

Vérlemezkeszám és IL-6, mint a kolorektális tumorok potenciális prognosztikai faktorai a túlélés szempontjából

Doktori tézisek

Dr. Jósa Valéria

Semmelweis Egyetem
Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Baranyai Zsolt, egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Tordai Attila, MTA doktora, Ph.D., egyetemi tanár
Dr. Igaz Iván, Ph.D., főorvos

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Arató András, DSc., MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Tory Kálmán, Ph.D., egyetemi adjunktus
Prof. Dr. Szabó László, med.habil., Ph.D., főorvos

Budapest

2021

BEVEZETÉS

A vastag- és végbélrák jelentőségét az adja, hogy a világon a harmadik, Magyarországon a második leggyakoribb daganatos megbetegedés. Korai diagnózis esetén gyógyítható. A mortalitás javuló tendenciát mutat, amely leginkább a szűrővizsgálatok elterjedésének, és a kezelésben történt fejlődésnek köszönhető.

Számos közlemény foglalkozik azzal, hogy a szolid daganatokat, köztük a vastag- és végbélrákot kísérő emelkedett vérlemezkeszám esetén rövidebb a teljes túlélés és gyakoribb az áttét képződés. Azonban a daganatot kísérő trombocitózis és a vastag- és végbélrák súlyosbodása közötti mechanizmusok még nem teljesen tisztázottak. Az egyik elmélet szerint a daganatsejtek hatására aktiválódó vérlemezkék köpenyszerűen körbeveszik a keringésbe jutó tumorsejteket, és ezáltal mechanikus védelmet biztosítanak a nyíróerőkkel szemben. Emellett megzavarják az immunrendszer által történő felismerést, illetve az általuk szecernált citokinek révén csökkentik a természetes ölüsejtek reakcióját.

Elősegítik a daganatsejtek extravazációját, valamint proangiogenetikus faktorok szecernálása révén (trombocita faktor 4, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor, trombocita eredetű növekedési faktor) a daganatok neoangiogenezisét, amellyel indirekt módon a proliferációjuknak és a daganat növekedésének kedveznek.

Egy petefészekrákban végzett vizsgálat alapján felmerült egy paraneoplasztikus útvonal, mely szerint a daganatsejtek által szecernált interleukin-6 (IL-6) fokozza a májban a trombopoetin (TPO) termelődését. Ez utóbbi a csontvelőben stimulálja a megakariopoézist, amely végül trombocitózishoz vezet. Az IL-6 és a TPO szerepére irányuló vizsgálatok vastag- és végbélrákban még nem történtek.

CÉLKITŰZÉS

Kutatásom felmértem, hogy valóban van-e prognosztikai értéke a trombocitózisnak a túlélés

tekintetében a gasztrointesztinális daganatokban. Vizsgálatom célja volt, hogy tisztázzam, mutat-e az IL-6 szint összefüggést az emelkedett vérlemezkeszámmal gasztrointesztinális tumorokban. Gyulladás-indukált daganatos modellben vizsgáltam, hogy szerepet játszik-e az IL-6 a kolorektális daganat kialakulásában, illetve befolyásolja-e a betegség súlyosságát. Ezenkívül vizsgálatom célja volt az IL-6 expresszió mértékének és eloszlásának tisztázása kolorektális daganatban.

MÓDSZEREK

Az IL-6 szint és az emelkedett vérlemezkeszám közötti összefüggés vizsgálatokor 157, különböző gasztrointesztinális daganatban szenvedő, és ezért műtéten átesett betegnél vizsgáltam a preoperatív vérlemezkeszámot és a szérum IL-6 szintet. A vérvétel a műtétet megelőző 4 hétben történt. Trombocitózisként a 400 G/l feletti vérlemezkeszámot definiáltam, a szérum IL-6 szintet Cobas 601 készülékkel mértem elektrochemilumineszcenz (ECLIA) módszerrel.

Az IL-6 expressziót 95 kolorektális adenokarcinóma miatt műtéten átesett betegnél vizsgáltam. A szövettani metszeteket egyrészt hematoxin-eozinnal festettem meg a sejtmagok láthatóvá tételéhez, másrészt IL-6 antitesttel az IL-6 expresszió felméréséhez. A metszeteket digitalizálás után a Panoramic Viewer (3DHistech) programmal értékeltem ki. Első lépésben metszetenként öt területet jelöltem ki, ügyelve arra, hogy a területeken a tumor- és a strómasejtek aránya megfeleljen az egész metszeten látott aránynak. Ezt követte maga az adenokarcinóma és a stróma sejteinek kijelölése. A tumorsejtek, illetve a strómasejtek festődési intenzitásának kiértékeléséhez a QuantCenter (3DHistech) programot alkalmaztam. A program a színintenzitás alapján számszerűsítette a pozitivitást, és ezt erős, mérsékelt, gyenge és negatív csoportokba sorolta. Az első két csoportot „kifejezett”, a második kettőt pedig „nem kifejezett” IL-6 expresszióként határoztam meg.

