

**Klinikai és kísérletes, molekuláris és multimodalitású képkeltő  
vizsgálatok B sejtes malignus lymphomában**

Doktori (Ph.D.) – értekezés

**Dr. Ritter Zsombor**

University of Pécs, Clinical Centre, Department of Medical Imaging



Doktori Iskola Vezetője: Prof. Dr. Bódis József

Programvezető: Prof. Dr. Kiss István

Témavezetők:

Prof. Dr. Zámbó Katalin

Dr. Alizadeh Hussain

Pécsi Tudományegyetem

Egészségtudományi Kar

Egészségtudományi Doktori Kar

Pécs, 2022

# 1 Bevezetés – A lymphomák diagnosztikája

A vérképzőszervi rosszindulatú daganatok különböző korcsoportokban fordulhatnak elő. A non-Hodgkin limfóma (NHL) világszerte a leggyakoribb hematológiai rosszindulatú daganat típus, amely a malignus megbetegedések és halálesetek közel 3%-át teszi ki. A daganatok változatos csoportját alkotják és a nyugati féltekén mintegy 80%-uk B-sejtes eredetű a nyugati féltekén. Felnőttekben a leggyakoribb szövettani altípus a diffúz nagy B-sejtes limfóma (DLBCL), amely az évente diagnosztizált NHL-ák mintegy 30-40%-át alkotja. A megbetegedések mintegy fele a 60 év feletiekben fordul elő.

A diffúz nagy B-sejtes limfómák a lymphoproliferatív neoplazmák különösen heterogén csoportját alkotják, eltérő biológiával, klinikai megjelenéssel és kezelésre adott válasszal. A hatékony kezelési stratégia érdekében fontos, hogy megértsük heterogén fenotípusukat.

A Rituximab több mint 1 évtizeddel ezelőtti bevezetése óta a DLBCL-ben szenvedő betegek életkilátásai és gyógyulási hajlama jelentősen javult, azonban azóta a gyógyulási arányok érdemben változatlanok. A DLBCL-es betegek kb. 40%-ánál alakul ki relapszus vagy refrakter betegség. A legtöbb beteg ebben a helyzetben a további kezelések ellenére is progrediál, ami arra utal, hogy a legnagyobb javulást és hatást az első vonalbeli terápiával lehet elérni. Összefoglalva a DLBCL potenciónalisán az esetek körülbelül 60%-ában gyógyítható meg a standard kezeléssel. A standard kezelés Rituximabot, ciklofoszfamidot, doxorubicin-hidrokloridot (hydroxydaunorubicin), vinkrisztin-szulfátot (Oncovin) és prednizont (R-CHOP) tartalmaz. A betegek mintegy 25-30%-a rezisztens a standard kemo-immunterápiára, ezért náluk más terápiás megközelítést alkalmaznak, a betegek 20%-át salvage terápiával kezelik, beleértve a nagy dózisú kemoterápiát és az autológ őssejt-transzplantációt.

A molekuláris genetika fejlődése nagyban hozzájárult a DLBCL biológiájának a mélyebb megértéséhez, és megnyitotta az utat a betegség kimenetelének javítását célzó személyre szabott terápiák előtt. A DLBCL genetikai térképének és molekuláris jellemzőinek megértésében elért előrelépések azonosítottak kemo-immunterápiára rosszul reagáló magas kockázatú csoportokat. Így egyre nagyobb klinikai igény van arra, hogy ezeket a nagy kockázatú betegeket minél korábban megtalálják, hogy megvalósulhasson egy hatékonyabb, célzott, egyénre szabott terápia, mivel a refrakter vagy relapszusos betegek többsége végül belehal a betegségbe.

## 1.1 Az FDG-PET/CT-ből származó, radiomikai módszerekkel nyert képi paraméterek jelentősége a túlélés előrejelzésében

A DLBCL-es betegek mintegy 25-30%-a rezisztens a jelenlegi első vonalbeli, Rituximab-alapú kemo-immunterápiával történő kezelésre, ezért a nem reagáló, nagy kockázatú csoport mielőbbi beazonosítása rendkívüli jelentőséggel bír.

A fent említett, magas kockázatú betegek kiválasztásához használható módszer lehet a szövettani kiértékelés mellett a kezelés előtti FDG-PET/CT (2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glükóz-pozitron emissziós tomográfia/computer tomográfia) vizsgálat során nyert konvencionális és texturális paraméterek elemzése. A klinikai vizsgálatokban egyre gyakrabban alkalmaznak olyan vizsgáló módszereket, melyek segítségével a személyre szabott terápia megvalósítható, és így a kezelésre adott válasz is jelentősen javulni tud. A daganatos betegségek képalkotását vizsgáló kutatások aktívan foglalkoznak a radiomikai adatokkal és a gépi tanulás alkalmazásával.

A radiomika fejlett matematikai elemzéssel történő, nagyszámú kvantitatív jellemző kinyerését jelenti az orvosi képekből. A jól definiálható, reprodukálható képi biomarkerek segítségével lehetőség nyílik a tumoros régiók pontosabb, részletesebb jellemzésére, és olyan adatokhoz juthatunk, amelyek az emberi szem számára láthatatlanok, felismerhetetlenek.

Azonban a korábbi kutatások alapján ismert, hogy a radiomikai adatok érzékenyen befolyásolhatók olyan tényezőkkel mint például a felvételi protokollok különbözősége, a választott képszegmentáció, a binning, a felbontási különbségek, valamint az adott számítási módszerek esetleges különbözősége. Ezek mind nehezebbé teszik a tanulmányok reprodukálhatóságát. Az olyan szabványosítási javaslatok, mint az Imaging Biomarker Standardization Initiative (IBSI) nagyban segítik a kutatások megismételhető módon történő elvégzését és az egységes nomenklatura használatát.

## 1.2 Preklinikai vizsgálatok 1: középpontban a Cerenkov-lumineszcencia képalkotás (CLI)

A közelmúltban elért eredmények alapján nemcsak a limfómák szövettani diagnosztikája és az in vivo képalkotó módszerek fejlődtek, hanem ezekkel összefüggésben jelentős fejlődés figyelhető meg az in situ, in vitro képalkotáson alapuló képalkotó diagnosztikai eszközök esetében is. Ezeknek a feltörekvő diagnosztikus eszközöknek az alkalmazása segíthet a különböző DLBCL csoportok korai időszakban történő differenciálásában. Így a beazonosított

alcsoporthoz alapján könnyebben megvalósulhat a gyors és személyre szabott immun- vagy kemoterápia.

A betegség diagnosztikája során, a definitív terápiák megkezdése előtt csaknem minden esetben nélkülözhetetlen lépés az érintett nyirokcsomók biopsziája és legalább egy, hozzáférhető, tumoros részének részletes szövettani vizsgálata.

