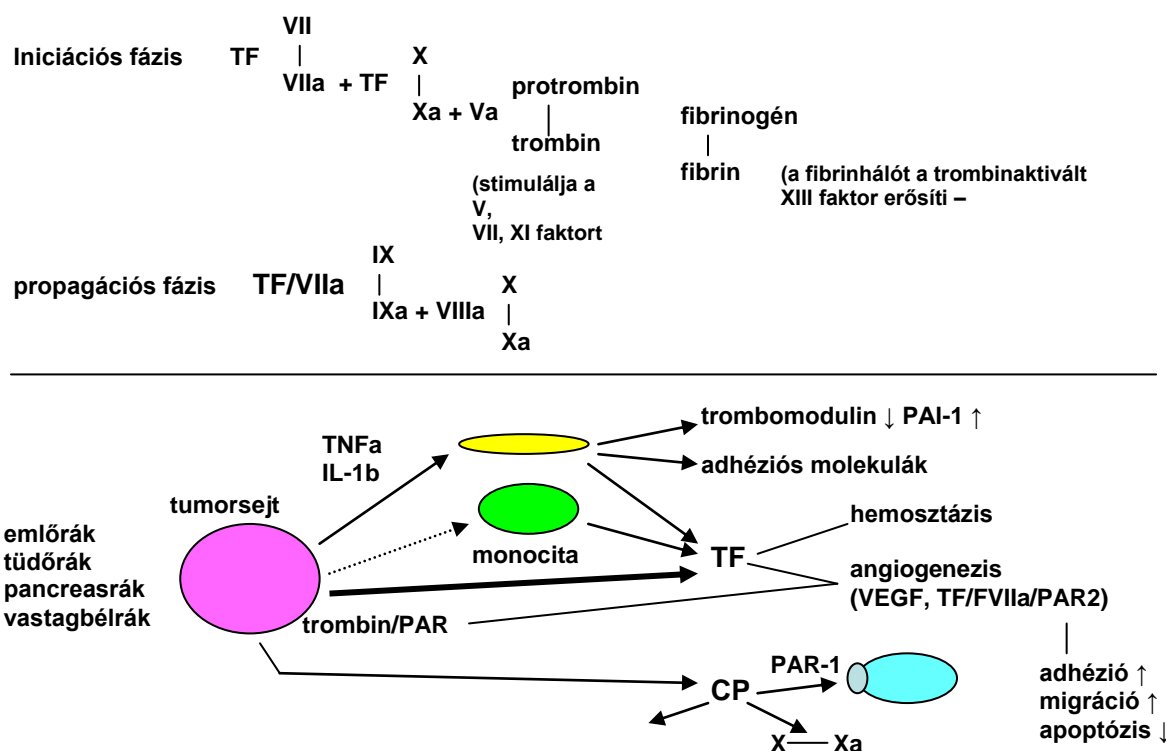


4.1. ábra Primer hemosztázis – trombociták aggregálódnak az endotél-sérülés helyén

von Willebrand faktorhoz (vWF), majd kollagénreceptoraik segítségével a matrixhoz. Az aktivált trombociták aggregálódnak, használva a GPIIb/IIIa receptoraikat és kitapadnak a sérült ér falához, kialakul a kezdeti vérrög. A tumorsejtek is képesek GPIb és GPIIb/IIIa receptorok termelésére, amelyekkel kapcsolódni tudnak a vWF-hoz és a trombocitákhoz. Preklinikai vizsgálatban a GPIIb/IIIa gátlása fokozta a metasztázisok létrejöttét, míg P-szelektinhiány esetén ez nem jött létre. Ez is azt bizonyítaná, hogy a GPIIb/IIIa a hemosztázisban játszott szerep mellett részt vesz a metasztázisok korai, P-szelektin-függő lépéseiben (7)

Normális körülmények között a fentiekkel párhuzamosan az endotél működése a nyugalmi antikoagulánsból prokoaguláns irányba változik és beindul a véralvadási kaszkád is. A fibrin, majd a fibrinháló tovább aktiválja a trombocitákat, de a fibrinolitikus rendszert is, hogy szükség esetén a plazmin el tudja távolítani a fibrint. A fentiek mellett a trombin nem-hemosztatikus elemekkel is kölcsönhatásba lép, elősegítve a kemotaxist, a fibroblasztok aktivitását, az angiogenezist, ezen keresztül a sérülés gyógyulását.

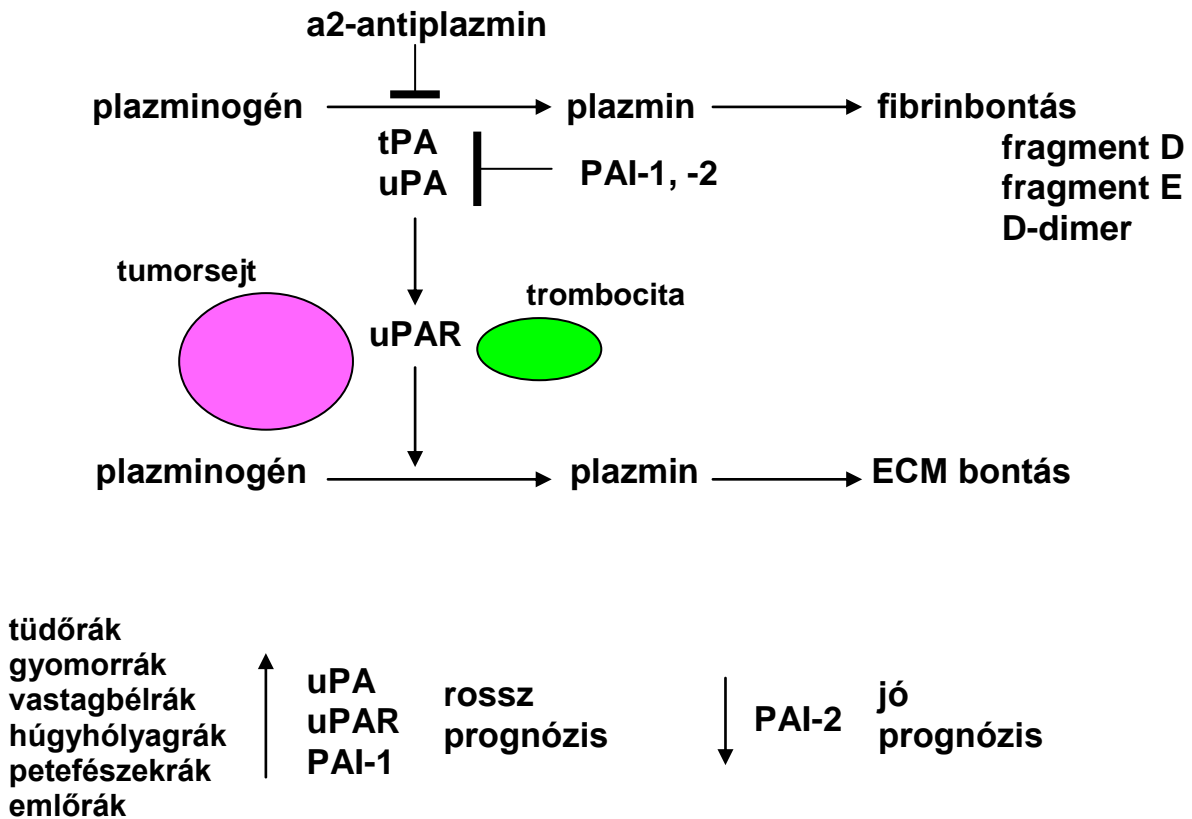
A véralvadást a szövet károsodása indítja el a szöveti faktor (tissue factor, TF, transzmembrán glikoprotein) segítségével, amely normálisan az endotél alatt helyezkedik el, és csak érsérülés esetén exponálódik (az aktiválók között található pl. IL-1 β , TNF α , bakteriális lipopoliszaccharid). A számos faktor kölcsönhatásának eredményeként megfelelő mennyiségű trombin (szerin-proteáz) keletkezik, a trombin pedig a fibrinogént hasítja fibrinné és alakul ki a már említett, a vérrög létrejöttét biztosító fibrinháló. Ez a klasszikus extrinsic út,



4.2 ábra – Szekunder hemosztázis – fibrinháló zárja el az endotél sérülést (fent). A daganatsejtek, részben a gazdaszervezet normális sejtjein keresztül számos prokoaguláns termelésével és aktiválásával segítik elő a véralvadást, és valószínűleg az angiogenezist (TF: tissue factor, transzmembrán receptor, citokin receptor szuperfamilia tagja; CP: cancer procoagulant, cisztein proteáz) (alul)

de a daganatok esetében az intrinsic út is aktiválódhat (a FXII. faktor segítségével). Megjegyezhető, hogy a TF a fibrinképződés elősegítése mellett serkenti a VEGF (vascular endothelial growth factor) termelődését, így az angiogenezist (8) Az angiogenezis támogatásában különösen a TF-FVIIa-PAR2 jelútnak tulajdonítanak fontos szerepet, amely emellett befolyásolja a migrációt is. Kísérleti adatok szerint a TF-FVIIa gátlása gátolta a daganat növekedését és az angiogenezist (a vérzés veszélyével).

A normális hemosztázis a vérrög képződését az érsérülés helyére korlátozza, amiben fontos szerepet játszik a TFPI (tissue factor pathway inhibitor), az antitrombin és az aktivált protein C. Ha ezek aktivitása alacsony, pl. a daganatos betegben, akkor az a hemosztázist aktiválja. A TFPI-nél az egyes családtagok hatása eltérő. Míg a TFPI-1 elősegíti a daganatsejtek kötődését az extracelluláris matrixhoz, és ezzel migrációjukat, a TFPI-2 ezt azzal akadályozza, hogy gátolja a plazmint, amely különben a matrix metalloproteázain keresztül bontja a matrixot, utat nyitva ezzel a daganatsejtek számára.



4.3. ábra – Fibrinolitikus rendszer szerepe a fibrinháló felbontása

A daganatos betegek többségében emelkedik a véralvadást elősegítő tényezők (FV, FVIII, FIX, FXI), és a véralvadás aktiválódását jelző markerek (pl. trombin-antitrombin, protrombin fragment 1+2, fibrinopeptid, D-dimer) szintje. Sok daganat képes TF termelésére, ezzel az extrinsic út aktiválására. Az intrinsic út részvételét jelezné a VIIa faktor emelkedése, azonban daganatok esetében ezt nem találták lényegesnek (9). Csak a daganatsejtek termelhetik a CP-t, amely a FVII faktortól függetlenül aktiválja a FX-et. A daganatsejtek a TF és a prokoagulánsok mellett termelhetnek olyan faktorokat is, amelyek a fibrinolitikus rendszert szabályozzák, mint a plazminogén aktivátor (PA), az ezt gátló PAI-1 és -2 (PA-inhibitor), és receptora (PAR). Továbbá, a daganatsejtek közvetlenül is kapcsolatba léphetnek a trombocitákkal, elősegítve azok aktiválódását és aggregációját, valamint felszabadíthatnak olyan szolubilis mediátorokat, mint az ADP, trombin és más proteázok, és persze olyanokat is, amelyek az endotélsejtekben fokozzák a TF termelődését, csökkentik a trombomodulínét, ezzel prokoaguláns környezet alakul ki az érfalnál (a protein C aktiválásának csökkenése miatt, 10).