Az IL-6 szerepét kolorektális daganatban egy állatkísérletben vizsgáltam. Egy új IL-6 génkiütött (KO) egérvonal létrehozása történt CRISPR/CAS9 módszerrel.

A vizsgálat kezdetén azoximetán intraperitonealis, majd 3 hetes ciklusonként 1 hétig az ivóvízhez adott 3% dextranszulfát (DSS) alkalmazásával gyulladás-asszociált kolorektális daganatot indukáltam IL-6 KO és vad típusú (WT) egerekben. A gyulladás súlyosságát decimális pontrendszerben ábrázoltam a széklet jellege és a perianalis tájék állapota alapján. A kísérlet végén képalkotó vizsgálatok (fluoreszcens konfokális endomikroszkópia és PET/MRI) történtek a teljes testre kiterjedő daganatos és gyulladásos érintettség tisztázására. A terminálást követően vér- és szövetmintavételt végeztem a vérlemezkeszám, az IL-6 szint és a TPO expresszió mérésére. A teljes vastagbél makroszkópos és mikroszkópos vizsgálatával a gyulladás és a daganatképződés mértékét, illetve a stádiumbeosztást lehetett meghatározni.

EREDMÉNYEK

Az IL-6 szint és az emelkedett vérlemezkeszám között pozitív összefüggést (korrelációs koefficiens: $R=0,214$, $p = 0,006$) igazoltam a gasztrointesztinális daganatoknál. Míg a daganat differenciáltsági foka nem befolyásolta szignifikánsan sem a vérlemezkeszámot, sem az IL-6 szintet, addig előrehaladott stádium esetén (3. és 4. stádium), azaz nagyobb tumorterhelés esetén az IL-6 szint szignifikánsan magasabb volt. Ez alapján feltételezhető, hogy a fokozottabb IL-6 termelésért közvetlenül vagy közvetve a daganat a felelős. Multivariáns elemzéssel a hemoglobin negatív, a fehérvérsejtszám pozitív szignifikáns összefüggést mutatott a trombocitaszámmal.

Az IL-6 expresszió vizsgálatát 64 kolorektális adenokarcinómában szenvedő betegnél végeztem. A betegek közel kétharmada férfi volt, a korai stádiumú betegek aránya mérsékelten nagyobb volt, mint az előrehaladott stádiumú betegeké (57,8% vs. 42,2%). A tumorok jelentős része közepesen differenciált volt

(64,1%), a jól (15,6%) és rosszul (20,3%) differenciált daganatok közel hasonló arányban fordultak elő.

A QuantCenter képanalízis platform segítségével kiszámoltam a tumor- és strómasejtek IL-6 pozitív területeinek százalékos eloszlását. Különbségek mutatkoztak a tumorsejtek és a strómasejtek IL-6 kifejeződése között. A kifejezett (erős és mérsékelt színintenzitás) IL-6 expressziót mutató sejtek aránya szignifikánsan magasabb volt a tumorsejtekben ($29,5 \pm 22,2\%$), mint a strómában ($22,1 \pm 13,2\%$) (Wilcoxon próba, $p = 0,005$). Előrehaladott stádiumú (3. és 4. stádium) betegekben a tumorsejtek IL-6 expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult. Hasonló összefüggés a strómasejteknél nem igazolódott.

A gyulladás-asszociált kolorektális állapotmodellben mind az IL-6 KO, mind a WT egereknél multifokális, polipoid daganatok alakultak ki, döntően a leszálló vastagbél területén. Szövettanilag tubuláris adenokarcinóma igazolódott. A daganatos góccok átlagos száma szignifikánsan nagyobb volt (Student-féle teszt, $t_{16} = -2,79$, $p = 0,013$) a WT ($6,22 \pm 0,52$), mint az IL-6 KO

csoportban ($4,22 \pm 0,49$). Az IL-6 KO csoportban az átlag teljes tumorvolumen (TTV: daganatos gócek volumenének összege) $13,6 (\pm 6,2) \text{ mm}^3$, míg a WT csoportban $21,9 (\pm 6,6) \text{ mm}^3$ volt. Ha a TTV-t kvartilisekre osztottuk, akkor a WT csoportban az eloszlás a nagyobb kvartilisek felé tolódott, azaz a daganatok mérete és a gócek száma nagyobb volt. A két csoport között különbség mutatkozott a daganatok differenciáltságát illetően is. Míg az IL-6 KO csoportban kizárólag jól differenciált daganatokat észleltem, addig a WT csoportban ugyanolyan arányban fordultak elő jól és közepesen differenciált daganatok.