Az érintett nyirokcsomók lokalizálásához, majd az ezt követő mintavételezés során a terápiás irányok meghatározásához előnyös lehet a jelenleg kötelezően alkalmazott, terápia előtti FDG-PET/CT vizsgálat vagy ma már ritka esetben a <sup>67</sup>Ga-citrát szcintigráfias felvételek felhasználása. Például az FDG-PET/CT-vizsgálatot követően az inhomogén daganatos szövetek, nyirokcsomók azonosítása, eltávolítása és további elemzése az alkalmazott fluor-18 izotóp Cerenkov-fénykibocsátásának a felhasználásával pontosabb molekuláris biológiai kiértékelést hozhat magával, ami hatékonyabb terápiás protokoll kiválasztásához is vezethet.

Ebben az irányban gondolkodva a munkacsoportunk korábban is alkalmazta a Bc.DLFL1 tumormodellt, amely egy BALB/c egerekből izolált spontán magas grádusú limfóma, és amely intraperitoneális injekcióval reprodukálhatóan transzplantálható szingén recipiensekbe. Ez a lymphoma a hasba injektálva peritoneálisan tapad meg, majd a nyirokutakon keresztüli terjedés során preferenciális szöveti eloszlást mutat a mesenterialis nyirokcsomókban és a lépben. Ez a jól ismert limfóma modell kiválóan alkalmas preklinikai kutatásokhoz, beleértve az új képalkotó technikák kipróbálását is. Általánosságban elmondható, hogy a sejtekkel való beoltást követően kb. 21 nappal az állatok minden esetben elpusztulnak, az állatok 90%-a 11 és 14 nap között exitál. A korábbi kísérletek alapján az állatok a limfóma sejtek beadását követő 4. nap előtt korai stádiumban vannak, a 7. naptól előrehaladott stádiumban, a 11. naptól pedig végstádiumban.

Munkánk ezen részének alapvető célja az volt, hogy felmérjük a Bc.DLFL1 limfóma esetében a stádium meghatározásának lehetőségeit a disszemináció nyomon követésével, amit in vivo PET és SPECT (Single photon emission computed tomography) képalkotással, valamint ex vivo nagy felbontású Cerenkov-lumineszcencia képalkotással (CLI) terveztünk megvalósítani.

A CLI mint fejlett, újszerű képalkotó modalitás jelentős transzlációs potenciállal rendelkezik. Ez egy optikai képalkotó módszer, amely a Cerenkov-fotonok emisszióján alapul. A Cerenkov-fotonok töltött részecskék, például elektronok és pozitronok mozgása által keletkezhetnek. Akkor jönnek létre, amikor a részecskék sebessége nagyobb, mint a fény sebessége egy közegben (például vízben vagy a szövetekben). Minden új CLI-alkalmazást nagy figyelem övez

a diagnosztikai kutatásokban, különösen azok, amelyek klinikailag engedélyezett és forgalmazott radioaktív gyógyszereket vagy izotópokat használnak. Az egyik ilyen potenciálisan használható radiofarmakon lehet a  $^{67}\text{Ga}$ , melynek CLI-hez való alkalmazhatóságát korábban még nem tesztelték. Az elméleti számítások azt mutatják, hogy a  $^{67}\text{Ga}$  izotóp bomlása során kibocsátott nagyenergiájú gamma-fotonok másodlagos elektronokat eredményezhetnek, amelyek vízben vagy víztartalmú szövetekben Cerenkov-lumineszcenciát eredményeznek.

### 1.3 Preklinikai vizsgálatok 2: a tumor terjedésének vizsgálata korai és előrehaladott stádiumban

A Bc.DLFL1 intraperitoneális beadását követően a limfómasejtek az omentum és a mesenterium limfocitákban gazdag régióiban kötődnek meg, majd a mesenterialis nyirokcsomók felé terjednek.

A hashártya-metasztázisok korai stádiumban történő felismerése a hasüregben terjedő betegségek hatékony terápiájának kulcsfontosságú eleme lehet. Egy korábbi peritoneális tumor terjedést vizsgáló tanulmány kimutatta, hogy hasúrben terjedő tumorok jelenléte esetén az FDG felvételében a neoplasztikus sejteknek van a legnagyobb szerepe.

Úgy gondoltuk, hogy a korábban jól leírt egérmodellünk optimális lehet a peritoneális terjedés transzlációs diagnosztikai lehetőségeivel foglalkozó preklinikai vizsgálatához. Ezért ebben a vizsgálati pontban célunk volt a Bc.DLFL1. limfóma korai terjedésének és előrehaladott stádiumban való kimutathatóságának az összehasonlítása, melyet in vivo FDG-PET, FDG-PET/MRI, valamint ex vivo autoradiográfia és CLI segítségével tettünk meg. E képalkotó technikák eredményeit immunhisztokémiai szövetelemzéssel korreláltattuk.

## 2 Célok

Doktori munkám során olyan képalkotó módszereket alkalmaztam, amelyek igazoltan hasznosak a diagnózis felállításában és a limfómás betegek terápiára adott válaszának értékelésében. A disszertáció egy klinikai és egy preklinikai részre osztható. A szakirodalom alapján a PET-képekből származó radiomikai adatok hozzájárulhatnak a tumor részletgazdagabb in vivo jellemzéséhez, és így segíthetnek az egyénre szabott tumorkezelésben. A dolgozatot egy kapcsolódó klinikai hipotézis felvázolásával kezdem. A klinikai kezelés során előfordulhat, hogy a nem megfelelő biopszia, szövettani mintavétel miatt késik a diagnózis. Az első preklinikai vizsgálatban egy új és pontos egérmodell (spontán limfóma) segítségével vizsgáltam egy képalkotás-által szigorúan irányított mintavételi módszert. A limfómasejtek terjedési mechanizmusai és útvonalai még mindig tisztázatlanok. Céлом volt a daganat terjedésének és heterogenitásának a jellemzése mind a preklinikai vizsgálatok első, mind a második részében. Tehát a klinikai és preklinikai kutatásaink során felmerülő új diagnosztikai lehetőségeket mutatom be a publikált közleményeink alapján.