A trombociták a daganatterjedés hematogén fázisában igen fontos szerepet játszanak, részben a már említett faktorok termelésével, részben a tumorsejtekkel aggregálódva védik meg őket az immunrendszer „támadásaitól”. (11)

Ahogy említettük a daganat növekedésével a koagulációs kaszkád aktiválása fokozza a fibrinolitikus rendszer aktivitását is. Ennek egyik markere a plazmában a D-dimer (DD) szint emelkedése. A DD a fibrinlebontás terméke, a fibrinogén két keresztkötött D-fragmentjéből áll. A daganatos betegekben a prokoaguláns aktivitás fokozódását, ezzel a trombus- és a embolia keletkezés esélyének növekedését jelezheti a DD-szint emelkedése. (De: normális DD-szint nem zárja ki a trombotikus folyamat jelenlétét.) (12)

4.2. Tromboprofilaxis – heparin és LMWH

Daganatos betegekben sok olyan tényező fokozhatja a koagulációs aktivitást (pl. TF, uPA, CP), amelyek rezisztensek a normális antikoagulációval szemben. A tumor progressziója mellett a terápia (pl. műtét, kemoterápia) is lehet prokoaguláns hatású. Ismert, hogy a kórházból való eltávozás utáni első napokban a daganatos betegeknél fokozott a VTE veszélye. Ebben a műtéti trauma mellett közrejátszik a hosszabb immobilizáció, vagy a vénakatéterek. A kemoterápiával kezelt daganatos betegeknél fellépő kockázat fokát a Khorana által felállított modell segítségével becsülni lehet. (4.1. Táblázat)

Tumoros (és nem tumoros) betegeken a trombózis kialakulásának megelőzésére és kezelésére a leginkább elterjedt eszköz a nem frakcionált heparin (UFH, unfractionated heparin), illetve újabban származékai, az alacsony molekulásúlyú heparinok (LMWH, low molecular weight heparin). (13-17) (Az LMWH-k egyedi molekulák, egymással nem helyettesíthetők.) Az UFH és LMWH összehasonlítása szerint az LMWH alacsony dózisának is ugyanolyan profilaktikus hatása van, mint az UFH-nak. A kezelés tartamát tekintve a prolongált profilaxis hatásosabb (18). Ebben az esetben is az LMWH-t részesítik előnyben (19)

A tromboprofilaxis fontos kérdései és válaszai a 2009-es hazai irányelvek alapján (20) a következők: (a) kiket részesítsünk profilaxisban? – a döntést befolyásolják: primer daganat típusa, kezelés formái, anamnézisben VTE, egyéb rizikótényezők; (b) mennyi ideig adjuk? – kezelés első hónapjai, recidívák, előrehaladt betegségnél az aktív onkológiai kezelés során; (c) milyen módszert alkalmazzunk? – gyógyszeres és mechanikus.

4.1. Táblázat - Kockázati modell a daganatos betegeknél kialakuló VTE-re, kemoterápia esetén (15)

| | |
|--|---|
| Halmozottan nagy kockázatú tumor (gyomor, pancreas, agy, vese) | 2 |
| Nagy kockázatú tumor (tüdő, lymphoma, nőgyógyászati, húgyhólyag, here) | 1 |
| Kezelés előtti trombocitaszám ≥ 350 G/l | 1 |
| Hemoglobin < 100 g/l vagy eritropoetin használata | 1 |
| Emelkedett fehérvérsejtszám ≥ 11 G/l | 1 |
| Testtömegindex ≥ 35 kg/m ² | 1 |
| (Kockázati kategóriák: alacsony (0), közepes (1-2), nagy (≥ 3)) | |

Primer profilaxis és kezelés ajánlott (a) kórházi ápolás alatt - daganatellenes műtétnél és utána 4 hétig, a kombinált kezelés tartama alatt; (b) nem hospitalizált betegnél – magas rizikó esetén, kombinált kezelés alatt.

Másodlagos (trombotikus esemény után) profilaxis és kezelés ajánlott: (a) DVT után 3-6 hónapig, (b) tüdőembolia után 6-12 hónapig, (c) előrehaladt vagy metasztatikus betegeknél (ha VTE áll fenn vagy korábban már ismétlődött).

4.3. Daganatgátlás – heparin és LMWH

A daganatos betegekben a protrombotikus állapot részben annak köszönhető, hogy a tumorsejtek aktiválni tudják a véralvadási rendszert. Ennek mechanizmusa nem teljesen ismert, de az igen, hogy a tumorsejtek képesek expresszálni hemosztatikus fehérjéket, elősegíteni gyulladáscitokinek termelését (a tumorsejtek vagy a normális sejtek által), valamint képesek adhézió révén kapcsolatot teremteni a normális sejtekkel, így trombocitákkal, endotélsejtekkel és monocitákkal. (21).

Az utóbbi időben felmerült, hogy a heparin és az LMWH-k a trombózist megelőző hatásuk mellett javíthatják a daganatos betegek túlélését. A preklinikai adatok szerint ez a hatás a metasztázisgátláson keresztül érvényesülne, de ennek a mechanizmusa nem ismert (16,22-30). Valószínű, hogy a tumorelles hatása független a hemosztázisra gyakorolt hatástól, bár a heparin sok olyan kapcsolattal rendelkezik, amelyek a metasztázisképződésben fontosak lehetnek. Ilyen partnerek lehetnek enzimek (pl. a heparináz), adhéziós molekulák (pl. P- és L-szelektin), növekedési faktorok, citokinek. A heparin/LMWH ebben az esetben megnehezítheti vagy meggátolhatja azt, hogy a tumorsejtek pl. megvédjék magukat a keringésben trombocita- vagy fibrinköpennyel, vagy gátolják kitapadásukat az endotélsejteken (és így az extravazációt). A heparin/LMWH hatása a lokálisan növekedő tumorra még kevésbé ismert, amit feltételeznek az az, hogy ezen a téren az angiogenezis gátlása lenne igen fontos.

A fent említettek közül a heparanáz (endo- β -D-glukuronidáz) képes heparánszulfát oldalláncokat lehasítani (pl. heparánszulfát-proteoglikánokról – sejt felszínen vagy matrixban). A heparanáz expressziójának a fokozódása a trombocitákban és a daganatsejtekben hozzájárul a TF aktiválásához, amely az egyik leghatékonyabb prokoaguláns. Ezzel hozták kapcsolatba többek között a heparanáz gátló heparin daganatellenes, antimetasztatikus hatását. Magas heparanáz aktivitást találtak pl. pancreasrákban (78%), gyomorrákban (80%), myeloma multiplexben (86%) (31-34).

A szelektinek (L, P, E) transzmembrán glikoproteinek, ligandjaik minimális felismerő egysége a sialil-Lewis^x és izomérje. A kapcsolatuk a sejtadhézió kivül részt vesz a jelátvitelben, ezzel befolyásolják a migrációt és más adhéziós fehérjéket, pl. az integrineket. A daganatok esetén szerepüket főleg a metasztatizálásban, annak is az intravaszkuláris fázisában feltételezik. Az L-szelektin a daganatsejtek és a leukociták – direkt vagy indirekt – kapcsolatát segítik elő, a P-szelektinek a daganatsejtek és a trombociták kapcsolatát, míg az aktivált endotélhez történő kitapadást a P és az E formák. Mind a heparin, mind az LMWH-k képesek kötődni a P- és L-szelektinekhez és gátolni azok funkcióját (ez a hatás független az antikoaguláns hatástól) (35)

A TF-ral kapcsolatban két tumorellenes stratégiát említenek: (a) az egyik szerint olyan kiméra fehérjét kellene alkalmazni, amelynek egyik része a tumor érrendszerét ismeri fel, míg a másik a trombogén, amely elzárva az ereket a tumorban annak elhalásához vezet. Elvileg. Veszélyt az emelkedett TF-szint miatt bekövetkező, tumoron kívüli trombózis jelenthet. (b) A másik elképzelés olyan immunkonjugátumot használna, amely elpusztít bármely TF-et expresszáló sejtet, így tumorsejtet, de endotélsejtet is. Ebben az esetben a vérzés veszélye a probléma a közvetlen tumorba történő injektálás ellenére. (36) A TF expresszióját nem kissejtes tüdőrák esetében prognosztikai faktornak gondolják, különösen, ha a szuppresszor gének sem működnek. (37) Az a kérdés, hogy mi a kapcsolat a TF és az általa befolyásolt események, valamint a tumoros őssejtek között, még eldöntésre vár. Felvetődött, hogy az őssejtek aktivitását a TF/PAR rendszer gátlásával lehetne befolyásolni (38)

Már egy évtizede, részben kísérleti, részben klinikai megfigyelések utaltak arra, hogy aktivált onkogének (pl. KRAS, EGFR, MET) vagy szuppresszorgének inaktiválása (pl. p53, PTEN) a hemosztázis zavaraihoz vezethetnek, fokozhatják a trombózishajlamot, főleg a TF és a PAI-1 termelésével. (39). Az is kiderült, hogy pl. az LMWH-val végzett kezelés tumorellenes hatású is lehet, azaz a véralvadási rendszer különböző fehérjei befolyásolhatják a tumorok növekedését, terjedését, illetve az angiogenezist. Így pl. a TF a proteázok, mint az FVIIa, az FXa és a trombin lokális termelésének elősegítésével aktiválhatják a jelátviteli

utakat (pl. trombinreceptorok, PAR1/2 hasítását), melyek azután hatékony angiogén faktorok (pl. VEGF, IL-8) fokozott expressziójához, antiangiogének (pl. trombospondinok) gátlásához, túlélést, migrációt, metasztázálást elősegítők termelődéséhez vezethetnek (40-42).

Többször kerültek említésre az angiogenezist befolyásoló tényezők. Természetesen ezek lehetnek proangiogének (pl. VEGF, PDGF, TF, trombin, FVII, FXIII) és antiangiogének (pl. PF4, trombospondin, antitrombin, PAI1) és a végeredmény a két csoport egyensúlyán múlik. A daganatsejtek célja a vérellátásuk biztosítása, amely több formában történhet, de proangiogénekre (nem csak az említettek) a legtöbb esetben szükség van. Ez a megjegyzés azt is jelenti, hogy a proangiogének gátlása nem minden angiogenezis formában lehet hatékony – beleértve a hemosztázist befolyásoló szereket is (antikoaguláns heparin, LMWH).

Az antikoaguláns hatású LMWH-k daganatokra kifejtett hatását több klinikai vizsgálat elemezte. Így pl. nadroparin hatását vizsgálták kemoterápiában részesülő daganatos betegeknél (előrehaladt szolid - tüdő, emlő, gyomor-bél, fej-nyak, pancreas - tumoroknál). A kezelés tartama maximum 4 hónap volt, általában olyan hosszú, mint a kemoterápiás kezelés. Igazolt vénás vagy arteriális tromboemboliás esemény a kezelték 2.0%-ánál, a placeboval kezelték 3.9%-ánál fordult elő (leghatékonyabb hatás a tüdő és gyomor-bélrendszeri daganatoknál jelentkezett). Súlyosabb vérzés a kezeltéknél volt, enyhébb a két csoportban egyformán. A 12 hónapos túlélés tekintetében nem volt különbség a csoportok között. (43) A MEDENOX-vizsgálatban a 40 mg-os enoxaparin csoportban, melyben a daganatos betegek aránya 12,3% volt, kisebbnek bizonyult a halálozás kockázata a placebo csoporthoz képest. A FAMOUS-, majd a CLOT-vizsgálat újraértékelése során a jobb prognózisú betegeknél az LMWH-val kezelt csoportban találtak túlélési előnyt. A MALT-vizsgálat már az előrehaladt stádiumú betegeknél is kedvezőbb túlélést értékelt. (25). Az egyes daganattípusokat tekintve az eredmények ellentmondásosak (44,45) (Az utóbbi vizsgálatokhoz deltaparint, nadroparint és certoparint használtak.)

A daganatellenes hatást azonban nem mindig sikerült igazolni. Randomizált, nyílt vizsgálatot végeztek nem kissejtes tüdőrákos (IIIB stádium), hormon-refrakter és lokálisan előrehaladt prosztatatarákos betegeken, akik a standard kemoterápiás kezelés mellett vagy kaptak nadroparint (sc., összesen 12 hétig – 6 hétig terápiás dózisban, majd ennek a felét) vagy nem. A median túlélés 13.1 és 11.9 hónap volt, emellett a progresszióig eltelt időben, a nagyobb vérzések arányában sem találtak különbséget. (46)

Néhány éve felvetődött, hogy a heparin antimetasztatikus és antikoaguláns hatása nem esik egybe (47) In vivo kísérleti rendszerben az egyik LMWH, az enoxaparin kifejtette a várt

antikoaguláns hatást, a nem-antikoaguláns formája (NA-LMWH) azonban nem, viszont az antimetasztatikus hatásuk hasonló volt.

