

Ritka tüdőtumорок PD-1, PD-L1 és claudin expressziójának vizsgálata

Doktori tézisek

Dr. Gyulai Márton

Semmelweis Egyetem

Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Moldvay Judit, DSc, egyetemi magántanár

Hivatalos bírálók: Dr. Czebe Krisztina, PhD, főorvos

Dr. Rókus András, PhD, egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Losonczy György, DSc, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Szász Attila Marcell, PhD, med. habil., tudományos
főmunkatárs

Dr. Bittner Nóra, PhD, főorvos, c. egyetemi docens

Budapest

2023

1. BEVEZETÉS

Az elmúlt két évtizedben a tüdőrák kezelésében és diagnosztikájában is jelentős változásoknak lehettünk tanúi. A molekuláris célzott terápiák és az immunterápia új lehetőségeket kínálnak a tüdőrák kezelésében. Ritka tüdőtumorerő esetében egyelőre nem áll rendelkezésre a rutin gyakorlatban is alkalmazható célzott terápia, ill. immunterápia.

Az irodalmi adatok alapján a ritka tüdődaganatok előfordulási gyakorisága kisebb, mint 1%. A nyálmirigy jellegű primer légúti daganatok előfordulása a légúti rosszindulatú daganatokhoz viszonyítva 0,1-0,2%. A bronchialis nyálmirigyek a trachea és a bronchusok submucosájában helyezkednek el. Morfológiájukat tekintve nagyon hasonlóak a nyak és az oropharyngealis régió fő nyálmirigyeihez. Ennek megfelelően hasonló jellegű, nyálmirigy típusú daganatok fejlődhetnek ki belőlük, bár sokkal ritkábban, mint a fej-nyaki régióban. Ide tartoznak a malignus bronchialis adenoid cysticus carcinoma (ACC) és a mucoepidermoid carcinoma (MEC).

Mind ACC, mind MEC esetén az optimális kezelés a sebészi eltávolítás, low-grade carcinoma és polypoid jellegű endobronchialis tumor esetén intervenciós bronchoszkópia is szóba jön. Kemoterápia, illetve radioterápia hatásosságáról nincsenek egyértelmű adatok.

A legtöbb ACC tumor lassan növekszik, és nem származik előny a szisztémás kemoterápiából. Az elmúlt években végzett klinikai vizsgálatok a kemoterápiás szerek alacsony hatásosságát mutatták metasztatizáló betegség esetén. Így tehát továbbra sincs elfogadott szisztémás kemoterápiás kezelés ACC-ben. Lassú lefolyású, metasztatizáló esetekben a szoros obszerváció a standard eljárás a szisztémás kezelés helyett. Gyorsan progrediáló esetekben szisztémás kemoterápiától várható mérsékelt eredmény a betegek egy részénél. A célzott terápiák fejlesztése még csak korai szakaszban van.

MEC esetén sincs elfogadott kemoterápiás rezsim. High-grade tumorok esetén adjuváns kezelésként, ill. nem reszekálható tumor esetén kemoterápiás kezelés szóba jön. Néhány vizsgálatban kemoterápiát és EGFR-TKI kezelést alkalmaztak, de az eredmények nem voltak meggyőzőek.

Az anti-PD-1 és anti-PD-L1 immuncheckpoint-inhibitor terápiák bevezetésével a tüdőrák túlélése jelentősen javult, mind ADC, mind SCC esetén. Pulmonáris eredetű ACC és MEC esetében azonban eddig átfogó PD-1, PD-L1 vizsgálatot nem végeztek. A claudinok (CLDN) a hám- és endothelsejtek tight junctionjait alkotó fehérjék közé tartoznak. Kóros expressziójuk és a prognózis között számos malignus tumor esetén összefüggés mutatható ki, de a különböző CLDN-ok expressziójának jellegzetes változásai a tumor lokalizációjától és típusától függően differenciáldiagnosztikai célokra is felhasználhatók. Pulmonális eredetű ACC-ben ill. MEC-ben nem vizsgálták még a CLDN-ok expresszióját.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. PD-1 és PD-L1 expresszió vizsgálata ritka tüdőtumorkban