1. Az első, klinikai részben a diffúz nagy B-sejtes limfóma (DLBCL) molekuláris képalkotó diagnosztikájával foglalkozom. DLBCL-ben a jól bevált terápiás protokollok ellenére a betegek 25-30%-a rezisztens a standard kemoimmunterápiával szemben, többnyire a betegség heterogén eredete miatt. A magas kockázatú betegek azonosításához automatizált gépi tanulást alkalmazva vizsgáltam a kiindulási FDG-PET/CT vizsgálatból származó in vivo radiomikai adatok és a klinikai paraméterek prognosztikai jelentőségét.
2. Az első preklinikai részben először az újszerű Cerenkov lumineszcencia képalkotást vizsgáltam, amely ígéretes megközelítés a képvezérelt sebészet és patológiai mintavétel terén. A teljes test izotópos tomográfiájával kombinálva további előnyökkel járhat. Céлом volt, hogy bizonyítékot szerezzek a módszer limfóma patodiagnosztikában való alkalmazhatóságáról, ezért egy új, kísérleti, spontán, magas agresszivitású B-sejtes limfóma egérmodellben (Bc.DLFL1) vizsgáltam a kombinált PET/CLI vagy SPECT/CLI diagnosztikai potenciálját.
3. A második preklinikai részben különböző képalkotó módszerek segítségével követtem a betegség korai stádiumú terjedését Bc.DLFL1 limfóma egérmodellben. Vizsgálataink során arra törekedtem, hogy megerősítsem a lokális FDG beadás jelentőségét a

diagnosztikai képalkotás során, a korai peritoneális manifesztációk pontos felismerésére és a tumorsejt terjedési mechanizmusának megértésére.

## 2.1 A dolgozatom fő célkitűzései

1. Kétéves eseménymentes túlélést előrejelző modell felépítése DLBCL-ben szenvedő betegek kezelés előtti FDG-PET/CT vizsgálatából származó radiomikai adatok segítségével
2. PET/SPECT és CLI képalkotást kombináló új módszer kifejlesztése egérmodellben, amely lehetővé teszi a legfontosabb érintett nyirokcsomó és/vagy az érintett nyirokcsomó legfontosabb részének irányított kivételét és feldolgozását.
3. A legoptimálisabb nukleáris medicina technika kiválasztása a lymphoma peritoneális terjedésének korai kimutatására egérmodell segítségével



## 3 Anyagok és módszerek:

### 3.1 Klinikai rész

A humán vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem kutatási etikai bizottsága és az Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet a következő engedélyek alapján felülvizsgálta és jóváhagyta: 6536 - Pécsi Tudományegyetem 2017 és OGYÉI/50268-8/2017. A nemzeti jogszabályoknak és az intézményi előírásoknak megfelelően a vizsgálatban való részvételhez nem volt szükség írásbeli tájékoztatáson alapuló beleegyezéshez.

A kezelés előtti [18F]FDG-PET/CT felvételeket 85 DLBCL-val diagnosztizált betegnél értékeltük újra. A felvételek két klinikai központban készültek. A követés során a 2 éves eseménymentes túlélést választottuk klinikailag releváns határértéknek. A betegeket két csoportba soroltuk. A 0. csoportban lévő betegeknél a 2 éves követési idő alatt nem történt esemény, az 1. csoportban lévő betegeknél a 2 éves időszak alatt relapszus történt, vagy eleve kemoreszisztensek voltak a standard terápiára. Az egyes betegeknél a lymphomás léziók kiszegmentálását követően kiválasztott tumoros régiókból az alkalmazott szoftver a jellemzőket hisztogramelemzéssel és textúra alapú módszerekkel számította ki. A hagyományos PET-paramétereket és a további in vivo radiomikai adatokat így megkaptuk. A fontosabb klinikai adatokat is összefoglaltuk. Az adatokból két éves eseménymentes túlélést előrejelző modellt hoztunk létre az egyik klinikai központ adatainak a felhasználásával (Center 1), majd a másik klinikai központ adathalmazát (Center 2) az első központ adathalmazára alapján felépített prediktív modell kereszt-hitelesítésére használtuk. A validálási esetekre vonatkozóan a program kiszámította a szenzitivitást, a specificitást, a pozitív prediktív értéket, a pontosságot és a görbe alatti területet (AUC, area under the curve).

### 3.2 Preklinikai vizsgálatok 1

A vizsgálatot a Pécsi Tudományegyetem helyi Etikai Bizottsága jóváhagyta. Továbbá, minden élő állatokkal végzett eljárás a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Főosztályának engedélyével, a következő engedélyszám alatt történt: BA02/2000-16/2015. Az itt közölt valamennyi vizsgálatot a Magyarországon hatályos állatjóléti és egyéb vonatkozó tárgyú szabályoknak megfelelően végeztük. A vizsgálatot az ARRIVE irányelveknek megfelelően terveztük és végeztük.

### 3.2.1 A Bc.DLFL1 limfóma terjedésének kísérleti állatmodellje

A Pécsi Tudományegyetem Immunológiai és Biotechnológiai Intézetének SPF Állattenyésztési Egységében tenyésztett, 8-12 hetes BALB/c egereket használtunk limfóma-receptorokként. Az egerek a leválasztást követően az Immunológiai és Biotechnológiai Tanszék hagyományos állattartó létesítményébe kerültek. A Bc.DLFL1 limfóma sejteket sorozatos intraperitoneális passzázs formájában tartottuk fenn. Az egerekbe minden esetben intraperitoneálisan injektáltunk kb.  $10^6$  Bc.DLFL1 limfoma sejtet.

### 3.2.2 Az állatok csoportosítása és száma tumorstádium szerint

Mind az FDG-PET, mind a  $^{67}\text{Ga}$ -citrát SPECT/MRI kísérletekben az állatokat a következő stádiumokra bontottuk: korai stádium (a limfóma sejtek beoltása után 4 nappal történő képalkotás), előrehaladott stádium (a beoltás után 8 és 9 nappal történő képalkotás) és végstádium (a beoltás után 11 és 12 nappal történő képalkotás). (A lymphoma inokulációt követően összesen hat csoportot hoztunk létre, csoportonként hat egérrel  $n=36$ ). A különböző stádiumú csoportokban radiológyszerként  $n=6$  állat volt. A végstádiumú állatok közül (11 nappal az inokulációt követően) elhalálozás következtében az FDG-PET csoportból öt állat volt alkalmas a kombinált in vivo tomográfiás - ex vivo CLI képalkotásra, és egy állat volt alkalmas a  $^{67}\text{Ga}$ -citrát SPECT/MRI képalkotásra.

A limfóma disszeminációját a korai stádiumban, valamint a klinikailag releváns stádiumokban, így az előrehaladott stádiumban és a terminális stádiumban is in vivo FDG pozitronemissziós tomográfiával (PET)/mágneses rezonancia képalkotással (MRI) és  $^{67}\text{Ga}$ -citrát egyfotonemissziós komputertomográfiával (SPECT)/MRI-vel követtük nyomon. Az in vivo képalkotást ex vivo nagy felbontású CLI-vel kombináltuk. Teszteltük a  $^{18}\text{F}$ -fluorin (F-18) és  $^{67}\text{Ga}$ -gallium izotópokkal végzett CLI alkalmazhatóságát az infiltrált nyirokcsomók kiválasztásához a tumor stadium meghatározásához és a patológiai kiértékeléshez.

## 3.3 Preklinikai vizsgálatok 2

Az egereket egy korai stádiumú csoportba soroltuk, ahol a képalkotást a limfóma sejtek inokulációja után egy nappal végeztük ( $n=18$  egér), és egy előrehaladott stádiumú csoportba, ahol a képalkotást  $n=3$  egérenél 7 nappal a sejtek beoltása után végeztük.

