
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Studii asupra corelației markerilor serologici și imunohistochimici din diverse neoplazii și activitatea metabolică decelată prin imagistica hibridă de tomografie prin emisie de pozitroni/computer tomografie (PET/CT)

Doctorand **Marius-Ioan Bădan**

Conducător de doctorat Prof. Asoc. Dr. **Doina Piciu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Tehnica imunohistochimică	17
1.1. Principiul de bază al imunohistochimiei	17
1.2. Markerii imunohistochimici utilizați în diagnosticul anatomopatologic	20
1.2.1. Modele de expresie imunohistochimică în microscopia optică	20
1.2.2. Markerii imunohistochimici utilizați uzual	21
1.3. Utilitatea imunohistochimiei în diagnosticul cancerelor	22
1.4. Noi anticorpi utilizați în diagnosticul neoplaziilor maligne	25
2. Tomografia cu emisie de pozitroni/computer tomografie	27
2.1. Principiul de bază al tehnicii hibrid PET/CT	27
2.2. Radiotrasori frecvent utilizați	29
2.2.1. Radiofarmaceutice utilizate frecvent în detecția cancerelor	29
2.2.2. Radiofarmaceutice cu utilitate în alte patologii	32
2.3. Noi compuși radioactivi folosiți în detecția tumorilor	33
3. Stadiul actual al corelațiilor histopatologice/imunohistochimice și tehnica imagistică PET/CT	34
3.1. Introducere	34
3.2. Studii clinice recente	35
3.2.1. Studii clinice asupra patologiei non-tumorale	35
3.2.2. Studii clinice asupra patologiei tumorale	35
3.3. Alte studii relevante	36
4. Domenii noi de cercetare în diagnosticul și managementul cancerului	37
4.1. Introducere	37
4.2. Biomarkerii tumorali de tip microARN (miARN)	38
4.3. Detecția neoplaziilor maligne prin celule tumorale circulante (CIC), prin ADN liber circulant (cfDNA) și ADN tumoral circulant (ctDNA)	38
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	43
2. Metodologie generală	45
3. Studiul 1 - Expriarea indicelui de proliferare celulară Ki67 și parametrul PET/CT în diferite neoplazii	49
3.1. Introducere	49
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	51
3.3. Material și metodă	51
3.4. Rezultate	54
3.5. Discuții	60
3.6. Concluzii	65
4. Studiul 2 - Corelații între markerii imunohistochimici și parametrul PET/CT în tumorile neuroendocrine	65
4.1. Introducere	65
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	66
4.3. Material și metodă	67

4.4. Rezultate	68
4.5. Discuții	73
4.6. Concluzii	76
5. Studiul 3 - Studiu asupra corelațiilor histologice si imunohistochimice si parametrii PET/CT în tumorile multiple	79
5.1. Introducere	81
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	82
5.3. Material și metodă	82
5.4. Rezultate	83
5.5. Discuții	94
5.6. Concluzii	100
6. Concluzii generale	101
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	103
REFERINȚE	105

Cuvinte cheie: imunohistochimie, PET/CT, Ki67, neoplazii maligne, Tektrotyd, tumori neuroendocrine, sinaptofizina, cromogranină, CD56, neoplazii primare multiple, cancer tiroidian.

INTRODUCERE

Cancerul este una din patologiile principale cauzatoare de mortalitate și morbiditate la nivel mondial, ocupând resurse vaste tehnologice, financiare, resurse medicale și nu în ultimul rând cu rol detrimental asupra vieții umane, atât din punct de vedere al calității acesteia, cât și din punct de vedere psiho-social. În ciuda recente pandemii cu care lumea s-a confruntat în ultimii ani, patologia malignă ocupă în continuare un rol central în practica medicală.