4.4. Saját vizsgálatok

A következőkben két vizsgálat megfigyeléseiről számolunk be.

1. vizsgálat

Betegek, kezelés. A randomizált, nyílt, retrospektív vizsgálatban LMWH-val kezelt és nem kezelt szolid daganatos - szinte kizárólag emlőrákos és vastagbélrákos – betegeket értékeltünk. (96 beteg - 62 emlőrák, 29 vastagbélrák, 5 petefészekrák). Az LMWH-kezelés nadroparinnal (Fraxiparin) történt (GlaxoSmith Kline) a kemoterápiás kezelés alatt, illetve a ciklusok között, legalább 6 hónapig. Az LMWH-t s.c. kapta a beteg, naponta egyszer, a testtömeg alapján számított dózisban. (Az LMWH előnye az UFH-nal szemben, hogy nincs szükség rendszeres laboratóriumi kontrollra és az, hogy a beteg otthon kezelheti saját magát.) A betegek különböző kemoterápiás protokollban részesültek: főleg FEC (5-fluorouracil, epirubicin, cyclophosphamid) emlőrák, deGramont-protokoll (5-fluorouracil, leucovorin) vastagbélrák, valamint paclitaxel és carboplatin petefészekrák esetén. A kontroll csoportba 68 beteg tartozott, akik nem kaptak LMWH-t. A betegeket képalkotó módszerekkel ellenőriztük; a vizsgálat kezdetén senkinél nem tapasztaltak agyi áttétet vagy mélyvénás trombózist.

A vizsgálat célja a betegeknél a progressziómentes és a teljes túlélés értékelése (utóbbi a kezelés kezdete és a halál beállta vagy az utolsó vizit ideje közötti időt jelenti). A betegség stádiumát a TNM-rendszer alapján állapítottuk meg.

Statisztikai értékelés. Az eredmények kiértékeléséhez Kaplan-Meier túlélési analízist, az eltérések szignifikanciáját Logrank, Tarone-Ware és Breslow-tesztek alapján számítottuk.

Eredmények

Az LMWH-kezelt betegek közül azoknál mutatkozott statisztikailag előnyös hatás, azaz hosszabb túlélés, akiknél a tumor T3 vagy T4 stádiumban volt (4.2 Táblázat). A nyirokcsomók érintettsége (N) nem okozott eltérést a két csoport között. M0 vagy M1 stádium mindkét csoportban előfordult. Meglepetésre, az LMWH-kezelés hosszabb túléléshez vezetett akkor, ha a betegeknél a kezelés kezdetekor már kimutatható(k) volt(ak) a metasztázis(ok) (kivéve a központi idegrendszert) (M1 stádium). (4.3 Táblázat)

A trombózisok és a vérzések gyakoriságában a két csoport között nem volt különbség.

4.2 Táblázat – Túlélés összehasonlítása az LMWH-val kezelt és a kontroll csoportban – T3 és T4 stádiumban

| | | <i>LMWH</i> | <i>Kontroll</i> |
|-----------|-------------------|-----------------|-----------------|
| <i>T3</i> | Betegszám | 33 | 16 |
| | Túlélési idő (hó) | | |
| | mean | 82.55 | 37.2 |
| | median | 71.93 | 21.27 |
| | 95% | | |
| | mean | (56.13; 108.96) | (23.95; 50.46) |
| | median | (26.83; 117.03) | (6.11; 36.42) |
| <i>T4</i> | Betegszám | 23 | 6 |
| | Túlélési idő (hó) | | |
| | mean | 49.31 | 58.87 |
| | median | 58.9 | 28.6 |
| | 95% | | |
| | mean | (39.76; 58.85) | (11.31;106.44) |
| | median | (50.91; 66.89) | (0; 63.8) |

4.3 Táblázat – Túlélés összehasonlítása az LMWH-val kezelt és a kontroll csoportban – M0 és M1 stádiumban

| | | <i>LMWH</i> | <i>Kontroll</i> |
|-----------|-------------------|-----------------|------------------|
| <i>M0</i> | Betegszám | 44 | 55 |
| | Túlélési idő (hó) | | |
| | mean | 117.66 | 135.32 |
| | median | 79.17 | 163.87 |
| | 95% | | |
| | mean | (53.72; 181.59) | (114.89; 155.75) |
| | median | (60.6; 97.72) | (16.81;310.92) |
| <i>M1</i> | Betegszám | 52 | 13 |
| | Túlélési idő (hó) | | |
| | mean | 75.38 | 33.85 |
| | median | 66.7 | 27.13 |
| | 95% | | |
| | mean | (58.66; 92.10) | (18.99; 48.72) |
| | median | (55.12; 78.28) | (6.13; 48.14) |

4.4 Táblázat – Túlélés összehasonlítása az LMWH-val kezelt és a kontroll csoportban – T3N0M1 és T3N1M1 stádiumban

| | | | <i>LMWH</i> | <i>Kontroll</i> |
|---------------|-------------------|--------|----------------|-----------------|
| <i>T3N0M1</i> | Betegszám | | 9 | 4 |
| | Túlélési idő (hó) | mean | 66.1 | 42.4 |
| | | median | 38.8 | 27.1 |
| | 95% | mean | (28.57; 103.7) | (112.46; 72.37) |
| | | median | (3.29; 74.31) | (-) |
| <i>T3N1M1</i> | Betegszám | | 11 | 4 |
| | Túlélési idő (hó) | mean | 65.04 | 34.43 |
| | | median | - | 15.7 |
| | 95% | mean | (47.9; 82.1) | (13.1; 55.8) |
| | | median | (-) | (0; 40.27) |

Kaplan-Meier analízist csak T3N0M1-ben és T3N1M1 csoportban tudtunk végezni. (A többi alcsoportban a betegszám túl alacsony volt az értékeléshez.) Mindkét esetben az LMWH-val kezeltéknél a túlélés median- és átlagértékei kedvezőbbek voltak (4.4. Táblázat)

Az átlagos követési idő 4.9 év volt. A diagnóziskor észlelt klinikai állapothoz képest bekövetkező változást – regresszió, progresszió, változatlan állapot – képalkotókkal és markerekkel értékeltük. A vizsgált időszak végén (az utolsó kórházi vizit vagy az elhalálozás időpontja) az LMWH-val kezelt betegeknél 32.3%-ban alakult ki progresszió, a kontroll csoportnál 50.7%-ban. A progressziómentes túlélés átlaga 35 hónap volt a kezelt és 26 hónap a kontroll csoportban, míg regresszió (tumortömeg 25%-nál nagyobb csökkenése) 12.5%-ban, illetve 3.1%-ban fordult elő. Klinikai változás nem következett be a betegek 55.2%-ánál az LMWH-kezelt, illetve 46.2%-ban a kontroll csoportban.

2. vizsgálat

Betegek. Összesen 299 – emlőrákban, vastagbélrákban, pancreasrákban és petefészekrákban szenvedő - beteget választottunk be random abba a retrospektív vizsgálatba, amelynek elsődleges célja az LMWH-kezelés hatásának, valamint a D-dimer, mint potenciális prognosztikai faktor vizsgálata volt. Az egyetlen kizáró oknak azt tekintettük, ha az adott esetről túl kevés (a kérdések megválaszolásához elégtelen mennyiségű) adat állt rendelkezésre. A vizsgált esetek néhány klinikopatológiai jellemzőjét mutatja az 4.5 Táblázat.

Markerek. A tumormarkereket – CEA, CA125, CA15-3, CA19-9 -, valamint a hemosztázis jellemző tényezőit rutin laboratóriumi módszerekkel mértük, hasonlóan emlőrákoknál a hormonstatus, és HER2 aktivitás meghatározásához (ELISA, EIA, immunhisztokémia, FISH – a vizsgálatokat a Szent Imre kórház Központi Laboratóriuma és Patológiai Osztálya végezte).

Kezelés. Tromboprofilaxishoz a nadroparint a betegek a testtömegre számítottan kapták naponta egyszer, s.c.; az enoxaparint (Clexane, Sanofi-Aventis) 40-60 mg/nap dózisban, függően a testtömegtől és a rizikótényezőktől; míg a dalteparint (Fragmin, Pfizer) 5000 IU dózisban (ha dalteparinnal indult a kezelés). Az LMWH-t a betegek az adjuváns terápiával (rendszerint a 6 hónapos ciklus során), majd ezután 3 hónapig; vagy a palliatív kezelés során (a kemoterápiával párhuzamosan) kapták. A betegek a megfelelő tájékoztatás után beleegyeztek az LMWH adásába és a kezelést legtöbbször saját maguk végezték. Az LMWH típusát kizárólag az határozta meg, hogy melyik állt rendelkezésre. A tromboprofilaxis főbb indikációs okai: malignus betegség, kemoterápia, előző trombotikus és/vagy tromboemboliás esemény – lényegében követve a Khorana által leírt rizikótényezőket (3.1. Táblázat). Melléktünetek esetén (trombocitopenia, vérzés) az LMWH-kezelést megszakítottuk. Ilyen szövődmény csak 4 esetben fordult elő. A kemoterápiás kezelés a megfelelő standard protokollok szerint történt.

Statisztikai értékelés. Az adatok közötti különbségek értékelésére a chi-square tesztet használtuk. A számításokat a Statistica 8.0 szoftverrel (StatSoft Inc, Tulsa) végeztük. Statisztikailag szignifikáns szintnek a $p < 0.05$ értéket tekintettük.

Eredmények

A vizsgált esetekben az életkor median és szélső értékei a szokásosak voltak. (4.5. Táblázat) Az sem meglepő, hogy a pancreasrákok több mint 80%-a csak előrehaladt vagy metasztatikus, inoperábilis állapotban került felismerésre, ez tükröződik a rövid túlélésben is. Bár az emlőrákok zöme a diagnóziskor az I/II. stádiumban volt, a késői felismerés aránya magas (több mint az esetek negyede), ami szűrési problémákra hívja fel a figyelmet. Érdekes, de nem magyarázható, hogy vastagbélrákok esetében miért csak nőknél fordultak elő második tumorok (zömmel emlő- és petefészekrákok). A szövettani és citológiai diagnózisokat azért

nem osztottuk alcsoportokra, mert az egyes csoportokban az esetszámok nagyon alacsonyak lettek volna.

4.5. Táblázat – Klinikopatológiai jellemzők

| | | <i>Emlőrák</i> | <i>Vastagbélrák</i> | <i>Pancreasrák</i> | <i>Petefészekrák</i> |
|----------------------------|---------------|--------------------|---------------------|--------------------|----------------------|
| <i>Esetszám</i> | <i>m/f</i> | 3/110 | 35/31 | 15/21 | -/84 |
| <i>Kor</i> (év, median) | <i>m</i> | 50 (49-62) | 64 (46-83) | 68 (56-77) | -- |
| | <i>f</i> | 56 (30-79) | 66 (44-80) | 67 (27-81) | 64 (35-84) |
| <i>Stádium</i> | <i>I/II</i> | 72.1 % | 40.7 % | 16.6 % | 34.6 % |
| | <i>III/IV</i> | 27.9 % | 59.3 % | 83.3 % | 65.4 % |
| <i>Multiplex tumor</i> | | 12/113 (10.6 %) | 11/66 (16.6 %)* | 2/36 (5.5 %) | 15/84 (17.8 %) |
| <i>Túlélés (év)</i> | <i><2</i> | 25.6 % | 42.4 % | 84.6 % | 31.4 % |
| | <i>≥2</i> | 74.4 % | 57.6 % | 15.4 % | 68.6 % |
| <i>Szövettan**</i> | | IDC, ILC | AC | AC | CAC |

* a 11 eset csak nőknél fordult elő (így a gyakoriság csak nőknél 35.1 %)

** csak a fő típusok – IDC: invazív dukális carcinoma, ILC: invazív lobuláris carcinoma, AC: adenocarcinoma, CAC: cystadenocarcinoma

Összefüggés az LMWH-kezelés és a hemosztáziszavarok között

Hemosztáziszavar (vénatrombózis, embolizáció - továbbiakban VTE) az LMWH-val kezelték között 11.5%-ban (24/208) fordult elő (15.8%-ban, ha az arteriás trombózisokat és embolizációt is értékeljük). Lényeges különbségek mutatkoztak az egyes tumortípusok között (pl. emlőráknál 6.6% - legalacsonyabb érték, pancreasráknál 22.7% - legmagasabb érték). A kis esetszám miatt csak a jelenség szintjén lehet említeni, hogy az LMWH-val kezelt és nem-kezelt (mindkettő VTE-mentes) csoportban a túlélés gyakorlatilag hasonló volt (63.2% vs 72.0%). (4.6 Táblázat).

