Egyetemi doktori (PhD) értekezés

METODIKAI ÖSSZEHASONLÍTÓ ELEMZÉSEK AZ EMLŐRÁK HER-2 ÉS ŐRSZEM NYIROKCSOMÓ DIAGNOSZTIKÁJÁBAN

Dr. Francz Mónika

Témavezető:
Dr. Szöllősi Zoltán Ph.D.

DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2011.

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK 3

1 BEVEZETÉS 4

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS 8

2.1 A HER2 FISH VIZSGÁLATOK IRODALMI ÁTTEKINTÉSE 8
2.2 AZ ŐSZEM NYIROKCSOMÓ VIZSGÁLATOK IRODALMÁNAK ÁTTEKINTÉSE 10

3 ANYAG ÉS MÓDSZER 16

3.1 ANYAG ÉS MÓDSZER A POSEIDON HER2/SE17 DUAL COLOR FISH KIT VALIDÁLÁSÁBAN 16
3.1.1 Tumor minták kiválasztása 16
3.1.2 Szöveti microarray blokk 16
3.1.3 Immunhisztokémiai vizsgálat 17
3.1.4 Fluorescens in situ hibridizáció 17
3.1.5 Statisztikai analízis 18
3.2 ANYAG ÉS MÓDSZER AZ INTRAOPERATÍV ŐRSZEM NYIROKCSOMÓ VIZSGÁLATOK SORÁN 19
3.2.1 A páciensek jellemzői 19
3.2.2 A sebészeti technika 19
3.2.3 Patológiai vizsgálat 20
3.2.4 Statisztikai analízis 23

4 EREDMÉNYNEK 25

4.1 EREDMÉNYEK A POSEIDON HER2/SE17 DUAL COLOR FISH KIT VALIDÁCIÓS VIZSGÁLATA SORÁN 25
4.1.1 A natív adatok 25
4.1.2 Immunhisztokémia 28
4.1.3 Fluorescens in situ hibridizáció 28
4.1.4 A két FISH próba összehasonlítása 28
4.1.5 A FISH kitek és a HercepTest összehasonlítása 33
4.2 EREDMÉNYEK AZ ŐRSZEM NYIROKCSOMÓ INTRAOPERATÍV VIZSGÁLATI MÓDSZEREINEK ÖSSZEHASONLÍTÁSÁBAN 35
4.2.1 Általános eredmények 35
4.2.2 Az egyes módszerekkel, és azok kombinációival kapott eredmények 41
4.2.3 Statisztikai elemzések 44

5 MEGBESZÉLÉS 46

5.1 A POSEIDON HER2/SE17 DUAL COLOR FISH KIT VALIDÁCIÓS VIZSGÁLATA 46
5.1.1 Új megállapítások a validációs vizsgálat során 49
5.2 AZ INTRAOPERATÍV ŐRSZEM NYIROKCSOMÓ VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEINEK MEGBESZÉLÉSE 50
5.2.1 Részletes tapasztalataink az egyes vizsgálattípusokkal kapcsolatban 51
5.2.2 Egyéb gyakorlati tapasztalataink a sentinel nyirokcsomó intraoperatív gyorsdiagnosztikájával kapcsolatban. 59
5.2.3 Új megállapítások az introperatív őrszem nyirokcsomó diagnosztikával kapcsolatban .. 62

6 ÖSSZEFOGLALÁS 64

7 IRODALOMJEGYZÉK 66

7.1 A HIVATKOZOTT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE 66
7.2 A MUNKA ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE 74
7.3 EGYÉB, A JELEN MUNKÁBAN NEM HASZNÁLT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE 75

8 TÁRGYSZAVAK 76

9 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 77

10 MELLÉKLETEK: A MUNKA ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK MÁSOLATA 78

RÖVIDÍTÉSEK

AE1/AE3	- citokeratin koktél (pan-citokeratin)
ÁN	- álnegatív
ÁP	- álpozitív
B 1-5	- a core biopsziák eredményét jelölő kód 1-5
C 1-5	- a citológiai eredményt jelölő kód 1-5
CEP-17	- a 17. kromoszóma centrális régiója
c-ERBB-2	- cellularis erythroblastos leukémia onkogén homológ, 2-es típus
CI	- konfidencia intervallum
CISH	- chromogen in situ hibridizáció
DAB	- 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid
DAPI	- 4,6-diamidin-2-phenylindol
DNA	- desoxyribonucleic acid
DNS	- dezoxiribonukleinsav
EGFR-2	- epidermal growth factor receptor, type 2
ERBB2	- viralis erythroblastos leukémia onkogén homológ, 2-es típus
F	- fagyasztásos vizsgálat
FDA	- Food and Drog Administration
FISH	- Fluorescens in situ hibridizáció
G	- gradus
HE	- hematoxylin-eosin festés
HER-2	- Humán epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa
HG	- high grade (magas grádusú)
HRP	- horseradish peroxydase (tormaperoxidáz)
IC	- imprint citológia
ICK	- immuncitokémia
IHK	- immunhisztokémia
ITC	- isolated tumor cells, izolált tumorsejtek
LG	- low grade (alacsony grádusú)
LINE	- long interspersed element
MBq	- megabequerell
MF	- fluoreszcens mikroszkóphoz való szűrők betűjele
neu	- neuroglioblastoma eredetű onkogén
NPV	- negatív prediktív érték
PBS	- phosphate buffered saline
PPV	- pozitív prediktív érték
RC	- konkordancia korrelációs együttható
RICK	- rapid immuncitokémia
SE17	- a 17. kromoszóma satelit enumerációs próbája (centromérje)
SINE	- short interspersed element
SISH	- silver-enhanced in situ hibridizáció
TMA	- tissue microarray, szöveti microarray, szöveti multiblokk
VN	- valódi negatív
VP	- valódi pozitív
VT	- Vermont (USA tagállam)

1 Bevezetés

A magyar nők körében magasan a leggyakoribb daganatos betegség az emlőrák. A Központi Statisztikai Hivatal adatai szerint pl. 2009-ben 6802 új emlőrákos megbetegedést jegyeztek hazánkban. Ugyanebben az évben 2169 emlőrákos halálozást jelentettek országosan.

A betegség diagnosztikája, terápiája bonyolult algoritmusok által meghatározott multidiszciplináris folyamat, melyben a döntések jó része valamilyen patológiai leleten alapszik.

A daganat szövettani vizsgálattal meghatározandó legfontosabb morfológiai jellemzői a méret, a többgócúság megléte, a sebészeti szélek épsége, a szöveti típus, a differenciáltsági fok (gradus), a nyirokérben vagy vérérben való terjedés, a regionális nyirokcsomók állapota. Ezen kívül speciális vizsgálatokkal minden esetben meg kell határozni a daganat proliferációjának intenzitását, hormonreceptor és HER2 receptor státuszát, és egyre gyakrabban felmerülő igényként a tumor prognosztikai jelentőségű genetikai tulajdonságait. Ezekhez citológiai, klasszikus szövettani, immunhisztokémiai, és molekuláris vizsgálatok hada áll rendelkezésre, melyek helyes megválasztásán múlik végső soron a beteg sorsa. Ebben sokat segítenek a nemzetközi és hazai ajánlások, de azokban is választható eljárások szerepelnek, így végeredményben egy-egy adott munkacsoportnak kell eldönteni, hogy melyik módszert alkalmazza a megengedettek közül, illetve, hogy - kellően megalapozva - az ajánlásban nem szereplő másik metódust választ.

Értekezésemben két, a szakirodalomban intenzíven tárgyalt témakörrel fogok foglalkozni: az emlőrák HER2 státuszát meghatározó FISH vizsgálattal, és az őrszem nyirokcsomók intraoperatív vizsgálati lehetőségeivel. Mindkét kérdés az

emlőrák diagnosztika, illetve kezelés kulcsfontosságú momentuma, mely nagyban befolyásolja a beteg kezelésének menetét.

A daganatban kimutatható HER-2 protein túltermelés fontos negatív prognosztikai jel. Az ilyen daganatok gyorsan nőnek, gyakran recidiválnak, gyorsan adnak áttétet, és általában a hagyományos terápiás módszerekkel szemben kevésbé érzékenyek.(1-4) A HER-2 proteint túltermelő tumorok célzott trastuzumab (HERCEPTIN) terápiájának 1998-as bevezetésével szükségessé vált a HER-2 status meghatározása.(5) A jelentős előnyök, melyek magas költségekkel és potenciális cardiotoxicitással párosulnak, megkövetelik a precíz HER2 meghatározást. A tesztet rutinszerűen kell elvégezni minden emlőrákos páciens esetében mindjárt a daganat első szövettani diagnózisakor.(6)

A jelenleg nemzetközileg elfogadott, és hazánkban is érvényes protokoll szerint első lépésben immunhisztokémiai vizsgálatot kell végezni.(7) Ennek pozitivitása esetén a trastuzumab terápiára alkalmasnak tartható a daganat. Negativitása esetén a daganat elméletileg a trastuzumab terápiára érzéketlen. Az immunhisztokémiai vizsgálat kétes eredménye esetén kell valamilyen in situ hibridizációs technikával vizsgálni, hogy génamplifikáció jelen van-e.

Számos ilyen módszer áll rendelkezésre, de napjainkban, a legszélesebb körben a fluoreszcencia in situ hibridizációt alkalmazzák. Az FDA által jóváhagyott, meglehetősen drága molekuláris tesztek mellett elérhetővé vált a piacon néhány olyan olcsóbb próba is, mely nem rendelkezik ilyen magas akkreditációval, bár bejegyzett in vitro diagnosztikum. Ilyen a Kreatech gyártmányú Poseidon fantázia nevű termékcsaládba tartozó Her2/Neu(17q12) / SE17 (a továbbiakban: HER2/SE17) dual color FISH kit is. Alkalmazásával a FISH vizsgálat ára jelentősen csökkenhetne, kérdés azonban, hogy mennyire megbízható eredményeket ad.

Az emlőrákos betegek terápiáját nagymértékben befolyásoló másik tényező a daganathoz tartozó regionális nyirokcsomók állapota, pontosabban a nyirokcsomókban kimutatható áttétek jelenléte. Ez részben prognosztikai jelként értékelendő, másrészt a közvetlen sebészi beavatkozást is nagyban befolyásolja. Nyirokcsomó áttétek jelenléte esetén általában agresszívebb kemoterápiás kezelés is mérlegelendő.

Az őrszem (vagy sentinel) nyirokcsomó a tumor felől áramló nyirokfolyadék útjába eső első nyirokcsomó, melyben elméletileg a leghamarabb jelennek meg a nyirokkeringésbe esetlegesen bekerülő daganatsejtek. Az őrszem nyirokcsomó pozitivitása esetén 30-60%-ban mutatható ki áttét a mögöttes nyirokcsomókban. Így az őrszem nyirokcsomó vizsgálata alapján el lehet dönteni, hogy érdemes-e felvállalni a jelentős posztoperatív szövődményekkel gyakran kísért teljes axilláris blokkdisszekciót. A nyirokcsomó legpontosabb vizsgálata paraffinos blokkokból metszett preparátumokon lehetséges, ennek azonban csak a műtét után napokkal készül el az eredménye, és pozitivitás esetén második műtétre van szükség.

Amennyiben a nyirokcsomóban lévő daganat már a műtét alatt, valamilyen gyorsdiagnosztikával kimutatható, akkor a műtét kiterjesztése még azzal az egy altatással elvégezhető. Számos módszer, illetve ezek kombinációja jön szóba. Ezek az egyre gyakrabban tárgyalt gyors molekuláris tesztek mellett többnyire fagyasztásos metszetkészítésen és lenyomati kenet vételen alapulnak. Nem véletlen tehát, hogy a szakirodalomban fellelhető egyik legintenzívebben vizsgált kérdéskör az, hogy melyik módszerrel lehet a legmegbízhatóbb eredményeket produkálni.

Dolgozatomban a fagyasztásos metszetkészítés, az imprint citológia és egy ígéretesnek tűnő, de ritkábban alkalmazott technika, a gyors keratin immuncitokémiai vizsgálat eredményeit vetem össze a végleges diagnózissal.

Célkitűzések:

A) A Poseidon HER2/SE17 FISH kit validálása az emlőrák HER2 amplifikációjának mérésében a PathVysion HER2/CEP17 FISH kithez viszonyítva.

- A Poseidon HER2/SE17 FISH kit és a PathVysion HER2/CEP17 FISH kit eredményeinek összevetése
- A HercepTest-tel végzett immunhisztokémiai vizsgálatok eredményének összevetése a kétféle FISH próbával kimutatott eredményekkel.
- A Poseidon HER2/SE17 FISH kit használatával kapcsolatos tapasztalatok összefoglalása

B) Az emlőrákos betegek műtéte során eltávolított őrszem (sentinel) nyirokcsomók intraoperatív diagnosztikai lehetőségei.

- Az őrszem nyirokcsomó vizsgálat technikájával kapcsolatos irodalom áttekintése.
- Az őrszem nyirokcsomó intraoperatív diagnosztikájában használt rapid immuncitokémiai vizsgálat technikájának ismertetése.
- Az intraoperatív fagyasztásos szövettani vizsgálattal, a lenyomati citológiával, és a rapid immuncitokémiai vizsgálattal nyert eredmények összevetése.
- Az őrszem nyirokcsomók napi rutin intraoperatív diagnosztikájában hasznosítható tapasztalatok összegzése.
- A tapasztalatok alapján az intraoperatív őrszem nyirokcsomó diagnosztika optimálisnak tűnő algoritmusának felállítása

2 Irodalmi áttekintés

2.1 A HER2 FISH vizsgálatok irodalmi áttekintése

A HER-2 a humán epidermális növekedési faktor receptor család 2. típusa. A receptor sejtfelszíni transzmembrán lokalizációjú, tirozin-kináz aktivitással rendelkező enzim, melynek saját ligandját (szemben a család többi tagjával) még nem sikerült azonosítani. (8) Aktiválódását a receptorcsalád valamelyik másik tagjával történő összekapcsolódása (heterodimerizációja) indítja be. (9) A HER2 aktiválódása a RAS jelátviteli úton keresztül a sejt szaporodását indítja be, a p13K úton a sejt apoptózisának gátlásával a túlélést biztosítja. (10,11) Génje: az EGFR-2 (más néven HER-2/neu, vagy c-ERBB-2) a 17. kromoszóma hosszú karjára lokalizálódik. (12) A gén megsokszorozódása, amplifikációja a fehérje felszaporodásához vezet, a receptor nagy tömegben jelenik meg a sejt felszínén, és itt immunhisztokémiailag is kimutathatóvá válik. (13)

A HER-2 status megállapítására bevezetett, a vizsgálat típusát és optimális kivitelezését tekintve legjobb metódus meghatározása sokáig ellentmondásos volt.