Pentru a contracara accelerarea incidenței cancerului, cercetările medicale și inovațiile tehnologice din ultimele decenii concentrate pe sfera neoplaziilor maligne au înregistrat salturi extraordinare atât din punct de vedere al diagnosticului precoce, al schemelor de prevenție cât și din punct de vedere al terapiilor. Printre metodele de diagnostic standardizate și utilizate frecvent, un rol aparte îl ocupă diagnosticul histopatologic, completat de tehnica imunohistochimică. Cercetarea științifică în această sferă se concentrează adesea pe descoperirea și studierea unor noi markeri tumorali, dar și pe ce corelații se pot realiza între aceste tehnici și alte metode de diagnostic tumoral. Una din metodele mai nou dezvoltate pentru diagnosticul, stadializarea și urmărirea atât a bolii cât și a răspunsului la tratament este reprezentată de tehnica hibridă imagistică a tomografiei cu emisie de pozitroni - tomografie computerizată (PET/CT).

Prezenta cercetare doctorală și-a propus studierea unor potențiale corelații dintre parametrii generați de tehnica PET/CT și markerii imunohistochimici cu rol diagnostic și prognostic în diverse patologii maligne. În realizarea acestui lucru au fost studiate teoretic atât tehnica imunohistochimică și tehnica PET/CT, cât și stadiul actual al cercetărilor menite să le întrunească într-un punct comun favorabil pentru avansul diagnosticului oncologic, într-un final trecându-se prin literatura de specialitate în vederea obținerii unei imagini de ansamblu a unor potențiale viitoare metode de diagnostic precoce și non-invaziv în cancer. Principalul obiectiv al acestei teze doctorale a fost de a investiga potențiale corelații între markerii imunohistochimici utilizați frecvent în histopatologie precum Ki67, cu rol în diagnosticul și prognosticului tumoral și a markerilor imunohistochimici folosiți în diagnosticul tumorilor neuroendocrine și parametrii determinați prin tehnica PET/CT în aceste cancere.

În urma unei analize extensive a publicațiilor științifice care au investigat relația dintre markerul Ki67, determinant al proliferării celulare tumorale și captarea tumorală de compuși radioactivi în PET/CT s-a constatat un parcurs lent și cu rezultate relativ ambigue asupra corelațiilor dintre acestea. Prin urmare, am decis să realizez o sinteză a datelor publicate în speranța obținerii unei imagini de ansamblu mai concrete și pentru a relansa avântul comunității științifice în această direcție de cercetare. Ulterior, am încercat să integrez în studiile ulterioare realizate, analiza acestei potențiale legături, acolo unde acest lucru a fost realizabil. În continuare, am încercat să studiez potențiale perspective corelative dintre markerii imunohistochimici utilizați frecvent în diagnosticul tumorilor neuroendocrine și captarea unui radiofarmaceutic sensibil pentru somatostatina, utilizat pentru diagnosticul SPECT/CT al acestor tumori. Totodată în cadrul acestui studiu am luat în vedere și markerii serologici și urinari relevanți pentru urmărirea acestora. Într-un studiu final, a fost realizată o cercetare privind tumorile maligne sincrone și metacrone cu implicarea patologiei neoplazice tiroidiene, una dintre cele mai frecvente patologii maligne din țara noastră, privind prin prisma analizei acestor tehnici. Deși natura retrospectivă a studiilor realizate și numărul mic de pacienți luați în vedere nu permit formularea unor concluzii generale edificatoare sau finale în urma cercetărilor, rezultatele

obținute au contribuit la o mai bună înțelegere a tehnicilor utilizate în prezent, a viitoarelor metode de diagnostic și a tumorilor sincrone în triplă asociere.

În concluzie, studierea corelațiilor dintre metodele standard de diagnostic și cele noi imagistice reprezintă o provocare de interes continuu menită să îmbunătățească managementul pacienților oncologici. În ciuda rezultatelor modeste obținute în urma acestor cercetări, prezenta teză s-a înscris în acest demers prin încercarea de a răspunde la unele întrebări privind potențialele legături ce pot fi desprinse prin practica cercetării dovezilor medicale.