Jelentős különbséget észleltem a mortalitási rátát illetően. Az IL-6 KO csoportban sokkal több állat pusztult el. Ennek hátterében azonban nem a daganatos betegség állt. Az egyes DSS kezeléseket követően az IL-6 KO állatoknál sokkal súlyosabb gyulladás alakult ki, és ez állt a fokozott mortalitás hátterében.

Az átlag vérlemezkeszám különbözött a négy alcsoportot összehasonlítva. A kezelt csoportokat vizsgálva az átlag trombocitaszám szignifikánsan

magasabb volt a WT csoportban (754 ± 103 G /l), mint az IL-6 KO állatoknál (340 ± 109 G /l). Mindkét genotípusban a vérlemezkeszám alacsonyabb volt a kontroll, mint a kezelt csoportokban, és ez a különbség szignifikáns volt a vad genotípus esetén. A máj TPO génexpressziója magasabb volt a kezelt WT állatokban, mint a többi csoportban. Az átlagos TPO szint hasonló volt a kontrollcsoportokban és a kezelt IL-6 KO csoportban.

Az intraluminális endomikroszkópiával jelentős különbség mutatkozott az állatok között. A nyálkahártya lumen felületéről készült *in vivo* képek a kripták aszimmetrikus mintázatát mutatták. A kripták nyílásának átmérője nagyobb volt, és alakjuk eltért a szokványos körkörös formától. Vörös csatornával fokozott nyáktermelést lehetett kimutatni. PET/MRI képeken a WT egérben az FDG-felvétel a kolon deszcendensben és transzverzumban nagyon magas volt a tumoros gócnak megfelelően, illetve egy retroperitoneális nyirokcsomóáttét is igazolódott. Az IL-6 KO állatoknál az FDG-felvétel a vastagbélben jelentősen kisebb volt, áttétre utaló eltérés nem igazolódott. Amennyiben a magas

aviditású tumoros gócok FDG-felvételét összehasonlítottam, az szignifikánsan magasabbnak bizonyult a WT egérben. A vastagbél radioaktivitás tartalma a teljes test radioaktivitásához képest szignifikánsan magasabb volt a WT állatban. Összességében a WT állat magasabb FDG-felvételt és -felhasználást mutatott, illetve egyidejűleg intenzívebb és nagyobb vastagbél FDG-felvételi gócok igazolódtak kvalitatív képanalízissel, mint ami az IL-6 KO állatoknál megfigyelhető volt.

KÖVETKEZTETÉSEK

A különböző gasztrointesztinális tumorokat vizsgálva azt találtam, hogy a szérum IL-6 szint és a vérlemezkeszám között összefüggés áll fenn. Multivariáns lineáris regressziós analízissel a hemoglobin negatív, a fehérvérsejtszám pozitív szignifikáns korrelációt mutatott a vérlemezkeszámmal. A szérum IL-6 szint szignifikánsan magasabbnak bizonyult az előrehaladott stádium esetén.

Kolorektális daganatban a kifejezett IL-6 expresszió szignifikánsan magasabb volt a tumorsejtekben. A vizsgálat során előrehaladott stádium esetén a tumorsejtek IL-6 expressziója szignifikánsan nagyobb volt, mint korai stádium esetén.

A gyulladás-asszociált kolorektális daganatmodellben a kezelt WT csoportban több gócu és nagyobb méretű, illetve alacsonyabban differenciált daganatok fordultak elő. Az IL-6 KO egereknél észlelt fokozott mortalitás hátterében a kifejezettebb gyulladás és az ezt követő csökkent regeneráció állt, amelynek oka a génkiütés volt. A kezelt WT egereknél a trombocitaszám szignifikánsan magasabb, a TPO expresszió pedig fokozott volt a többi csoporthoz képest. Az in vivo képalkotó vizsgálatok a kezelt WT egereknél elhúzódó gyulladást és súlyosabb daganatos érintettséget igazoltak. A vizsgálatom alapján amennyiben nem termelődik IL-6, akkor a daganatos terhelés és progresszió kisebb mértékű volt, a TPO expresszió és ennek következményeként a trombocitaszám szignifikánsan alacsonyabb lett.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Jósa V, Brodszky V, Zaránd A, Mezei T, Szilasi Z, Merkel K, Fehér A, Szállási Z, Baranyai Z. (2020) The relationship between IL-6 and thrombocytosis accompanying gastrointestinal tumours. *Prz Gastroenterol*, 15:215-219. **IF: 0,0**

Josa V, Ferenczi S, Szalai R, Fuder E, Kuti D, Horvath K, Hegedus N, Kovacs T, Bagamery G, Juhasz B, Winkler Z, Veres DS, Zrubka Z, Mathe D, Baranyai Z. (2020) Thrombocytosis and Effects of IL-6 Knock-Out in a Colitis-Associated Cancer Model. *Int J Mol Sci*, 21:6218. **IF: 4,556**