Az immunhisztokémiai vizsgálat (IHK) a legtöbb rutin szövettani laborban végezhető, és számos gyártó HER-2 ellenes primer antitest reagense érhető el a piacon. (14,15) Az antitestek megbízhatósága, specificitása azonban igen változó, nagyon sok függ az alkalmazott technológiától, utólagos vizsgálat esetén a blokk tárolásától és a kiértékelés is meglehetősen szubjektív.(16) A kiértékelés szubjektivitását hivatott csökkenteni az a scoring szisztéma, melyet az FDA hagyott jóvá, és amely a reakció erősségét négy csoportba sorolja (0, 1+, 2+, 3+). (17,18) Ennek ellenére az értékelés így is jelentős szubjektív elemeket tartalmaz, reprodukálhatósága, különösen a 2+ erősség megítélésében igen alacsony. Ezt támasztja alá egy hazai felmérés is, mely

a HER-2 immunhisztokémiai reakciók értékelését hasonlította össze a résztvevő intézetek között. (19)

Gyakori tapasztalat volt, hogy az immunhisztokémiai vizsgálattal pozitívnak ítélt tumor nem reagált kellőképpen a kezelésre. (20) Ez összefüggésben áll azzal a jelenséggel, hogy az immunhisztokémiai vizsgálattal pozitívnak ítélt esetek egy részében nem mutatható ki genetikai vizsgálattal valódi gén amplifikáció. A jelenség valószínűleg több okra vezethető vissza, ezek egyike lehet a 17. kromoszóma poliszómiája, amely az 1 kromoszómára lokalizálódó gének számának megnövekedése, tehát valódi génamplifikáció nélkül is magyarázza a fehérje immunhisztokémiailag kimutatható túlprodukcióját.(21-23)

A FISH esetén a fluoreszkáló jelet direkt módon le lehet számolni a daganatsejtekben. A dual color próbákkal egyszerre jelölhető a 17. kromoszóma centromérje és a keresett HER-2/neu (c-ERBB-2) gén locusa. Ezeket sejtenként leszámolva meghatározható az egy sejtmagra illetve egy kromoszómára eső gének száma. Ez a fajta mennyiségi kiértékelés a FISH vizsgálatot sokkal objektívebbé, ezáltal megbízhatóbbá teszi. (24-27) Az összehasonlító elemzések szerint, az immunhisztokémiailag HER-2 negatívnak (0, 1+) ítélt tumorok FISH vizsgálattal 92-98 %-ban nem mutatnak gén amplifikációt, és szintén magas a konkordancia a két vizsgálat között (89-100%) az immunhisztokémiailag 3+ erősségű HER-2 pozitivitást mutató tumorok esetén. Az immunhisztokémiailag 2+ erősségű daganatoknak azonban csupán 23-25 %-a mutat gén amplifikációt. (28-32)

Ezek az eredmények lehetővé teszik, hogy az immunhisztokémiai vizsgálatot előszűrő tesztként lehessen alkalmazni a daganat HER-2 státuszának meghatározására. Tekintettel arra, hogy a FISH vizsgálat igen drága, és a patológiai laborok jó részében nem áll rendelkezésre, a ma érvényben lévő ajánlások az FDA

által elfogadott scoring rendszerrel immunhisztokémiailag 2+ erősségűnek ítélt tumorok in situ hibridizációs alapú (FISH, CISH, SISH) vizsgálatát írják elő.(33-36) Természetesen a különböző gyártmányú FISH tesztek is eltérő értékűek. Az FDA honlapján elérhető adatok szerint az USA-ban három FISH alapú HER2 reagens van engedélyezve erre a vizsgálatra:

1. A PathVysion HER2 DNA Probe Kit (Abbott-Vysis, Downers Grove, Illinois, USA)
2. ONCOR® INFORM™ HER2 FISH kit (Ventana Medical Systems, Tucson), melyet csak prognosztikai markerként hagytak jóvá.
3. DakoCytomation Her2 FISH pharmDx™ Kit (Dako, Glostrup, Dánia)

Viszonylag újkeletű a piacon a Kreatech által gyártott Poseidon ERBB2, HER2/Neu(17q12)/SE17 FISH próba (továbbiakban Poseidon HER2/SE17 FISH kit). A kit alkalmasnak tűnik rutin HER-2 meghatározásra, és lényegesen olcsóbb, mint a többi próbák. Egy 2010-ben megjelent publikáció beszámol arról, hogy a teszttel igen magas interobserver reprodukábilitást értek el.(37)

Amennyiben a reagens megbízható, gazdaságosabbá tehetné a FISH vizsgálatokat. Jelen munkánk során a reagens validálását végeztük el a PathVysion HER2 DNA Probe Kithez (továbbiakban PathVysion HER2/CEP17 FISH kithez) viszonyítva.

2.2 Az őszem nyirokcsomó vizsgálatok irodalmának áttekintése

Az emlőkarcinóma legfontosabb kórjósló tényezője az azonos oldali hónalji nyirokcsomó státusz. Ennek vizsgálata eredetileg a hónalji nyirokcsomóblokk teljes kiirtásával történt meg, melyet az emlő teljes, vagy részleges eltávolításával egy időben végeztek (46). A rutinszerűen végzett axilláris blockdissectio pontos adatokat biztosított tumor stádiumáról és az adjuváns kezelés megtervezéséhez. A módszer

súlyos szövődménye, az uralhatatlan lymphoedema azonban azonos oldali felső végtagon jelentős életminőség romláshoz vezetett.(47) Igazán előnye csak a nyirokcsomó metastasist adó daganatos esetekben volt, melyek azonban az összes ilyen beavatkozáson átesetteknek csupán kb. a 43-45 %-a (48-50).

Az emlőrák szervezett szűrésének bevezetése után, valamint a fejlődő diagnosztikus technikának köszönhetően gyakoribbakká váltak a korai stádiumú emlődaganatok.(51) Ez pedig kérdésessé tette a teljes hónalji blokk eltávolításának szükségességét. (52,53)

Az őrszem nyirokcsomó fogalmát először Gould EA és munkatársai alkalmazzák egy 1960-ban megjelent cikkben, mely a parotis tumorok regionális nyirokcsomóit vizsgálja. Az őrszem nyirokcsomó - definíciójuk szerint- az első olyan nyirokcsomó, mely a tumor területét drenálja. (54) A következő évtizedekben fokozatosan terjedt el az elmélet és a gyakorlat a penis, vulva, cervix daganatok területén. Végül is a melanoma sentinel nyirokcsomó biopsziájának általánosan elfogadott elvét követően merült fel az emlőrákok esetében történő alkalmazás ötlete.

Krag és munkatársai által 1993-ban közölt cikkben az emlődaganatok sentinel nyirokcsomójának radio-lokalizálásáról, és sebészi eltávolításáról ír (55), majd ezt követően jelenik meg a Giuliano és munkatársai által írt cikk, mely részletesen taglalja a 174 esetből 114 esetben sikeresen végrehajtott sentinel nyirokcsomó eltávolítás technikáját. Ők vitális kék festékkel jelölték a nyirokcsomót (56).

A rohamosan elterjedő őrszem nyirokcsomó technika jelentősen megváltoztatta az axillaris nyirokcsomó staging gyakorlatát. Ha az őrszem nyirokcsomó tumormentes, akkor a többi nyirokcsomóban csupán 1 % az esélye daganat jelenlétének (57)

Ezért, ha műtét közben megállapítható, hogy a sentinel nyirokcsomó tumormentes, akkor elkerülhető a teljes hónalji nyirokcsomóblokk kiirtása, így megóvható a páciens a felesleges szövődményektől.(58-63**)**

Az eltávolított őrszemnyirokcsomó intraoperatív vizsgálatának szokásos módja a fagyasztásos metszetkészítés, de ezzel csaknem egy időben jelentek meg irodalmi közlések az imprint citológia, valamint a két metódus együttes alkalmazásáról. A fagyasztásos vizsgálat előnye a magas szenzitivitás, de a metszetek gyakran művileg erősen károsodottak, a szövet tönkremegy, a metszetek elkészítése viszonylag hosszadalmas, bár kétségtelen, hogy a kész metszetek vizsgálata - gyakorlottságtól függően - relatíve kevés időt igényel. Ezzel ellentétben az imprint citológiai preparátum gyorsan elkészül, többnyire részlet gazdag, a vizsgálandó minta megőrződik a későbbi részletes feldolgozás céljára. Azonban az imprint citológia hátránya, hogy a kenetek értékelése több időt vesz igénybe, gyakran megtörténik, hogy a daganatsejtek relatíve kis számban vannak jelen, így nagyobb az esélye, hogy a vélemény bizonytalan (64- 74).

Magyarországon viszonylag hamar megjelenik a technika, 2002–ben már felmérés születik a hazai gyakorlatról (75). A módszer elterjesztése elsősorban Cserni Gábor munkásságához köthető. Számos, e tárgyban megjelent cikke után 2004-ben Európa több intézetével együttműködve mérte fel a sentinel nyirokcsomók feldolgozásának technikáját. A felmérésben résztvevők vagy fagyasztásos technikával, vagy imprint citológiával, vagy a kettő kombinációjával vizsgálták intraoperatíve az őrszem nyirokcsomókat, azonban leggyakrabban az akár egy, akár több szintről készített fagyasztást végezték. (76)

Mivel mindkét módszer rendelkezik jelentős hátrányokkal is, érthető a törekvés kezdetektől fogva, hogy egyéb technikai kiegészítésekkel próbálják a hátrányokat minimalizálni.

Viale G és munkatársai 1999-ben megjelentettek egy cikket a sentinel nyirokcsomó intraoperatív vizsgálatáról, melynek részeként immunhisztokémiai vizsgálatot alkalmaztak a fagyasztott preparátumon. Az elsődleges céljuk akkor még annak a bizonyítása volt, hogy a sentinel nyirokcsomó státusza alapján biztonságosan lehet következtetni az axilla többi nyirokcsomóinak állapotára. Az intraoperatív vizsgálatra küldött nyirokcsomót 50 mikrononként teljesen elfaragták, valamennyi szintről lehúzott egyik metszeten HE festést, egy másikon pedig immunhisztokémiai vizsgálatot végeztek. Ezzel a rendkívül precíz, ámbár kifejezetten időigényes és költséges metódussal arra a következtetésre jutottak, hogy az immunhisztokémiai vizsgálat nem javította a gyorsdiagnosztika szenzitivitását szemben az egyszerű HE festéssel. Természetesen a vizsgálat a fő célját elérte, nevezetesen bizonyította a sentinel nyirokcsomó eltávolítás létjogosultságát. (77)

A fagyasztásos vizsgálat és az immunhisztokémiai vizsgálat kombinálása egymással tehát viszonylag hamar felmerült lehetőségként, de a módszer hosszadalmassága miatt nem tűnt célszerűnek. 2002-ben Karsten és munkatársai a sentinel nyirokcsomók fagyasztott metszetein cytokeratin reagenssel végzett rapid immunfluorescentiás vizsgálat eredményeit közölték le. A metódus leírásuk szerint 10 perc alatt kivitelezhető, és igen magas szenzitivitásúnak ítélték (78). 2003-ban Beach és munkatársai a sentinel nyirokcsomó fagyasztott metszetén végzett rapid cytokeratin immunhisztokémiai vizsgálat szenzitivitását 57%-osnak mérték, így nem tartották megbízhatónak a módszert, szemben a fagyasztásos metszet készítéssel

(79). A témában megjelent cikkek többsége azonban a módszert magas érzékenységűnek, megbízhatónak találta.(80-82)

Finn kutatók (Leikola J. P és munkatársai) 2005-ben egy igen széles beteganyagon végzett vizsgálatuk eredményeként megállapították, hogy az intraoperatív sentinel nyirokcsomó diagnosztika módszerei közül a rapid immunhisztokémiai vizsgálat a lobularis típusú emlőrákok áttéteinek és a bármilyen típusú emlődaganatból származó micrometastasisoknak és izolált tumorsejt-csoportoknak a detektálásában használható a leginkább. Ők a lobularis invazív emlőrák áttétének immunhisztokémiával végzett gyorsdiagnosztikájában 87%-os szenzitivitást mértek, míg a HE festett fagyasztott metszettel vizsgált esetekben csak 66%-ban tudták azonosítani a metastasist. Vizsgálatuk érdekessége volt, hogy a 438 esetből álló IHK csoport adatait egy másik, 557 fős, HE festett fagyasztásos módszerrel vizsgált csoport adataihoz hasonlították. Így kiküszöbölték azt a lehetséges torzító tényezőt, amikor az egyik módszer eredményének ismerete befolyásolja a másik módszerrel végzett vizsgálat pontosságát az azonos vizsgálati anyagon. (83)

Hasonló eredményre jutottak dél-koreai kutatók, Choi Y.J és munkatársai 2006-ban közölt cikkükben a módszert 85%-os szenzitivitásúnak találták, és a legfontosabb szerepét a micrometastasisok és izolált tumorsejt csoportok észlelésében látták. (84)

Az imprint citológiai vizsgálat legfontosabb előnye a fagyasztásos vizsgálattal szemben, hogy a fagyasztásra nem alkalmas méretű nyirokcsomókból is elvégezhető. Emellett a nagyméretű nyirokcsomókat felszeletelve annak valamennyi szeletéről adhat felvilágosítást szemben a legtöbbször nem teljesen reprezentatív fagyasztásos vizsgálattal. A fagyasztott metszeteken végzett rapid immunhisztokémiai vizsgálat mellett tehát a lenyomati keneteken is megkísérelték az immuncitokémiai vizsgálat kivitelezését. Ezen a téren Salem AA és munkatársi

fejtettek ki kimagasló aktivitást (85,86). Az eredmények ezzel a metódussal is bíztatóak voltak, megfelelő gyakorlottsággal vizsgálva a fagyasztásos metszeteken alkalmazott rapid immunhisztokémiai vizsgálathoz hasonló szenzitivitás érhető el (87,88).

A sentinel nyirokcsomó intraoperatív diagnosztikájában is teret hódítanak a molekuláris módszerek, mint például a GeneSearch BLN assay (Veridex, LLC, Warren, NJ) és a One-step Nucleic Acid Amplification assay (Sysmex, Japan), melyeket intraoperatív diagnosztikára fejlesztettek ki. Ezek szenzitivitása és specificitása hasonló a végleges szövettani vizsgálatéhoz. A molekuláris vizsgálatok azonban, ellentétben az eddig felsorolt technikákkal, nem alkalmasak a metastasis méretének, szöveti típusának meghatározására, ami pedig fontos a többi nyirokcsomóban történő metastasis megjelenés valószínűsége szempontjából. Mivel a molekuláris vizsgálattal az egész nyirokcsomót vizsgálják, így detektálható az összes, random szerűen jelenlévő olyan daganatsejt is, melyek elsikkadnának a hagyományos módszerekkel. (89,90)

Érdekességképpen megemlítek egy teljesen új megközelítésű intraoperatív sentinel nyirokcsomó diagnosztikai technikát, mely a szerzők szerint a lenyomati kenetekkel, és fagyasztásos vizsgálattal egyenértékű eredményeket produkál a nyirokcsomó friss metszéslapjáról készült spektroszkópos felvétel alapján. A 2010-ben leközölt módszer, a műtőben elhelyezett készülékkel elvégezhető, teljesen digitális képelemzés alapján, patológiai segédlet nélkül ad véleményt, és megfelelő adatfeltöltés (tanítási fázis) után, - közleményükben bőségesen illusztrálva, - a micrometastasisokat is képes észlelni.(91)

3 Anyag és módszer

3.1 Anyag és módszer a Poseidon HER2/SE17 dual color FISH kit validálásában

3.1.1 Tumor minták kiválasztása

2006-és 2007 kötött diagnosztizált 122 invazív emlőrákos beteget választottunk ki. Minden esetben egy patológus felülvizsgálta a korábban készült HE metszeteket és immunreakciókat és ellenőrizte az eredeti diagnózis helyességét. A beválaszthatóság feltétele volt, hogy a műtéti preparátumból parafinos blokkok legyenek elérhetők. A metszetek alapján választottuk ki a rendelkezésre álló paraffinos blokkokból a tovább vizsgálandó, tumort tartalmazó részletet.

3.1.2 Szöveti microarray blokk

60 lokuszos szöveti microarray (TMA) blokkokat alkottunk a mintákból származó 1 mm-es szövethengerekből microarray blokképítő eszköz segítségével. (TMA Master, 3D Histech, Budapest, Magyarország). Páciensenként 3 szövethengert építettünk be, és egy normál máj részletet az orientálhatóság céljából. A TMA blokkokat korábban Kononen és munkatársa által leírt metódust alapul véve állítottuk össze. (38)

A szövethengerek pontos lokalizációját alfabetikus koordináták segítségével táblázatban rögzítettük. A core-okat az eredeti, HE metszetek alapján a tumor reprezentatív területeiből választottuk ki. Számolva a tumor potenciális heterogenitásával minden eredeti paraffinos tumorszövet centrumából, és két átellenes széléből vettünk 1-1 szövethengert.