SINTEZA CONTRIBUȚIEI PERSONALE

Studiu 1-Exprimarea indicelui de proliferare celulară Ki67 și parametrii PET/CT în diferite neoplazii:

În acest prim demers științific mi-am concentrat atenția asupra corelației parametrilor PET/CT și cel mai folosit și solicitat indice determinat imunohistochimic din raporturile histopatologice, respectiv, indicele de proliferare celulară Ki67. În acest sens s-a explorat extensiv, în metodologie de tip review sistematic, literatura de specialitate pentru stadiul actual al corelațiilor PET/CT și colorațiile imunohistochimice în diverse patologii, cu accent pe corelațiile documentate în legătură cu indicele de proliferare celulară. În același timp, o parte din documentare s-a axat pe viitoare direcții de cercetare cu potențial să înlocuiască validarea imunohistochimică. Analiza generală a studiilor recente selectate, indică faptul că rezultatele histopatologice și tehnica imunohistochimică sunt esențiale în finalizarea acestora și în evaluarea validității ipotezelor de lucru. Cercetarea asupra corelației dintre markerul imunohistochimic de proliferare celulară Ki67 și parametrii PET/CT, are potențialul să fie un domeniu de studiu științific de interes, doar pentru anumite patologii tumorale. Combinația proprietăților microARN-urilor, alături de publicațiile recente care dovedesc fezabilitatea acestora în diagnosticul bolilor, indică posibilitatea utilizării acestora drept markeri de validare pentru studiile care implică tehnica hibridă PET/CT.

Studiu 2- Corelații între markeri imunohistochimici și parametrii PET/CT în tumorile neuroendocrine.

Studiile recente au demonstrat o tendință ascendentă persistentă a creșterii numărului de tumori neuroendocrine ale intestinului subțire și pancreatice, cu prevalență majoritară în Europa. Această creștere, raportată și în alte părți ale lumii, ar putea fi atribuită, în parte, creșterii performanțelor diagnostice. Dezvoltarea compușilor radiofarmaceutici analogi de somatostatina a reprezentat un aspect esențial în diagnosticul tumorilor neuroendocrine (NET). Imagistica funcțională, în special scintigrafia receptorilor de somatostatina, a devenit cea mai bună opțiune pentru detectarea acestor tumori, deoarece caracterizează densitatea receptorilor de somatostatina (SSTR). Încă de la începutul anilor 2000, Tektrotyd (99mTc-EDDA/HYNIC-Tyr3-Octreotide), un astfel de analog al somatostatinei, a fost identificat ca fiind promițător în diagnosticarea tumorilor neuroendocrine și continuă să fie studiat în cercetarea actuală. Studiul de față a demonstrat constatări concordante cu alte publicații științifice în ceea ce privește incidența tumorilor neuroendocrine în relația cu vârsta pacienților și cu expresia markerului IHC cromogranina A în NET bine și moderat diferențiate. Interpretarea expresiei imunohistochimice a anticorpilor specifici NET ar putea fi o cale de a localiza originea primară a metastazelor NET, în asociere cu datele clinice și cu cele imagistice. Intensitatea expresiei membranare a markerului IHC CD56 ar putea prezenta o relație invers proporțională cu absorbția de Tektrotyd în tumorile

neuroendocrine, indiferent de gradul de diferențiere tumorală. Cu toate acestea, pentru a consolida și stabili această corelație, sunt necesare studii suplimentare pe eșantioane populaționale mai mari.

Studiul 3- Studiu asupra corelațiilor histologice și imunohistochimice și parametrii PET/CT în tumorile multiple.