Kérdés, hogy van-e kapcsolat a fenti adatok és a D-dimer (továbbiakban DD) szintje között, hiszen a DD-szint elvileg a fokozott koagulációs állapotot tükrözi. Ha minden daganatos esetet együtt értékelünk, akkor az emelkedett DD-szint sokkal rosszabb prognózist jelzett,

mint a normális szint (élők / halottak aránya: 30.1% versus 88.4%) a 12 éves értékelési periódus alatt (4.7A Táblázat) Az LMWH-val kezelt betegeknél a DD-szint emelkedésének és a normális szintnek a gyakorisága majdnem azonos volt, ezért az LMWH-kezelés és a DD-szint között nem mutatkozott kapcsolat (4.7B Táblázat) A kapcsolat hiánya arra is utal, ami ismert, hogy a DD-szintet különböző tényezők befolyásolhatják. Az LMWH-val kezeltknél a DD-szint leggyakrabban a petefészekrákban, legritkábban az emlőrákban emelkedett.

4.6. Táblázat – Összefüggés az LMWH-kezelés és a VTE között

| | <i>Emlőrák</i> | <i>Vastagbélrák</i> | <i>Pancreasrák</i> | <i>Petefészekrák</i> | <i>összes</i> | |
|----------------|----------------|---------------------|--------------------|----------------------|---------------|---------|
| LMWH-kezelték | 75 | 50 | 22 | 61 | 208 | |
| VTE* | 5 (6) | 5 (8) | 5 (5)** | 9 (14) | 24 (33) | |
| gyakoriság (%) | 6.6 | 10.0 | 22.7 | 14.5 | 11.5% | |
| | | | | | (15.8%) | |
| LMWH/VTE | +/+ | 4/1*** | 1/3 | 0/6** | 4/8 | 9/18# |
| | +/- | 59/11 | 25/21 | 1/15 | 32/21 | 117/68# |
| | -/- | 5/1 | 6/3 | 1/3 | 6/0 | 18/7# |
| | -/+ | -- | 0/1 | -- | 1/0 | 1/1 |

*.VTE – zárójelben: beleértve az artériás trombózist és emboliákat

** kizárva a v. lienalis és v. portae trombózist

*** élők és elhunytak aránya (az értékelési periódus alatt) (+) LMWH-val kezelt vagy VTE-ban szenvedő beteg, (-) LMWH-val nem kezelt vagy VTE nélküli beteg

A különbség szignifikáns (#) az összes esetet figyelembe véve a ++ és a +/- csoportok, valamint a ++ és a -/- csoportok között.

Összefüggés az LMWH-kezelés, a DD-szint és a túlélés között

A túlélés értékelésekor (2011. november) csak azokat a betegeket vettük figyelembe, akiknél a diagnózis 2000. január és 2009. decembere között történt. Ezért a betegeket – mesterségesen - két csoportra osztottuk a túlélés szempontjából, azokra, akik kevesebb, mint két évvel éltek túl a diagnózist (<2 év), és azokra, több mint 2 évvel (>2 év). Az összes LMWH-kezelt beteg adatát tekintve nem volt különbség a két csoport között. Ezt mutatták a petefészekrákos és a

4.7. Táblázat – Összefüggés az LMWH-kezelés, a VTE gyakorisága és a D-dimer szint között

| (A) | | LMWH+ VTE+ élők / elhunytak | LMWH+ VTE- élők / elhunytak | LMWH- VTE- élők / elhunytak | összes eset |
|---------------|-----|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------|
| Emlőrák | DD+ | 0/1 | 10/6 | 1/0 | 11/7 |
| | DD- | 2/0 | 32/0 | 2/0 | 36/0 |
| Vastagbélrák | DD+ | 0/1 | 4/14 | 1/0 | 5/15 |
| | DD- | 0/1 | 10/4 | 1/0 | 11/5 |
| Pancreasrák | DD+ | 0/3 | 0/9 | 0/1 | 0/13 |
| | DD- | 0/0 | 2/2 | 1/1 | 3/3 |
| Petefészekrák | DD+ | 0/1 | 5/15 | 1/0 | 6/16 |
| | DD- | 2/0 | 7/0 | 2/0 | 11/0 |
| Összes eset | DD+ | 0/6 | 19/44 | 3/1 | 22/51 (30.1%) |
| | DD- | 4/1 | 51/6 | 6/1 | 61/8 (88.4%) |

| (B) | LMWH+ | | |
|---------------|-------|-----|---------|
| | DD+ | DD- | DD+/DD- |
| Emlőrák | 30 | 44 | 40.5 % |
| Vastagbélrák | 22 | 19 | 53.7 % |
| Petefészekrák | 32 | 18 | 64.0 % |
| Összes eset | 84 | 81 | 50.1 % |

Nem volt beteg az LMWH/VTE -/+ csoportban

vastagbélrákos esetek, míg emlőráknál a betegek 76.5%-a, pancreasráknál pedig csak 26.0%-uk került a hosszabban túlélők közé. (4.8. Táblázat) Utóbbiak szoros összefüggést mutatnak a daganatok előrehaladt stádiumával a diagnózis idején. A DD-szint esetén a hosszabb túlélés egyformán jelentkezett az emelkedett és normális értékeket mutató esetekben, mind az összes esetet együtt értékelve, mind az egyes tumortípusoknál, a pancreasrákokat kivéve.

4.8. Táblázat – Összefüggés az LMWH-kezelés, a D-dimer szint és a túlélés között

| | Túlélés (év) | LMWH-kezelés | | D-dimer szint | | betegek száma |
|----------------------|--------------|--------------|-----|---------------|----------|---------------|
| | | igen | nem | emelkedett | normális | |
| <i>Emlőrák</i> | <2 | 12 | 3 | 3 | 6 | |
| | >2 | 39 | 2 | 15 | 12 | 55.6%* |
| | >2 | 76.5%** | | | | |
| <i>Vastagbélrák</i> | <2 | 21 | 1 | 11 | 12 | |
| | >2 | 22 | 6 | 12 | 14 | 46.1% |
| | >2 | 51.2% | | | | |
| <i>Pancreasrák</i> | <2 | 17 | 3 | 5 | 7 | |
| | >2 | 6 | 0 | 2 | 0 | --- |
| | >2 | 26% | | | | |
| <i>Petefészekrák</i> | <2 | 24 | 0 | 14 | 1 | |
| | >2 | 36 | 5 | 12 | 14 | 46.1% |
| | >2 | 60.0% | | | | |
| <i>Összes eset</i> | >2 | 52.6% | | 55.4% | 60.6% | |

* az emelkedett és a normális DD-szint a >2 csoportban

** a >2 és <2 túlélők aránya az LMWH-kezelt csoportban

A stádium a tumor progresszióját jelzi. Az LMWH-val nem kezelt betegek száma túl kevés volt az értékeléshez. Az LMWH-val kezelték között viszont a DD-szint emelkedése sokkal gyakoribb volt az előrehaladottabb, mint a korábbi stádiumban, így ezek az értékek a rosszabb prognózisra utaltak. A különbségek szignifikánsnak bizonyultak (4.9. Táblázat). Az ellenkezőjét találtuk a korai stádiumokban, ahol a normális DD-szintek a jobb prognózis mellett szóltak. Mindez arra utal, hogy a DD-szint potenciális prognosztikai marker lehet.

4.9 Táblázat Összefüggés az LMWH-kezelés, a DD-szint és a stádium között

| Stádium | LMWH-kezelt | | DD- | |
|---------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| | DD+ | DD- | DD+ | DD- |
| | I/II | III/IV | I/II | III/IV |
| Emlőrák | 14 85.7%* | 8 37.5% | 28 92.8% | 5 80.0% |
| Vastagbélrák | 7 85.7% | 15 6.7% | 6 83.3% | 13 69.2% |
| Petefészekrák | 8 62.5% | 25 32.0% | 9 88.9% | 8 100.0% |
| Pancreasrák | --- | 13 0% | | 4 50% |
| Összes eset | 29 79.3# | 61 19.7%# | 43 90.7% | 30 76.7% |

A kevés beteg miatt (0-2/csoport) az LMWH-val nem kezelt betegeket nem értékeltük

* az értékelési periódust (12 év) túlélte betegek aránya

A különbségek szignifikánsnak mutatkoztak a DD+ I/II és DD+ III/IV csoportok, valamint a DD+ III/IV és a DD- III/IV csoportok között ($p < 0.05$)

Összefüggés a „klasszikus” tumormarkerek és a DD szintjei között

A vizsgálatba bevont tumorok esetében mindennapos a markerek használata, elsősorban a progresszió megítélésére, ami egyben tükrözi a terápia eredményességét is, végső soron prognosztikai információt hordoznak. Az értékelt eseteknél részben a diagnóziskor mért értékeket vettük figyelembe, részben a betegség lefolyása során észlelteket. Igen sokszor több adat is rendelkezésre állt, ami nem okozott problémát, ha túlnyomóan egy irányba mutattak. Ha az emelkedett és normális értékek azonos gyakorisággal fordultak elő, akkor az esetet emelkedett értékűnek tekintettük, mert ennek a klinikai jelzése fontosabb, mint a normális határok közötti értékeké. (4.10. Táblázat)

A vizsgálatból az alábbi következtetéseket vontuk le. (a) A pancreasrákok és a petefészekrákok esetében az emelkedett DD-szint gyakorisága hasonló volt a klasszikus markerekéhez (pancreasrák: CA19-9 és petefészekrák: CA125/CEA), viszont sokkal

gyakoribb volt vastagbélrákok és emlőrákok esetében a szokásos markereknél (vastagbél: CEA, emlőrák: CA15-3/CEA). (b) Ugyanezt a tendenciát lehetett megfigyelni a stádiumokkal jellemzett progresszió során. (c) Előfordult, hogy a klasszikus markerek és a DD szintjei együtt emelkedtek, vagy maradtak normális szinten, de ennek az együttes változásnak a gyakorisága messze nem érte el az összes esetet. (d) Az értékelés szerint emlőrákok és petefészekrákok esetében a CEA meghatározása feleslegesnek látszik.