A TMA blokkokból 4 μm vastag metszetet húztunk le felületkezelt tárgylemezekre. Minden blokkból készültek HE festett metszetek is részben a morfológiai tájékozódás elősegítésére, részben, hogy leellenőrizzük a szövethengerek tartalmát. Amennyiben

valamelyik szövethenger nem tartalmazott tumorszövetet, a szükséges lokalizációból újabb részletet építettünk be helyette.

3.1.3 Immunhisztokémiai vizsgálat

A TMA metszetek immunhisztokémiai vizsgálatát HercepTest kittel végeztük (Dako, Glostrup, Denmark) a használati előírás szerint. Röviden: az antigén feltárás pH 7,2 citrátpufferben (0,1 mol/l,) 40 percig, 95 ℃-os víz fürdőben történt. Az immunreakciókat DAKO autostainer (Dako) végezte. A reakciót 3,3'diaminobenzidin (DAB) chromogénnel vizualizáltuk. Valamennyi egyszerre végzett IHK reakció mellett pozitív és negatív kontrollokat is alkalmaztunk. Az eredményt a HercepTestre kidolgozott és az FDA által jóváhagyott, a membrán festődés mintázatát és erősségét alapul vevő pontrendszert követve értékeltük ki. Az immunreaktivitás kétes eredményű volt (2+), ha a daganatsejtek több mint 10%-a mutatott enyhe, vagy közepes erősségű komplett membránfestődést, vagy kevesebb, mint 30%-a mutatott erős körkörös komplett reakciót. Biztosan pozitív (3+) volt a reakció, ha az invazív daganatsejtek több mint 30%-a mutatott intenzív komplett membránfestődést. Ha a membránfestődés hiányzott, vagy az invazív sejtek kevesebb, mint 10%-ában jelentkezett, akkor a reakciót negatívnak minősítettük (0, vagy 1+). A három szövethengerből mindig a legmagasabb értéket vettük figyelembe.

3.1.4 Fluorescens in situ hibridizáció

A TMA metszeteket xilolban deparaffináltuk és etanolban rehidráltuk. A tárgylemezeket a Vysis által gyártott Paraffin Pretreatment II kittel kezeltük a használati utasítás szerint. Főbb vonalakban: a lemezeket 37 ℃-os vízfürdőben 6 percig proteáz-K oldattal kezeltük. Öblítés és levegőn való szárítás után 10 µl próbát tettünk mindegyik TMA lemezre. Egymástól elkülönítve a Vysis PathVysion HER2 / CEP17 próbáját és a Kreatech Poseidon HER2 / SE17 próbáját alkalmaztuk. Fedés

és gumi tömítővel való lezárás után a metszeteket 73°C-on 5 percig denaturáltuk, majd ezt követően egy éjszakán át 37 °C-on hybridizáltuk. A denaturálást és hibridizálást StatSpin® ThermoBrite hibridizációs készülékkel végeztük. A hibridizáció után a metszeteket mostuk, majd 20 µl DAPI-val (4,6-diamidin-2-phenylindol) festettük. A FISH szignálokat Olympus BX51-es fluoreszcens mikroszkóppal azonosítottuk. A filterpárt a PathVysion kithez optimalizáltuk. A HER2 locus specificus azonosító jel és a centromér azonosító szignál (CEP17 és SE17) arányát tumoronként 60 tumorsejten, 100-szoros immerziós nagyítással számoltuk le. Pozitív HER2 amplifikációnak tartottuk, ha a HER2 szignál és a 17. kromoszóma aránya 2, vagy annál több volt. Low-grade amplifikációt állapítottunk meg, ha az arány 4 alatt volt, és a 4, vagy e fölötti arányt high-grade amplifikációnak minősítettük. Ha a 17. kromoszóma sejtenkénti számának átlaga 2,5 fölött volt, polysomiát állapítottunk meg.

3.1.5 Statisztikai analízis

A folytonos változóként kifejezett FISH eredményekre vonatkozóan az eljárások közötti egyezést konkordancia korrelációs együtthatók (RC) (39,40) és Bland–Altman-féle 95%-os egyezési határok kiszámításával értékeltük. (41)

Az adathalmaz centrumának vizualizálására a redukált főtengelyt, azaz az átlagok metszéspontján a szórások hányadosának megfelelő meredekséggel áthaladó egyenest alkalmaztuk. A kategorikus kimenetelek közötti egyezést a Kappa-statisztikával értékeltük, az osztályok számának megfelelően analitikus vagy bootstrap-alapú eljárással képezve annak konfidencia-intervallumát (CI)(42)

Specificitás, szenzitivitás, pozitív és negatív prediktív érték, helyes osztályozási hányad, valamint ezek binomiális egzakt konfidencia-intervalluma leírásával jellemeztük az olyan bináris kimenetelű tesztpárokat, amelyek esetében az egyik

teszt osztályozási teljesítményének értékeléséhez a másik teszt referenciának volt tekinthető.

3.2 Anyag és módszer az intraoperatív őrszem nyirokcsomó vizsgálatok során

3.2.1 A páciensek jellemzői

Munkánk alapját a nyíregyházi Jósa András Oktatókórház Pathológiai Osztályán a napi rutin diagnosztika során 2009. február és november között végzett prospektív adatgyűjtés adja. Preoperatíve citológiával (C3-C5), vagy core-biopsiával (B3-B5) diagnosztizált, majd a végleges szövettani feldolgozással malignusnak bizonyult emlőelváltozással operált olyan páciensek esetei kerültek bele a vizsgálatba, akiknél intraoperatív sentinel vizsgálat történt, függetlenül attól, hogy megelőzőleg részesültek-e neoadjuváns kezelésben.

A sentinel nyirokcsomó eltávolítás indikációja a C3-C5 és B3-B5 emlőelváltozás mellett a citológiailag negatív, vagy nem, illetve sikertelenül vizsgált nyirokcsomó státusz volt.

3.2.2 A sebészeti technika

Valamennyi páciens esetében a műtétet megelőző napon nyirokcsomó scintigráfiát végeztek. Ennek során a detektálás előtt átlag 24 órával 0,2 ml Nanocoll-t fecskendeztek a tumorba. A Nanocoll kevesebb, mint 80 nm-es részecskeméretű human albumin colloid, melyet 100 MBq erősségű 99mTc-mal jelöltek (Nycomed Amersham Sorin Zrt. Saluggia, Olaszország).

Az operáció alatt kézi vezérlésű gamma detektorral térképezték fel a nyirokcsomókat. Őrszem nyirokcsomónak minősítették a legintenzívebben jelző nyirokcsomót, valamint az összes olyan csomót a környezetében, mely a legintenzívebb jel 25 %-át meghaladó erősséget mutatott. Első lépésben a nyirokcsomót távolították el, majd ezután történt az emlőben lévő elváltozás

operációja. Ez idő alatt nyirokcsomót osztályunkra küldték gyorsdiagnosztika céljából.

Amennyiben az intraoperatív patológiai vizsgálat metastasist igazolt az őrszem nyirokcsomóban, az elsődleges sebészi ellátás során a hónalji nyirokcsomók I. és II. szintjét is disszekálták a vena axillaris magasságáig. Az intraoperatív sentinel nyirokcsomó diagnosztika negatív, vagy bizonytalan véleménye esetén további nyirokcsomót az első műtétben nem távolítottak el. Szintén nem folytatták a műtétet akkor, ha a sentinel nyirokcsomó intraoperatív vizsgálata izolált tumorsejtek jelenlétét detektálta, vagy vetette fel. Amennyiben az intraoperatív patológiai diagnózis a későbbi részletes szövettani feldolgozással fals negatívnak bizonyult, második műtétként végezték el az I. és II. axilláris nyirokcsomószint eltávolítását.

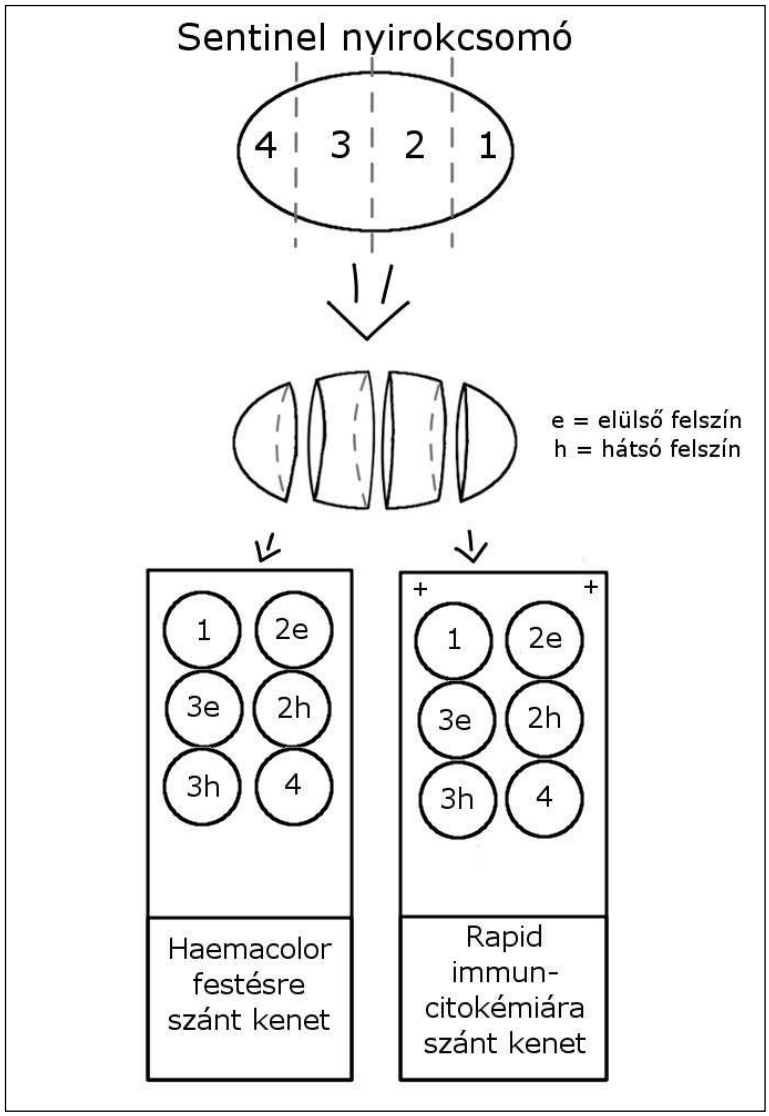
3.2.3 Patológiai vizsgálat

3.2.3.1 Lenyomati kenetek készítése:

Az őrszem nyirokcsomót először megtisztítottuk a külső zsírszövettől, majd 1,5-2 mm vastag szeletekre vágtuk a hosszanti tengelyére merőleges síkban. Minden metszéslapról egyszerre két lenyomatot készítettünk két különböző felületkezelt tárgylemezre úgy, hogy a frissen vágott metszéslapra finoman rányomtuk az üveget. Ügyeltünk, hogy az azonos metszési síkokból származó lenyomat azonos helyre kerüljön mindkét lemezen, és minél sűrűbben, de egymást nem fedve legyenek a lenyomatok a tárgylemezen. Így két egyforma mintázatú lenyomatot nyertünk, ahogyan az 4.1. ábra mutatja.

Az egyik lenyomati kenetet Hemacolorral (Merck, Darmstadt, Germany) festettük, a másikon intraoperatív (rapid) immuncitokémiai vizsgálatot végeztünk a Saalem A és munkatársai által leírt metódust alapul véve.(86)

4.1. ábra. Lenyomati preparátumok készítése a sentinel nyirokcsomóból
Sematikus ábra.



3.2.3.2 Hemacolor festés:

A levegőn megszárított kenetet Mercofix (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) fixáló spray-vel fújjuk le, 4 perc fixálás után, öblítés nélkül Hemacolor 2-es oldatba, majd 10 mp festés után, öblítés nélkül Hemacolor 3-as oldatba (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) tesszük. 20 mp után puffer tablettából készített pH 7,2-es puffer oldatban 45 mp-ig tartjuk. Öblítés desztillált vízzel, szárítás szobahőmérsékleten, majd fedés xylolból.

3.2.3.3 Rapid immuncitokémiai reakció:

Az előkezelt lemezre készített a lenyomati kenetet 2 percig szobahőmérsékleten szárítottuk, majd 30 másodpercre fixáltuk hűtött acetonban, ezután szobahőmérsékleten 1 percig szárítottuk, lemostuk fiziológiás sóoldatban, majd öblítettük foszfát pufferben (PBS). A rapid immuncitokémiát 1:100 hígítású anti-cytokeratin (AE1/AE3; Dako, Glostrup, Denmark) primer immunsavóval végeztük. A primer antitesttel 3 perc 10 másodpercig inkubáltuk a preparátumot 37 ℃ fokon, termosztátban, majd PBS pufferrel mostuk. Ezt követően polymer horseradish peroxidase-zal (HRP) jelölt szekunder antitesttel (EnVision Detection Kit, Dako) inkubáltuk újabb 3 perc 10 másodpercig, 37 ℃ fokon , termosztátban. Mosás után diaminobenzidinnel hívtuk elő a reakciót, majd hematoxylin magfestést alkalmaztunk. Az immunreakció önmagában 12 percet, a teljes procedúra megközelítőleg 20 percet vett igénybe.

3.2.3.4 Fagyasztásos vizsgálat

Emellett az 5 mm-es, vagy annál nagyobb nyirokcsomó egyik szeletéből fagyasztott metszetek is készültek hematoxylin-eosin festéssel. A fagyasztásos vizsgálatra a makroszkóposan gyanús területből igyekeztünk kivágni. Amennyiben a nyirokcsomó szabad szemmel épnek tűnt, bőséges parenchymájú területet választottunk.

A kiválasztott mintát először szénsavhóban lehűtött petroléterben lefagyasztottuk, majd Microm HM550 típusú kryostatban -20℃ fokon, 1 0 µm-es sorozatmeszeteket készítettünk. A szövettani és citológiai leleteket összevetettük az immuncitokémiai preparátummal. Az eredményt telefonon közöltük a műtőben lévő operatőrrel.

A megmaradt mintát 4% neutrális pufferelt formalinban fixáltuk, több nyirokcsomó esetén külön jelöléssel.

3.2.3.5 A sentinel nyirokcsomó végleges szövettani vizsgálata

A végleges szövettani értékelést a nyirokcsomó szeletek formalinban fixált, paraffinba ágyazott blokkjainak első szintjéből készült HE festett metszetek, és a harmadik réteg metszetein elvégzett cytokeratin (AE1/AE3; Dako, Glostrup, Denmark) immunhisztokémiai reakciók alapján végeztük.

3.2.3.6 A kapott leletek értékelése

A tumor és nyirokcsomó stádiumot a TNM 6 alapján állapítottuk meg. Az őrszem nyirokcsomó micrometastasisának véleményeztük az olyan metastaticus gócokat, melyek legnagyobb átmérője nagyobb volt, mint 0,2 mm, de nem volt nagyobb, mint 2 mm. Izolált tumorsejteknek tartottuk a maximum 0,2 mm-es, és kisebb sejtcsoportokat. (92) Bármely méretű metastasist (macro-, micrometastasis, izolált tumorsejt) pozitív eredménynek tekintettünk függetlenül attól, hogy a jelenleg érvényes kezelési protokollok szerint az eredmény milyen további teendőt indikált. (Tehát az N0-ITC nem tette szükségessé az axillaris blokk eltávolítását.) Az értékelés során a bizonytalan eredményt negatívnak vettük. Szintén negatívnak vettük a bármilyen okból sikertelenül végzett vizsgálatot.