În acest studiu obiectivul de interes a fost patologia tumorală malignă tiroidiană. Colorația imunohistochimică pentru Ki67 nu este utilizată de rutină în diagnosticul anatomopatologic al carcinoamelor tiroidiene. Mai mult, din punctul de vedere al corelațiilor exprimării indicelui de proliferare Ki67 și captarea radiotrasorului 18F-FDG în această patologie se remarcă, în literatura de specialitate, o corelație slabă și moderată, cu un indice în jur de 10% pentru tumorile bine diferențiate. Aceste lucruri, au direcționat cercetarea înspre caracterizarea carcinoamelor tiroidiene maligne prin perspectiva asocierii lor cu alte neoplazii maligne sincrone sau metacrone, prin prisma investigării acestora utilizând tehnica hibridă PET/CT și prin analiza lor în paralel cu investigații imunohistochimice, ecografice și serologice. În urma studiului, cu eșantion limitat, s-a observat posibilitatea detectării neoplaziilor primare maligne multiple prin investigații imagistice de rutină, înaintea debutului simptomatologiei. Acest lucru îndeamnă la atenție sporită în urmărirea pacienților oncologici și subliniază importanța tehnicii PET/CT în acest sens.

Concluzii generale

1. Corelația între markerul imunohistochimic Ki67, folosit ca indicator al proliferării tumorale și captarea analogului de glucoză radioactivă 18F-FDG prin PET/CT în patologia tumorală, deși reprezintă o idee atrăgătoare pentru cercetare, aceasta merită aprofundată în studii ulterioare pe anumite tipuri de tumori precum tumorile timusului și tumorile stromale gastro-intestinale.
2. Conform rezultatelor primului nostru studiu, această corelație a fost intens studiată în comunitatea științifică medicală, cu rezultate uneori discordante, cea mai puternică afirmație din punct de vedere al dovezilor, fiind aceea că există o corelație pozitivă moderată, per total, între cele două elemente.
3. Combinația proprietăților microARN-urilor, alături de publicațiile recente care dovedesc fezabilitatea acestora în diagnosticul bolilor, indică posibilitatea utilizării lor drept markeri de validare pentru studiile care implică tehnica hibridă PET/CT.
4. Al doilea studiu cuprins în această cercetare doctorală aduce pentru prima oară în discuție analiza expresiei imunohistochimice a anticorpilor utilizați în diagnosticul tumorilor neuroendocrine în corelație cu captarea unui radiotrasor sensibil utilizat în tehnica SPECT/CT. Rezultatele studiului, limitate de eșantionul populațional, nu au pus în evidență o corelație semnificativă. Cu toate acestea, expresia membranală de CD56 a demonstrat o corelație invers proporțională față de intensitatea captării de Tektrotyd. Pentru validarea acestei ipoteze nascente și a aplicabilității sale în viitoare direcții de cercetare sunt necesare studii suplimentare pe eșantioane populaționale mai mari.
5. Cuantificarea expresiei membranare sau citoplasmatică a markerilor imunohistochimici în metastazele tumorilor neuroendocrine ar putea reprezenta un factor adjuvant, alături de datele clinice, imagistice și din literatura de specialitate, în determinare unei localizări primare tumorale.

6. Rezultatele celui de-al doilea studiu arată că nivelurile biomarkerilor serologici și urinari urmăriți în pacienții diagnosticați cu tumori neuroendocrine, nu au dovedit corelații cu parametrii imagistici sau cu expresia anticorpilor imunohistochimici utilizați pentru diagnostic.
7. Ultimul nostru studiu demonstrează importanța de necontestat a tehnicii imagistice PET/CT precum și a utilizării markerilor imunohistochimici în diagnosticul și urmărirea pacienților cu tumorilor sincrone și metacrone.
8. Deși tumorile sincrone și metacrone nu reprezintă evenimente izolate, carcinoamele tiroidiene în asocieri triplă cu alte malignități sunt extrem de rare (0,05%), conform datelor studiate pe o perioadă de 20 de ani.
9. Pacienții cu tumori mamare sau din sfera ginecologică ar trebui urmăriți clinic și imagistic pentru diagnosticul precoce a unor potențiale tumori tiroidiene ulterioare și viceversa.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Prin intermediul studiilor efectuate, prezenta teză de doctorat atinge următoarele puncte în ceea ce privește originalitate lucrării și a contribuției acesteia în domeniul științific :

Primul studiu.