4.10 Táblázat – „Klasszikus” markerek és a D-dimer emelkedett szintje

| | Marker | Gyakoriság (%) | | |
|----------------------|--------|----------------|--------------|----------------|
| | | Összes eset | I/II stádium | III/IV stádium |
| <i>Emlőrák</i> | CA19-9 | 31.0# | 23.6 | 50.0 |
| | CEA | 12.9# | 9.0 | 23.3 |
| | DD | 41.6# | 32.2 | 63.3 |
| <i>Vastagbélrák</i> | CEA | 34.8# | 35.7 | 33.3 |
| | DD | 57.7# | 53.3 | 60.0 |
| <i>Pancreasrák</i> | CA19-9 | 78.2 | NA | 78.5 |
| | DD | 68.7 | NA | 66.6 |
| <i>Petefészekrák</i> | CA125 | 63.6# | 34.8 | 74.2 |
| | CEA | 15.6# | 8.3 | 18.5 |
| | DD | 53.8# | 36.3 | 61.5 |

NA: kevés eset miatt nem értékelhető

A különbségek szignifikánsak emlőráknál a CA15.3 és CEA, valamint a DD és CEA között, a petefészekráknál a CA125 és a CEA, valamint a DD és CEA között, vastagbélráknál a CEA és a DD között ($p < 0.05$)

4.5. Megbeszélés

Nem kétséges, hogy a malignus tumorokat hemosztáziszavarok kísérhetik, főleg trombotikus események, embolizációval vagy anélkül. Leggyakrabban valószínűleg a petefészekrákok, agydaganatok és lymphomák érintettek, de a fokozott rizikó VTE kialakulására minden tumortípusnál jelentkezik. Ez vonatkozik bármely stádiumra és kezelési formára is. Főleg a

vénákban alakulnak ki trombózisok, ami a tüdőembolia forrását jelenti, de nehéz kizárni – bár rendszerint ezt teszik – az artériás oldal érintettségét, trombózisokkal, embolizációval (pl. agy, szív). Az általunk értékelt esetek közül emlőrákban volt a legalacsonyabb és pancreasrákban a legmagasabb a VTE előfordulása. Ezek ugyan megegyeznek a nemzetközi adatokkal, de nem szabad elfelejteni, hogy majdnem minden beteg krónikus LMWH-kezelésben részesült.

Az LMWH-k (és a heparin) véralvadást gátló hatásuk mellett több megfigyelés szerint daganatellenes hatással is rendelkezhetnek. A két hatást többen elkülöníthetőnek tartják, de az is igaz, hogy a daganatos betegek túlélésének meghosszabbodását, amelyet igen sokan észleltek preklinikai kísérletekben, a klinikumban nem mindig sikerült igazolni (16,22,24,25,28,30,31,47,48). Utóbbival egyezett az az újabb vizsgálat, amely NSCLC-ben (IIIB stádium) és prosztatarákban értékelte a maximum 3 hónapig adott LMWH hatékonyságát, de az a túlélést nem javította (49). Eseteinkben – az 1. vizsgálatban – viszont azt találtuk, hogy a nadroparinnal legalább 6 hónapig kezelt – főleg vastagbélrákos és emlőrákos - betegeknél szignifikánsan meghosszabbodott a túlélés, bizonyos alcsoportokban (T3 és T4, valamint M1).

A tumorgátlás érvényesülhet lokálisan (erre utalnak az 1. kísérlet eredményei – gátlás a primer tumor és a metasztázis növekedésében), és a progresszió során egyaránt. Utóbbi elsősorban a metasztatizálás gátlását jelentené, amely azért látszik elfogadhatónak, és magyarázhatónak, mert az LMWH-k képesek megakadályozni a véralvadási kaszkádot, ezzel pl. a tumorsejtcsoportokat a keringés és immunrendszer általaival szemben megvédő fibrinköpeny kialakulását. A gátló hatás sejtszinten is érvényesülhet, elsősorban a trombociták és az endotelsejtek koagulációt elősegítő hatásának kikapcsolásával. A tumorok lokális növekedésének befolyásolását elsősorban az angiogenezis gátlásán keresztül érhetik el az LMWH-k, de ezen a téren is ellentmondásosak a megfigyelések. A magyarázat azért is nehéz, mert egyrészt az angiogenezisnek több formája létezik és ezek eltérő támadáspontokat igényelnek, másrészt még az ismert angiogenezisgátlók esetében sem egyszerű pl. a VEGF-ek, vagy más angiogen tényezők és a klinikai hatás között kapcsolatot találni.

Elsősorban a terápia megválasztásának szempontjából nagyon fontos a betegséget különböző szempontból megbízhatóan jellemző markerek használata (diagnosztikai, prediktív, prognosztikai markerek). Ilyen markerekkel rendelkezünk, azonban hatékonyságuk, amelyet az érzékenységükkel (szenzitivitás) és specificitásukkal érnek el, már sok kívánnivalót hagy maga után. Feltételeztük, hogy ha a szervezetben a koagulációs állapot a tumornak kedvez, akkor az ezt jelző markerek közül pl. a D-dimer „viselkedhet” markerként. Erre utalt az, hogy – az összes tumort figyelembe véve – a DD emelkedett szintje rossz

prognózissal párosult. A tumortípusokat tekintve az emelkedés leggyakrabban petefészekrák eseteiben volt kimutatható, legritkábban emlőráknál. Ezek az adatok indokolták azt, hogy a DD-szint emelkedését az egyes tumortípusokban széles körben használt markerekkel hasonlítsuk össze. Ez az összehasonlítás azért is indokolt, mert a jelenlegi markerek hatékonysága – ahogy említettük - enyhén szólva nem megfelelő, illetve megfelelő bizonyos határok között, amelyekkel alkalmazásuk során tisztában kell lenni. Csak példa, hogy a petefészekráknál alkalmazott CA125 is a korai esetek csak kb. felében (a mi vizsgálatainkban 34.0%-ban) emelkedett. Ezért további markereket kerestek és azonosították a HE4/WFDC2-t, amely a CA125-tel kombinálva emeli a prognózis megítélésének pontosságát. (50,51). Saját 2. vizsgálatunkban, nagyon hasonlóan, a DD-szint azonosan vagy jobban emelkedett a daganatnövekedés korábbi stádiumaiban, mint a klasszikus markerek. A pancreasrák kivételével (amelyet zömmel a késői stádiumban fedeztek fel) a többi tumornál (emlőrák, vastagbélrák, petefészekrák) a DD-szint prognosztikai markernak mutatkozott. Vizsgálatunk arra is rámutatott, hogy pl. emlőráknál és petefészekráknál nem indokolt a CEA meghatározása.

Az új és pontosabb markerek vizsgálata kiterjedten folyik, nem egyszer többszörös markerek, azaz marker-profil meghatározásával (pl. ilyen emlőrákoknál az Oncotype DX, vagy a MammaPrint – de hasonlóak már más tumortípusnál is megjelennek). A DD-szint prognosztikai képessége azért is jelentős, mert költséghatékonyság tekintetében igen kedvező.

ZÁRÓ GONDOLATOK

Az utóbbi évtizedben a molekuláris szintű technológia előretörésével a daganatokkal kapcsolatos ismereteink is rohamosan bővülnek. Azt már megtanultuk, hogy a daganatok genetikai, pontosabban genetikai és epigenetikai betegségek, olyan szabályozási zavar következményei, amelyeknek normális megfelelői gondoskodnak „működésünk” alapjairól. Belőlünk keletkeznek, a normálistól néha alig kimutatható eltérésekkel, mégis öntörvényűvé válhatnak, dacolva az ellenük kialakított leghatékonyabbnak gondolt igyekezetünkkel is. A nagy remény, hogy a daganatok kialakulásának, növekedésének, terjedésének még jobb megismerésével eredményesebb terápiás stratégiát tudunk kialakítani és alkalmazni a gyakorlatban, még csak bontogatja szárnyait. Ahogy lenni szokott, lassan elmúlik a csodavárás ideje, a kritikátlan remények utáni csalódások, hogy helyt adjanak az aprólékos, a megismerésen, főleg evidenciákon nyugvó tervezésnek. Az biztosnak látszik, hogy a daganatok kezelésében az azok viselkedését meghatározó szabályozási zavarokat kell kiiktatnunk, de ami egyelőre igen megnehezíti az eredményességet, az az egyes daganatok eltérő karrierje, mindenekelőtt a szabályozási problémák sokrétűsége, a geno- és fenotípusbeli heterogenitás.

A molekuláris ismeretek szélesedése vezetett ahhoz, hogy kezdünk rájönni a daganatokban kialakult kulcsfontosságú hibákra, azokra, amelyek terápiánk célpontjai lehetnek. A célpont eltalálása, méghozzá a beteg számára a legkedvezőbb módon, nem olyan egyszerű, mint ahogy gondoltuk. E többszereplős eseménynek egyik fontos részét képezik a daganatokban levő molekuláris célpontok, azonban azt már tudjuk, hogy milyen megmagyarázhatatlan nehézséget jelent a legjobbnak gondolt gyógyszer alkalmazása is. Igen egyszerűnek látszott az, hogy a génhiba következtében keletkezett hibás fehérje gátlása csődöt jelent a daganatsejtek számára. (Az esetleges hiánypótlásra - pl. szuppresszorgének esetén - csak elképzelések vannak.) Csakhogy nem számoltunk számos, még most is ismeretlen tényező mellett olyanokkal, mint a mikro RNS-ek, vagy a hasítási változatok, a keletkezett fehérjék nem megfelelő módosulásai, nem is beszélve arról a „zavaró” tényről, hogy az általunk támadott célpont mellett, sokszor azzal kölcsönhatásban, más szabályzók is működ(het)nek a sejtekben, nem egyszer „menekülési” utat kínálva a daganatsejtek számára, terápiás igyekezetünknek pedig rezisztenciát mutatva. (1-3)

A jelen és a közeljövő feladata az adott daganatról a minél pontosabb genetikai térkép azonosítása, a felelős molekuláris célpontok megjelölése, a találati valószínűséget nagyban elősegítő jelzőmolekulák (markerek, biomarkerek, tumormarkerek) kimutatása. Ma a

tervezést sokszor még egy-egy ilyen marker „vezényli”, támogatja vagy ellenzi, de már részben a piacon vannak a multigénes vizsgálati rendszerek, azzal kecsegtetve, hogy prediktív vagy prognosztikai jóslásukat akár a napi rutin onkológia is hasznosítani tudja. Emellett a gyógyszerfejlesztés sem akar lemaradni (sőt nem egyszer a diagnosztika előtt jár), és hoz létre olyan multifunkciós (pl. multikináz-gátló) szereket, amelyeknél ma még az esetleges hatás esetén sem tudjuk a siker okát azonosítani. A sikertelenséget könnyebb magyarázni. De hát ezek a szerek mégiscsak fehérjéket támadnak, és csak hézagos ismereteink miatt kapaszkodunk annyira a génhibákba. Persze azok is nagyon fontosak, új osztályozások alapjait, gyógyszertervezési trendeket vetítenek elénk, végülis a funkcionális zavarok meghatározásáról van szó. De már növekszik a fehérjék tudománya, a proteomika, első eredményei itt vannak a láthatáron – mint a szabályozási hálózat újabb szereplői.

Természetesen a vizsgálatok túlnyomó része egy-egy részletkérdéssel foglalkozik. Az általunk feltett kérdések még egy ilyen részletnek is csak kicsiny darabkáját próbálták megfogalmazni, középpontban a markerekkel. Az nem kérdés, hogy a terápiás stratégiát befolyásoló markerek jelentős része magában a daganatsejtben keresendő (mint a KRAS vagy az EGFR és kapcsolatai), de egyre több adat mutat arra, hogy mennyire fontos a daganat és a gazdaszervezet kapcsolata (erre példa a hemosztázis változása), sőt a gazdaszervezet daganattól független, de különösen a gyógyszeres kezelést befolyásoló jellegzetességeinek ismerete (mint amilyen pl. a metabolizáció kérdése, ami szorosan összefügg a betegben mellékhatásként kialakuló válaszreakciókkal is).