- Vizsgálatunk célja az volt, hogy meghatározzuk a PD-1 és PD-L1 protein expresszió mértékét ritka tüdőtumorkban, és ezáltal felmérjük az immunterápia lehetséges szerepét ezen tumorok kezelésében.
- A PD-L1 protein expressziót a tumorsejtekben és az immunsejtekben kívántuk vizsgálni, míg a PD-1 protein expressziót az immunsejtekben terveztük tanulmányozni.
- Célunk volt továbbá a két ritka tüdőrák szövettani típus PD-1 és PD-L1 expressziója közti különbség vizsgálata, valamint a főbb klinikopatológiai jellemzőkkel való korreláció vizsgálata.

2.2. CLDN expresszió vizsgálata tüdő eredetű ACC-ben és MEC-ben

- Vizsgálatunk célja különböző CLDN fehérjék expressziójának vizsgálata volt tüdő eredetű ritka nyálkamirigy tumorokban.
- A CLDN expressziós mintázat leírása mellett célunk volt a vizsgált két ritka tüdőrák szövettani típus CLDN expressziójának összehasonlítása, továbbá a főbb klinikopatológiai paraméterekkel való korreláció tanulmányozása.

3. MÓDSZEREK

3.1. Betegcsoportok

3.1.1. PD-1 és PD-L1 expresszió vizsgálata ritka tüdőtumzorokban

Retrospektív vizsgálatunkban 66 patológiailag verifikált ritka tüdődaganatot, köztük 26 MEC-et, 27 ACC-t és 13 tracheobronchialis papillomát (TBP) vizsgáltunk. Mivel a beteget 1987-2019 között diagnosztizáltak és kezelték az Országos Korányi Pulmonológiai Intézetben, ezért valamennyi tumorminta ismételt szövettani elemzését elvégeztük. Az ACC és a MEC diagnózisokat a következő IHC markerekkel erősítettük meg: pancytokeratin, aktin, S100 és p63.

3.1.2. CLDN expresszió vizsgálata tüdő eredetű ACC-ben és MEC-ben

Retrospektív vizsgálatunkban 1987 és 2023 között diagnosztizált 12 ACC-t és 23 MEC-et tanulmányoztunk. 27 esetben sebészi reszekció történt, 8 betegnél pedig merev bronchoszkóppal, általános érzéstelenítésben végzett bronchoszkópos tumoreltávolítás. A sebészi reszekció eseteiben patológiai TNM-et (pTNM), míg a bronchoszkópos kimetszés eseteiben klinikai TNM-et (cTNM) alkalmaztunk.

3.2. Immunhisztokémia

3.2.1. PD-1 és PD-L1 expresszió vizsgálata ritka tüdőtumorkban

A sebészeti minták esetében immunhisztokémiai (IHC) festést végeztünk TMA (tissue microarrays) multiblokkokon (5 × 6-os panel; átmérő 2 mm), páciensenként dupla vagy tripla kiszúrásokkal, melyek a formalinban rögzített, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetminták reprezentatív területeiről származtak (TMA Master; 3DHitech, Budapest, Magyarország). A bronchoszkópos excindátumok esetében 3µm vastagságú metszetek készültek az IHC vizsgálathoz TMA nélkül. Először Ventana SP142-t használtunk primer PD-L1 antitestként (SP142 klón, 1:100 hígítás; Spring Bioscience, Ventana; Oro Valley, AZ). Nem észleltünk azonban semmilyen immunreakciót sem a tumorsejteken (TC), sem az immunsejteken (IC), ezért ezt követően PharmDx 22C3 antitestet alkalmaztunk. A PD-1 festéshez Abcam 52587 antitestet használtunk. Az egér monoklonális PD-L1 és PD-1 antitesteket (PharmDx, 22C3-as klón, azonnal felhasználható, illetve Abcam, NAT105-ös klón, 1:50 hígítás) az IHC-hez standardizált protokollok szerint használtuk. Deparaffinizálás és rehidratálás után a metszeteket 3%-os H₂O₂ oldatban 10 percig inkubáltuk a nonspecifikus háttérfestés csökkentésére. Ezt követően 40 percig 10 mM citrát pufferben (pH 6,0) 98°C-on melegítettük. A mintákat ezután 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk Ultra V Block (UltraVision LP detection system, Lab Vision Corporation, Thermo Fisher Scientific Inc., Pittsburgh, MA, United States) használatával, majd a PD-L1 és PD-1 antitest inkubálása következett másnapig 4°C-on. Az immunreakciót az UltraVision LP Detection System használatával detektáltuk a gyártó ajánlásainak megfelelően (Lab Vision Corporation). Az antitest vizualizálását 3-3'-diaminobenzidinnel (DAB) és hematoxylin ellenfestéssel végeztük. Pozitív kontrollként