- Abordarea temei axate pe corelația dintre markerul IHC KI67 și captarea de 18F-FDG în PET/CT prin analiza celor mai recente studii realizate în ultimii ani.
- Concentrarea acestei lucrări pe publicații ce implică studii clinice, cu aplicabilitate mai concretă în managementul pacienților.
- Introducerea în discuție a proprietăților micro-ARN-urilor ca potențiali biomarkeri viitori în diagnosticul patologiei tumorale, prin studierea publicațiilor recente pe această temă și prin corelarea lor cu parametrii PET/CT.

Deși există publicații care au abordat această temă în trecut, fiind realizată și o meta-analiză pe subiect, studiul nostru s-a axat pe datele indexate recent și pe studii clinice încercând să valorifice atât metode diagnostice concretizate în timp cât și una din viitoarele tehnici cu potențial contributiv în acest domeniu.

Al doilea studiu.

- Cercetare pilot privind asocierea markerilor imunohistochimici și radiotrasori utilizați frecvent în diagnosticul și urmărirea pacienților cu tumori neuroendocrine.
- Analiza originală a markerilor imunohistochimici cromogranină A, sinaptofizină și CD56 în paralel cu parametrii de scintigrafie, SPECT/CT, analogul de somatostatină radiomarcant Tektrotyd și cu valorile markerilor serologici recoltați în patologia tumorilor neuroendocrine. Studiarea potențialelor corelații în urma asocierii expresiei anticorpilor utilizați în diagnosticul NET și captarea de Tektrotyd în SPECT/CT este o temă abordată în premieră. Cu toate că studiul a fost de mică amploare, cu rezultate non-corelative direct, datele culese au generat perspective noi pentru viitoare direcții de cercetare.

Al treilea studiu.

- Cercetare retrospectivă în premieră a patologiei tumorale maligne tiroidiene în asocieri cu alte doua tipuri de cancer, sincrone sau metacrone.
- Sublinierea importanței urmăririi pacienților oncologici de rutină prin tehnica PET/CT pentru diagnosticul și tratamentul precoce unei a doua sau chiar unei a treia tumori primare dezvoltate în timp. Prin natura studiului de lungă durată, pe o perioadă de 20 de ani, s-a

adus la cunoștință potențialul dezvoltării unor multiple tumori maligne primare, înainte sau după diagnosticul unei tumori tiroidiene, în intervale de timp relativ scurte. Acest studiu contribuie la sporirea vigilenței comunității medicale în prevenția apariției tumorilor primare secundare și terțiare în cadrul pacienților oncologici.

PhD THESIS SUMMARY

Studies on the correlation between serological and immunohistochemical markers from various neoplasms and the metabolic activity detected by positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) hybrid imaging

PhD student **Marius-Ioan Bădan**

PhD thesis advisor Asoc. Prof. Dr. **Doina Piciu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Immunohistochemical stains	17
1.1. Immunohistochemistry principle	17
1.2. Frequently used immunohistochemical stains in histopathology	20
1.2.1. Immunohistochemical patterns in optical microscopy	20
1.2.2. Immunohistochemical markers used in day-to-day practice	21
1.3. The use of immunohistochemistry in cancer diagnosis	22
1.4. New antibodies used in cancer diagnosis	25
2. Positron emission tomography/computed tomography hybrid imaging	27
2.1. PET/CT hybrid imaging principle	27
2.2. Frequently used radiopharmaceuticals	29
2.2.1. Radiopharmaceuticals frequently used in cancer detection	29
2.2.2. Radiopharmaceuticals used in other pathologies	32
2.3. New radioactive compounds used in tumor detection	33
3. The current state of knowledge related to histopathological, immunohistochemical and PET/CT correlations	34
3.1. Introduction	34
3.2. Recent clinical studies	35
3.2.1. Clinical trials pertaining to non-tumoral pathology	35
3.2.2. Tumor oriented clinical trials	35
3.3. Other relevant studies	36
4. New research frontiers in cancer diagnosis and management	37
4.1. Introduction	37
4.2. MicroARN (miARN) tumoral biomarkers	38
4.3. Cancer detection through circulating tumor cells (CIC), free circulating DNA (cfDNA) and circulating tumoral DNA (ctDNA)	38
PERSONAL CONTRIBUTIONS	
1. Work hypothesis/objectives	43
2. General methodology	45
3. Study 1- Ki67 cell proliferation index expression and PET/CT parameters in diverse neoplasms	49
3.1. Introduction	49
3.2. Hypothesis	51
3.3. Materials and methods	51
3.4. Results	54
3.5. Discussions	60
3.6. Conclusion	65
4. Study 2 - Correlations between immunohistochemical markers and PET/CT parameters in neuroendocrine tumors	
4.1. Introduction	65
4.2. Hypothesis	66
4.3. Materials and methods	67