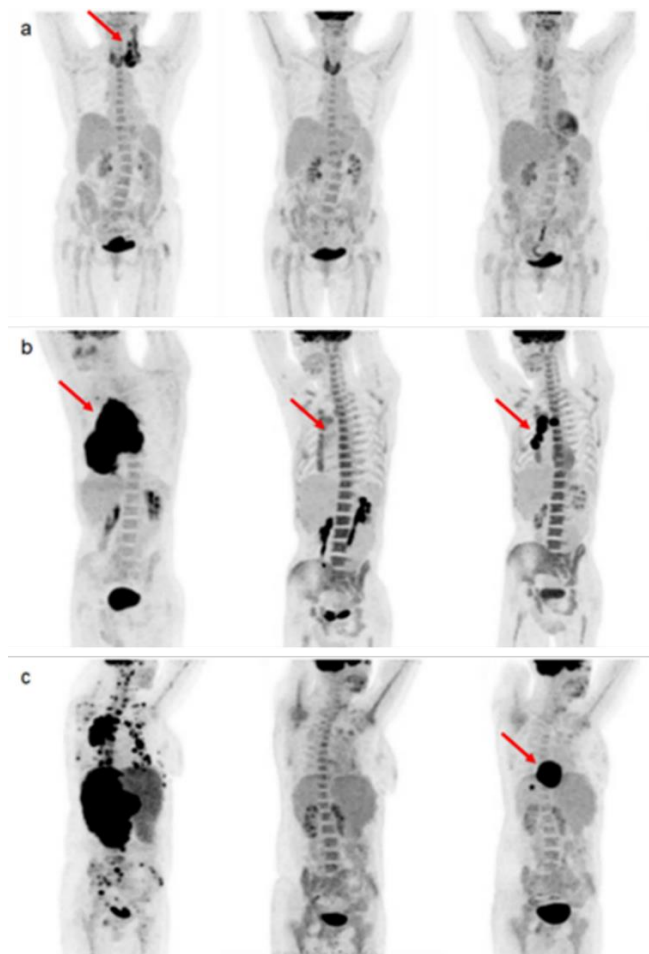
A korai stádiumú csoportban kilenc állat kapott intraperitoneális FDG-injekciót, és ugyanígy kilenc egér kapott FDG-t intravénás úton, az oldalsó farokvénába. Az előrehaladott stádiumú csoport kizárólag intravénás FDG-injekciót kapott.

In vivo [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET és [ $^{18}\text{F}$ ]PET/MRI, valamint ex vivo autoradiográfia és Cerenkov-lumineszcencia képalkotó (CLI) vizsgálatokat végeztünk. FITC (fluoreszcein-5-izotiocianát) molekulák száloptikás konfokális endomikroszkópos képalkotását és immunhisztokémiát is végeztünk.

## 4 EREDMÉNYEK

### 4.1.1 Betegadatok

A standard kemo-immuno terápia végén 55/85 betegnél teljes metabolikus remisszió volt elérhető. Az utánkövetés során 14 beteg primer refrakternek bizonyult, nem reagált a kezelésre, 14 beteg 12 hónapon belül relabált, 2 betegnél pedig 24 hónapon belül történt relapszus. Összesítve, a terápia befejeztével 30 betegnél volt még kimutatható, metabolikusan aktív tumorszövet, vagy 24 hónapon belüli relapszus (1. ábra).



1. ábra: A klinikai eredmények összehasonlítása a maximum intensity projection (MIP) képek alapján három betegnél (a-c). Az egyes betegeknél az első kép a primer staginget, a második az interim vizsgálatot, a harmadik pedig a kezelés utáni restaging vizsgálatot mutatja. A piros nyilak FDG-avid limfómafókuszokat jelölnek. (a): Komplet metabolikus remisszió. Fokozott FDG felvétel a pajzsmirigyben mindhárom felvételen, mely thyreoditis következménye volt. (b): Relapszus a kezelést követően. Az interim felvételen Deauville score 4. (c): Az interim felvételen Deauville score 3 azonban a kezelést követően relapszus igazolódott.

### 4.1.2 Statisztikai kiértékelés

Chi-négyzet teszttel szignifikáns összefüggést találtunk a sejteredet (COO), az R-IPI, a stádiumok, és a 2 éves eseménymentes túlélés alapján meghatározott csoportok között. Az 1. csoportban szignifikánsan több non-GC típusú beteg volt, akiknek a stádiuma és az R-IPI indexe is magasabbnak bizonyult. A nemek és a fent említett két csoport között nem volt szignifikáns összefüggés. A betegek klinikopatológiai jellemzőit az alábbi táblázat ismerteti.

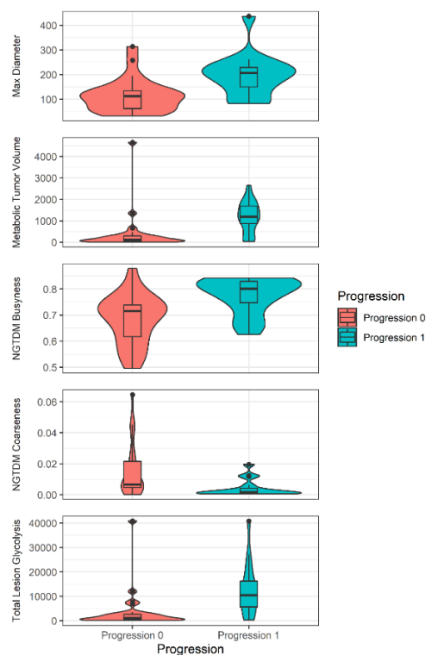
1. táblázat: A betegek klinikai kimenetelének és klinikai adatainak összehasonlítása, az esetleges kapcsolat keresésére Chi-négyzet próbát végeztünk.