placentaszövetet használtunk. Az összes mintát gyakorlott patológus vizsgálta meg ($\times 400$ -as nagyítással) és értékelt ki. A pozitív TC és IC értékét félkvantitatív módszerrel határoztuk meg, a pozitív sejtek százalékos arányaként. A TC-nek 1%, 5% és 50%, míg az IC-nek 1%, 5% és 10%-os határértékeket rögzítettünk, amelyek a leggyakrabban használt küszöbértékek, és amelyeket mi is alkalmaztunk a korábbi tanulmányainkban is.

3.2.2. CLDN expresszió vizsgálata tüdő eredetű ACC-ben és MEC-ben

Mivel a biopsziás szövetminták túlnyomó többségét 2020 előtt vették, ezért az összes tumormintát újra megvizsgáltuk. Az ACC és a MEC diagnózisát a következő immunhisztokémiai (IHC) markerekkel erősítettük meg: pancytokeratin, aktin, S100 és p63. A szöveti jellemzőket, mint például a tumor grádusát (1-3), a nekrozis jelenlétét (igen/nem), az érinfiltráció jelenlétét (igen/nem) és a lymphoid infiltráció mértékét (enyhe/közepes) hematoxin-eozinnal festett metszeteken határoztuk meg.

A sebészeti minták esetében az IHC-festést TMA-kon (5x6; átmérő, 2 mm) végeztük. Szövetblokkokként egy vagy két kiszúrás (core biopszia) történt, amelyeket FFPE szövetminták kiválasztott területeiből készítettünk (TMA Master; 3DHitech, Budapest, Magyarország). A bronchoszkópos kimetszések esetén 3 μ m vastagságú metszeteket készítettünk az IHC-khez TMA-készítés nélkül.

Az immunreakciókhoz a következő antitesteket és hígításokat használtuk: CLDN1 mAb (Invitrogen, 1:200), CLDN2 mAb (Invitrogen, 1:300), CLDN3 pAb (Invitrogen, 1:200), CLDN4 mAb (Invitrogen, 1:200), CLDN5 mAb (Invitrogen, 1:20), CLDN7 mAb (Invitrogen, 1:200) és CLDN18 mAb (Invitrogen, 1:200). Minden

primer antitestet 42°C-on inkubáltunk 32 percig. Az IHC festéseket a Roche Ventana Benchmark ULTRA automatizált tárgylemezfestő készülékkel (Ventana Medical Systems, Roche Diagnostics, Franciaország) végeztük az UltraView univerzális DAB IHC Detection Kit (Roche, Franciaország) segítségével. Az antitestek vizualizálása után a tárgylemezeket hematoxilinnel ellenfestettük. Pozitív kontrollként CLDN pozitív tüdőrákszöveteket használtunk a CLDN1, -2, -3, -4, -5, -7 és -18 reakciókhoz.

Minden metszetet két tapasztalt patológus 400x-os nagyítással vizsgált és értékelt. Az immunpozitivitás szintjét a H-score segítségével határoztuk meg, amelyet a festődés intenzitásának (osztályozva: 0 = nem festődik; 1 = gyenge; 2 = közepes; vagy 3 = erős) és a pozitív sejtek százalékos arányának szemikvantitatív értékelésével számoltunk ki.