4.4. Results	68
4.5. Discussions	73
4.6. Conclusion	76
5. Study 3 - Study on histological and immunohistochemical correlations with PET/CT parameters in multiple primary tumors	
5.1. Introduction	81
5.2. Hypothesis	82
5.3. Materials and methods	82
5.4. Results	83
5.5. Discussions	94
5.6. Conclusion	100
6. Concluding remarks	
7. Thesis originality and the contributions to the field	
REFERENCES	105

Keywords: immunohistochemistry, PET/CT, Ki67, cancer, Tektrotyd, neuroendocrine tumors, synaptophysin, chromogranin, CD56, multiple primary neoplasms, thyroid cancer.

INTRODUCTION

Cancer is one of the main pathologies responsible for mortality and morbidity worldwide, consuming vast technological, financial and medical resources and, last but not least, having a detrimental role on human life, both in terms of its quality and from a psycho-social point of view. Despite the recent pandemic that the world has faced in recent years, oncological pathology still occupies a central role in medical practice.

To counter the accelerating incidence of cancer, oncological medical research and technological innovations in the last decades have made extraordinary leaps forward in terms of early diagnosis, prevention schemes and therapies. Histopathological diagnosis, which is supplemented by immunohistochemistry techniques, has a distinctive place among the standardised and widely used diagnostic approaches. Scientific research in this subject frequently focuses on the identification and analysis of novel tumor antibodies, as well as the possible connections between this approach and other tumor diagnostic tools. Positron emission tomography-computed tomography (PET/CT) hybrid imaging is one of the most recently discovered technologies for diagnosing, staging, and monitoring illness and response to therapy.

The goal of this PhD research was to look into potential connections between PET/CT produced parameters and immunohistochemistry markers that play diagnostic and prognostic roles in various cancers. To accomplish this, both immunohistochemical and PET/CT techniques were theoretically studied, alongside with a thorough literature review of scientific research aimed at merging these techniques into a favourable common point for the advancement of oncological diagnosis, and for the potential future of early and non-invasive diagnostic methods in cancer. The primary goal of this PhD thesis was to look into potential correlations between immunohistochemical markers commonly used in histopathology, such as Ki67, and tumor diagnosis and prognosis, as well as immunohistochemical markers used in neuroendocrine tumor diagnosis and parameters determined by PET/CT in these cancers.

An extensive review of scientific publications investigating the relationship between the Ki67 antibody, a marker of tumor cell proliferation, and tumor uptake of radioactive compounds in PET/CT revealed ambiguous results and slow scientific progress. As a result, I decided to synthesize the published data in the hopes of obtaining a more concrete overview and to try renewing the scientific community's interest in this field of research. Following that, I endeavored to include the investigation of this probable link, when possible, into subsequent research. Next, I wanted to look into any possible correlations between immunohistochemical markers routinely employed in the diagnosis of neuroendocrine tumors and the absorption of a somatostatin-sensitive radiopharmaceutical utilized in SPECT/CT imaging of these tumors. Furthermore, we also considered relevant serological and urinary markers for follow-up. In a final study, my research was focused on synchronous and metachronous malignant tumors involving thyroid cancer, one of the most frequent malignant diseases in our country, through the analysis of these techniques. Although the retrospective nature of the study and the small number of patients included prevent me from drawing edifying or final general conclusions from my research, the findings have contributed to a better understanding of the currently used diagnostic methods in synchronous and metachronous tumors.

