

Histiocytosisok molekuláris genetikai vizsgálata és klinikuma

Doktori tézisek

Dr. Tóth Béla

Semmelweis Egyetem
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tímár József, DSc., professor emeritus

Hivatalos bírálók:

Dr. Balatoni Tímea, PhD, főorvos

Dr. Tímár Botond, PhD, egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Demeter Judit, DSc, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Szalai Zsuzsanna, PhD, osztályvezető főorvos

Dr. Csóka Monika, PhD, egyetemi docens

Budapest
2021

1. Bevezetés

A histiocytosisokat a mononukleáris fagocitarendszer sejtjeinek és a dendritikus sejteknek (DC) benignus vagy malignus proliferációja és infiltrációja jellemzi. A betegségek ezen heterogén csoportját klinikopatológiai, immunhisztokémiai és ultrastrukturális tulajdonságok alapján lehet differenciálni, prognózisuk jelentősen különbözik. A histiocytosisok osztályozása megváltozott az elmúlt 50 évben. A Histiocytoma Társaság (Histiocyte Society) módosított klasszifikációja ezeket a rendellenességeket öt csoportba sorolja klinikai, fenotípusos, hisztológiai, molekuláris és képalkotó tulajdonságok alapján. Az L-csoport magában foglalja a Langerhans sejtes histiocytosist (Langerhans cell histiocytosis, LCH), indeterminált sejtes histiocytosist (indeterminate cell histiocytosis, ICH), Erdheim-Chester-kórt (Erdheim-Chester disease, ECD) és a kevert LCH/ECD betegséget. A C-csoportba tartoznak a bőrre és/vagy nyálkahártyára lokalizált kórképek, amelyek nem felelnek meg az LCH diagnosztikai kritériumainak. Az M-csoportba tartoznak a primer és szekunder malignus histiocytosisok. Az R-csoport: Rosai-Dorfman-kór

(Rosai-Dorfman disease, RDD) és egyéb nem bőrre lokalizálódó, nem Langerhans-sejtes histiocitosisok. A primer és szekunder haemophagocytás lymphohistiocytosis (HLH) és a makrofág aktivációs szindrómák alkotják a H-csoportot.

A histiocytosisok ritkán előforduló betegségek, a pontos incidencia nem ismert. Az LCH – amely a leggyakoribb histiocytosis – gyakorisága a gyermekek körében becslések szerint 4,6 és 9 eset/millió, míg felnőttek körében ez 1–2 eset/millió.

Etiopatogenezisük nem teljesen tisztázott. Az L-csoportba tartozó betegségek jelentős részében azonosított mitogénaktivált protein-kináz (MAPK) útvonalakat aktiváló klonális expanziót okozó mutációk támogatják azt a feltevést, hogy ezen betegségek neopláziás eredetűek, ezért egyes szerzők ezeket a betegségeket gyulladáshoz vezető myeloid daganatoknak tekintik. Az LCH-ban szenvedő betegek 57%-ában igazoltak *BRAF* V600E mutációt, hasonló arányban (54%) észlelték ezt a mutációt az ECD-ben szenvedő betegeknél is. A második leggyakrabban észlelt MAPK-útvonalat érintő mutáció a *MAP2K1* gént érinti, a *BRAF* V600E mutációt nem

hordozó LCH-léziók 33%-ában igazoltak *MAP2K1*-mutációt. A bőrre lokálizálódó histiocytosisok patogenezise ismeretlen.

A histiocytosisok klinikai megjelenése változatos, a lokalizált betegségtől a több szervet érintő formáig, mely a beteg halálát okozhatja. A bőrre és a nyálkahártyára lokalizált histiocytosisok mellett a bőr érintettségét gyakran észlelik LCH-ban.

A diagnózis a klinikai kép, hisztopatológiai, immunhisztokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatok alapján állítható fel.