A fentiek- lényegesen leegyszerűsítve – arra utalnak, hogy a munkánkban is vizsgált problémák, reményeink szerint hozzájárul(hat)nak ahhoz, hogy a daganatok kezelésében minél inkább az egyénre szabott stratégia érvényesüljön.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az utóbbi évtizedben a molekuláris szintű technológia előretörésével a daganatokkal kapcsolatos ismereteink is rohamosan bővülnek. Ez vezetett ahhoz, hogy kezdünk rájönni a daganatokban kialakult kulcsfontosságú hibákra, azokra, amelyek terápiánk célpontjai lehetnek. A jelen és a közeljövő feladata az adott daganatról a minél pontosabb genetikai térkép azonosítása, a felelős molekuláris célpontok megjelölése, a találati valószínűséget, terápiás érzékenységet vagy a prognózist előre jelző molekulák (biomarkerek) kimutatása. Vizsgálataink, melyek e terület néhány részletkérdésére irányultak, a következő főbb megállapításokra vezettek:

(1) Az anti-EGFR-kezelés második, sokszor többedik vonalban is klinikai előnyt (operabilitás, regresszió) ért el a vad-típusú KRAS-t hordozó betegek 36%-ában. A KRAS mutánsok között a G13D mutáció volt a leggyakoribb, amely újabb tapasztalatok szerint még érzékeny lehet anti-EGFR kezelésre.

2) Vastagbélrákminták immunhisztokémiai (IHC) vizsgálata (TMA-val) arra utalt, hogy az IHC értékek és a klinikai – elsősorban progresszióval kapcsolatos – jellemzők között kevés a kapcsolat. Az EGFR-elleni antitesttel kapott eredmények szerint a diagnózishoz vett mintákban igen nagy arányban – a túlélés hosszától függetlenül - a normális bélhám proliferációjának szabályozása érvényesül. Ezt erősíti, hogy a jobb túlélést mutatók között az EGFR mellett az általa befolyásolt út elemei jelennek meg (RAS, RAF, ERK, STAT3).

(3) A D-dimer szintje azonos vagy jobban emelkedett a daganatnövekedés korábbi stádiumaiban, mint a klasszikus markereké. A vizsgált daganattípusoknál (emlőrák, vastagbélrák, petefészekrák) a D-dimer szintje prognosztikai markernak mutatkozott, és meghatározása ajánlott a klasszikus markerek mellett – utóbbiak között viszont a CEA meghatározása pl. emlőráknál és petefészekráknál nem indokolt.

A fentiek reményeink szerint hozzájárul(hat)nak ahhoz, hogy a daganatok kezelésében minél inkább az egyénre szabott stratégia érvényesüljön.

SUMMARY

In the past decade the revolutionary development of molecular technology contributed a lot to the increase of our knowledge on cancer. These informations led to the discovery and understanding of those key regulatory changes in the genesis and progression of malignancies which can serve as targets in tumor diagnostics and therapy. One of the main challenges in the research field is to identify the most important molecular networks, the molecular targets, which can predict therapeutic responsiveness in order to select the appropriate patients, as well as markers (biomarkers) to judge the prognosis of the disease. The aims of our study approached some details of the biomarker area and reached certain conclusions:

(1) The anti-EGFR therapy – used in the second-line or even further – proved to be effective, providing clinical advantage (operability, regression) in 36% of patients carrying wild-type KRAS. G13D mutations were the most frequent among the KRAS-mutants, which - according to current data – could react to anti-EGFR therapy. (2) Extended immunohistochemical (IHC) analysis on colorectal cancer samples (using tissue microarray) found rather few connections between the IHC evaluation and the clinical characteristics related mainly to survival. According to the results with anti-EGFR antibodies in the diagnostic histological samples suggested that the regulatory pathway which rules the proliferation of normal colonic mucosa is also present in colonic cancer cells. This finding is supported by the increased activity of the downstream members (as RAS, RAF, ERK) of the EGFR signalling. (3) The level of D-dimer increased at least as much as the level of classical tumor markers in the early stages of tumor growth, therefore, D-dimer can be considered as a prognostic factors in tumor types studied (breast-, colorectal-, ovarian cancers) and its measurement is advised besides the classical markers. Additional observation, that CEA has no help e.g. in breast- and ovarian cancers.

It is our hope that our results may contribute to the design of a more individual-based antitumor strategy.

IRODALOM

1. BIOMARKEREKRŐL – ÁLTALÁBAN

1 Schilsky RL: Personalized medicine in oncology: the future is now. *Nat Rev Drug Discov* 9, 363-366, 2010

2 Fine B, Amier L: Predictive biomarkers in the development of oncology drugs: a therapeutic industry perspectives. *Clin Pharmacol Ther* 85, 535-538, 2009

3 Duffy MJ, Crown J: A personalized approach to cancer treatment: how biomarkers can help. *Clin Chem* 54, 1770-1779, 2008

4 August J: Market watch: emerging companion diagnostics for cancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 9, 351, 2010

5 Goodsaid F, Papaluca M: Evolution of biomarker at the health authorities . *Nat Biotechnol* 28, 441-443, 2010

6 La Thangue NB, Kerr DJ: Predictive biomarkers: a paradigm shift towards personalized cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 587-596, 2011

7 Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783-792, 2001

8 Dawood S, Broglio K, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Giordano SH: Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment? An institutional-based review. *J Clin Oncol* 28, 92-98, 2010

9 Muthuswamy SK: Trastuzumab resistance: all roads leads to SRC. *Nat Med* 17, 416-418, 2011

10 Phillips KA, Marshall DA, Haas JS, Elkin EB, Liang SY, Hassett M, Ferrusi I, Brock JE, Van Bebber SL: Clinical practice patterns and cost effectiveness of human epidermal growth receptor 2 testing strategies in breast cancer patients. *Cancer* 115, 5166-5174, 2009

11 Cuadros M, Villegas M: Systematic review of HER2 breast cancer testing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 17, 1-7, 2009

12 Ashworth A: A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *J Clin Oncol* 26, 3785-3790, 2008

13 Hutchinson L: Targeted therapies: PARP inhibitor olaparib is safe and effective in patients with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Nat Rev Clin Oncol* 7, 549, 2010

14 O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, Yoffe M, Patt D, Rocha C, Koo IC, Sherman BM, Bradley C: Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 364, 205-214, 2011

15 Sasaki T, Rodig SJ, Chirleac LR, Janne PA: The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 46, 1773-1780, 2010

16 Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB: Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363, 809-819, 2010

17 Albain KS, Barlow WE, Shak S, Hortobagyi GN, Livingston RB, Yeh IT, Ravdin P, Bugarini R, Boehner FL, Davidson NE, Sledge GW, Winer EP, Hudis C, Ingle JN, Perez EA, Pritchard KI, Shepherd L, Gralow JR, Yoshizawa C, Allred DC; Osborne CK; Hayes DF: The Breast Cancer Intergroup of North America. Prognostic and predictive value of the 21-gene Recurrence Score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol* 11, 55-65, 2010

18 Corless CL: Personalized cancer diagnostics. *Science* 334, 1217-1218, 2011

19 Hanash SM, Baik CS, Kallioniemi O: Emerging molecular biomarkers - blood based strategies to detect and monitor cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 142-150, 2011

20 Pantel K, Alix-Panabieres C: Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trend Mol Med* 16, 398-406, 2010

21 Chen X, Ba Y, Ma LJ, Cai X, Yin Y, Wang KH, Guo JG, Zhang YJ, Chen JN, Guo X, Li QB, Li XY, Wang WJ, Zhang Y, Wang J, Jiang XY, Xiang Y, Xu C, Zheng PP; Zhang JB, Li RQ, Zhang HJ, Shang XB, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K; Zhang JF, Zhang CY: Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18, 997-1006, 2008

22 Kulasingam V, Diamandis EP: Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol* 5, 588-599, 2008

23 Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, DiSilvestro P, Miller MC, Allard WJ, Gajewski W, Kurman R, Bast RC, Skates SJ: A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 112, 40-46, 2009

2. KRAS MUTÁCIÓK VASTAGBÉLRÁKOKBAN

1 Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, Krzyzanowska MK, Maroun J, McAllister P, Van Cutsem E, Brouwers M, Charette M, Haller DG: American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 22, 3408-3419, 2004

- 2 Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A: Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor-receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 101, 1308-1324, 2009
- 3 van Schaeybroeck S, Allen WL, Turkington RC, Johnston PG: Implementing prognostic and predictive biomarkers in CRC clinical trials. *Nature Rev Clin Oncol* 8, 222-232, 2011
- 4 Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bor-Sagi D: RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Rev Cancer* 11, 761-774, 2011
- 5 Kopper L, Timár J, Becságh P, Nagy Zs: Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában. 2. kiadás. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2011
- 6 Kopper L, Timár J: A KRAS mutációjának hazai körvizsgálata („validálási” vizsgálat) vastagbélrákban. *Magyar Onkol* 53, 361-366, 2009
- 7 van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, Carneiro F, Seruca R, Bosman FT, Quirke P, Fléjou JF, Plato Hansen T, Langner C, Hoefler G, Ligtenberg M, Tiniakos D, Tejpar S, Bevilacqua G, Ensari A: KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch* 453, 417-431, 2008
- 8 Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA: Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter „RASCAL” study. *J Natl Cancer Inst* 90, 675-684, 1998
- 9 Wang C, van Rijnsoever M, Grieco F, Bydder S, Elsaleh H, Joseph D, Harvey J, Iacopetta B: Prognostic significance of microsatellite instability and K-ras mutation type in stage II colorectal cancer. *Oncology* 64, 259-265, 2003
- 10 Ogino S, Meyerhardt JA, Irahara N, Niedzwiecki D, Hollis D, Saltz LB, Mayer RJ, Schaefer P, Whittom R, Hantel A, Benson AB 3rd, Goldberg RM, Bertagnolli MM, Fuchs CS; Cancer and Leukemia Group B; North Central Cancer Treatment Group; Canadian Cancer Society Research Institute; Southwest Oncology Group: KRAS mutation in stage III colon cancer and clinical outcome following intergroup trial CALGB 89803, *Clin Cancer Res* 15, 7322-7329, 2009
- 11 Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, Dietrich D, Biesmans B, Bodoky G, Barone C, Aranda E, Nordlinger B, Cisar L, Labianca R, Cunningham D, Van Cutsem E, Bosman F: Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 28, 466-474, 2010
- 12 Barault L, Veyrie N, Jooste V, Lecorre D, Chapusot C, Ferraz JM, Lièvre A, Cortet M, Bouvier AM, Rat P, Roignot P, Faivre J, Laurent-Puig P, Piard F: Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population based series of colon cancer. *Int J Cancer* 122, 2255-2259, 2008
- 13 Scaltrini M, Baselga J: The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12, 5268-5272, 2006

- 14 Harari PM: Epidermal growth factor inhibition strategies in oncology. *Endocr Rel Cancer* 11, 689-708, 2004
- 15 Nicholson RI, Gee JM, Harper ME: EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 37 (suppl 4) S9-S15, 2001
- 16 Lockhart AC, Berlin JD: The epidermal growth factor receptor as a target for colorectal cancer therapy. *Semin Oncol* 32, 52-60, 2005
- 17 Shia J, Klimstra DS, Li AR, Qin J, Saltz L, Teruya-Feldstein J, Akram M, Chung KY, Yao D, Paty PB, Gerald W, Chen B: Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Mod Pathol* 18, 1350-1356, 2005
- 18 Francoual M, Etienne-Grimaldi, Formento JL, Benchimol D, Bourgeon A, Chazal M, Letoublon C, André T, Gilly N, Delpero JR, Lasser P, Spano JP, Milano G: EGFR in colorectal cancer: more than a simple receptor. *Ann Oncol* 17, 962-967, 2006
- 19 Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, Sobrero A, Barone C, Cascinu S, Colucci G, Cortesi E, Nichelatti M, Gambacorta M, Siena S: Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol* 25, 3238-3245, 2007
- 20 Cappuzzo F, Finocchiaro G, Rossi E, Jänne PA, Carnaghi C, Calandri C, Bencardino K, Ligorio C, Ciardiello F, Pressiani T, Destro A, Roncalli M, Crino L, Franklin WA, Santoro A, Varella-Garcia M: EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 19, 717-723, 2008
- 21 Salazar R, Roepman P, Capella G, Moreno V, Simon I, Dreezen C, Lopez-Doriga A, Santos C, Marijnen C, Weterga J, Bruin S, Kerr D, Kuppen P, van de Velde C, Morreau H, Van Velthuisen L, Glas AM, Van't Veer L, Tollenaar R: Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol* 29, 17-24 2010
- 22 de Castro-Carpeno J, Belda-Iniesta C, Casado E, Agudo EH, Batile JF, Barón MG: EGFR and colon cancer: a clinical view. *Clin Transl Oncol* 10, 6-13, 2008
- 23 Lievre A, Bachet JB, LeCorre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Côté JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P: KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 66, 3992- 3995, 2006
- 24 Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD: Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26, 1626-1634, 2008
- 25 Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ,