Ezen kívül meghatároztuk a sentinel nyirokcsomóhoz tartozó emlődaganatok szöveti típusát, annak notthinghami hisztológiai grádusát az Elston-Ellis által módosított Scarff–Bloom–Richardson gradálás szerint.(93,94)

3.2.4 Statisztikai analízis

A végleges szövettani vizsgálat eredményeit összegeztük: a tumor szöveti típusa, mérete, grádusa, a sentinel nyirokcsomó végleges eredménye. 95%-os konfidencia intervallum mellett meghatároztuk az imprint citológia, a fagyasztásos vizsgálat, és a rapid immuncitokémia szenzitivitását, specificitását, pozitív és negatív prediktív értékét az őrszem nyirokcsomóban lévő metastaticus daganatsejtek detektálása

szempontjából. Ugyanezen értékeket adtuk meg az egyes vizsgálómódszerek következő kombinációira is: imprint citológia és fagyasztott metszet, fagyasztott metszet és rapid immuncitokémia, imprint citológia és rapid immuncitokémia valamint a három módszer együttes alkalmazása. Viszonyítási alapnak a formalinfixált, paraffinba ágyazott sentinel nyirokcsomóból készült HE-festett metszetek és pancytokeratin immunhisztokémiai vizsgálattal értékelt preparátumok eredményét tekintettük.

4 Eredménynek

4.1 Eredmények a Poseidon HER2/SE17 dual color FISH kit validációs vizsgálata során

4.1.1 A natív adatok

Az immunhisztokémiai, és a kétféle FISH reakciók eredményeit a 4.1. táblázat tartalmazza.

4.1. Táblázat A HerCept Test (IHK), a PathVysion HER2/CEP17 FISH és a Poseidon HER2/SE17 FISH vizsgálatok eredményei.
(IHK= immunhisztokémia, PV=PathVysion, P=Poseidon, H=a HER2 gén magonkénti átlagos kópiaszáma, C= a 17. kromoszóma centromérjének átlagos magonkénti száma, R= H/C arány, HG=high grade amplifikáció, LG=low grade amplifikáció; vastagon szedett szám = polysomia)

Eset sz.	IHK	PV-H	PV-C	PV-R	PV eredmény	P-H	P- C	P-R	P eredmény
1	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
2	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
3	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
4	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
5	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
6	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
7	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
8	1+	8,5	2,2	3,86	LG	9,5	2,3	4,13	HG
9	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
10	0	4,6	2	2,3	LG	4,8	2,1	2,29	LG
11	2+	6,8	2,2	3,09	LG	6,6	2,3	2,87	LG
12	0	2,2	2,1	1,05	neg	2,3	2,1	1,1	neg
13	1+	4,3	2,1	2,05	LG	4,4	2,1	2,1	LG
14	0	1,8	1,9	0,95	neg	1,9	1,8	1,1	neg
15	1+	3,1	2,1	1,5	neg	2,9	2	1,45	neg
16	2+	2,5	2,4	1,04	neg	2,4	2,3	1,04	neg
17	1+	2,1	2	1,05	neg	2	2	1	neg
18	3+	5,8	2,1	2,76	LG	4,8	2,1	2,29	LG
19	1+	1,7	1,6	1,06	neg	1,8	1,6	1,13	neg
20	3+	14,7	2,3	6,4	HG	16,2	2,2	7,36	HG
21	2+	2,1	2	1,05	neg	2	2	1	neg
22	3+	24,3	2,4	10,125	HG	23,6	2,4	9,83	HG
23	2+	2,3	2,2	1,05	neg	2,2	2	1,1	neg
24	3+	25,3	2,3	11	HG	26,6	2	13,3	HG
25	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
26	0	2,6	**3**	0,86	neg	2	2	1	neg
27	1+	2	2	1	neg	2	2	1	neg

Eset sz.	IHK	PV-H	PV-C	PV-R	PV eredmény	P-H	P- C	P-R	P eredmény
28	1+	2	2	1	neg	2	2	1	neg
29	2+	1,8	1,6	1,125	neg	2	1,7	1,18	neg
30	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
31	1+	2	2	1	neg	2	2	1	neg
32	0	2,8	**3**	0,93	neg	2,9	**3**	0,97	neg
33	0	4,2	2,4	1,75	neg	4,2	2,4	1,75	neg
34	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
35	1+	2	2	1	neg	2	2	1	neg
36	2+	2,1	2	1,05	neg	2	2	1	neg
37	2+	4,4	**4,1**	1,07	neg	4,3	**4**	1,08	neg
38	3+	18,1	2,1	8,62	HG	17,5	2,1	8,33	HG
39	1+	2	2	1	neg	2	2	1	neg
40	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
41	1+	2	2	1	neg	2	2	1	neg
42	1+	2	2	1	neg	2	2	1	neg
43	0	2,2	2,3	0,96	neg	2,1	2,2	0,95	neg
44	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
45	3+	25,6	2,1	12,19	HG	27,5	2	13,75	HG
46	1+	2	2	1	neg	2	2	1	neg
47	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
48	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
49	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
50	1+	2	2	1	neg	2	2	1	neg
51	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
52	2+	2	2	1	neg	2	2	1	neg
53	1+	2	2	1	neg	2	2	1	neg
54	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
55	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
56	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
57	0	3	2,1	1,43	neg	2,8	2	1,4	neg
58	1+	2,8	**2,9**	0,97	neg	2,8	**3**	0,93	neg
59	1+	2	2	1	neg	2	2	1	neg
60	3+	6,8	2,1	3,24	LG	6,5	2,2	2,95	LG
61	1+	2	2	1	neg	2	2	1	neg
62	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
63	2+	6,2	**2,6**	2,38	LG	3,5	**2,6**	1,35	neg
64	0	2,1	1,8	1,17	neg	2,2	1,9	1,16	neg
65	3+	21,3	2,2	9,68	HG	20,5	2,1	9,76	HG
66	1+	2	2,1	0,95	neg	2	2	1	neg
67	1+	1,9	1,9	1	neg	2	2	1	neg
68	2+	4,4	**3,1**	1,42	neg	3,6	**2,9**	1,24	neg
69	0	2,1	2	1,05	neg	2	2	1	neg
70	0	2,8	**2,9**	0,97	neg	2,9	**3**	0,97	neg
71	2+	2,4	2,3	1,04	neg	2,3	2	1,15	neg

Eset sz.	IHK	PV-H	PV-C	PV-R	PV eredmény	P-H	P- C	P-R	P eredmény
72	1+	2	1,9	1,05	neg	2	2	1	neg
73	0	1,2	1,3	0,92	neg	1,4	1,2	1,17	neg
74	3+	16,3	2,4	6,79	HG	15,5	2,3	6,74	HG
75	0	3,1	**3,2**	0,97	neg	2,9	**2,9**	1	neg
76	1+	2,5	2,1	1,19	neg	2,3	2	1,15	neg
77	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
78	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
79	2+	2,2	1,8	1,22	neg	2	1,9	1,05	neg
80	2+	8,2	2,1	3,91	LG	6,7	1,8	3,72	LG
81	3+	22,1	2,1	10,52	HG	21,3	2	10,65	HG
82	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
83	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
84	1+	2,9	**3,1**	0,94	neg	3	**3,3**	0,91	neg
85	1+	2,6	**2,8**	0,93	neg	2,7	**3**	0,9	neg
86	0	2,8	**2,7**	1,04	neg	2,9	**2,7**	1,07	neg
87	2+	3,4	**3**	1,13	neg	2,8	**2,7**	1,04	neg
88	2+	2,2	2,3	0,96	neg	2	2	1	neg
89	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
90	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
91	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
92	1+	2	2	1	neg	2	2	1	neg
93	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
94	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
95	1+	2	2	1	neg	2	2	1	neg
96	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
97	1+	5,4	2	2,7	LG	4,8	1,9	2,53	LG
98	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
99	0	1,7	1,6	1,06	neg	1,9	1,7	1,12	neg
100	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
101	2+	3,1	2,5	1,24	neg	2,9	2,4	1,21	neg
102	1+	2	2	1	neg	2	2	1	neg
103	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
104	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
105	2+	2,1	1,9	1,11	neg	2	2	1	neg
106	0	2,3	2,4	0,96	neg	2,6	**2,6**	1	neg
107	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
108	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
109	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
110	3+	36,8	2,3	16	HG	31,5	2	15,75	HG
111	3+	8,4	1,6	5,25	HG	9,3	1,7	5,47	HG
112	0	3,1	**3**	1,03	neg	2,7	**2,6**	1,04	neg
113	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
114	0	2,8	**2,9**	0,97	neg	3	**3,1**	0,97	neg
115	3+	19,3	2,3	8,39	HG	21,2	2,3	9,22	HG

Eset sz.	IHK	PV-H	PV-C	PV-R	PV eredmény	P-H	P- C	P-R	P eredmény
116	1+	3,8	**4,2**	0,91	neg	3,8	**3,6**	1,06	neg
117	0	2,2	1,9	1,16	neg	2	2	1	neg
118	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
119	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg
120	3+	13,2	2,2	6	HG	14,5	2,3	6,3	HG
121	0	2	2,1	0,95	neg	2	2	1	neg
122	0	2	2	1	neg	2	2	1	neg

(IHK= immunhisztokémia, PV=PathVysion, P=Poseidon, H=a HER2 gén magonkénti átlagos kópiaszáma, C= a 17. kromoszóma centromérjének átlagos magonkénti száma, R= H/C arány, HG=high grade amplifikáció, LG=low grade amplifikáció; vastagon szedett szám = polysomia)

4.1.2 Immunhisztokémia

122 eset immunhisztokémiai vizsgálatának eredményét dolgoztuk fel. Az esetenként 3 TMA henger eredménye közül a legerősebb értéket vettük figyelembe. Végül is 62 esetben lett az immunhisztokémiai vizsgálat eredménye 0, 29 esetben 1+, 17 esetben 2+, és 14 esetben 3+.

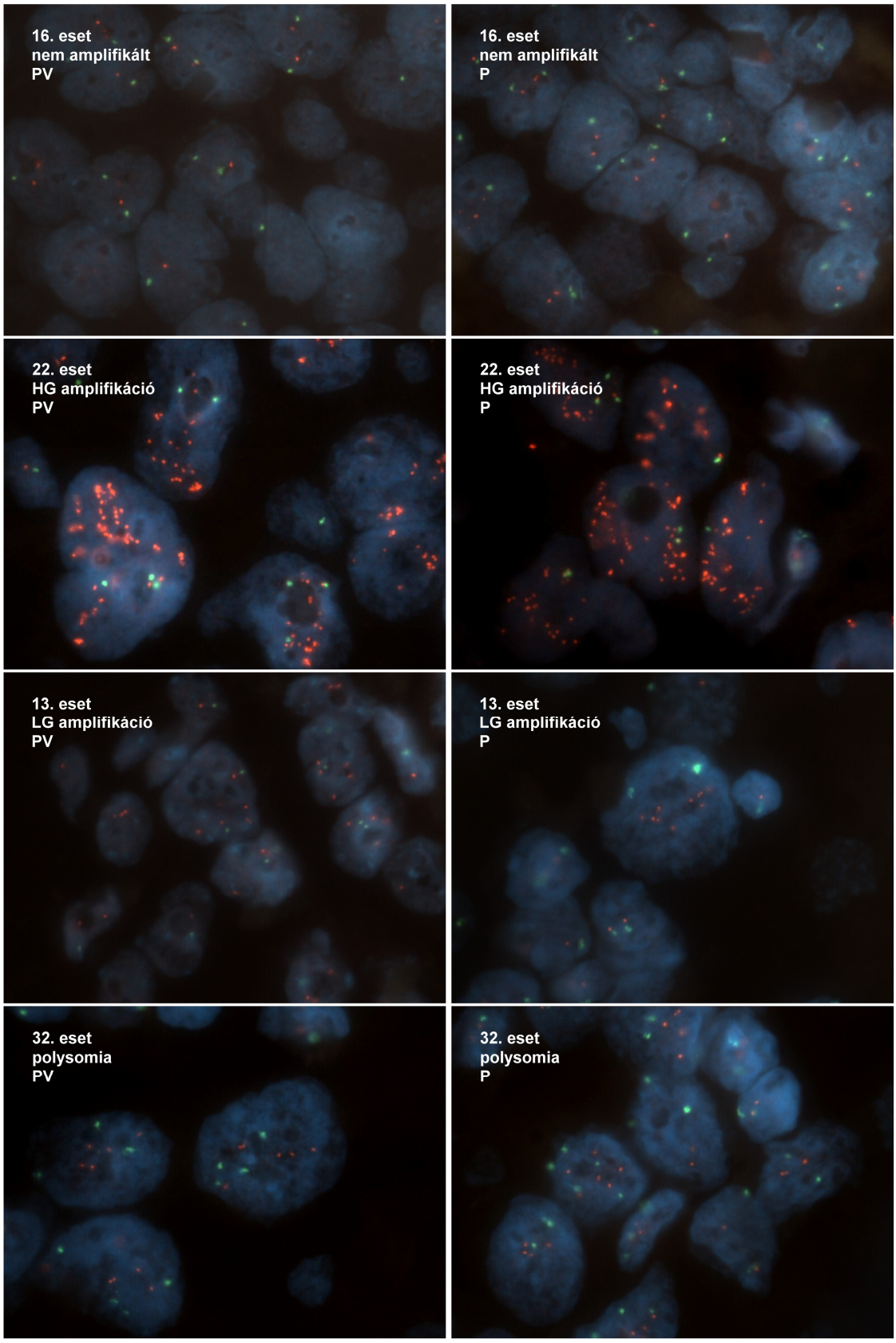
4.1.3 Fluorescens in situ hibridizáció

A 122 emlőrákos eseten a HER-2 FISH analízist is sikerrel elvégeztük. Általában mondhatjuk, hogy a festődés és a szignál minősége az esetek többségében kiváló volt. Teljes szignál hiánnyal nem találkoztunk. A HER2/CEP17 arányok alapján az eseteket három csoportra osztottuk. PathVysion reagenssel 101 esetben nem volt amplifikáció, 9 esetben volt LG amplifikáció és 12 esetet soroltunk a HG amplifikáció kategóriába. A Poseidon FISH kittel ezek az értékek sorrendben 102, 7 és 13 voltak.

4.1.4 A két FISH próba összehasonlítása

A reakciók szubjektív megítélés alapján közel hasonló mértékben voltak értékelhetők. A 4.1. ábra a különböző próbákkal elvégzett FISH vizsgálatokból mutat egy-egy nem amplifikált, HG-, LG amplifikációt, illetve polysomiát mutató esetet.

4.1. ábra Nem amplifikált, low grade és high grade amplifikációt, valamint polysomiát mutató esetek a PathVysion és Poseidon kitekkel vizsgálva.



A statisztikai elemzések során a Poseidon FISH kit-tel történt méréshez a PathVysion FISH eredményeket tekintettük referencia alapnak. A két próbát a HER-2 gén lokusának azonosíthatósága (az amplifikáció detektálás képessége), a 17. kromoszóma centromérjének, vagyis a poliszómiának a detektálási képessége, és az amplifikáció gradálásának képessége szempontjából hasonlítottuk össze.