A tünetek lokalizációja, kiterjedése, a kezdeti kezelésre adott terápiás válasz lényegesen befolyásolja a betegség kimenetelét. Lokalizált betegség esetén a rendelkezésre álló terápiás lehetőségekkel kiválóan lehet kontrollálni a betegséget, azonban szisztémás betegség esetén gyakori a relapszus, illetve a progresszió a konvencionális terápiák mellett. Számos közlemény jelent meg a célzott terápiák hatékonyságáról olyan betegeknél, akiknél a MAPK-útvonalak aktiválódását igazolták. A tirozin-kináz-inhibitor imatinibet is sikeresen alkalmazták LCH, ECD és RDD egyes eseteiben, habár ezen esetekben a pontos

hastásmechanizmus nem ismert. Az imatinib képes a C-KIT (stem cell factor receptor, SCFR) gátlására, eddig egy esetben igazolták a C-KIT immunhisztokémiai expresszióját RDD miatt kezelt beteg histiocytás infiltrációjában, és imatinib kezelés mellett gyors javulást tapasztaltak. Histiocytosisokban a *C-KIT* gént érintő mutációt ismereteink szerint nem igazoltak.

2. Célkitűzések

Kísérleteink során a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán korábban diagnosztizált, L-csoportba tartozó vad típusú *BRAF* (*BRAF*-wild type, *BRAF*-wt) histiocytosisokban (LCH, ICH) szenvedő betegek ex vivo bőrmintáin végeztünk molekuláris biológiai vizsgálatokat *C-KIT*-, *MAP2K1*- és *NRAS*-mutációk kimutatása céljából. A mutációk észlelése ezen betegségek hátterének neopláziás eredetét támogatja, terápiás jelentőséggel bír, továbbá a bőrtünetek molekuláris biológiai vizsgálatának lehetősége egyszerűbb mintavételt tesz lehetővé, mely a betegek számára kevésbé megterhelő. További célkitűzésünk volt

a gyermekek körében ritkán előforduló ICH esetében a thalidomide kezelés hatékonyságának felmérése.

3. Módszerek

Munkánk során a histiocytosisok L-csoportjába tartozó hat felnőtt és két gyermek páciens (LCH: hét beteg, ICH: egy beteg) formalinban fixált, paraffinba ágyazott bőrmintáit vizsgáltuk. Az összes mintát a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikájának szövettani archívumából gyűjtöttük. Az összes beteget a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán diagnosztizálták és/vagy kezelték 2003 és 2015 között. A következő beválasztási kritériumokat alkalmaztuk: (1) a szövetmintákban a tumorsejtek aránya $>10\%$ és (2) Sanger-szekvenálással a tumor *BRAF*-wt. A vizsgálatokhoz szükséges etikai engedéllyel rendelkezünk (SE RKEB 146/2018). A histiocytosis diagnózisa a hematoxilin-eozinnal (H&E) festett metszetek és az elektronmikroszkópia szövettani értékelésén, valamint az S100-, CD1a-, CD68- és CD207-expressziójának immunhisztokémiai módszerrel történő

értékelésén alapult. Az összes mintát két független patológus vizsgálta a Histiocyta Társaság módosított osztályozása szerint.

BRAF-, *MAP2K1*-, *C-KIT*- és *NRAS*-mutációk analízise: a deparaffinizációt követően a tumorsejtekben gazdag régiók kiválasztása makrodisszekcióval történt. A DNS-mintákat High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Németország) alkalmazásával izoláltuk, a protokoll szerint (20. verzió). Az *NRAS* gén 3-as exonját, a *BRAF* gén 15-ös exonját, a *MAPK2K1* gén 2-es és 3-as exonjait, valamint a *C-KIT* gén 9-es, 11-es, 13-as, 17-es és 18-as exonjait PCR-rel amplifikáltuk. A mutációanalízis a PCR-termékek tisztított PCR-fragmensein Sanger-szekvenálással történt.

4. Eredmények

***BRAF*-mutáció:** Minden betegünk *BRAF*-vizsgálata vad típust igazolt.

***MAP2K1*-mutáció:** A hét *BRAF*-wt LCH páciens közül háromnál észleltünk *MAP2K1*-mutációt (3/7, 42,9%). Figyelemre méltó, hogy az ICH miatt kezelt betegünk is

MAP2K1-mutációt hordozott. A négy *MAP2K1*-mutációt hordozó betegünk közül kettőben *MAP2K1* egy nukleotidot érintő variációt (single-nucleotide variant, SNV) is kimutattunk.