Josa V, Federer K, Zrubka Z, Reiniger L, Baranyai Z. (2021) Az IL-6 expresszió vizsgálata colorectalis adenocarcinomában szenvedő betegeken. *Orv Hetil*, 162:1502-1507. **IF:0,417**

A disszertációtól független közlemények

Baranyai Z, **Jósa V**, Tóth A, Szilasi Z, Tihanyi B, Zaránd A, Harsanyi L, Szállási Z. (2016) Paraneoplastic thrombocytosis in gastrointestinal cancer. *Platelets*, 27: 269-275. **IF: 2,465**

Szilasi Z, **Jósa V**, Zrubka Z, Mezei T, Vass T, Merkel K, Helfferich F, Baranyai Z. (2020) Neutrophil-To-Lymphocyte and Platelet-To-Lymphocyte Ratios as Prognostic Markers of Survival in Patients with Head and Neck Tumours-Results of a Retrospective Multicentric Study. *Int J Environ Res Public Health*, 17:1742. **IF: 2.849**

Baranyai Z, Répássy G Jr, Molnár V, Forgács G, Hacki T, **Jósa V**, Balázs Á, Vass T. (2020) Nyelőcső-perforatio miatt végzett oesophagusexstirpatio rekonstrukciója hypopharyngogastrostoma képzésével. *Orv Hetil*, 161:756-760. **IF: 0,417**

Jósa V, Krzystanek M, Vass T, Lang T, Juhász V, Szilágyi K, Tihanyi B, Harsányi L, Szállási Z, Salamon F, Baranyai Z. (2015) Thrombocytosis of Liver Metastasis from

Colorectal Cancer as Predictive Factor. *Pathol Oncol Res*, 21:991-7. **IF: 1,940**

Josa V, Krzystanek M, Eklund AC, Salamon F, Zarand A, Szallasi Z, Baranyai Z. (2015) Relationship of postoperative thrombocytosis and survival of patients with colorectal cancer. *Int J Surg*, 18:1-6. **IF: 1,657**

Baranyai Z, Krzystanek M, **Jósa V**, Dede K, Agoston E, Szász AM, Sinkó D, Szarvas V, Salamon F, Eklund AC, Szállási Z, Jakab F. (2014) The comparison of thrombocytosis and platelet-lymphocyte ratio as potential prognostic markers in colorectal cancer. *Thromb Haemost*, 111:483-90. **IF: 4,984**

Baranyai Z, **Jósa V**, Krzystanek M, Eklund AC, Szász AM, Szállási Z. (2013) A thrombocytosis mint prediktív faktor értékelese colorectalis tumorokban. *Magy Seb*, 66:331-7.

Baranyai Z, **Jósa V**, Merkel K, Zolnai Z. (2013) Carcinoid Tumor in Accidental, Asymptomatic Meckel's Diverticulum. *J Surg Tech Case Rep*, 5:56-7.

Sinkó D, Baranyai Z, Nemeskéri C, Teknos D, **Jósa V**, Hegedus L, Mayer A. (2010) Sugárkezelés mellett fellépő bélgyulladások tünettana, diagnosztikája, terápiás lehetőségei . Orv Hetil, 151:1450-4.

Baranyai Z, Sinkó D, **Jósa V**, Zaránd A, Teknos D. (2011) A radiogén enteritis kezelésének kihívásai napjainkban. Orv Hetil, 152:1120-4.

Baranyai Z, Mersich T, Dede K, Besznyák I, Zaránd A, Teknos D, Nagy P, Salamon F, Nagy P, Nagy Z, Kótai Z, Szász M, Lukács L, Szállási Z, **Jósa V**, Jakab F. (2011) Projektalapú mintagyűjtéstől a biobankig. Orv Hetil, 152:606-9.

Baranyai Z, Kulin L, **Jósa V**, Mayer A. (2011) A sebészeti infekciók mint megbiztonsági problémák. Magy Seb, 64:107-11.

Baranyai Z, **Jósa V**, Kulin L. (2011) Az új sebészi eljárások és eszközök befogadása a megbiztonság tükrében. Orv Hetil, 152:2091-5.

Jósa V, Császár J, Baranyai Z, El Khoffash A, Becske M. (2012) Antibiotikum és probiotikum együttes adásának előnyei Otorhinolaryngologia Hungarica, 58: 72-75.

Jósa V, Császár J, Nagy P, Baranyai Z, Becske M. (2011) Sialoblastoma, ritka gyermekkori nyálmirigydaganat (esetbemutató) Otorhinolaryngologia Hungarica, 57: 152-155.