Zalcberg JR: K-ras mutations and benefit from cetuximabin advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 359, 1757-1766, 2008

26 De Rook W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, Biesmans B, Van Laethem JL, Peeters M, Humblet Y, Van Cutsem E, Tejpar S: KRAS wild type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 19, 508-515, 2008

27 Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, Wong TW, Huang X, Takimoto CH, Godwin AK, Tan BR, Krishnamurthi SS, Burris HA 3rd, Poplin EA, Hidalgo M, Baselga J, Clark EA, Mauro DJ: Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 25, 3230-3237, 2007

28 Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, Siena S, Bardelli A: Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor recedptor antibody therapies. *Cancer Res* 67, 2643-2648, 2007

29 Finocchiaro G, Cappuzzo F, Janne PA, Bencardino K, Carnaghi C, Franklin WA, Roncalli M, Crino L, Santoro A, Varella-Garcia M: EGFR, HER2 and Kras as predictive factors for cetuximab sensitivity in colorectal cancer (abstract) *J Clin Oncol* 25, 18 suppl), a4021, 2007

30 Allegra CP, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, McAllister PK, Morton RF, Schilsky RL: American Society of Clinical Oncology provisional clinical option: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Pathol* 27, 2091-2096, 2009

31 van Cutsem E, et al: Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer, *New Engl J Med* 360, 1408-1417, 2009

32 van Cutsem E, Lang I, Folprecht G, Nowacki M, Barone C, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Celik I, Kohne C: Cetuximab plus FOLFIRI: final data from the CRYSTAL study on the association of KRAS and BRAF biomarker status with treatment outcome (abstract) *J Clin Oncol* 28 (15 suppl), a3570, 2010

33 Siena S et al: Randomized phase III study of panitumumab (pmab) with FOLFOX4 compared to FOLFOX4 alone as first line treatment for metastatic colorectal cancer: PRIME trial (abstract) *J Clin Oncol* 28 (15 suppl), 3565, 2010

34 Peeters M, Cervantes-Ruiperez A, Strickland A, Ciuleanu T, Mainwaring PN, Tzekova VI, Santoro A, Johnson CW, Zhang A, Gansert JL: Randomized phase III study of panitumumab (pmab) with FOLFIRI versus FOLFIRI alone as second line treatment in patients with metastatic colorectal cancer; Patients reported outcomes (abstract). *J. Clin Oncol* 28 (15 suppl), 3566, 2010

35 De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Tu D, Siena S, Lamba S, Arena S, Frattini M, Piessevaux H, Van Cutsem E, O'Callaghan CJ, Khambata-Ford S, Zalcberg JR, Simes J, Karapetis CS, Bardelli A, Tejpar S: Association of KRAS p.G13D

mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA* 304, 1812-1820, 2010

36 Jemal A, Siegel R, Ward IE, Hao Y, Xu J, Thun MJ: Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59, 225-249, 2009

37 Van Cutsem E, Oliveira J: Primary colon cancer. ESMO clinical recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. *Ann Oncol* 20, 49-50, 2009

38 Tie J, Lipton L, Desai J, Gibbs P, Jorissen RN, Christie M, Drummond KJ, Thomson BN, Usatoff V, Evans PM, Pick AW, Knight S, Carne PW, Berry R, Polglase A, McMurrick P, Zhao Q, Busam D, Strausberg RL, Domingo E, Tomlinson IP, Midgley R, Kerr D, Sieber OMet al: KRAS mutation is associated with lung metastasis in patients with curatively resected colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 17, 1122-1130, 2011

39 Cejas P, Lopet-Gómez M, Aguayo C, Madero R, de Castro Carpeño J, Belda-Iniesta C, Barriuso J, Moreno García V, Larrauri J, López R, Casado E, Gonzalez-Barón M, Feliu J: KRAS mutations in primary colorectal cancer tumors and related metastases: a potential role in prediction of lung metastasis. *PLoS One*. 2009 Dec 18;4(12):e8199

40 Chung KJ, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, Hamilton A, Pan D, Schrag D, Schwartz L, Klimstra DS, Fridman D, Delsen DP, Saltz LB: Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 23, 1803, 1810, 2005

3. JELÁTVITELI UTAK VIZSGÁLATA

1 Egulyuz C, Viguera E, Milan L, Perez J: Multitissue array review: a chronological description of tissue array techniques, applications and procedures. *Pathol Res Pract* 202, 561-568, 2006

2 Kajdacsy-Balla A, Geynisman JM, Macias V, Setty S, et al: Practical aspects of planning, building, and interpreting tissue microarrays: the Comparative Prostate Cancer Tissue experience. *J Mol Histol* 38, 113-121, 2007

3 Meyer HE, Stühler K: High-performance proteomics as a tool in biomarker discovery. *Proteomics* 7, 18-26, 2007

4 Hewitt SM, Taikita M, Abedi-Ardekani B, Kris Y, et al: Validation of proteomic-based discovery with tissue microarrays. *Prot Clin Appl* 2, 1460-1466, 2008

5 Cregger M, Berger AJ, Rimm DL: Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression. *Arch Pathol Lab Med* 130, 130, 1026-1030, 2006

6 Camp RL, Chung GG, Rimm DL: Automated subcellular localization and quantification of protein expression in tissue microarrays. *Nat Med* 8, 1323-1327, 2002

7 Decaestecker C, Lopez XM, D'Haene N, Roland I, Guendouz S, Duponchelle C, Berton A, Debeir O, Salon IK: Requirements for the valid quantification of immunostains on tissue microarray materials using image analysis. *Proteomics* 9, 4478-4494, 2009

8 Kononen J, Bubendorf I, Kallioniemi A, et al: Tissue microarrays for high throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4, 844-847, 1998

9 Kopper L, Timár J, Becságh P, Nagy Zs: Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában. 2. kiadás. Semmelweis Kiadó, Budapest. 2011

10 Spisák S, Galamb B, Wichman B, Sipos F, Galamb O, Solymosi N, Nemes B, Tulassay Zs, Molnár B: Vastagbél-daganatok ellenanyag-microarray-vel kimutatott, TMA-validált progressziós markerei. *Orv Hetilap* 150, 1607-1613, 2009

11 Valcz G, Sipos F, Krenács T, Molnár J, Patai ÁV, Leiszter K, Tóth K, Solymosi N, Galamb O, Molnár B, Tulassay Zs: Elevated osteopontin expression and proloferative/apoptotic ratio in the colorectal adenoma-dysplasia-carcinoma sequence. *Pathol Oncol Res* 16, 541-545, 2010

12 Oliveira LA, Artigiani-Neto R, Waisberg DR, Fernandes LC, Lima FO, Waisberg J: nm23 protein expression in colorectal carcinoma using TMA (tissue microarray): association with metastases and survival. *ARq Gastroenterol* 47, 361-367, 2010

13 Huerta S, Hrom J, Gao X, Saha D, Anthony T, Reinhart H, Kapur P: Tissue microarray constructs to predict a response to chemoradiation in rectal cancer. *Dig Liver Dis* 42, 679-684, 2010

4. VÉRALVADÁS ÉS A DAGANATOS PROGRESSZIÓ

1 Bouillard JB, Bouillaud S: De l'Obliteration des veines et de son influence sur la formation des hydropisies partielles: consideration sur la hydropisies passive et general. *Arch Gen Med* 1, 188-204, 1823

2 Trousseau A: Phlegmasia alba dolens. *Clinique Medicale de l'Hotel Dieu de Paris*. 3, 654-712, 1865

3 Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR: malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA* 293, 492-496, 2005

4 Murchinson JT, Wylie L, Stockton DL: Excess risk of cancer in patients with primary venous thromboembolism: a national, population-based cohort study. *Br J Cancer* 91, 92-95, 2004

5 Noble S, Pasi J: Epidemiology and pathophysiology of cancer-associated thrombosis. *Brit J Cancer* 102, 52-59, 2010

6 Kirwan CC, Nath E, Byrne GJ, McCullum CN: Prophylaxis for venous thromboembolism during treatment for cancer: questionnaire survey. *BMA* 327, 597-598, 2003

- 7 Erpenback L, Nieswandt B, Schön M, Pozgajova M, Schön MP: Inhibition of platelet GPIIb/IIIa and promotion of malignant melanoma metastasis. *J Invest Dermatol* 130, 576-586, 2010
- 8 Ruf W, Yokota N, Schaffner F: Tissue factor in cancer progression and angiogenesis. *Thromb Res* 125 suppl 2, 536-538, 2010
- 9 Rickles FR, Brenner B: Tissue factor and cancer. *Semin Thromb Hemost* 34, 143-145, 2008
- 10 Van Sluis GL, Büller HR, Spek CA: The role of activated protein C in cancer progression. *Thromb Res* 125, Suppl 2, S138-S142, 2010
- 11 Leslie M: Beyond clotting: the powers of platelets. *Science* 328, 562-564, 2009
- 12 Kvolik S, Jukic M, Matijevic M, Marjanovic K, Glavas-Obrovac L: An overview of coagulation disorders in cancer patients. *Surg Oncol* 29, e33-e46, 2010
- 13 Nagy Zs: Daganatok és a hemosztázis. *Path Oncol Res Suppl* 2, 9-14, 2007
- 14 Blaskó Gy: Az antikoaguláns profilaxis és a kemoterápia. *Magyar Onkológia* 52, 193-199, 2008
- 15 Khorana AA, Kuderer NM, Culakova E, Lyman GH, Francis CW: Development and validation of a predictive model for chemotherapy-associated thrombosis. *Blood* 111, 4902-4907, 2008
- 16 Mousa SA, Petersen LJ: Anticancer properties of low molecular weight heparin: preclinical evidence. *Thromb Haemost* 102, 258-267, 2009
- 17 Pápai Zs: A thromboemboliák megelőzésének és ellátásának gyakorlati vonatkozásai az onkológiában. *LAM* 20, 383-388, 2010
- 18 Bergquist D, Agnelli G, Cohen AT, Eldor A, Nilsson PE, Le Moigne-Amrani A, Dietrich-Neto F; ENOXACAN II Investigators: for the ENOXACAN-II Investigators. Duration of prophylaxis against venous thromboembolism with enoxiparin after surgery for cancer. *N Engl J Med* 346, 975-980, 2002
- 19 Wagman LD, Baird MF, Bennett CL, Bockenstedt PL, Cataland SR, Fanikos J, Fogarty PF, Goldhaber SZ, Grover TS, Haire W, Hassoun H, Jahanzeb M, Leung LL, Linenberger ML, Millenson MM, Ortel TL, Salem R, Smith JL, Streiff MB; National Comprehensive Cancer Network: Venous thromboembolic diseases: clinical practice guidelines in Oncology. *JNCCN* 4, 838-869, 2006
- 20 Pflieger Gy, a Magyar Thrombosis és Haemostasis Társaság felkért szakértői, Transzfúziológiai és Haematológiai Szakmai Kollégium: A thromboembolia kockázatának csökkentése és kezelése. *Orv Hetilap* 150, 2330-2403, 2009
- 21 Falanga A, Panova-Noeva M, Russo L: Procoagulant mechanisms in tumour cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 22, 49-60, 2009