3.3. Statisztikai analízis

3.3.1. PD-1 és PD-L1 expresszió vizsgálata ritka tüdőtumorkban

Minden statisztikai elemzést az SPSS Statistics 25.0 package (SPSS Inc., Chicago, IL, Egyesült Államok) szoftver segítségével végeztük. Az életkor szerinti felosztáshoz az onkológiai vizsgálatokban egyik leggyakrabban használt küszöbértéket (55 év) használtuk.

Az alacsony esetszám miatt a kategorikus adatokat, mint az életkor (≤ 55 év vs. > 55 év), a nem (férfi vs. nő) és a dohányzási előzmények (soha nem dohányzott vs. korábban dohányos volt vs. jelenleg is dohányos) a Fisher-féle egzakt próbával vizsgáltuk. A különböző PD-L1/PD-1 alcsoportok ($< 1\%$ vs. $\geq 1\%$) összehasonlítása szintén a Fisher-féle egzakt próbával történt. Minden közölt p-érték kétoldali próbából származott, és 0,05 vagy annál alacsonyabb értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

3.3.2. CLDN expresszió vizsgálata tüdő eredetű ACC-ben és MEC-ben

Minden statisztikai elemzést az R 4.2.1-es verziójával végeztünk (R Foundation for Statistical Computing, Bécs, Ausztria). A kategorikus és ordinális paraméterek statisztikai elemzését Fisher-féle egzakt próbával végeztük. A folytonos változókat Mann-Whitney-tesztel vagy Kruskal-Wallis-tesztel hasonlítottuk össze. A minták hierarchikus klaszterezését a mért expressziós szintek alapján a ComplexHeatmap R szoftvercsomag használatával végeztük (v.2.10.0; URL: <https://jokergoo.github.io/ComplexHeatmap-reference/book/>; utolsó elérés dátuma: 5/10/2021). A távolságmátrixot az euklideszi távolságmértékkel számoltuk ki, a dendrogramokat pedig a ward.D klaszterezési módszerrel hoztuk létre. Az expressziós szintek korrelációit páronkénti módon, Pearson korreláció segítségével számoltuk ki. A lineáris korrelációs együttható (R) értéke -1 és 1 között változik mindkét értéket beleértve. Az elemzések során a Benjamini-Hochberg korrekciót alkalmaztuk a többszörös teszt korrekcióra.

3.4. Etikai engedélyek

A vizsgálatainkat a Helsinkai Nyilatkozatban foglalt irányelvekkel összhangban végeztük. A vizsgálathoz ETT TUKEB ill. ÁNTSZ engedéllyel rendelkezünk (ETT 7214-1/2016/EKU [0109/16], ÁNTSZ IF-77-3/2016, SE IKEB241/2016). A retrospektív vizsgálathoz a betegetől beleegyező nyilatkozatra nem volt szükség. A klinikai adatok összegyűjtését követően után a betegazonosítókat eltávolítottuk, hogy a beteget sem direkt, sem indirekt módon ne lehessen azonosítani.

4. EREDMÉNYEK

4.1. PD-1 és PD-L1 expresszió vizsgálata ritka tüdőtumorkban

A PD-1 expressziót immunsejteken 5 MEC (19.2%), 4 ACC (14.8%) és 2 TBP (15.4%) esetén tudtuk kimutatni. Mindössze egyetlen MEC esetben mutatkozott 5%-nál nagyobb PD-1 expresszió az immunsejteken.

Mivel csak nagyon kevés mintán találtunk 5%-ot meghaladó PD-L1/PD-1 expressziót a tumorsejteken (TC) és az immunsejteken (IC), ezért dichotomizált kategóriákat használtunk a statisztikai analízishez (azaz pozitív ($\geq 1\%$) vs. negatív ($< 1\%$)).