***C-KIT*-mutáció:** A hétből négy *BRAF*-wt LCH mintában mutattunk ki *C-KIT*-mutációt (57,1%), és az ICH minta szintén pozitív volt a *C-KIT*-mutáció szempontjából. Hét *C-KIT*-mutációt találtunk az öt L-csoportba tartozó histiocytosis miatt kezelt beteg esetében. A mutációkat a 9. (2/7, 28,6%), a 11. (2/7, 28,6%), 13. (1/7, 14,3%) és a 18. (2./7, 28,3%) exonokban mutattuk ki. Egy mutációt leszámítva, amely nonszensz mutáció volt, minden mutáció missense mutáció volt. Két LCH-s betegben (1. és 5. beteg) két *C-KIT*-exon párhuzamosan volt érintett: a 9., 18. és a 11., 13. exonok. A *C-KIT*-SNV-k gyakorisága szintén gyakori volt a *BRAF*-wt LCH-k között (4/7, 57,1%). Érdekes, hogy a *C-KIT*-SNV-k közül négyből kettőt *C-KIT*-mutációval együtt észleltük LCH-ban. Figyelemre méltó, hogy az LCH-ban található egyik *C-KIT*-SNV (11. exon K558K) csendes irányító (silent driver) mutáció (COSM1243).

NRAS-mutáció: Az összes minta *NRAS*-státusza vad típusú volt.

Kezelés, kórlefordítás: MS-LCH, RO⁺ gyermekbetegünknel (6. beteg) csak *MAP2K1*-mutációt igazoltunk, a kombinált citosztatikus terápia ellenére több alkalommal észleletek relapszust, a másik csak *MAP2K1*-mutációt hordozó betegünknel (7. beteg), csak bőrérzékenység volt (SS-LCH), mely tünetek lokális kortikoszteroid kezelés mellett javultak. A *C-KIT*-mutáns csoportban az endokrin érintettségű MS-LCH, RO⁻ betegnel (5. beteg) thalidomide kezelés mellett részleges regressziót észleltünk. Ebben a csoportban a csak bőrre lokalizálódó SS-LCH miatt kezelt betegek (1. és 4. beteg) bőrelváltozásai figyelemre méltó javulást mutattak a lokális kortikoszteroidok és az irradiáció alkalmazását követően. A *MAP2K1*- és *C-KIT*-mutációkat egyaránt hordozó MS-LCH, RO⁻ beteg (3. beteg) jelentős javulást mutatott a tüdőátültetés és a thalidomide kezelés után. *MAP2K1*- és *C-KIT*-mutációt egyaránt hordozó másik gyermekbetegünket (8. beteg) thalidomide-dal kezeltük, mely mellett jelentős javulás volt tapasztalható. A második endokrin érintettségű MS-LCH, RO⁻ páciens (2.

beteg) negatív volt az összes vizsgált mutáció szempontjából, és sikeresen kezeltük thalidomide-dal.

5. Következtetések

Az alábbi pontokban foglalom össze a munkám eredményeiből levont következtetéseket:

1. Adataink azt mutatják, hogy a *BRAF*-wt LCH betegek gyakran hordoznak szomatikus *C-KIT*-mutációkat (57,1%), mely eredmények azt sugallják, hogy az LCH a *C-KIT*-mutáns tumorok csoportjába tartozhat.
2. Patogén *C-KIT*-mutációk kimutatása esetén a C-KIT-inhibitoroknak terápiás jelentősége is lehet, habár az általunk kimutatott mutációk eltérnek az imatinibre érzékeny *C-KIT*-mutáns tumorok klasszikus hotspot mutációitól.
3. Az irodalmi adatoknak megfelelő arányban észleletünk *MAP2K1*-mutációkat (42,9%), ráadásul a *C-KIT*- és a *MAP2K1*-mutációk nem voltak egymást kölcsönösen kizáró mutációk, így jövőbeni új terápiás lehetőségként felmerülhet a C-KIT és a MEK kettős gátlása.