In conclusion, the investigation of correlations between established diagnostic procedures and innovative imaging techniques is an ongoing and exciting challenge aimed to

improve the management of cancer patients. Despite the modest results obtained from this research, this thesis contributed to the effort by seeking to address some concerns regarding the potential relationships that may be derived by exploring this field of medicine.

SUMMARY OF PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1- Ki67 cell proliferation index expression and PET/CT parameters in diverse neoplasms

In this first scientific approach I focused my attention on the correlation between PET/CT parameters and the most used and requested immunohistochemical marker in histopathological reports, namely the Ki67 cell proliferation index. In this regard, a thorough systematic-review type of analysis was made concerning the current state of PET/CT correlations and immunohistochemical stains in various pathologies, with a focus on documented correlations with the cell proliferation index. Additionally, part of the literature analysis focused on future research directions with the potential to replace immunohistochemical validation. The overall review of the recent selected studies indicates that histopathological findings and immunohistochemical stains are essential in their completion and in assessing the validity of the working hypotheses. Research on the correlation between the Ki67 cell proliferation marker and PET/CT parameters has the potential to be an area of great scientific interest, only for certain types of tumours. The combination of properties of microRNAs, together with recent publications proving their feasibility in disease diagnosis, indicate the possibility of their use as validation markers for studies involving the PET/CT hybrid technique.

Study 2 - Correlations between immunohistochemical markers and PET/CT parameters in neuroendocrine tumors

Recent studies have shown a persistent upward trend in the incidence of neuroendocrine tumors with pancreatic and small intestine localisations, predominantly in Europe. This increase, also reported in other parts of the world, could be attributed in part to improved diagnostic capabilities. The development of somatostatin radiopharmaceutical analogs has been crucial in the diagnosis of neuroendocrine tumors (NETs). Functional imaging, particularly somatostatin receptor scintigraphy, has become the preferred option for detecting these tumors as it reliably characterizes the density of somatostatin receptors (SSTRs). Since the early 2000s, Tektrotyd (^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-Tyr3-Octreotide), a somatostatin analog, has been identified as promising candidate in diagnosing neuroendocrine tumors and continues to be studied in current research. This study demonstrated findings consistent with other scientific publications regarding the incidence of neuroendocrine tumors in relation to patient age and the expression of the IHC marker chromogranin A in well- and moderately differentiated NETs. Interpreting the immunohistochemical expression and patterns of specific NET antibodies could be a way to localize the primary origin of NET metastases, in conjunction with clinical and imaging data. The intensity of membranous expression of the CD56 antibody may have an inversely proportional relationship with the uptake of Tektrotyd in neuroendocrine tumors, regardless of tumor differentiation. However, further studies on larger population samples are needed to strengthen and establish this correlation.

Study 3 - Study on histological and immunohistochemical correlations with PET/CT parameters in multiple primary tumors

The aim of interest in this investigation was malignant thyroid pathology. Ki67 immunohistochemical staining is not frequently used in the histopathological diagnosis of thyroid carcinomas. Furthermore, in this type of cancer, a weak to moderate association between the expression of the Ki67 proliferation index and the uptake of the 18F-FDG radiotracer has been observed in the literature, with an index of around 10% for well-differentiated tumors. These factors have steered the research toward characterizing malignant thyroid carcinomas based on their association with other synchronous or metachronous malignancies, investigating them with hybrid PET/CT techniques, and analyzing them alongside immunohistochemical, ultrasound, and serological investigations. This limited sample size study shows the possibility of detecting multiple primary malignant neoplasms through routine imaging investigation even before the onset of symptoms, underscoring the importance of PET/CT hybrid imaging. Increased attention in monitoring oncology patients is therefore warranted in this regard.