Variables	No Progression or Remission	Progression within 24 months	p-value
<b>Sex, n=85</b>	<b>(n=55)</b>	<b>(n=30)</b>	<b>0.611</b>
Male (n, %)	28 (32.9%)	17 (20%)	
Female (n, %)	27 (31.8%)	13 (15.3%)	
<b>ECOG, n=83</b>	<b>(n=55)</b>	<b>(n=28)</b>	<b>0.113</b>
0 (n, %)	16 (19.3%)	6 (7.2%)	
1 (n, %)	26 (31.3%)	8 (9.6%)	
2 (n, %)	11 (13.3%)	12 (14.5%)	
3 (n, %)	2 (2.4%)	2 (2.4%)	
<b>Stage, n=85</b>	<b>(n=55)</b>	<b>(n=30)</b>	<b>0.017</b>
1 (n, %)	10 (11.8%)	0	
2 (n, %)	17 (20%)	5 (5.9%)	
3 (n, %)	9 (10.6%)	8 (9.4%)	
4 (n, %)	19 (22.6%)	17 (20%)	
<b>R-IPI, n=85</b>	<b>(n=55)</b>	<b>(n=30)</b>	<b>0.015</b>
0 (n, %)	7 (8.2%)	1 (1.2%)	
1 (n, %)	29 (34.1%)	9 (10.6%)	
2 (n, %)	19 (22.6%)	20 (23.5%)	
<b>COO, n=82</b>	<b>(n=53)</b>	<b>(n=29)</b>	<b>0.018</b>
GC (n, %)	27 (32.9%)	7 (8.5%)	
N-GC (n, %)	26 (31.7%)	22 (26.8%)	

### 4.1.3 Automatizált gépi tanulási elemzés és biomarkerek azonosítása

Az automatizált gépi tanulás alkalmazásával két éves eseménymentes túlélést előrejelző modellt hoztunk létre az első központ adatainak (n=41, Center 1) a felhasználásával. Az egyközpontú keresztvalidáció a következő eredményeket adta: 66%-os érzékenység, 77%-os specificitás, 78%-os pozitív prediktív érték, 70%-os negatív prediktív érték, 71%-os pontosság és 0,74-es AUC. Az elemzés alapján a legfontosabb képi paraméterek a 2 éves eseménymentes

túlélés becsléséhez a következők: az egyes betegeknél kiválasztott tumoros régió maximális átmérője=max diameter (mm, 9%), a TLG (Total Lesion Glycolysis, 8%), a TMTV (Metabolikus Tumor Volumen (cm<sup>3</sup>, 8%), valamint két, a beadott radiofarmakon eloszlásának heterogenitását leíró texturális paraméter NGTDM (Neighbourhood gray-tone difference matrix) busyness (9%) és a NGTDM Coarseness (5%). Ezen paraméterek eloszlásait violin plot-on ábrázoljuk (2. ábra).



2. ábra: A Violin-plot (R: A Language and Environment for Statistical Computing, version 4.04., using package ggplot2, version 3.3.3) a 2 éves eseménymentes túlélés előrejelzésében prominens képi paraméterek értékeit mutatja.

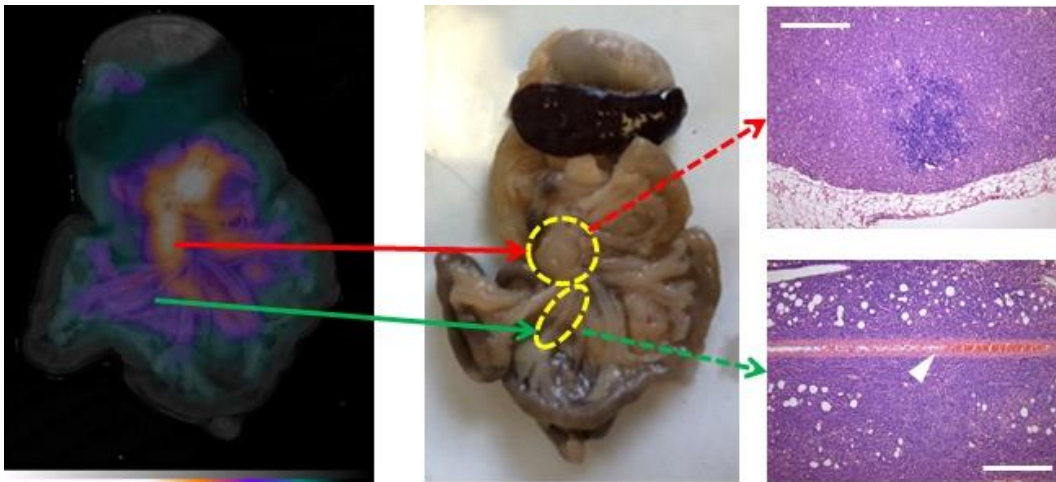
#### 4.1.4 A predikciós modell független kereszt-validálása

Az első központból származó adatokra felépített prediktív modell 79%-os érzékenységet, 83%-os specificitást, 69%-os pozitív prediktív értéket, 89%-os negatív prediktív értéket, 82%-os pontosságot és 0,85 AUC-t eredményezett a második központ adathalmazán.

## 4.2 Preklinikai vizsgálatok 1: középpontban a Cerenkov-lumineszcencia képalkotás (CLI)

### 4.2.1 Az FDG-felvétel jellemzése in vivo PET/MRI-vel és ex vivo CLI-vel egyaránt megvalósítható előrehaladott stádiumú limfómában.

Előrehaladott lymphoma stádiumban (az injekció beadása utáni 8. napon vagy azon túl) intravénás FDG beadást követően in vivo PET/MRI alkalmazásával egyértelmű, körülírt, kórosan fokozott FDG dúsulást tudunk kimutatni az érintett mesenterialis nyirokcsomókban. Ex vivo CLI-vel inhomogén, kóros FDG-dúsulást figyeltünk meg a mesenterialis erek mentén az infiltrált zsírszövetben, a megnagyobbodott mesenterialis nyirokcsomókon belül, az omentumban és a lép hilusban is. Az FDG-avid régiók későbbi szövettani elemzése megerősítette a limfóma-sejtekkel való infiltrációjukat (3. ábra). Az áramlási citometriás vizsgálat szintén támogatta a lymphoma sejtek jelenlétét.



3. ábra: Ex-vivo CLI késői stádiumú limfómában: FDG-avid Bc-DLFL.1 lymphoma fókuszok H&E festéssel a mesenterialis nyirokcsomóban (fent) és a mesenteriumban (lent) CLI (balra), és a bélpreparátum sztereomikroszkópos képe (középen), szövettan (jobbra): a piros nyíl mutatja, hogy a felső bekerített terület a sztereomikroszkópos képen Cerenkov-fényt bocsát ki, és megfelel a mesenterialis nyirokcsomóknak, amely a jobb felső kép alapján lymphoma sejtekkel masszívan infiltrált (szaggatott piros nyíllal összekötve). Az alsó zöld nyíl a mesenterium egyik, kisebb Cerenkov-jelintenzitású részét köti össze (ellipszissel jelölve), a mesenterialis artériát körülvevő kiterjedt limfóma-infiltrátummal (nyílhegy). Méretarány = 200  $\mu$ m.

#### 4.2.2 Ex vivo CLI-vel is igazolható tumoros infiltrátum, az előzetesen <sup>67</sup>Ga-citrát SPECT/MR-el lokalizált távoli nyirokcsomó áttétben.