4.1.4.1 Az amplifikáció és poliszómia detektálásának képessége

A PathVysion FISH próbával detektált eredményekhez képest a Poseidon FISH kit szenzitivitása 95,2%, specificitása 100% volt, míg a pozitív prediktív érték (PPV) 100%, a negatív prediktív érték (NPV) 99% volt. (4.2.A. táblázat). 15 eset mutatott polysomiát mindkét kittel, bár 2 eset nem ugyanazzal a reagenssel. A polysomia diagnosztizálás képességét tekintve a Poseidon FISH kit szenzitivitása 93,3%, specificitása 99,1%, a PPV 93,3% és az NPV 99,1%, a PathVysion FISH-kit eredményeihez hasonlítva. (4.2B. táblázat)

4.2.táblázat A Poseidon reagenssel végzett amplifikáció vizsgálat (A) és a 17 –es kromoszóma detektálásának (B) szenzitivitása, specificitása, pozitív és negatív prediktív értéke a PathVysionnal összevetve
CI: 95% konfidencia intervallum, PPV: pozitív prediktív érték, NPV: negatív prediktív érték

A.		**POSEIDON**		
		Amplifikáció van	**Nincs amplifikáció**	**összes**
PATH-VYSION	**Amplifikáció van**	20	1	21
	Nincs amplifikáció	0	101	101
	összes	20	102	122
		%	**CI (%)**	
	szenzitivitás	95,2	76,2 99,9	
	specificitás	100	96,4 100	
	PPV	100	83,2 100	
	NPV	99	94,7 100	

B.		POSEIDON		
		polysomia	disomia	összes
PATH-VYSION	polysomia	14	1	15
	disomia	1	106	107
	összes	15	107	122
		%	CI (%)	
	szenzitivitás	93,3	68,1 99,8	
	specificitás	99,1	94,9 100	
	PPV	93,3	68,1 99,8	
	NPV	99,1	94,9 100	

A HER2 és centromér szignálok sejtenkénti átlagos számát, valamint a HER2 / centromér arányt, mint folytonos változót statisztikailag elemezve a 4.2. ábrában bemutatott grafikonokat kaptuk. A konkordancia korrelációs hányados (RC) közel tökéletes egyezést mutatott a PathVysion és a Poseidon FISH teszt között a HER2 és centromer specifikus sejtenkénti szignál számban (RC=0.993 és 0,929, ennek megfelelően p<0,0001), valamint a HER2/centromér arányban (RC=0,993, p<0,0001). Mind a három grafikonban a redukált fő tengelyek majdnem teljesen fedik a tökéletes egyezés vonalát.

4.1.4.2 Az amplifikáció gradálásának képessége

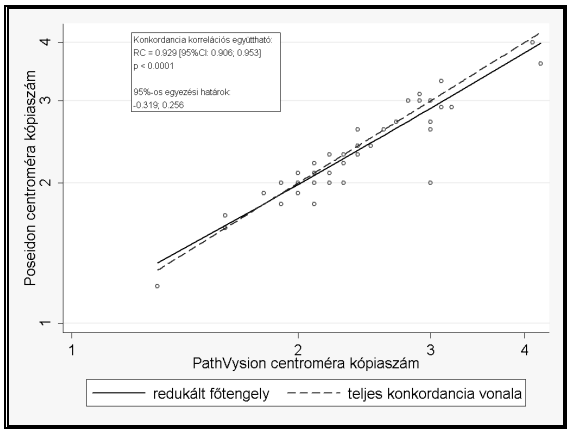
A PathVysion próbával negatív (amplifikációt nem mutató) 101 eset mindegyike negatív volt a Poseidon kittel is. Ugyanígy valamennyi PathVysion-nel HG amplifikációnak minősített eset a Poseidon reagenssel is az erősen amplifikált csoportba tartozott. Azonban a PathVysionnal low grade amplifikációnak tartott 9 eset egyike (63.sz) nem mutatott amplifikációt, egy másik pedig (8. sz.) high grade amplifikációt mutatott a Poseidon FISH kittel vizsgálva. Ha összehasonlítjuk ezen csoportokon alapulva a két reagenst, a Kappa-statisztika tökéletes egyezést mutat közöttük. (Kappa=0,9441, p<0,0001; lásd 4.3.táblázat)

4.2.ábra

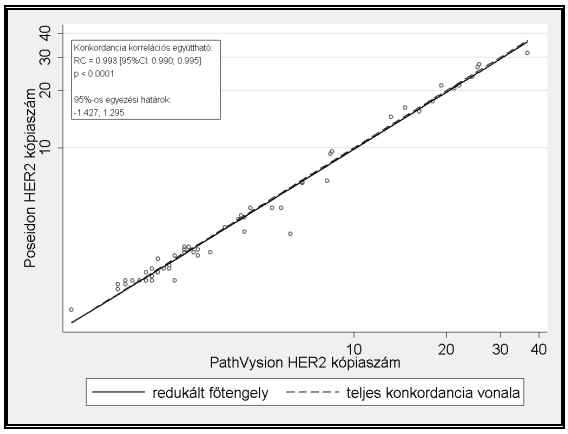
Az egyezés mértéke a PathVysion és a Poseidon FISH kitek között a 17. kromoszóma centromér számát (A), a HER2 génamplifikációt (B), és a HER2/17.kromoszóma arányát (C) tekintve.

RC: konkordancia korrelációs együttható; CI: konfidencia intervallum

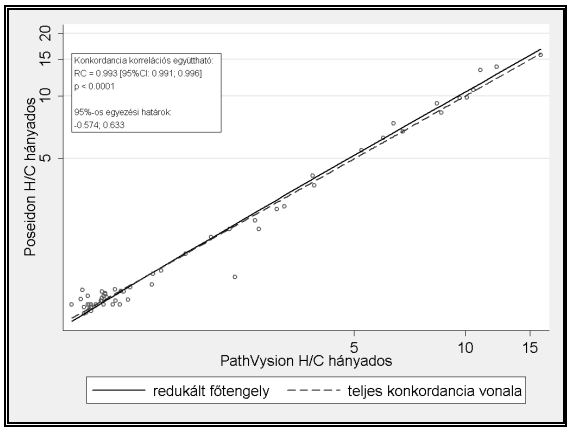
A



B



C



4.3. táblázat A PathVysion és a Poseidon FISH kitekkel mért amplifikáció gradálás egyezési szintjének összehasonlítása (Kappa-statisztika)

		POSEIDON			
		Nincs amplifikáció	**LG amplifikáció**	**HG amplifikáció**	**összes**
PATHVYSION	**Nincs amplifikáció**	101	0	0	101
	LG amplifikáció	1	7	1	9
	HG amplifikáció	0	0	12	12
	összes	102	7	13	122

Egyezés: 98,36%
Kappa: 0.9441 (CI: 0,836; 1,000)

CI= 95% konfidencia intervallum

4.1.5 A FISH kitek és a HercepTest összehasonlítása

Az IHK eredményeket kétféleképpen osztottuk fel: első esetben a 2+ és 3+ együtt számított pozitívnak, a második esetben csak a 3+ értéket tekintettük pozitív értéknek. Az IHK vizsgálat a PathVysion-nel detektált amplifikációt az első esetben 85,2%-ban (CI: 77,7%; 91%), a második esetben 94,3%-ban (CI: 88,5%, 97,7%) volt képes megjósolni. Az IHK-teszt alacsonyabb pontossággal jósolta meg a Poseidon kittel végzett vizsgálatok eredményét az első esetben (84,4%; CI: 76,8%; 90.4%). Másrészt viszont, ha a pozitív immuneredménynek csak a 3 + erősségűt vettük, valamivel nagyobb számban találtunk amplifikációt a Poseidon kittel, mint a PathVysion reagenssel (95,1%; CI:89,6% 98,2%). Az első felosztás szerinti pozitív immunreakció esetén a Kappa-statisztika mérsékelt egyezést mutatott a HercepTest és PathVysion FISH (Kappa=0,5645 p<0,0001) valamint a HercepTest és a Poseidon FISH vizsgálat között (Kappa=0,5344 p<0,0001). Amennyiben csak 3+ erősségű immunreakciót tekintettük pozitívnak, az egyezés mértéke jelentősen emelkedett (Kappa=0.7681 a PathVysion és Kappa=0,7960 a Poseidon esetén; p<0,0001). Az eredményeket a 4.4. táblázatban foglaltuk össze.

4.4. táblázat A FISH és a HercepTest osztályozás egybevetése. A.) PathVysion / HercepTest (pozitív a 2+ és 3+ együtt); B.) PathVysion / HercepTest (pozitív csak a 3+); C.) Poseidon / HercepTest (pozitív a 2+ és 3+ együtt); D.) Poseidon / HercepTest (pozitív csak a 3+); CI= 95% konfidencia intervallum

A		**PathVysion**		
HercepTest, pozitív: 2+ és 3+ együtt		**Van amplifikáció**	**Nincs amplifikáció**	**összes**
	Pozitív	17	14	31
	Negatív	4	87	91
	összes	21	101	122
Egyezés: 85.2% (CI: 77.7%, 91.0%)				
Kappa: 0.5645 (CI: 0.389, 0.740; p<0.0001)				

B		**PathVysion**		
HercepTest, pozitív: csak 3+		**Van amplifikáció**	**Nincs amplifikáció**	**összes**
	Pozitív	14	0	14
	Negatív	7	101	108
	összes	21	101	122
Egyezés: 94.3% (CI: 88.5, 97.7%)				
Kappa: 0.7681 (CI: 0.606, 0.930; p<0.0001)				

C		**Poseidon**		
HercepTest, pozitív: 2+ és 3+ együtt		**Van amplifikáció**	**Nincs amplifikáció**	**összes**
	Pozitív	16	15	31
	Negatív	4	87	91
	összes	20	102	122
Egyezés: 84.4% (CI: 76.8%, 90.4%)				
Kappa: 0.5347 (CI: 0.355, 0.714; p<0.0001)				

D		**Poseidon**		
HercepTest, pozitív: csak 3+		**Van amplifikáció**	**Nincs amplifikáció**	**összes**
	Pozitív	14	0	14
	Negatív	6	102	108
	összes	20	102	122
Egyezés: 95.1% (CI: 89.6%, 98.2%)				
Kappa: 0.7960 (CI: 0.640, 0.952; p<0.0001)				

4.2 Eredmények az őrszem nyirokcsomó intraoperatív vizsgálati módszereinek összehasonlításában

4.2.1 Általános eredmények

Munkánkban a 2009. február és november között, a rutin szövettani diagnosztikában végzett sentinel nyirokcsomó vizsgálatok eredményeit elemeztük. 98 invazív emlőrákos beteg 100 emlőtumor műtéte során eltávolított, összesen 127 sentinel nyirokcsomó leleteit összegeztük. A nyirokcsomók mindegyikéből fagyasztásos vizsgálatot, lenyomati kenetet, valamint imprint citológiai preparátumon kivitelezett rapid immuncitokémiai vizsgálatot végeztünk. Két betegnek szimultán kétoldali emlőtumora volt, így kétoldali őrszem nyirokcsomó eltávolítás is történt. Ezeket két külön esetnek vettük (41. sz., 42 sz. és az 56. sz., 57.sz. eset) 80 esetben 1 db, 13 esetben 2 db, 7 esetben 3 db nyirokcsomót küldtek vizsgálatra.

A tumorok szöveti típus szerinti megoszlása a következő volt: 70 (70 %) invazív ductalis carcinoma, 15 (15%) invazív lobularis carcinoma, és 15 (15%) egyéb típusú invazív emlőcarcinoma. Az egyéb daganatok között 7 db különböző altípusú invazív papillaris carcinomát, 2 db tubulolobularis carcinomát, 2 db mucinosus carcinomát, 2 db metaplasticus carcinomát, 1 db tubularis carcinomát, és 1 db solid neuroendocrin carcinomát detektáltunk. 18 tumor G1-es, 57 tumor G2-es és 25 daganat G3-as differenciáltságú volt. A daganatok 48%-a T1, 44%-a T2, 7%-a T3 és 1%-a T4b méretű volt a végleges szövettani vizsgálat alapján. A T1-es tumorok közül 2 db a T1a, 12 db a T1b és 34 db a T1c csoportba tartozott. A végleges vizsgálattal az esetek 73%-a N0, 20%-a N1, 4%-a N2 és 3%-a N3 kategóriába esett. Az általános adatokat a 4.5. táblázat foglalja össze.

4.5. táblázat
A vizsgálatban szereplő esetek általános adatai összegezve

Esetszám	100 db			
Sentinel nyirokcsomók száma	127 db			
Sentinel nyirokcsomók végleges vizsgálatának eredményei	pozitív	36 db	ITC	6 db
			micrometastasis	3 db
			macrometastasis	27 db
	negatív	91 db		
Tumorok szöveti típusa	ductális	70 db		
	lobularis	15 db		
	egyéb	15 db	Invazív papillaris (különféle)	7 db
			mucinosus cc	2 db
			tubulolobularis	2 db
			metaplasticus	2 db
			neuroendocrin	1 db
			tubularis	1 db
Tumorok grádusa	G1	18 db		
	G2	57 db		
	G3	25 db		
T-kategóriák	T1	48 db	T1a	2 db
			T1b	12 db
			T1c	34 db
	T2	44 db		
	T3	7 db		
	T4	1 db	T4a	1 db
Végleges N-kategóriák (esetenként)	N0	73 db	N0 (i-)	70 db
			N0 (i+)	3 db
	N1	20 db	N1mi	4 db
			1a	16 db
	N2	4 db	N2a	4 db
	N3	3 db	N3a	3 db

A sentinel nyirokcsomók vizsgálatának natív adatai a 4.6. táblázatban láthatók.

A táblázat segítségével az egyes esetekhez tartozó nyirokcsomók, azok intraoperatív vizsgálati eredményei, majd a végleges vizsgálat eredményei követhetők nyomon.