Tekintettel arra, hogy az elsőként használt Ventana SP142 antitesttel végzett PD-L1 immunfestés nem adott pozitív immunreakciót egyik mintán sem, ezért a továbbiakban PharmDx 22C3 antitestet használtunk. PD-L1 expressziót tumorsejteken 2 MEC mintán (7.7%) és 1 ACC mintán (3.7%) tudtuk kimutatni, és nem adott reakciót a TBP mintákon. Ugyanakkor PD-L1 expresszió az immunsejteken 9 MEC esetben (34.6%) és 4 ACC esetben (14.8%) volt kimutatható, és nem volt detektálható a TBP mintákon. A MEC minták nagyobb arányban festődtek, mint az ACC minták, de ez a különbség nem volt szignifikáns ($p = 0.119$). Mindegyik PD-L1 TC pozitív tumor mintán PD-L1 IC pozitivitást is megfigyeltünk. 5%-nál magasabb PD-L1 TC és/vagy IC expresszió csak egy ACC és 2 MEC esetben mutatkozott. Közülük az egyik MEC mintán, mely egy dohányos nőtől származott, tumorsejteken 50%-ot meghaladó, míg immunsejteken 10%-nál nagyobb immunpozitivitást tudtuk igazolni (6. ábra); egy férfitől származó MEC mintán 5-49% PD-L1 TC szint mutatkozott, egy másik férfitől származó ACC mintán 5-9% PD-L1 IC szint mutatkozott.

Megvizsgáltuk a potenciális összefüggéseket a klinikopatológiai adatok és a tumork különböző PD-1/PD-L1 expressziós profilja

között. MEC esetén 1%-nál nagyobb immunpozitivitás tumorsejteken vagy immunsejteken szignifikánsan több esetben volt kimutatható 55 évesnél idősebbeknél, mint ennél fiatalabbaknál ($p = 0.046$ ill. $p = 0.01$). Ezen a megfigyelésen kívül semmilyen szignifikáns korrelációt nem találtunk a PD-1/PD-L1 expressziós szintek és a betegadatok között, mint kor, nem vagy dohányzási anamnézis.

Fentiek mellett vizsgáltuk a kapcsolatot a tumor szövettani típusa és a tumorsejteken, illetve az immunsejteken mutatkozó PD-L1 expresszió, valamint az immunsejteken detektált PD-1 expresszió között. 1%-ot meghaladó PD-L1 expressziós szint az immunsejteken MEC esetén szignifikánsan gyakoribb volt, mint TBP esetén ($p < 0.001$). Ettől eltekintve semmilyen további összefüggést nem észleltünk a szövettani altípusok és a PD-1/PD-L1 expressziós szintek között.

Mivel az FFPE blokkok kora befolyásolhatja az IHC reakciókat, ezért összehasonlítottuk a régebbi és az újabb szövettani mintákat, de nem találtunk szignifikáns különbséget az IHC pozitivitási szintek között a 2006 előtti és utáni minták elemzésekor.

4.2. CLDN expresszió vizsgálata tüdő eredetű ACC-ben és MEC-ben

Az ACC és MEC minták klinikopatológiai jellemzőinek összehasonlítása során megfigyeltük, hogy az ACC-tumorerő magasabb grade-del rendelkeztek (korrigált p-érték = 0,044, 1. táblázat) és magasabb stádiumúak voltak (korrigált p-érték = 0,044), mint a MEC-tumorerő. Az ACC-tumorerő betegek általában idősebbek is voltak, mint a MEC-tumorerő betegek (medián: 64 vs. 48 év, korrigált p-érték = 0,044, 1. táblázat). A két altípus tumorerőnek összehasonlításakor nem lehetett más szignifikáns tendenciát kimutatni

sem a nem, sem a dohányzás, sem az érrendszeri érintettség, sem a nyirokszervi infiltráció, sem a nekrozis tekintetében.

A CLDN IHC pozitív tumorok többsége erős és homogén festődést mutatott. A CLDN IHC negatív tumorok bizonyos eseteiben endogén pozitív kontrollként szolgáló nem-tumoros szövet segítette a helyes kiértékelést.

A CLDN1, -3, -4 és -7 IHC esetében membranózus CLDN immunpozitivitás volt megfigyelhető, míg a CLDN2, -5 és -18 IHC esetében citoplazmatikus festődést találtunk. Általában minden pozitív tumor diffúzan és meglehetősen egyenletesen festődött. Az immunfestődés intenzitása általában hasonló – vagy akár erősebb – volt, mint a szomszédos normál hörgőhámé. Az expresszió heterogenitása ugyanazon tumor különböző területein csak nagyon kevés esetben volt megfigyelhető.