Előrehaladott stádiumban a megnagyobbodott mesenterialis nyirokcsomók MRI vizsgálattal is jól láthatók. A Ga-67-citrát iv. alkalmazásakor a fiziológias bélaktivitás miatt az abdominális terjedés, kóros halmozás a SPECT metszetek alapján nehezen megítélhető volt, azonban mediastinálisan ez a háttéraktivitás hiányzott, így könnyen felismerhető volt a kóros halmozás egy parathymikus nyirokcsomónak megfelelően, anélkül, hogy ezt egyértelmű kóros -MRI vizsgálattal- megállapítható morfológia kísérte volna. A parathymikus nyirokcsomók eltávolítását követően ex vivo CLI-vel és az azt követő szövettani elemzéssel, -beleértve az IgM és a B220 kettős immunfluoreszcenciás jelölést-, igazoltuk a limfóma-infiltrátum jelenlétét.

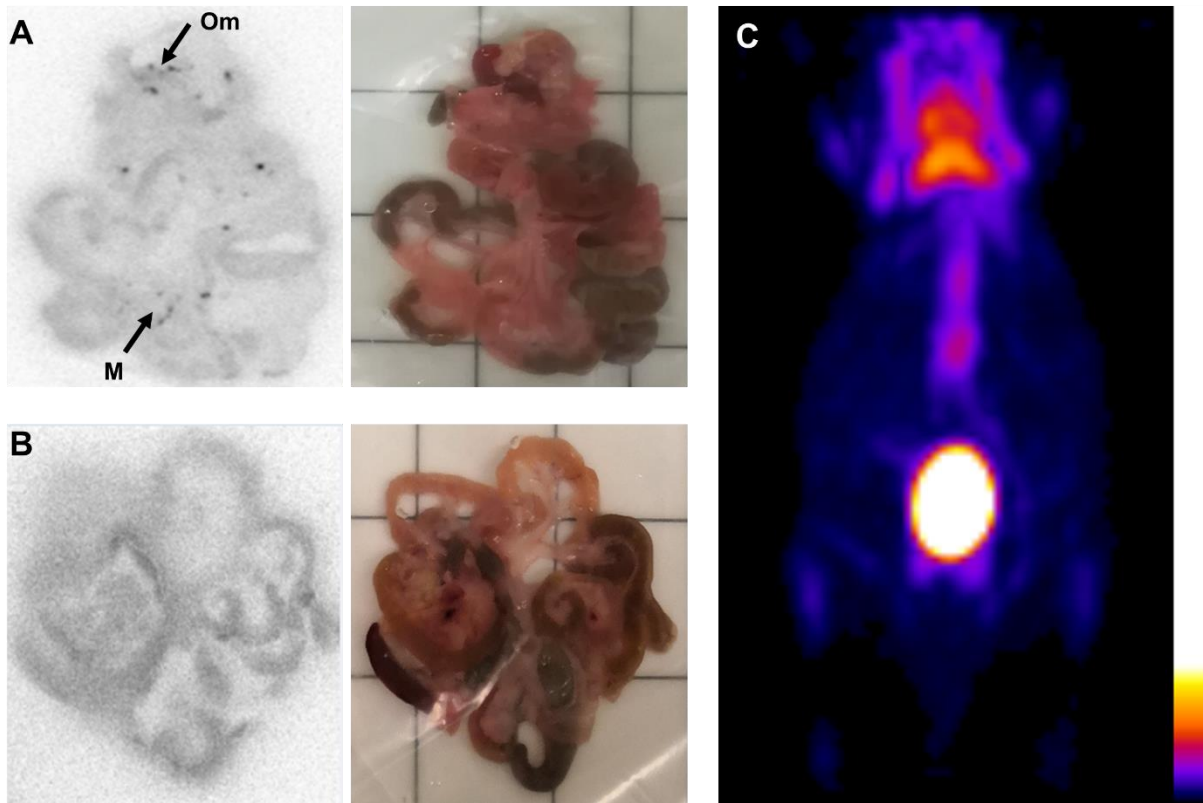
#### 4.3 Preklinikai vizsgálatok 2: a tumor terjedésének vizsgálata korai és előrehaladott stádiumban

##### 4.3.1 A Bc.DLFL1 limfóma sejtek korai megtapadásának és terjedésének nyomon követése intraperitoneális inokulációt követően szisztémás és lokális FDG beadás alkalmazása mellett

A legtöbb tumorsejt-típus nagyfokú glükózfelhasználása jól ismert, ezt alkalmazza a nukleáris medicinai diagnosztika, mivel az jelzett FDG molekula a sejtbe kerülését követően a rákapcsolt fluor-18 atom miatt a sejtben csapdába esik és felhalmozódik.

Ennek ismeretében annak megállapítására, hogy az in vivo PET vagy CLI lehetővé teszik-e a magas grádusú lymphoma progressziójának korai stádiumban történő nyomon követését, FDG radiofarmakon használtunk. A Bc.DLFL1 lymphoma sejteket intraperitoneálisan injektáltuk, majd 24 órával később intraperitoneálisan, vagy intravénásan adtuk be az FDG-t. In vivo PET vizsgálat segítségével nem tudtunk lymphomához köthető tracer dúsulást azonosítani ebben a stádiumban (1 nappal a lymphoma inokulációt követően) intraperitoneális, sem intravénás radiofarmakon beadás esetén. Annak bizonyítására, hogy a radiofarmakon valóban eléri-e a potenciális omentális és mesenterialis megtapadási helyeket ex vivo autoradiográfiát végeztünk a teljes bélrendszerrel, mely alapján 2 órával az intraperitoneális FDG beadást követően a Bc.DLFL1 lymphoma sejtekkel injektált egereknél több, jól elkülöníthető lymphomának tartható sejtcsoportosulást tudtunk kimutatni a mesenteriumban vagy az omentumban; ezzel szemben az FDG intravénás beadását követően hasonló mintázat nem volt azonosítható (4. ábra).





4. ábra: A korai stádiumú Bc.DLFL1 egér limfóma modellben az intraperitoneális FDG beadás alkalmasabb volt a tumorsejtek detektálásában mint ha azt intravénásan adtuk volna be. A ex vivo autoradiográfiás vizsgálat 24 órával az intraperitoneális lymphoma beoltás után i.p. FDG-injekció mellett az ARG-kazettára helyezett omentumhoz (Om) és mesenteriumhoz (M) tapadt halmozó tumor sejteket mutatja (A). A radiotracer intravénás beadása útján nem jut el a mesenteriumhoz és omentumhoz tapadó limfóma sejtekhez (B). A tájékozódás érdekében a mintákhoz tartozó fényképet is bemutatjuk (A-B). A PET 3D MIP képen csak a normális FDG eloszlás látható egérben, a vizsgálat 2 órával az intraperitoneális FDG beadását követően készült (C).