4.6. táblázat Az egyes esetekhez tartozó sentinel nyirokcsomók vizsgálatának részletes natív adatai (ICK: immuncitokémia, IHK: immunhisztokémia)

Eset sorszám	Nycs sorszám	Sentinel lenyomati kenet	Sentinel fagyasztás	Sentinel ICK	Sentinel végleges (IHK-val)	A metastasis mérete (mm) a végleges mintában
1	1	+	+	+	+	21
2	2	-	-	-	-	
3	3	-	-	-	-	
4	4	-	-	-	-	
5	5	-	-	-	-	
6	6	-	-	-	-	
7	7	-	-	-	-	
8	8	-	-	-	-	
9	9	-	-	-	-	
	10	-	-	-	-	
10	11	-	-	-	-	
	12	-	-	-	-	
11	13	-	-	-	-	
12	14	+	+	+	+	4,5
13	15	-	-	-	-	
	16	-	-	-	-	
14	17	-	-	-	-	
15	18	-	-	-	-	
16	19	?	-	-	+	5
17	20	+	+	+	+	35
18	21	-	-	-	-	
19	22	-	-	-	-	
	23	-	-	-	-	
20	24	-	-	-	-	
21	25	-	-	-	-	
22	26	-	-	-	-	
23	27	-	-	-	+	3,5
24	28	-	-	-	-	
25	29	+	+	0	+	8,5
26	30	?	-	-	-	
27	31	+	+	+	+	8
	32	ITC	-	?	-	
28	33	-	-	-	-	
29	34	+	+	+	+	2
30	35	-	-	-	-	
	36	-	-	-	-	
31	37	-	-	-	-	
32	38	-	-	-	-	
33	39	-	-	-	-	
34	40	-	-	-	-	
35	41	+	+	+	+	5
36	42	-	-	-	-	

Eset sorszám	Nycs sorszám	Sentinel lenyomati kenet	Sentinel fagyasztás	Sentinel ICK	Sentinel végleges (IHK-val)	A metastasis mérete (mm) a végleges mintában
	43	?	-	-	-	
	44	-	-	?	-	
37	45	+	+	+	+	11
38	46	+	+	+	+	8
39	47	-	-	-	-	
40	48	-	-	-	ITC	0,1
	49	-	-	-	ITC	0,1
41	50	-	-	-	-	
42	51	-	-	-	-	
43	52	-	-	-	-	
	53	-	-	-	-	
44	54	-	-	-	-	
	55	-	-	-	-	
	56	-	-	-	-	
45	57	-	-	-	-	
46	58	+	-	+	+	2,3
	59	-	-	-	-	
47	60	-	-	-	-	
48	61	+	+	+	+	4
	62	ITC	-	ITC	-	
	63	-	-	-	-	
49	64	-	-	-	mic	0,4
50	65	+	+	+	+	6,5
	66	+	+	+	+	5
	67	+	+	+	+	4,8
51	68	-	-	-	-	
52	69	+	+	+	+	7
53	70	-	-	-	-	
54	71	-	-	-	-	
55	72	-	-	-	mic	0,4
	73	-	-	-	ITC	0,1
	74	-	-	-	-	
56	75	-	-	-	-	
57	76	-	-	-	-	
58	77	-	-	-	-	
59	78	-	-	-	-	
60	79	-	-	-	-	
61	80	-	-	-	-	
62	81	-	-	-	-	
63	82	-	-	-	-	
64	83	-	-	-	-	
65	84	-	-	-	-	
66	85	-	-	-	-	

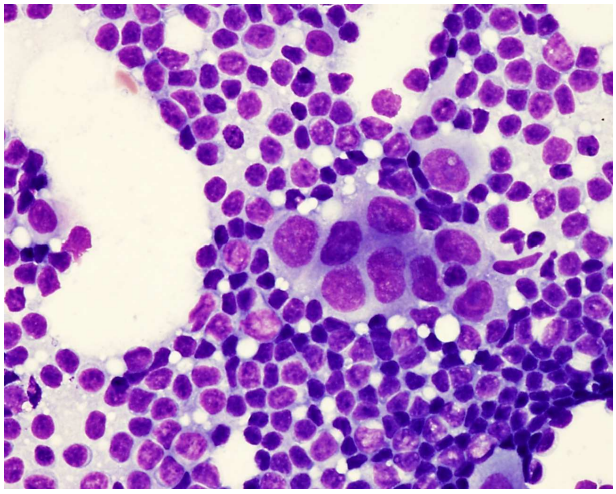
Eset sorszám	Nycs sorszám	Sentinel lenyomati kenet	Sentinel fagyasztás	Sentinel ICK	Sentinel végleges (IHK-val)	A metastasis mérete (mm) a végleges mintában
67	**86**	-	-	?	ITC	0,15
68	**87**	+	+	+	+	5
69	**88**	-	-	-	mic	0,64
	89	-	-	-	-	
70	**90**	-	-	-	-	
	91	-	-	-	-	
71	**92**	+	+	+	+	3,5
72	**93**	-	-	-	-	
73	**94**	-	-	-	-	
74	**95**	-	-	-	-	
75	**96**	+	+	+	+	11
76	**97**	-	-	-	-	
77	**98**	?	-	?	-	
78	**99**	-	-	-	-	
79	**100**	-	-	-	-	
80	**101**	+	-	+	+	3,5
81	**102**	+	+	+	+	3,5
82	**103**	-	+	+	+	3,5
83	**104**	+	+	+	+	6
	105	?	-	-	+	3
	106	-	-	-	-	
84	**107**	?	-	-	-	
85	**108**	-	-	-	-	
86	**109**	?	-	-	-	
	110	-	-	-	-	
87	**111**	-	-	-	-	
88	**112**	ITC	-	ITC	+	2,4
89	**113**	-	-	-	-	
90	**114**	+	+	+	+	10
91	**115**	-	-	-	-	
92	**116**	-	-	-	-	
93	**117**	-	-	-	-	
94	**118**	-	-	-	-	
95	**119**	-	-	-	-	
96	**120**	-	-	-	-	
	121	-	-	-	-	
	122	-	-	-	-	
97	**123**	-	-	-	-	
98	**124**	ITC	-	ITC	ITC	0,1
	125	ITC	-	?	ITC	0,1
99	**126**	-	-	-	-	
100	**127**	-	-	-	-	

Valamennyi nyirokcsomóból elkészült mindhárom vizsgálat. A nyirokcsomókból készült fagyasztásos metszetek és a hemacolorral festett lenyomati kenetek minősége kielégítő volt valamennyi esetben.

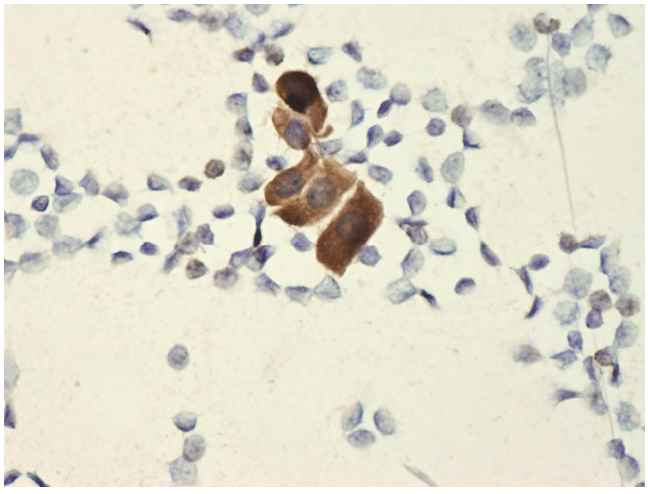
Egy esetben nem sikerült értékelhető módon kivitelezni a rapid immuncitokémiai vizsgálatot (29. nyirokcsomó). A nyirokcsomóban macrometastasis volt, amit mind az imprint citológiával, mind a fagyasztásos vizsgálattal tudtunk észlelni. A rapid immuncitológiai vizsgálatra készített kenet a feldolgozás során, technikai hiba miatt, értékelhetetlenné vált. A statisztikai elemzésnél ezt az egy vizsgálatot negatívnak vettük, mint ahogyan a kétes eredményeket is negatívként elemeztük.

A daganatsejtek többnyire morfológiailag is jól elkülöníthetők voltak a preparátumokban. Az 4.3. ábra a metastaticus daganatsejtek festődését mutatja hemacolor festéssel, összehasonlítva a megfelelő lenyomati kenet területen a rapid citokeratin immuncitokémiai reakcióval detektálható daganatsejtekkel (4.4.ábra). A 4.5. ábra ugyanezen eset HE festett fagyasztott preparátumáról készült.

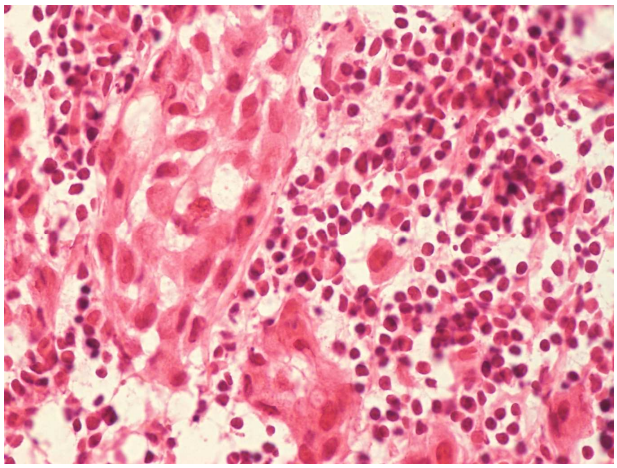
4.3. ábra Metastaticus daganatsejtek lenyomati kenetben Hemacolorral festve. (104.sz.nyirokcsomó, eredeti nagyítás 40x)



4.4. ábra Metastaticus daganatsejtek lenyomati kenetben citokeratin rapid immuncitokémiai reakcióval (104. sz. nyirokcsomó, eredeti nagyítás 40x)



4.5 ábra Metastaticus góc a sentinel nyirokcsomóban, fagyasztott metszetben, HE festve (104.sz.nyirokcsomó, eredeti nagyítás 40x)



4.2.2 Az egyes módszerekkel, és azok kombinációival kapott eredmények

A végleges szövettani vizsgálattal 36 nyirokcsomóban találtunk daganatsejtet, ebből 27 nyirokcsomóban macrometastasist. Imprint citológiával és rapid ICK-val 23-23 esetben, fagyasztásos vizsgálattal csupán 21 esetben mondtunk ezekre pozitivitást. A micrometastasisok, izolált tumorsejt-csoportok detektálása jóval kisebb sikerrel járt. A végleges vizsgálat 9 nyirokcsomóban azonosított micrometastasist, vagy izolált tumorsejt csoportokat. Fagyasztásos vizsgálattal ezek közül egyiket sem sikerült észlelnünk. Imprint citológiával 2, rapid ICK-val pedig csak 1 esetben diagnosztizáltuk a daganatsejtek jelenlétét.

Álpozitív eredményünk is volt: imprint citológiával 2, rapid immuncitokémiával 1 esetben véltünk izolált tumorsejteket látni a későbbi feldolgozással negatívnak bizonyult nyirokcsomókban. Fagyasztással álpozitív eset nem volt.

Az egyes technikákkal nyert, a végleges szövettani diagnózisokkal egybevetett eredményeket a 4.7. táblázatban foglaltuk össze.

A 4.8. táblázat az egyes vizsgálómódszerek kombinálásával elért eredményeket mutatja.

4.7.táblázat A metastasis detektálása az őrszem nyirokcsomókban az egyes technikákkal a végleges eredményhez viszonyítva

	összes	**Macro-metastasis**				**Micrometastais vagy ITC**				**Negatív**				**Összes pozitív**		**Összes negatív**	
V	127	27				9				91				36		91	
		Poz.	**+**	**Neg.**	**-**	**Poz.**	**+**	**Neg.**	**-**	**Poz.**	**+**	**Neg.**	**-**	**VP**	**ÁN**	**VN**	**ÁP**
			ITC		**+/-**		**ITC**		**+/-**		**ITC**		**+/-**				
IC	127	23	22	4	3	2	0	7	7	2	0	89	85	25	11	89	2
			1		1		2		0		2		4				
RICK*	127	23	22	4	4	1	0	8	6	1	0	90	87	24	12	90	1
			1		0		1		2		1		3				
F	127	21		6		0		9		0		91		21	15	91	0

V: végleges szövettani vizsgálat; IC: imprint citológia, F: fagyasztásos vizsgálat, RICK: rapid immuncitokémia; ITC: izolált tumorsejt, VP: valódi pozitív, VN: valódi negatív, ÁP: álpozitív, ÁN: álnegatív

4.8. táblázat A metastasis detektálása az őrszem nyirokcsomókban az egyes módszerek kombinálásával

	összes	Macro-metastasis				Micrometastais vagy ITC				Negatív				Összes pozitív		Összes negatív	
V	127	27				9				91				36		91	
		Poz.	**+ ITC**	**Neg.**	**- +/-**	**Poz.**	**+ ITC**	**Neg.**	**- +/-**	**Poz.**	**+ ITC**	**Neg.**	**- +/-**	**VP**	**ÁN**	**VN**	**ÁP**
IC+F	127	24	23 1	3	1 2	2	0 2	7	7 0	2	0 2	89	85 4	26	10	89	2
IC+RICK	127	24	23 1	3	1 2	2	0 2	7	6 1	2	0 2	89	83 6	26	10	89	2
F+RICK	127	24	23 1	3	3 0	1	0 1	8	6 2	1	0 1	90	87 3	25	11	90	1
F+RICK+IC	127	24	23 1	3	1 2	2	0 2	7	6 1	2	0 2	89	84 5	26	10	89	2

V: végleges szövettani vizsgálat; IC: imprint citológia, F: fagyasztásos vizsgálat, RICK: rapid immuncitokémia; ITC: izolált tumorsejt, VP: valódi pozitív, VN: valódi negatív, ÁP: álpozitív, ÁN: álnegatív

Amennyiben a vizsgálatok eredményét különböző kombinációkban elemezzük, akkor jobb eredményre jutunk, bár az imprint citológiával véleményezett 2 álpozitív eredmény minden olyan kombinációban jelen van, melyben az IC szerepel. Kombinációban a fagyasztás és a gyors immuncitokémia együttesen alkalmazva hozta a leggyengébb eredményt, míg az összes többi kombináció teljesen egyforma eredményre vezetett.

4.2.3 Statisztikai elemzések

.A végleges szövettani diagnózissal összevetve az imprint citológia szenzitivitása 69,44% (CI: 51.73%-83,08%) volt. A fagyasztásos vizsgálat szenzitivitása 58.33% (CI: 40.89%–74.04%) volt, a rapid immuncitokémiáé pedig 66.67% (CI: 48,95-80,90%). Ha a lenyomati citológiát és akár a fagyasztásos vizsgálatot, akár a rapid immuncitokémiai vizsgálatot együttesen elemezzük, a tumor detektálás szenzitivitása 72.22%-ra növekedett (CI: 54.57%–85.21%), ami megegyezik a három vizsgálat együttesen mért szenzitivitásával. A fagyasztásos vizsgálat és a rapid immuncitokémiai vizsgálat együttes szenzitivitása 69,44% (CI: 51.73%-83,08%) volt.

A végleges szövettani diagnózishoz viszonyított specificitás az imprint citológia esetén 97.80% (CI: 91.53%–99.62%) volt, a fagyasztásos vizsgálaté 100% (CI: 94.95%–100%), míg a rapid immuncitokémiai vizsgálaté 98.90% (CI: 93.17%–99.94%). Ha a vizsgálómódszereket kombináljuk, akkor azt találtuk, hogy a legmagasabb, 98,90%-os (CI: 93.17%–99.94%) specificitás a fagyasztás és a rapid immuncitokémiai vizsgálat együttes alkalmazásával érhető el, míg az összes többi kombináció valamivel kisebb, 97.80% (CI: 91.53%–99.62%) értéket mutat. A pozitív prediktív érték hasonló tendenciát mutat, míg a negatív prediktív érték ebben a variációban a legkisebb. Ez utóbbi alapján tehát ebben a kombinációban várható a legtöbb álnegatív eredmény. Az eredményeket a 4.9. táblázat szemlélteti.