A CLDN expressziós szintek és a klinikopatológiai jellemzők közötti összefüggéseket - tekintettel a rendelkezésre álló esetek alacsony számára - az összes adaton vizsgáltuk, figyelmen kívül hagyva a tumor szövettani altípusát.

A CLDN expressziós szintek elemzésekor azt figyelhettük meg, hogy a CLDN4-et befolyásolják leginkább különböző klinikopatológiai tényezők. A grade 2-es tumorokban magasabb volt a CLDN4-expressziós szint, mint a grade 1-es fokozatúakban (medián H-érték: 60 vs. 1; Mann-Whitney-teszt p-értéke: 0,045), és pozitív korreláció volt megfigyelhető a stádium és a CLDN4-expresszió között ($R = 0,5$, p-érték: 0,003).

A CLDN4-szintek pozitív összefüggést mutattak az életkorral ($R = 0,49$, p-érték: 0,004).

Mindemellett azt találtuk, hogy nekrozis megléte esetén a tumorok magasabb CLDN5-expressziót mutattak, mint azok a tumorok, amelyekben nem volt jelen nekrozis (medián H-érték: 60 vs. 0; Mann-Whitney-teszt p-érték: 0,009).

A legmeggyőzőbb összefüggést a CLDN18 expressziója és a dohányzás között figyelhettük meg: a soha nem dohányzók tumorai alacsonyabb CLDN18 expressziós értéket mutattak, mint a jelenleg dohányzók tumorai (H-score értékek mediánja: 70 vs. 190, Mann-Whitney-teszt p-értéke: 0,003).

Mіндеzen összefüggések közül csak az utóbbi maradt szignifikáns a többszörös teszt korrekciót követően.

Az ACC és MEC minták CLDN expressziós profilját vizsgálva számottevő különbségeket találtunk. A CLDN1, -2, -4 és -7 expressziós szintje jelentősen eltérő eloszlást mutatott az ACC és a MEC tumorok esetében. Az ACC-mintákon jellemzőbb volt a CLDN2 és -4 fokozott expressziója, míg a MEC esetek a CLDN1 és -7 emelkedett szintjét mutatták. Egyik tendencia sem maradt azonban szignifikáns a többszörös teszt korrekciót követően. ACC-ben a CLDN1 volt az egyetlen olyan marker, amely minden tumorszövetben negatív volt, míg a MEC-ben nem volt olyan marker, amely minden mintában negatív lett volna.

Annak érdekében, hogy részletesebb betekintést nyerjünk, a minták egyszerű, „nem felügyelt” hierarchikus klaszterezését végeztük el a mért expressziós szintek alapján. Az esetek így kapott dendrogramját két csoportra osztottuk, és azt kaptuk, hogy a tüdőrák altípusai a két csoporton belül (néhány kivételtől eltekintve) meglehetősen egységesek, ami arra utal, hogy a CLDN expressziós mintázatai eredendően megkülönböztetik az ACC és a MEC tumorokat (korrigált p-érték = 0,032). Másrészt, a fennmaradó klinikopatológiai paraméterek viszonylag jól keverednek a két csoportban (kiigazított p-értékek: 1,0, 1,0, 1,0, 1,0, 0,468, 1,0, 1,0, 1,0, 1,0, 1,0 a nem, a dohányzás, a grade, a TNM stádium, a vaszkuláris érintettség, a lymphoid infiltráció és a nekrozis tekintetében), ami azt jelzi, hogy a

CLDN expressziós szintek alapján történő elkülönítést befolyásoló fő tényező valóban a tumor altípusa.

A CLDN expresszió szintjei közötti összefüggéseket az alacsony esetszám miatt a tumor altípusától függetlenül a teljes adathalmazon értékeltük. Pozitív korrelációt azonosítottunk a CLDN5 és -2 ($R = 0,55$, korrigált p -érték = $0,02$), a CLDN3 és -4 ($R = 0,57$, korrigált p -érték = $0,02$), valamint a CLDN5 és -18 ($R = 0,53$, korrigált p -érték = $0,04$) expressziós szintjei között. Mindezek az összefüggések szignifikánsak maradtak a többszörös teszt korrekciót követően is.