4. A *C-KIT*- és *MAP2K1*-mutációt szintén együtt észleltük az ICH miatt kezelt betegünkénél. Ismeretink szerint a kevesebb mint 100 közölt esetből egy betegnél észleletek *BRAF* mutációt, 3 betegnél pedig *ETV3-NCOA2* transzlokációt. Az általunk kimutatott két új mutáció ICH-ban – a fenti eredmények mellett – szintén támogatja a klonális eredetet.
5. Az ICH esetén észlelt *C-KIT*- és *MAP2K1*-mutációk ennél a betegségnél is felvetik a *C-KIT*- és/vagy *MEK*-gátlók terápiás lehetőségét, különösen malignitással társult esetekben.
6. A thalidomide terápiás opció lehet egyéb terápiára rezisztens generalizált ICH esetén gyermekeknél is.
7. A bőrléziók molekuláris biológiai vizsgálata a betegek számára kevésbé megterhelő, mivel egyszerűbb mintavételt tesz lehetővé.

6. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

Tóth Béla, Kiss Norbert, Hársing Judit, Kárpáti Sarolta, Csomor Judit, Bödör Csaba, Tímár József, Rásó Erzsébet. Frequent KIT mutations in skin lesions of patients with BRAF wild-type Langerhans cell histiocytosis. **VIRCHOWS ARCHIV** 477: 5 pp. 749-753. (2020) **IF: 4,064**

Toth B, Katona M, Harsing J, Szepesi A, Karpati S. Indeterminate Cell Histiocytosis in a Pediatric Patient: Successful Treatment with Thalidomide. **PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH** 18: 2 pp. 535-538. (2012) **IF: 1,555**

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – közlemények:

Áy Éva, Müller Viktor, Mezei Mária, PocsKay Ágnes, Koroknai Anita, Müller Dalma, Győri Zoltán, Marschalkó Márta, **Tóth Béla**, Kárpáti Sarolta, Lakatos Botond, Szlávik János, Takács Mária, Minárovits János.

Transmitted drug resistance in newly diagnosed and treatment-naïve HIV type 1-infected patients in Hungary. **JOURNAL OF GLOBAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE** 20 pp. 124-130. (2020). **IF: 4,035**

Imrédi E, Liskay G, Kenessey I, Plotár V, Gödény M, **Tóth B**, Fedorcsák I, Tímár József. Aquaporin-1 Protein Expression of the Primary Tumor May Predict Cerebral Progression of Cutaneous Melanoma. **PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH** 26: 1 pp. 405-410. (2020) **IF: 3,201**

Kiszner Gergo, Balla Peter, Wichmann Barna, Barna Gabor, Baghy Kornelia, Nemeth Istvan Balazs, Varga Erika, Furi Istvan, **Toth Bela**, Krenacs Tibor. Exploring Differential Connexin Expression across Melanocytic Tumor Progression Involving the Tumor Microenvironment. **CANCERS** 11: 2 Paper: 165, 21 p. (2019) **IF: 6,126**

Fábián Melinda, Balogh Petra, Hársing Judit, Somlai Beáta, Kuzmanovszki Daniella, Holló Péter, Kostic Szilárd, Patyányik Mihály, Kárpáti Sarolta, **Tóth Béla**. Graviditás alatt diagnosztizált melanoma esete.

**BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI
SZEMLE** 94: 3 pp. 149-154.(2018)

Kuzmanovszki D, Varga A, **Tóth B**, Szakonyi J, Hársing J, Wikonkál N, Holló P. Az immunterápia aktualitásai a metasztatikus melanoma kezelésében.

**BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI
SZEMLE** 93: 4 pp. 155-159. (2017)

Németh Orsolya, Farkas Katalin, Tóth Éva, **Tóth Béla**, Nagy Zoltán Zsolt, Resch Miklós Melanoma malignum szisztémás MEK-inhibitor kezelésének szemészeti mellékhatása. **SZEMÉSZET** 154: 3 pp. 148-153. (2017)

Imredi E, **Toth B**, Doma V, Barbai T, Raso E, Kenessey I, Timar J. Aquaporin 1 protein expression is associated with BRAF V600 mutation and adverse prognosis in cutaneous melanoma. **MELANOMA RESEARCH** 26: 3 pp. 254-260. (2016) **IF: 2,615**