4.9. táblázat A különféle őrszem nyirokcsomó vizsgálati metódusok és azok kombinációinak szenzitivitása, specificitása, pozitív és negatív prediktív értéke a végleges szövettani vizsgálathoz viszonyítva, 95%-os konfidencia intervallum mellett.

módszer	szenzitivitás		Specificitás		PPV		NPV	
	%	95%CI	%	95%CI	%	95%CI	%	95%CI
IC	69.44	51.73, 83.08	97.80	91.53, 99.62	92.59	74.25, 98.71	89.00	80.78, 94.11
F	58.33	40.89 74.04	100.00	94.95 100,00	100.00	80.76 100.00	85.84	77.42 91.60
RICK*	66,67	48,95 80,90	98.90	93.17 99.94	96.00	77.68 99.79	88.24	79,98 93,51
IC + F	72,22	54.57 85.21	97.80	91.53 99.62	92.86	75.04, 98.75	89.90	81.79, 94.78
IC + RICK*	72,22	54.57 85.21	97.80	91.53 99.62	92.86	75.04, 98.75	89.90	81.79, 94.78
F + RICK*	69,44	51,73 83,08	98.90	93.17 99.94	96.15	78.42, 99.80	89.11	80.96, 94.17
IC + F + RICK*	72,22	54.57 85.21	97.80	91.53 99.62	92.86	75.04, 98.75	89.90	81.79, 94.78

CI: konfidencia intervallum, PPV: pozitív prediktív érték; NPV: negatív prediktív érték; IC: imprint citológia, F: fagyasztásos vizsgálat, RICK: rapid immuncitokémia;

5 Megbeszélés

5.1 A Poseidon HER2/SE17 dual color FISH kit validációs vizsgálata

A HER-2/neu fehérje túlprodukciója és / vagy a gén amplifikációja az invazív emlőrákok rosszabb kimenetelét jelzi. Ezen túlmenően ez a célmolekulája a daganat trastuzumabbal történő kezelésének. Mivel tehát fontos szerepe van a terápiás döntésben, ezért kiemelt jelentőségű, hogy a HER-2/neu státuszt megbízható, reprodukálható, technikailag jól kivitelezhető módszerrel állapítsuk meg. Bár sokféle technológia létezik, a legszélesebb körben az immunhisztokémia (IHK), és a FISH technika kerül alkalmazásra ezen a téren. Ennek valószínű oka, hogy mindkét eljárás paraffinos szöveti blokkokon alkalmazható, így jól beleilleszthető a rutin patológiai diagnosztikába. A ma érvényes ajánlások a leginkább célravezető technológiának az immunhisztokémiai vizsgálat és valamilyen in situ hibridizáción alapuló molekuláris metódus kombinációját tartják.(33-36)

A gén amplifikáció értékelésére a FISH-t használják kiterjedten. A HER2 és a 17. kromoszóma centromérjét egyszerre jelző dual color FISH próba arra is választ tud adni, hogy a megnövekedett HER-2 génkópiaszám valódi gén megsokszorozódásból, vagy a 17. kromoszóma számának szaporodásából adódik-e.(21-23) Az invazív emlőrákok 56-92%-ában aneuploidiát jeleztek, ezért a dual color módszerek jelentős előnnyel rendelkeznek a csupán a gén kópiaszámot detektáló metódusokkal szemben. Dolgozatunkban összehasonlításra került mindkét reagens fluoreszkáló festékkel direkt jelölt DNS próbákat alkalmaz, melyek segítségével a HER-2/neu génkópia szám és a 17. kromoszóma centromerikus régiójának arányát is megadhatjuk.

Az FDA által jóváhagyott PathVysion HER2/CEP17 kit – utalva a szakirodalomban megjelent tanulmányokra - gold standardnak tekinthető az elérhető HER2 FISH assay-k között.(43-45) Másrészt viszont a PathVysion FISH kittel végzett HER2 kimutatás költsége meglehetősen magas. Kérdés, hogy a kevésbé ismert, kereskedelmi forgalomban lévő FISH reagensek, melyek közül az egyik a Kreatech által gyártott dual color kit, képesek lehetnek-e ugyanolyan jó minőségű eredményekre? A Poseidon ERBB2, HER2/Neu(17q12)/SE17 kitet a 17q12 locuson lévő HER2 gén kópiaszámának meghatározására optimalizálták, emellett a 17 kromoszóma centromérjére specifikus próba (SE17) segítségével az adatok a 17. kromoszóma száma alapján korrigálhatók. A 2008-ban piacra került próba egyik fő jellemzője, hogy úgynevezett „repeat-free" technológiát alkalmaz. Ennek lényege, hogy a reagens Cot1 DNS-t is tartalmaz, melynek feladata, hogy a zavaró elemként jelenlévő ismétlődő szekvenciákat (SINE= short interspersed element, LINE= long interspersed element), vagy az azonos géncsalád homológ szekvenciájú tagjait blokkolja. Ezáltal igen intenzívvé, és egyértelművé válnak a jelek, a háttérreakció lehetősége lecsökken. A Poseidon HER2 próba a kit ismertetője szerint csak a 17q12 locuson lévő gént jelöli szemben a PathVysion HER2 tesztjével, mely ennél szélesebb sávot jelöl a kromoszómán (17q11.2-q12). A HER2 próba PlatinumBright 550 fluoreszkáló festékkel jelölt, amelynek excitációja 546+/-12 nm-es, emissziója 580+/-30 nm-es hullámhossz tartományban történik. Az SE17 próbát PlatinumBright 495 fluorochrommal jelölték, melynek excitációja 495+/-20nm, emissziója pedig 525+/-30 nm hullámhossznál mérhető.

Ezek az excitációs és emissziós hullámhosszak detektálhatók ugyanazzal a szűrő párral, melyet a PathVysion assay-ben használt Spectrum Orange és Spectrum

Green fluorochromokhoz fejlesztettek ki (MF101, MF102; Chroma Technology Corp, Rockingham, VT, USA).

Mindezek mellett általában azt tapasztaltuk, hogy a Poseidon HER-2 kittel valóban szép, egyértelmű jeleket kaptunk, melyeket könnyű volt elemezni.

A HER2 és CEP17 kópia számok és a HER2/CEP17 arány – mint folytonos változók – alapján kalkulált konkordancia korrelációs koefficiens tökéletes egyezést mutatott a két FISH reagens között. Ezen túlmenően a kategorizált változókkal elvégzett Kappa-statisztika is tökéletes egyezést igazolt a PathVysion és a Poseidon FISH kitek között.

A 122 vizsgált eset közül csak egy olyan tumor volt, melynek amplifikáció státusza jelentősen eltért a két assay-vel. A 63. számú esetnél PathVysion próbával sejtmagonként 6,2 HER-2 kópiaszámot, míg a Poseidon kittel csak 3,5 átlagos HER-2 génszámot azonosítottunk. Mivel mindkét kittel azonos arányú, sejtenkénti átlagos 2,6 CEP17 számot, vagyis egyforma mértékű polysomiát állapítottunk meg, ezért a HER-2/CEP17 arány PathVysionnal 2,38 volt, a Poseidon kittel viszont csak 1,35. Tehát a PathVysion kit low grade amplifikációt jelzett, míg a Poseidon kittel nem tudtunk amplifikációt kimutatni. Tehát ebben az esetben a két reagens között a HER-2 gén azonosításában volt jelentős különbség. Sajnos nem áll rendelkezésre megfelelő klinikai információ a betegről, mellyel hatékonyan tudnánk kontrollálni az eredményeket. Ennek ellenére a Poseidon kit repeat free technológiájának ismeretében esetleg magyarázható a mérési különbség a HER-2 gén kópiaszámát illetően.

Egyéb ilyen mértékű eltérést nem tapasztaltunk. Az a két eset, melyekben a 17. kromoszóma státusz diagnosztizálásában eltérő eredményre jutottunk (26. sz., 106.

sz.) csak elhanyagolható variációkat jelentettek a sejtenkénti 2,5 CEP17 szignál határérték körül.

A „gold standardnak” tartott PathVysiont véve viszonyítási alapnak, a Poseidon assay magas szenzitivitást, specificitást, pozitív és negatív prediktív értéket produkált, még akkor is, ha a tumor ploiditását mértük. Ha a FISH adatokat az IHK eredményekkel vetjük egybe, úgy tűnik, a HercepTest hasonló pontossággal képes a két FISH vizsgálattal megállapított amplifikáció státuszt megjósolni. Nagyobb a pontosság akkor, ha az IHK eredményeket csupán a 3+ erősségű reakciók esetén tekintettük pozitívnak, ami nem meglepő, tekintve a 2+ erősségű IHK reakciót adó esetek körében mindkét FISH assay-vel alacsony gyakorisággal (17,7% és 13,3%) detektáltunk gén amplifikációt. A megfelelés az IHK és a FISH eredmények között, ahogyan a Kappa-statisztika is mutatja, a mérsékeltről az erős egyezésig nőtt, amikor az IHK eredményeket a 3+-nél osztottuk fel, nem pedig 2+nél. A két FISH reagens eredményekből derivált Kappa-statisztika értékei hasonlóak voltak mindkét tesztben. Ezen túlmenően a 3+IHK – FISH egyezés egy kissé magasabb volt a Poseidon kittel, mint a PathVysion reagenssel.

5.1.1 Új megállapítások a validációs vizsgálat során

Ezekből az eredményekből a következő megállapításokra jutottunk:

- A Poseidon HER2/SE17 dual color FISH kit megbízhatóan alkalmazható a klinikai gyakorlatban, mert
    - gyakorlatilag egyenértékű a PathVysion HER2/CEP17 kittel mind az amplifikáció azonosításában, mind az amplifikáció mértékének meghatározásában, mind pedig a 17 kromoszóma centromerikus régió számának meghatározásában.

- a standard próbához hasonló arányban mutat amplifikációt az immunhisztokémiailag HER2 pozitív illetve negatív daganatokban.

- A Poseidon HER2/SE17 dual color FISH-kit alkalmazása a PathVysion kittel azonos eszközöket igényel.
- A Poseidon HER2/SE17 dual color FISH-kit használatával jelentős költségmegtakarítást lehet elérni a HER2 vizsgálat terén, mert a PathVysion HER2 DNA Probe Kit majdnem kétszer olyan drága, mint a Poseidon megfelelője.
- Mivel a Kreatech gyártmányú kit ára összemérhető a HercepTest immunhisztokémiai reagens árával, különösen a további megtakarításokat eredményező TMA módszerrel együttesen alkalmazva a reális lehetőség nyílik arra, hogy minden emlőrákos esetben el lehessen végezni a sokkal megbízhatóbb in situ hibridizációt, különösen a nagyszámú HER-2 vizsgálatot végző laborokban.

5.2 Az intraoperatív őrszem nyirokcsomó vizsgálatok eredményeinek megbeszélése

Prospektív tanulmányunkban egymás mellett alkalmaztunk három különböző intraoperatív sentinel nyirokcsomó feldolgozási technikát - a fagyasztott metszet vizsgálatot, az imprint citológiát, és a rapid immuncitokémiát -, hogy meghatározzuk, melyik vizsgálat, vagy vizsgálatkombináció a legszenzitívebb és legspecifikusabb az őrszemnyirokcsomóban lévő daganatsejtek detektálása szempontjából.

Adataink azt mutatták, hogy a hagyományos fagyasztásos vizsgálat rendelkezett a legalacsonyabb szenzitivitással, tehát a legkisebb valószínűséggel, ezzel ismertük fel a pozitív eseteket (27 macrometastasisból csupán 21-et észleltünk, míg a 3 micrometastasisból és a 6 ITC-ből egyiket sem). Az önállóan alkalmazott módszerek közül az imprint citológiával adtunk legtöbb valódi pozitív véleményt (a 36 esetből 25-

ben) Ez a módszer bizonyult a valamivel eredményesebbnek a néhány sejtes daganatmennyiség detektálásában. A macrometastasisok detektálása bármelyik kettős, vagy a hármas metódus kombináció alkalmazásával teljesen egyforma pontossággal történt: a 27 macrometastasisból 23-at a vizsgálómódszerek tetszőleges kombinációjával is macrometastasisnak véleményeztünk, egyben pedig izolált tumorsejt-csoportokat találtunk. A fagyasztásos vizsgálat nem produkált fals pozitív eredményt, azaz a specificitása 100%-os volt, Ezt az eredményt bármelyik kombináció minimálisan rontotta. Összességében azonban megállapíthatjuk, hogy akármelyik módszert önállóan, vagy kombináltan alkalmazva a fajlagosság legalacsonyabb értéke 97,8 % volt.

Ha végig tekintjük a statisztikai elemzés adatait, láthatjuk, hogy igen hasonló eredmények születtek a vizsgáló módszerek kombinációját tekintve. Éppen ezért a megfelelő metódus, vagy kombináció kiválasztásához számos egyéb, a gyakorlatban szem elé kerülő tényezőt is mérlegelni kell.

5.2.1 Részletes tapasztalataink az egyes vizsgálattípusokkal kapcsolatban

5.2.1.1 Fagyasztásos vizsgálat:

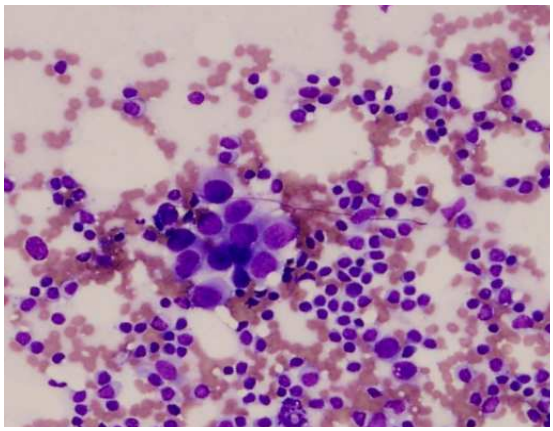
A fagyasztott mintából készült preparátum többnyire jóval szerényebb minőségű a beágyazott preparátumhoz képest. Feltehetőleg éppen ezért nem várható tőle a micrometastasisok és az izolált tumor sejtek észlelése. Viszont a macrometastasis meglehetős biztonsággal azonosítható. Kisméretű nyirokcsomóból (a mi gyakorlatunkban a 6 mm-esnél kisebbek) nem célszerű megcsinálni, mert fennáll a veszélye, hogy releváns területek mennek tönkre és maradnak így korrekt vélemény nélkül. Mi csak a nyirokcsomó 1 részletéből végeztünk fagyasztást, de ha az esetleges metastasis 2-3 mm-es, könnyen észrevétlen maradhat a makroszkópos vizsgálat során. Szintén felmerül a veszélye annak, hogy a véletlenül a fagyaszott

preparátumba került kisméretű metastasis a végleges preparátum elkészítésénél elfaragódik. Előnye, hogy a szövetkörnyezetben látott daganatnak a szöveti típusa, a tumor góc metszetben látott mérete, neostroma képződés valamint a tokinvázió is észlelhető. A metszet áttekintése egyszerűbb, gyorsabb, mint a lenyomati kenetek szoros végigpásztázása és ez ellensúlyozza a kissé hosszabb technikai időt, melyet a metszet elkészítése emészt fel.

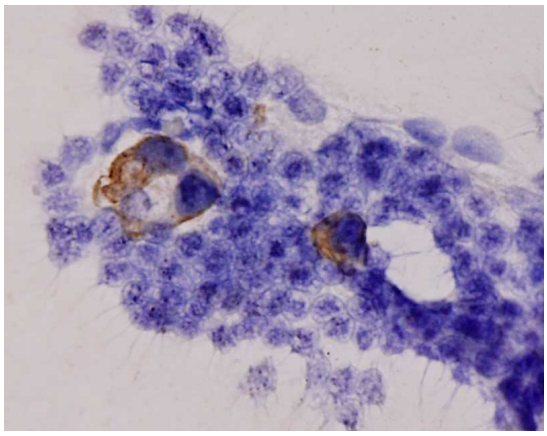
5.2.1.2 Imprint citológia:

Jelen vizsgálatsorozatban önálló metódusként a legmagasabb szenzitivitású módszernek bizonyult. Óriási előnye, hogy a nagyobb nyirokcsomóról is átfogó képet ad. 2 esetben izolált tumorsejt csoportokat is sikerült vele detektálni, és ezeket imprint citológiával is annak gondoltuk. Azonban ezzel a módszerrel két álpozitív esetünk is volt.

A 32. nyirokcsomó a 27. számú, ductalis invazív carcinomás eset második sentinelként eltávolított nyirokcsomója volt. Az eset első nyirokcsomója egyértelmű macrometastasist tartalmazott, így a hónalji nyirokcsomó blokk eltávolítását a macrometastasis jelenlétére alapozva végezték el. Az eltávolított további nyirokcsomók közül még egyben volt metastasis. Az 5.1 és 5.2. ábra a 32. nyirokcsomó általunk ITC-nek nyilvánított területét mutatja az imprint citológiai preparátumon Hemacolor festéssel, illetve immuncitokémiai vizsgálattal. Függetlenül attól, hogy a végleges feldolgozásban nem sikerült megtalálni az izolált tumorsejteket, továbbra is az a véleményünk, hogy ezek valóban daganatsejtek voltak. Tehát valójában nem is tekinthető álpozitívnak az eset.