Tekintettel az FFPE blokkok jól ismert időbeli minőségromlására, a fenti megfigyelt tendenciák validálása érdekében külön-külön újra elemeztük a régebbi és az újabb mintákat. A mintákat "régi" és "új" kohorszokba soroltuk az FFPE-blokkok készítésének éve alapján: a 2009 előtt készített blokkokat "réginek", míg az ezt követően készítetteket "újnak" neveztük. A kategorizálás küszöbértékének az adatállományunkban szereplő FFPE-blokkok készítési éveinek mediánját választottuk.

Általánosságban – ahogyan az várható volt – a CLDN expressziós szintjét tekintve a régi esetek alacsonyabb expressziós szintet mutattak, mint az újak, bár a legtöbb esetben nem jelentős mértékben. Ez alól a tendencia alól a CLDN1 és -4 volt a kivétel, ahol a H-értékek mediánja mindkét mintacsoportban nagyon alacsony volt. (Mediánok és többszörös teszteléssel korrigált Kruskal-Wallis teszt p -értékei a régi vs. új esetekre: 0 vs. 0, $p = 0,76$ (CLDN1), 100 vs. 200, $p = 0,003$ (CLDN2), 20 vs. 50, $p = 0,90$ (CLDN3), 2 vs. 1, $p = 0,95$ (CLDN4), 0 vs. 10, $p = 0,56$ (CLDN5), 140 vs. 150, $p = 0,76$ (CLDN7), 50 vs. 160, $p = 0,11$ (CLDN18)). Ezen általános tendenciák ellenére azonban a fent tárgyalt eredmények az új és a régi minták esetében is érvényesek maradnak, ha külön-külön elemezzük őket, habár néhány esetben kissé

csökkent statisztikai erővel. Ami az ACC és a MEC tumorok expressziós mintázatát illeti, a MEC esetek emelkedett CLDN1 és -7 szintje mind a régi, mind az új mintákban megfigyelhető volt. Az ACC minták mindkét kohorszban igazoltan magasabb CLDN4-szintet mutattak, továbbá a régi mintákon magasabb CLDN2-szint mutatkozott.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. PD-1 és PD-L1 expresszió vizsgálata ritka tüdőtumorkban

- Retrospektív tanulmányunk eredménye alapján kimondható, hogy tüdő eredetű MEC, ACC és TBP esetében ritka a PD-L1 és PD-1 expresszió.
- Tekintettel arra, hogy az egyik MEC mintában nagyon erős PD-L1 immunpozitivitást találtunk mind a TC-ken, mind az IC-ken, további vizsgálatokat tartunk szükségesnek nagyobb betegkohorszon.
- Amennyiben MEC-ben a $\geq 50\%$ PD-L1 TC előfordulása megerősítést nyer, még akkor is, ha csak a betegeknek kis hányadában, akkor a magas PD-L1-expressziójú MEC-et külön alcsoportnak tekinthetjük, külön kezelési opcióval, mint például az immuncheckpoint-gátlók.
- Eredményeink arra utalnak, hogy a primer tüdő nyálkamirigydaganatok heterogének nemcsak a MEC/ACC alcsoportok tekintetében, hanem ezen szövettani altípusokon belül is. Ennek a megfigyelésnek nagyobb esetszámon történő vizsgálata hozzájárulhatna a ritka tüdőrákok személyre szabott terápiájához.