- 22 Tóvári J, Bereczky B, Gilly R, Skopál J, Vágó Á, Tímár J: Effect of heparin treatment on the metastatization of melanoma in a preclinical model (in Hungarian). *Magyar Onkológia* 48, 235, 241, 2004
- 23 Tímár J: Hemosztáziszavarok és a rosszindulatú daganatok hematogén áttétképzése. *Orvosképzés* 81, 137-144, 2006
- 24 Kakkar AK: Low molecular weight heparin and survival in patients with malignant disease. *Cancer Control* 12, 22.30, 2005
- 25 Klerk CPW, Smorenburg SM, Otten H-M, Lensing AW, Prins MH, Piovella F, Prandoni P, Bos MM, Richel DJ, van Tienhoven G, Büller HR: The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. *J Clin Oncol* 23, 2130-2135, 2005
- 26 Szende B; Paku S; Racz G; Kopper L: Effect of fraxiparine and heparin on experimental tumor metastasis in mice. *Anticancer Research* 25 (4): 2869-2872, 2005
- 27 Von Delius S, Ayvaz M, Wagenpfeil S, Eckel F, Schmid RM, Lersch C: Effect of low-molecular-weight-heparin on survival in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma. *Thromb Haemostasis* 98, 434-439, 2007
- 28 Lazo-Langner A, Gross GD, Spaans JN, Rodger MA: The effect of low-molecular-weight heparin on cancer survival. A systematic review and meta-analysis of randomized trial. *Thromb Hemostasis* 5, 729-737, 2007
- 29 Niers TMH, Brüggeman LW, van Sluis GL, Liu RD, Versteeg HH, Büller HR, VAN Noorden CJ, Reitsma PH, Spek CA, Richel DJ: Long-term thrombin inhibition promotes cancer cell extravasation in a mouse model of experimental metastasis. *Internat Soc Thrombosis Haemostasis* 7, 1595-1597, 2009
- 30 Borsig I: Antimetastatic effect of heparins and modified heparins. Experimental evidence. *Thrombosis Res* 125, suppl 2, S66-S71, 2010
- 31 Nadir Y, Brenner B: Heparanase procoagulant effects and inhibition by heparins. *Thromb Res* 125, suppl 2, 572-576, 2010
- 32 Sato T, Yamaguchi A, Goi T, Hirono Y, Takeuchi K, Katayama K, Matsukawa S: Heparanase expression in human colorectal cancer and its relationship to tumor angiogenesis, hematogenous metastasis, and prognosis. *J Surg Oncol* 87, 174-182, 2004
- 33 Versteeg HH, Ruf W: Emerging insights in tissue-factor dependent signaling events. *Semin Thromb Hemost* 32, 24-32, 2006
- 34 Vlodaysky I, Friedmann Y: Molecular properties and involvement of heperanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J Clin Invest* 108, 341-347, 2001
- 35 Laubli H, Borsig L: Selectins promote tumor metastasis. *Sem Cancer Biol* 20, 169-177, 2010

- 36 Katshuri RS, Taubman MB, Mackman N: Role of tissue factor in cancer. *J Clin Oncol* 27, 4834-4838, 2009
- 37 Regina S, Valentin J-B, Lachot S, Lemarié E, Rollin J, Gruel Y: Increased tissue factor expression is associated with reduced survival in non-small cell lung cancer and with mutation of TP53 and PTEN. *Clin Chem* 55, 1834-1842, 2009
- 38 Milsom C, Magnus N, Mehan B, Al-Nedawi K, Garnier D, Rak J: Tissue factor and cancer stem cells. Is there any linkage? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 2005-2014, 2009
- 39 Bocaccio C, Comoglio PM: Genetic link between cancer and thrombosis. *J Clin Oncol* 2011
- 40 Rak J, Klement G: Impact of oncogenes and tumor suppressor genes on deregulation of hemostasis and angiogenesis in cancer. *Cancer Met Rev* 19, 93-96, 2000
- 41 Petralia GA, Lemoine NR, Kakkar AK: Mechanisms of diseases: the impact of antithrombotic therapy in cancer patients. *Nat Clin Pract Oncol* 2, 356-363, 2005
- 42 Rak J, Yu JL, Luyendyk J, Mackman N: Oncogenes, Trousseau-syndrome, and cancer related changes in the coagulome of mice and humans. *Cancer Res* 66, 10642-10646, 2006
- 43 Agnelli G, Gussoni G, Bioanchini C, Verso M, Mandalà M, Cavanna L, Barni S, Labianca R, Buzzi F, Scambia G, Passalacqua R, Ricci S, Gasparini G, Lorusso V, Bonizzoni E, Tonato M; PROTECHT Investigators: Nadroparin for the prevention of thromboembolic events in ambulatory patients with metastatic or locally advanced solid cancer receiving chemotherapy: a randomised, placebo-controlled, double-blind study. *Lancet Oncol* 10, 943-949, 2009
- 44 Altinbas M, Coskun HS, Er O, Ozkan M, Eser B, Unal A, Cetin M, Soyuer S: A randomized clinical trial of combination chemotherapy with and without low molecular weight heparin in small cell lung cancer. *J Thromb Haemost* 2, 1266-1271, 2004
- 45 Haas S, Kakkar AK, Kemkes-Matthes B et al: Prevention of venous thromboembolism with low molecular weight heparin in patients with metastatic breast or lung cancer – results from the TOPIC studies. *J Thromb Haemost* 3, OR059, 2005
- 46 Mandala M, Falanga A, Piccioli A, Prandoni P, Pogliani EM, Labianca R, Barni S; working group AIOM: Venous thromboembolism and cancer. Guidelines of the Italian Association of Medical Oncology (AIOM) *Oncology Hematology* 59, 194-204, 2006
- 47 Kakkar AK, Levine MN, Kadziola Z: Low molecular weight heparin, therapy with deltaparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS). *J Clin Oncol* 22, 1944-1948, 2004
- 48 Kenessey I, Simon E, Futosi K, Bereczky B, Kiss A, Erdödi F, Gallagher JT, Tímár J, Tóvári J: Antimigratory and antimetastatic effect of heparin-derived 4-18 unit oligosaccharides in a preclinical human melanoma metastasis model. *Thromb Haemost* 102, 1265-1273, 2009

49 Doormaal FF, Di Nisio M, Otten HM, Richel DJ, Prins M, Buller HR: Randomized trial of the effect of the low molecular weight heparin nadroparin on survival in patients with cancer. *J Clin Oncol* 29, 2071-2076, 2011

50 Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, DiSilvestro P, Craig Miller M, Allard WJ, Gajewski W, Kurman R, Bast Jr RC, Skates SJ: A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 112, 40-46, 2009

51 Kulasingam V, Pavlou MR, Diamandis EP: Integrating high-throughput technologies into the quest for effective biomarkers for ovarian cancer. *Nature Cancer Rev* 10, 371-378, 2010

ZÁRÓ GONDOLATOK

1 Sequist LV, Heist RS, Shaw AT, Fidias P, Rosovsky R, Temel JS, Lennes IT, Digumarthy S, Waltman BA, BAST E, Tammireddy S, Morrissey L, Muzikansky A, Goldberg SB, Gainor J, Channick CL, Wain JC, Gaissert H, Donahue DM, Muniappan A, Wright C, Willers H, Mathisen DJ, Choi NC, Baselga J, Lynch TJ, Ellisen LW, Mino-Kenudson M, Lanuti M, Borger DR, Iafrate AJ, Engelman JA, Dias-Santagata D: Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Ann Oncology* 22, 2616-2624, 2011

2 Prat A, Ellis MJ, Perou CM: Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists. *Nature Rev Clin Oncol* 9, 48-57, 2012

3 Weigelt B, Pusztai L, Ashworth A, Reis-Filho JS: Challenges translating breast cancer gene signatures into the clinic. *Nature Rev Clin Oncol* 9, 5864, 2012

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

• *Az értekezés témájához kapcsolódók*

Nagy, Zsuzsanna

Daganatok és hemosztázis

Pathol Oncol Res Suppl 2, 9-14, 2007

Nagy, Zsuzsanna, Vera Turcsik, György Blaskó

The effect of LMWH (Nadroparin) on Tumor Progression

Pathol Oncol Res 15, 689-692, 2009

IF: 1.152

Nagy, Zsuzsanna, Orsolya Horváth, Julia Kádas, Dorottya Valtinyi, Larisza László, Bence Kopper, György Blaskó

D-dimer as a potential prognostic marker

Pathol Oncol Res DOI: 10.1007/s12253-011-9493-5

IF: 1.483

• *Egyéb közlemények*

Tallósy Imre, Vargha Géza, Pölöskey Anna, Nagy Zsuzsanna, Kricskovits Ágota

Citosztatikus kezelések (CMF) szövődményeként kialakuló alveolitisek (pneumonitisek)

Orvosi Hetilap 128, 1621-1622, 1987

Moskovits Katalin, Nagy Zsuzsanna

Előrehaladott daganatos betegségben szenvedők fájdalomcsillapítása orális retard hatású morfinkészítménnyel, M-Eslonnal

Gyógyszereink, 1995

The ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) Trialists Group.

Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised Trial. The Lancet, 359, 2131-2139, 2002

(Nemzetközi trial eredménye)

Dank Magdolna, Zergényi É, Torgyik László, Nagy Zsuzsanna

Az emlőrák kemoterápiája

In: Onkofarmakológia. Szerk: Jeney András, Kralovánszky Judit

Medicina, 2005, 679-714

Nagy, Zsuzsanna

Zolderonic acid (ZOMETA) a significant improvement in the treatment of bone metastases.

Pathol Oncol Res 11,186-187, 2005

IF: 1.162

Nagy, Zsuzsanna

Emlőrák hormonterápiája premenopauzában levő betegeken

Pathol Oncol Res Suppl 3, 1-7, 2007

Kopper László, Nagy Zsuzsanna

Biszfoszfonátok hatása a csontokra és a csontokon kívül
Pathol Oncol Res Suppl 1, 2-5, 2007

Nagy Zsuzsanna

Emlőrákos betegek kezelése fulvesztranttal – lehetne hatékonyabb?
LAM 20, 733-736, 2010

Nagy Zsuzsanna

Gyógyszeres terápiák
Medical Tribune 22, 11, 2010

Nagy Zsuzsanna

Az emlőrák kezelésének újabb eredményei
Orvostovábbképző Szemle 17, 10-13, 2010

Kopper László, Tímár József, Becságh Péter, Nagy Zsuzsanna

Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában
Semmelweis Kiadó, Budapest, 2009

Kopper László, Tímár József, Becságh Péter, Nagy Zsuzsanna

Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában. 2. kiadás
Semmelweis Kiadó, Budapest, 2011

Nagy Zsuzsanna

Célzott terápia. In „Gyakorlati onkológia és onkohematológia.” Szerk: Dank M, Demeter J.
Vox Medica Kiadói Kft, 2012, előkészületben

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok Mindazoknak, akik az értekezés elkészítésében közvetlenül vagy közvetve a segítségemre voltak,

mindenekelőtt volt főnökeimnek, közülük is elsősorban dr. Moskovits Katalinnak, akitől nagyon sokat tanultam

Külön köszönettel tartozom

dr. Kopper Lászlónak, a Patológiai Doktori Iskola és az Onkológiai Program vezetőjének,

dr. Tímár Józsefnek, témavezetőmnek,

dr. Blaskó Györgynek, bátorításáért, szakmai tanácsaiért.

Munkatársaimnak, az Onkológiai Profil minden volt és jelenlegi dolgozójának, áldozatos munkájuk az értekezés lényegét jelentő klinikai eredmények elérését tette lehetővé.

A Szent Imre Kórház mindenkori vezetésének.

Együttműködő partnereimnek, így

a Semmelweis Egyetem, I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet munkatársai
közül dr. Micsik Tamásnak, dr. Krenács Tibornak, dr. Fónyad Lászlónak
a KPS Kft munkatársainak