Annak igazolására, hogy az omentálisan és mesenterialisan megfigyelhető FDG dúsulások biztosan a limfóma sejtek következtében alakultak ki, intraperitoneálisan BcDLFL.1 sejteket injektáltunk, amelyeket előzőleg CFSE-vel (5-6-karboxifluoreszcein-szukcinimidil-észter) jelöltünk, és eloszlásukat anti-FITC antitesttel végzett immunhisztokémiai vizsgálattal követtük nyomon. Ezzel a technikával olyan jelölési mintázatot találtunk, amely megegyezik az autoradiográfiával megfigyelt FDG eloszlással az omentumban és a mesenterialis artériákat körülvevő, korábban leírt perivascularis zsír cuff-okban. Tehát az FDG intraperitoneális beadását követő in situ whole mount autoradiográfiás eredményeinket alátámasztják a limfóma sejtek nem véletlenszerű, korai eloszlását mutató immunhisztokémiai adatok. A CFSE-jelölt limfóma-sejtek szelektív in vivo kötődésének további megerősítéseként ex vivo konfokális száloptikás fluoreszcens mikroszkópiát is alkalmaztunk. Azt találtuk, hogy a mesenteriumon

belül a CFSE-jelölt limfóma-sejtek az anti-FITC immunhisztokémiával megfigyelt mintázathoz hasonlóan fokális halmozódást mutatnak. Összességében ezek az eredmények azt jelzik, hogy bár a Bc.DLFL1 limfóma sejtek egyértelműen preferált peritoneális területeken tapadnak meg, FDG-vel való in vivo nyomkövetésük sem intravénás, sem intraperitoneális izotóp beadást követően nem volt lehetséges, míg az ex vivo FDG-vel való monitorozás intraperitoneális FDG beadás esetén képes volt beazonosítani a limfóma fókuszokat.

#### 4.3.2 A limfóma expansziójának sikeres monitorozása előrehaladott stádiumban nyirokcsomó metasztázis esetén PET/MR-rel és az azt követő CLI-vel

Limfóma sejt beoltás után 7 nappal azt találtuk, hogy - ellentétben a kóros radiofarmakon felvétel hiányával a limfóma korai stádiumában -, jól kimutatható kóros FDG dúsulás volt látható a radiofarmakon intravénás beadását követően PET/MRI-vel. A legintenzívebb FDG akkumuláció a megnagyobbodott mesenterialis nyirokcsomókban (mLN) volt. A környező területek, mesenterialis ágak területén a PET felvétel felbontásának javítására Cerenkov lumineszcens képalkotást alkalmaztunk. Ezzel a módszerrel a megnagyobbodott mLN-ek intenzív jele mellett jó felbontással kevésbé intenzív lumineszcencia jeleket tudtunk kimutatni az omentumban és a zsírszövetben, valamint a mesenterialis erek és a nyirokerek mentén, melyek szintén az FDG felvételhez voltak kapcsolhatóak. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a lymphoma későbbi stádiumában a nyirokcsomó áttétek már iv. FDG beadás mellett is jól kimutathatók PET/MRI-vel, azonban a PET képeken a nyirokcsomók és a környező mesenterialis szövetek a dúsulás alapján nehezen elkülöníthetők egymástól. Az ex vivo CLI ezzel szemben jól elkülöníthetően tudta azonosítani mind a nyirokcsomó, mind a mesenterialis lymphoma érintettségét.

## 5 Összefoglalás: a dolgozat új eredményei

1. Kétéves eseménymentes túlélést előrejelző modell felépítése DLBCL-ben szenvedő betegek kezelés előtti FDG-PET/CT vizsgálatából származó radiomikai adatok segítségével

Kétéves eseménymentes túlélés előrejelzésére alkalmas modellt hoztam létre a két központban történt retrospektív elemzés során nyert képi paraméterek felhasználásával és automatizált gépi tanulás alkalmazásával. Az eseménymentes túlélés előrejelzésének legfontosabb képi biomarkerei a legnagyobb tumoros lézió maximális átmérője, a TMTV, az NGTDM coarseness, az NGTDM busyness és a TLG voltak. Elemzésemben a SUV max és a klinikai paraméterek kevésbé voltak prediktívek. Ennek ellenére tovább kell vizsgálni az eddig azonosított képi biomarkereket és prediktív teljesítményüket más klinikai körülmények között

2. PET/SPECT és CLI képalkotást kombináló új módszer kifejlesztése egérmodellben, amely lehetővé teszi a legfontosabb érintett nyirokcsomó és/vagy az érintett nyirokcsomó legfontosabb részének irányított kivételét és feldolgozását.

Eredményeim bizonyítják, hogy a PET-tel vagy SPECT-tel végzett in vivo teljes test képalkotás, majd az ezt követő ex vivo CLI felvételek nemcsak a preklinikai vizsgálatokban, hanem a klinikai gyakorlatban is irányadók lehetnek a tumorreszekcióban, a patológia értékeléséhez és a terápia tervezéséhez. A CLI alkalmazható daganatos szövetek körvonalazására és sebészi eltávolításuk irányítására. Az ex vivo CLI vizsgálat irányíthatja a korábban PET vizsgálat alapján lokalizált megnagyobbodott nyirokcsomók patológiai mintavételét. Segítségével más, műtéti úton eltávolított nyirokcsomók ex vivo tovább vizsgálhatók. Ebben a vizsgálati kontextusban először számoltam be a  $^{67}\text{Ga}$  izotóppal történt Cerenkov képalkotásról. A SPECT, PET és CLI együttes alkalmazása a klinikai onkológiai gyakorlatban is indokolt/hasznos lehet.

3. A legoptimálisabb nukleáris medicina technika kiválasztása a lymphoma peritoneális terjedésének korai kimutatására egérmodell segítségével

Eredményeim rámutatnak az alkalmazott egérmodell hasznosságára a limfóma korai felismerésében és a sejtek metasztatikus útvonalainak kimutatásában, ezek a klinikumban is nagy jelentőséggel bírnak. Mindezek alapján a radioizotópos diagnosztikai eljárások során jobban meg kell fontolni a lokális FDG beadást. A korai peritoneális metasztázisok mielőbbi felmérése így kivitelezhetővé válhat limfómában, de klinikailag talán még fontosabb vastagbél-

, gyomor- vagy petefészekrák esetében. Az általam alkalmazott lokális diagnosztikai megközelítés és a különböző képalkotó eljárások kombinációja rávilágít, hogy a szisztémás kezelések mellett a lokális terápiának is fontos szerepe lehet egyes betegek, betegségek hatékony kezelésében, elősegítve a személyre szabott terápia alkalmazását. A Cerenkov-képalkotás az egyik olyan klinikumba bevezetendő optikai diagnosztikus módszer lehet, mely szintén segítheti a személyre szabott kezelések tervezését, megvalósítását.

## 6 Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Prof. Dr. Zámbó Katalinnak és Dr. Hussain Alizadeh egyetemi Docens úrnak, hogy megosztották velem tudásukat és, hogy mindvégig támogatták interdiszciplináris kutatásunkat. Nagyon hálás vagyok Tanszékvezetőnk, Dr. Schmidt Erzsébet rengeteg segítségért és támogatásért.