5.2. CLDN expresszió vizsgálata tüdő eredetű ACC-ben és MEC-ben

- Tanulmányunk – mely az első, amelyik tüdő ACC-ben és MEC-ben átfogóan leírja a CLDN expressziós mintázatot – azt igazolta, hogy egyes CLDN-ok túlzott expressziója mind az ACC-ben, mind a MEC-ben megnyithatja az utat az anti-CLDN kezelés előtt ezekben a ritka tüdőrák altípusokban.
- Eredményeink alapján pulmonális ACC és MEC esetében leginkább a CLDN2, -7 és -18 elleni onkoterápiák lehetősége merül fel, de emellett a CLDN3 és -4 overexpresszió is célpontként szolgálhat.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. Gyulai M, Harkó T, Fábián K, Karskó L, Agócs L, Szigeti B, Fillinger J, Szallasi Z, Pipek O, Moldvay J. Claudin expression in pulmonary adenoid cystic carcinoma and mucoepidermoid carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2023. 29:1611328. IF: 2,8
2. Gyulai M, Megyesfalvi Z, Reiniger L, Harko T, Ferencz B, Karsko L, Agocs L, Fillinger J, Dome B, Szallasi Z, Moldvay J. PD-1 and PD-L1 expression in rare lung tumors. *Pathol Oncol Res.* 2023. 29:1611164. IF: 2,8
3. Gyulai, M., Harkó, T., Moldvay, J. Adenoid cystikus carcinoma és mucoepidermoid carcinoma a tüdőben. *Medicina Thoracalis.* 2023. 76.(4.) p.183-189. IF: -

6.2. Egyéb közlemények

1. Reiniger L, Téglási V, Pipek O, Rojkó L, Glasz T, Vágvölgyi A, Kovalszky I, Gyulai M, Lohinai Z, Rásó E, Tímár J, Döme B, Szállási Z, Moldvay J. Tumor necrosis correlates with PD-L1 and PD-1 expression in lung adenocarcinoma. *Acta Oncol.* 2019. 58(8):1087-1094. IF: 3,701
2. Klikovits T, Lohinai Z, Fábián K, Gyulai M, Szilasi M, Varga J, Baranya E, Pipek O, Csabai I, Szállási Z, Tímár J, Hoda MA, Laszlo V, Hegedűs B, Renyi-Vamos F, Klepetko W, Ostoros G, Döme B, Moldvay J. New insights into the impact of primary lung adenocarcinoma location on metastatic sites and sequence: A multicenter cohort study. *Lung Cancer.* 2018. 126. p.139-148. IF: 4,599

3. Fabian, K; Gyulai, M; Furak, J; Varallyay, P; Jackel, M; Bogos, K; Dome, B; Papay, J; Timar, J; Szallasi, Z et al. Significance of Primary Tumor Location and Histology for Brain Metastasis Development and Peritumoral Brain Edema in Lung Cancer. *Oncology*. 2016. 91.(5.) p. 237-242. IF: 2,262
4. Podmaniczky, E; Fábián, K; Pápay, J; Puskás, R; Gyulai, M; Furák, J; Tiszlavicz, L; Losonczy, Gy; Tímár, J; Moldvay, J. Decreased ERCC1 expression after platinum-based neoadjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Pathol Oncol Res*. 2015. 21.(2.) p.423-431. IF:1,94
5. Cserepes M, Ostoros G, Lohinai Z, Raso E, Barbai T, Timar J, Rozsas A, Moldvay J, Kovalszky I, Fabian K, Gyulai M, Ghanim B, Laszlo V, Klikovits T, Hoda MA, Grusch M, Berger W, Klepetko W, Hegedus B, Dome B. Subtype-specific KRAS mutations in advanced lung adenocarcinoma: a retrospective study of patients treated with platinum-based chemotherapy, *Eur J Cancer*. 2014, 50:1819-1828 IF: 5,417
6. Fábián, K; Furák, J; Gyulai, M; Jackel, M; Várallyay, P; Pápay, J; Losonczy, Gy; Moldvay, J. Agyi áttétet adó tüdőrákok klinikopatológiai analízise. *Medicina Thoracalis*. 2013. 66.(3.) p.106-112. IF: -
7. Pápay, J; Sápi, Z; Egri, G; Gyulai, M; Szende, B; Losonczy, G; Tímár, J; Moldvay, J. Platinum-based chemotherapy in lung cancer affects the expression of certain biomarkers including ERCC1. *Pathol Oncol Res*. 2009.15.(3.) p. 445-450. IF: 1,152
8. Gyulai M, Slavei K, Péntes I, Strausz J. Malignus és benignus légúti szűkületek megoldása légúti protézis (stent) beültetéssel. *Orv Hetil*. 2006, 45:2163-2166. IF: -