General remarks

1. Although the correlation between the Ki67 immunohistochemical antibody, which is used as an indicator of tumor proliferation, and the uptake of the 18F-FDG radioactive glucose analog used in PET/CT is intriguing, it warrants further investigation in future studies only on specific types of tumors such as thymic tumors and gastrointestinal stromal tumors.
2. Based on the findings of our first investigation, this association has been intensively researched in the medical scientific community, with occasionally contradictory results. The most compelling evidence-based claim is that there is a moderately positive association between the two factors.
3. The combination of microRNA characteristics, as well as recent papers confirming their use in disease diagnosis, indicate the possibility of using them as validation markers for future studies involving PET/CT hybrid techniques.
4. The second study in this research examines for the first time the expression of commonly used antibodies in neuroendocrine tumor diagnosis in connection with the uptake of a high sensitivity radiotracer utilized in SPECT/CT. The study's results, limited by the population sample, did not show a meaningful association. However, the degree of Tektrotyd absorption was inversely related to CD56 membrane expression. More studies on larger population samples are needed to confirm this developing idea and its relevance to future research areas.
5. Quantifying membranous or cytoplasmic immunohistochemical marker expression in neuroendocrine tumor metastases, in addition to clinical, imaging, and literature data, might be an additional factor in establishing original tumor localisation.
6. The second investigation found that the levels of serum and urine biomarkers in patients with neuroendocrine tumors did not correlate with imaging parameters or the expression of immunohistochemical antibodies used for diagnosis.
7. Our final research illustrates the undeniable value of PET/CT imaging and the use of immunohistochemical markers in recognizing and monitoring of patients with synchronous and metachronous malignancies.

8. Although synchronous and metachronous tumors are not isolated instances, findings from a 20-year study show that triple relationships of thyroid carcinomas with other malignancies are exceedingly rare (0.05%).

9. Patients with breast or gynecological malignancies should be clinically and radiologically examined to detect any future thyroid tumors early, and vice versa.

Thesis originality and the contributions to the fields

This doctoral thesis accomplishes the following points in terms of originality and addition to the scientific area through the investigations conducted:

First study.

- A focused approach on the correlation between the IHC marker Ki67 and the uptake of 18F-FDG in PET/CT through the analysis of the most recent studies conducted in recent years.

- The focus of this paper on publications that involve clinical studies and have a concrete use in patient treatment.

- Bringing forward for discussion the properties of micro-ARNs as potential future biomarkers in tumor diagnosis and their correlation with PET/CT parameters based on recent publications on the subject

While there have been publications that have addressed this topic in the past, as well as a meta-analysis on the subject, our study focused on recent data and clinical studies, attempting to value both current diagnostic methods as well as future diagnostic techniques with the potential to contribute to this field.

Second study.

- Pilot study on the relationship between immunohistochemical markers and radiotracers often used in the diagnosis and follow-up of patients with neuroendocrine tumors.

- Original analysis of the immunohistochemical markers cromogranin A, sinaptofizin, and CD56 in comparison with scintigraphic parameters, SPECT/CT, Tektrotyd somatostatin analogue, and serological markers obtained in neuroendocrine tumor pathology.

The study of potential correlations between antibody expression used in NET diagnostics and Tektrotyd uptake in SPECT/CT is a first time endeavor. Despite the fact that the study was of limited size and yielded results that showed no direct correlation, the data collected provided new perspectives for future research directions.

Third study.

- A premiere, a retrospective study of malignant thyroid pathology in connection with two other forms of cancer, synchronous or metachronous.

- Emphasis on the importance of routine follow-up in oncology patients using PET/CT for early diagnosis and treatment of a second or even a third primary tumor developed over time.

The probable development of several primary malignant tumors before or after the identification of a thyroid tumor, within relatively short time intervals, has been brought to attention through the study of 20 years worth of medical data. This study contributes by increasing the vigilance of the medical community in preventing the occurrence of secondary and tertiary primary tumors in cancer patients.