Nagyra értékelem, hogy Dr. Máthé Domokostól és Prof. Dr. Balogh Pétertől lehetőségem nyílt megismerkedni a kisállat kísérletek tervezésével, elvégzésével, és a preklinikumban alkalmazott képalkotó diagnosztikával. Nagy köszönettel tartozom Dr. Papp Lászlónak, aki magas szintű statisztikai ismereteivel, valamint munkánk klinikai részének megtervezésében és lebonyolításában segítette munkánkat.

Hálás vagyok Prof. Dr. Németh Péternek publikációimhoz és kutatómunkámhoz nyújtott előremutató javaslataiért. Ezen túlmenően sok köszönettel tartozom publikációim egyéb társszerzőinek is, és itt szeretném megemlíteni Dr. Budán Ferencet, aki javaslataival szintén sokat segített munkámban.

Ez a dolgozat nem készülhetett volna el a feleségem és a családom támogatása nélkül.

## 7 Az értekezéshez kapcsolódó publikációk

1. Zsombor Ritter, László Papp, Katalin Zámbó, Zoltán Tóth, Dániel Dezső, Dániel Sándor Veres, Domokos Máthé, Ferenc Budán, Éva Karádi, Anett Balikó, László Pajor, Árpád Szomor, Erzsébet Schmidt and Hussain Alizadeh, Two-Year Event-Free Survival Prediction in DLBCL Patients Based on In Vivo Radiomics and Clinical Parameters.

Frontiers in Oncology (2022) <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.820136> Q1, IF: 6,244

2. Zsombor Ritter, Katalin Zámbó, Péter Balogh, Dávid Szöllősi, Xinkai Jia, Ákos Balázs, Gabriella Taba, Dániel Dezső, Ildikó Horváth, Hussain Alizadeh, David Tuch, Kunal Vyas, Nikolett Hegedűs, Tibor Kovács, Krisztián Szigeti, Domokos Máthé & Erzsébet Schmidt, In situ lymphoma imaging in a spontaneous mouse model using the Cerenkov Luminescence of F-18 and Ga-67 isotopes.

Scientific Reports (2021) 11:24002 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03505-3> D1, IF: 4,379

3. Zsombor Ritter, Katalin Zámbó, Xinkai Jia, Dávid Szöllosi, Dániel Dezső, Hussain Alizadeh, Ildikó Horváth, Nikolett Hegedus, David Tuch, Kunal Vyas, Péter Balogh, Domokos Máthé and Erzsébet Schmidt, Intraperitoneal Glucose Transport to Micrometastasis: A Multimodal In Vivo Imaging Investigation in a Mouse Lymphoma Model

International Journal of Molecular Sciences (2021) 22(9): 4431

<https://doi.org/10.3390/ijms22094431> D1, IF: 5,924

**Összesített IF: 16,546**

### 7.1 Egyéb publikációk

1. Zsolt Szakacs, Amar La Jorgen Kristensen, Nelli Farkas, Zsombor Ritter, Szabolcs Kiss, Anett Baliko, Hussain Alizadeh, 90Y-ibritumomab tiuxetan in B-cell non-Hodgkin lymphomas: Real-world data from the United Arab Emirates.

Advances in Radiation Oncology (2021) <https://doi.org/10.1016/j.adro.2021.100882> Q2, IF: 2,655

2. Laszlo Szabo, Richard Molnar, Andras Tomesz, Arpad Deutsch, Richard Darago, Timea Varjas, Zsombor Ritter, Jozsef L. Szentpeteri, Kitti Andreidesz, Domokos Mathe, Imre Hegedüs, Attila Sik, Ferenc Budan, and Istvan Kiss, Olive Oil Improves While Trans Fatty Acids Further Aggravate the Hypomethylation of LINE-1 Retrotransposon DNA in an Environmental Carcinogen Model.

Nutrients (2022) 14:908. <https://doi.org/10.3390/nu14040908> D1, IF: 5,719

**Összesített IF: 8,374**

## 7.2 Idézhető absztraktok:

1 Z. Ritter, D. Máthé, P. Balogh, D. Szöllösi, I. Horváth, D. Tuch, K. Vyas, E. Schmidt, K. Zámbo, The investigation of the spreading of a novel spontaneous high grade lymphoma from BALB/c mice with CLI and different imaging modalities. EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE AND MOLECULAR IMAGING (1619-7070 1619-7089): 45 Suppl. 1. pp S613-S613 (2018)

2 Ritter Z, Zambo K., Balogh P., Szollosi D., Xinkai J., Dezso D., Alizadeh H., Horvath I., Hegedus N., Mathe D., Schmidt E. The significance of intraperitoneal administration of 18F-FDG in a preclinical mouse model EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE AND MOLECULAR IMAGING (1619-7070 1619-7089): 47 SUPPL 1 pp S644-S645 (2020)

3 Dezso D., Zambo K., Ritter Z., Ban Z., Szabo Z., Bodis B., Varady E., Szukits S., Toth A., Nemes O., Rucz K., Szujo S., Mezosi E., Bajnok L., Schmidt E., Measurement of epicardial adipose tissue with FDG-PET/CT in patients with type-2 diabetes mellitus EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE AND MOLECULAR IMAGING (1619-7070 1619-7089): 46 SUPPL 1 pp S465-S465 (2019)

4 Ritter Z., Zambo K., Dezso D., Szabo Z., Ban Z., Kajtar B., Farkas K., Szomor A., Hussain A., Schmidt E., Clinical and prognostic significance of FDG-PET derived biomarkers in high grade B cell lymphoma. EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE AND MOLECULAR IMAGING (1619-7070 1619-7089): 46 SUPPL 1 pp S565-S565 (2019)

5 Dezso D., Zambo K., Ritter Z., Ban Z., Szabo Z., Varady E., Bodis B., Nemes O., Rucz K., Szujo S., Mezosi E., Bajnok L., Schmidt E. Significance of epicardial and visceral adipose tissue measurement by 18F-FDG-PET / CT in type 2 diabetes mellitus. EUROPEAN

JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE AND MOLECULAR IMAGING (1619-7070 1619-7089): 47 SUPPL 1 pp S526-S527 (2020)

6 Ritter Z., Zambo K., Dezso D., Szabo Z., Ban Z., Szigeti K., Szollosi D., Veres D., Farkas K., Szomor A., Mathe D., Hussain A., Schmidt E., Prognostic significance of FDG-PET derived conventional and textural parameters in high grade B cell lymphoma EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE AND MOLECULAR IMAGING (1619-7070 1619-7089): 48 SUPPL 1 pp S540-S541 (2021)

7 Dezso D., Zambo K., Ritter Z., Ban Z., Szabo Z., Schmidt E., Evaluation of incidental gastrointestinal accumulations in 18F-FDG PET to differentiate malignant lesions from benign ones. EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE AND MOLECULAR IMAGING (1619-7070 1619-7089): 48 SUPPL 1 pp S528-S528 (2021)