Bánvölgyi A, Balla E, Bognár P, **Tóth B**, Ostorházi E, Bánhegyi D, Kárpáti S, Marschalkó M Lymphogranuloma venereum: első hazai esetek [Lymphogranuloma venereum: the first Hungarian cases]. **ORVOSI HETILAP** 156: 1 pp. 36-40. (2015) **IF: 0,291**

Fabian M, Toth V, Somlai B, Harsing J, Kuroli E, Rencz F, Kuzmanovszki D, Szakonyi J, **Toth B**, Karpati S. Retrospective Analysis of Clinicopathological Characteristics of Pregnancy Associated Melanoma. **PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH** 21: 4 pp. 1265-1271. (2015) **IF: 1,940**

Kuzmanovszki D, **Tóth B**, Szakonyi J, Hársing J, Kuroli E, Kárpáti S, Holló P. Kezdeti tapasztalatok dabrafenib kezeléssel előrehaladott melanomában
BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI SZEMLE 91: 1 pp. 57-61. (2015)

Nemes-Nikodém E, Brunner A, **Tóth B**, Tóth V, Bánvölgyi A, Ostorházi E. Neisseria gonorrhoeae törzsek rezisztenciaadatai Magyarországon [Antimicrobial resistance of Neisseria gonorrhoeae strains in Hungary]. **ORVOSI HETILAP** 156: 6 pp. 226-229. (2015) **IF: 0,291**

Tóth B, Hársing J, Marschalkó M, Kárpáti S. Porokeratosis ptychotropica (verrucosus porokeratosis). **BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI SZEMLE** 91: 1 pp. 45-47. (2015)

Tóth B, Sági Z, Bánhegyi D, Marschalkó M, Kárpáti S. Anális citológia [Anal cytology]. **ORVOSI HETILAP** 156: 1 pp. 24-27. (2015) **IF: 0,291**

Wikonkál N, Nagy P, **Tóth B**, Marschalkó M, Tislér A, Kárpáti S. Veseérintettség syphilises fertőzésben: esetismertetés és a szakirodalom áttekintése [Syphilitic glomerulonephritis: case report and review of the literature]. **ORVOSI HETILAP** 156: 1 pp. 32-35. (2015) **IF: 0,291**

Farkas B, Ostorhazi E, Ponyai K, **Toth B**, Adlan E, Parducz L, Marschalko M, Karpáti S, Rozgonyi F. Az *Ureaplasma urealyticum* és a *Mycoplasma hominis* antibiotikum-érzékenysége és gyakorisága szexuálisan aktív egyének genitális mintáiban [Frequency and antibiotic resistance of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in genital samples of sexually active individuals]. **ORVOSI HETILAP** 152: 42 pp. 1698-1702. (2011)

Tóth B, Ottó IÁ, Kárpáti S. STD és terhesség. **MAGYAR CSALÁDORVOSOK LAPJA** 2011: 3 pp. 12-15. (2011)

Toth V, Hornyak C, Kovacs T, **Toth B**, Varallyay G, Ostorhazi E, Koles J, Bereczki D, Marschalko M, Karpati S. Meningovascularis neurosyphilis miatti fiatal kori ischaemiás cerebrovascularis betegség [Meningovascular neurosyphilis as the cause of ischemic cerebrovascular disease in a young man]. **ORVOSI HETILAP** 152: 19 pp. 763-767. (2011)

Komlosi V, Hitre E, Pap E, Adleff V, Reti A, Szekely E, Biro A, Rudnai P, Schoket B, Muller J, **Tóth B**, Ottó Sz, Kásler M, Kralovánszky J, Budai B. SHMT1 1420 and MTHFR 677 variants are associated with rectal but not colon cancer. **BMC CANCER** 10 Paper: 525, 10 p. (2010)
IF: 3,153

Tóth B, Várkonyi V, Hársing J, Désaknai M, Tóth V, Kelemen Zs, Járay B, Kárpáti S. Morbus queyrat. **STD ÉS GENITÁLIS INFEKTOLÓGIA** 2: 4 pp. 174-177. (2008)