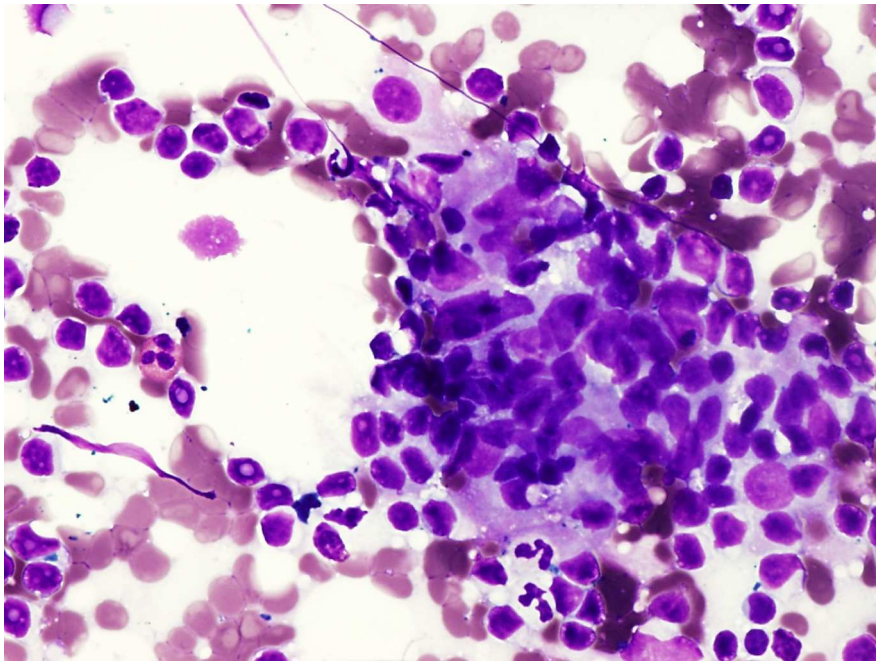
5.1 ábra A 32.sz. nyirokcsomó pozitívnak ítélt területe a lenyomati preparátumban Hemacolor festéssel



5.2. ábra A 32. sz. nyirokcsomó pozitívnak ítélt területe citokeratin immuncitokémiai vizsgálattal.

A második álpozitív eset a 62. nyirokcsomó volt, ami a 48. számú lobularis invazív daganathoz eltávolított három sentinel nyirokcsomó közül volt az egyik. A beteg első nyirokcsomója macrometastasist tartalmazott, és erre alapozva végezték el a hónalji nyirokcsomóblokk kiirtását. A végleges vizsgálattal sem a 2. sentinelben egyébként rapid immuncitokémiával is észlelt izolált tumorsejteket, sem az egyértelműen tumoros sentinel nyirokcsomón kívül további metastaticus nyirokcsomókat nem sikerült azonosítani. Utólag átnézve a preparátumot, a gyanús sejtek valószínűleg nem daganatsejtek voltak, tehát ez tényleg álpozitív eredmény volt.

Az imprint citológiával 5 esetben nem tudtuk eldönteni, hogy a szokatlan megjelenésű sejt daganatos eredetű-e. Ezek közül 1 nyirokcsomóban a végleges vizsgálattal egy 3 mm-es macrometastasist találtunk. Ez a 83. számú invazív ductalis carcinomás eset 3, sentinelként eltávolított esete közül volt a második (105.sz. nyirokcsomó). Az esethez tartozó 1. nyirokcsomóban egyértelmű macrometastatist találtunk mindhárom vizsgálattal, majd a véglegessel is. Az 5.3. ábra a 105.számú nyirokcsomóban látott bizonytalanul értékelhető sejtcsoportot mutatja.



5.3 ábra A 105.számú nyirokcsomóból készült lenyomati kenetben bizonytalanul megítélhető sejtcsoport Hemacolor festéssel

A többi esetben a bizonytalan intraoperatív imprint citológiai vélemény után a végleges vizsgálatokkal nem sikerült daganatsejteket találni a nyirokcsomóban. Meggyőződésünk szerint a lenyomati kenetekben intraoperatív vizsgálattal biztosan azonosított szoliter daganatsejtek akkor is minimum ITC-nek tarthatók, ha a végleges beágyazott preparátumokban ezeket nem sikerült immunhisztokémiai módszerrel sem kimutatni. Bár az ITC-k jelenléte nem indikálja a hónalji nyirokcsomóblokk kiirtását, mindenképpen figyelemfelkeltő eredménynek tartandó, és az axilla további szoros kontrollját kell, hogy eredményezze.

5.2.1.3 Rapid immuncitokémia:

Szenzitivitását és specificitását tekintve is az önállóan értékelt három teszt közül a középső volt. Főleg a technikai hibákból eredően a morfológiailag gyanús sejtek halvány, nehezen értékelhető reakciója mellett a nem gyanús megjelenésű sejtek, és akár az összes lymphoid sejt álpozitivitása egyaránt jelentkezhet. Ilyenkor a

hagyományosan festett lenyomati kenetben látottak esetleg segíthetik az értékelést. Jól begyakorlott technikai kivitelezés mellett azonban megbízható, és elfogadhatóan gyors vizsgálómódszer. Emellett a nyirokcsomó dendritikus sejtjeinek citokeratin pozitivitása jelentkezhet hibaforrásként. Ez utóbbi különösen lobularis carcinomából származó viszonylag kicsi, és disszociálódott daganatsejtektől különíthető el nehezen.

5.2.1.3.1 A reakció sikerességét befolyásoló tényezők

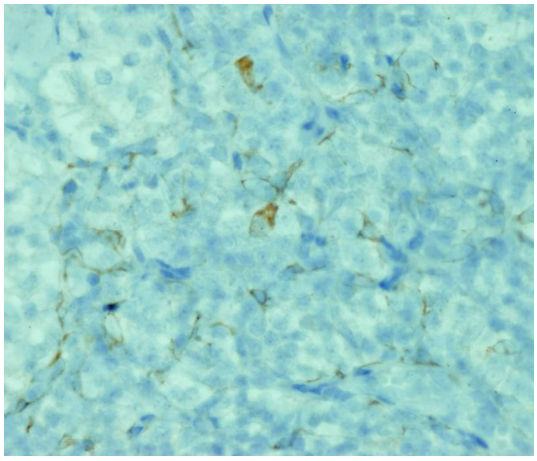
- Fixálás, beleértve a kenet túlzott beszáradástól való óvását, és a megfelelően lehűtött acetont. Ezt elkerülendő a kenetkészítés helyén ott kell lennie a hűtött acetont tartalmazó küvettának, és a keneteket előre el kell látni azonosítókkal. Emellett ügyelni kell a gyors, precíz lenyomatkészítésre.
- A nem friss vágási felszín: A sejtek száradása a nyirokcsomó metszési felszínén is elindulhat, ha nem elég friss a vágási felület a lenyomat készítés pillanatában. Ez elsősorban sejtszegény preparátumokat eredményez, melyek nem feltétlenül reprezentatívak az adott vágási felszínt illetően.
- A túl zsíros nyirokcsomó, vagy a zsírszövet nem elégséges lefejtése a nyirokcsomó felszínéről a felvágás előtt. A zsírnemű anyag jelenléte mellett tapasztalatunk szerint a sejtek gyakorlatilag leváltak a felszínről.
- Nem megfelelő erővel nyomják a felszínre a tárgylemezt. Ekkor valószínűleg nem fog a teljes felszín reprezentálódni. (főleg nagy átmérőjű, elzsírosodott centrumú nyirokcsomóknál probléma)
- Túl vastag a preparátum, esetleg nagyobb kiszakadt szövet fragmentumot tartalmaz. Ilyenkor vaskos álpozitivitás jelentkezhet a reagens csapdaként viselkedő viszonylag nagyobb lymphoid sejtcsoportban.

5.2.1.3.2 A dendritikus sejtek citokeratin pozitivitása:

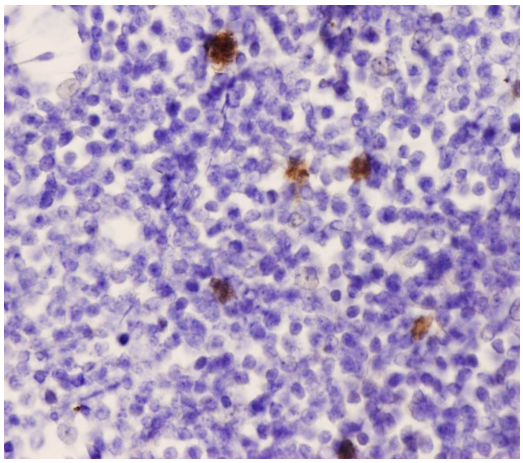
A nyirokcsomók szabályos szöveti szerkezetében jelen lévő dendritikus sejtek szövettani metszetekben jól megítélhető finom rajzolatú pozitivitást adnak keratin immunsavóval. A reakció jellegzetesen a nyirokcsomót átszövő halvány, kis magvú, nyúlványos körvonalú sejteket rajzol ki. A sejtek elkülönítése a jelenlévő daganatsejtektől metszetben többnyire könnyű. Problémát akkor jelenthet az azonosításuk, ha ismert lobularis invazív emlőcarcinoma áttétét keressük lenyomati keneteken végzett immunreakcióval. A legfontosabb morfológiai jelek a következők:

- A dendritikus sejtek lenyomati kenetekben mindig elszórtan egyesével vannak jelen,
- viszonylag kicsik,
- a magjuk alig azonosítható,
- a citokeratin reakció bizonytalan, elmosott határú, általában szemcsés, szemben a markáns pozitivitást adó daganatsejtekkel.
- A sejteket jellemző módon – az immunitásban betöltött szerepüknek megfelelően - lymphocyták veszik szorosan körül, mintegy egységet képezve.
- A lymphocyták közé a sejt finom nyúlványokat ereszt, de legalább is elmosott határúnak tűnik szemben a szoliter daganatsejtek kerekded megjelenésével.

A 5.4. ábrán szöveti környezetben látható a dendritikus sejtek pozitivitása, míg a 5.5 ábra a lenyomati kenetekben citokeratin reakcióval mutatkozó dendritikus sejtet mutatja.



5.4 ábra Dendritikus sejtek citokeratin pozitivitása parafinos blokkból készült metszetben (citokeratin AE1/AE3, hematoxylin magfestés,

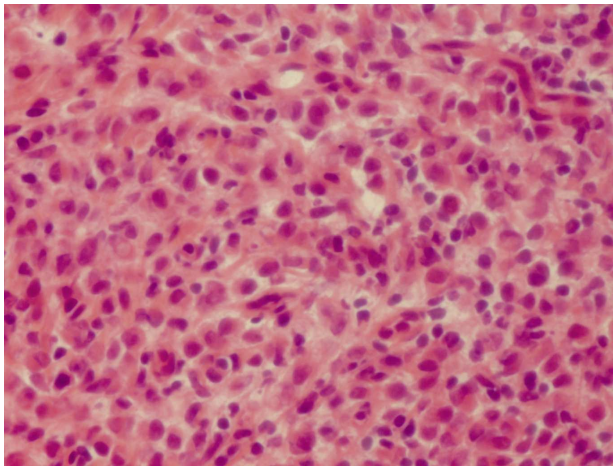


5.5 ábra Dendritikus sejt citokeratin pozitivitása lenyomati kenetben

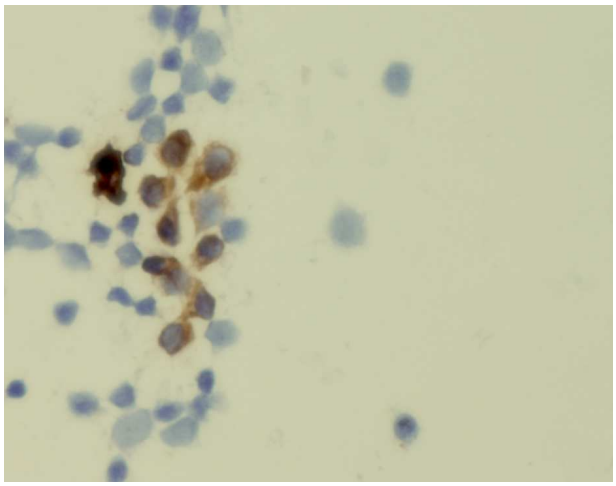
5.2.1.3.3 Lobularis carcinomából származó metastasisok detektálása

Mint ahogy számos irodalom is foglalkozik vele, az invazív lobularis carcinomából származó sejtek detektálása nagyon nehéz a sejtek jellemzően kicsi mérete, és a szintén jellemző egysejtes diffúz infiltrációs minta miatt. A daganatos sejtek intraoperatív és a végleges preparátumból történő detektálásához egyaránt hasznos a cytokeratin immunhisztokémia. (95,96)

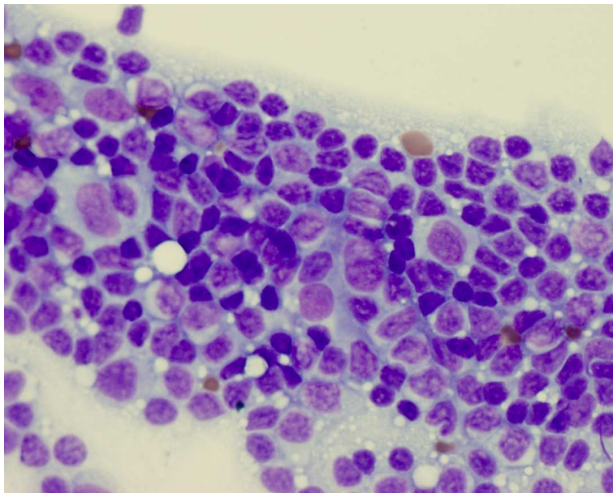
A jelen munkánkban 3 esetben adott lobularis carcinoma macrometastasist a sentinel nyirokcsomóba (48., 52., 82. számú eset). Ebből mindhárom esetet tudtuk diagnosztizálni a rapid immuncitokémiai módszerrel, illetve a fagyasztott metszetben, míg a 82. sz. eset lenyomati kenetében hemacolor festéssel nem sikerült fellelnünk a 3,5 mm-es metastasis nyomát. Utólag elemezve sem sikerült teljes biztonsággal daganatsejteket azonosítani pusztán morfológiailag. Az 5.6. ábra a fagyasztásos preparátumról készült, az 5.7. ábra az immuncitokémiai reakciót, míg az 5.8. ábra az azzal azonos régióját mutatja a hemacolorral festett preparátumnak.



5.6. ábra A 103.sz nyirokcsomóban (82. eset) lobularis carcinomából származó kisméretű daganatsejtek árasztják el a nyirokcsomó állományát. (40x, HE, fagyasztott preparátum)



5.7. ábra A 103.sz nyirokcsomóról készült lenyomati kenetben keratin immuncitokémiai vizsgálattal kimutatható daganatsejt-csoport. (40x cytokeratin



5.8. ábra A 103.sz nyirokcsomó lenyomati preparátumában a fentivel azonos régióban talált sejtcsoport, melyek nem különülnek el biztonsággal a környező nyiroksejtektől. (40x, Hemacolor festés, lenyomati kenet)

Egy esetből származó 2 nyirokcsomóban (98. eset, 124.,125. sz. nyirokcsomó) a végleges szövettani vizsgálattal izolált tumorsejteket sikerült kimutatnunk. A fagyasztott preparátumokban ezeket nem láttuk, míg a lenyomati kenetben hemacolor festéssel észleltük őket. A rapid immuncitokémiai reakcióval csak 1-2 gyanús sejtcsoportot láttunk, de nem tudtuk a reakciót biztosan pozitívként értékelni.

Összességében a lobularis rákok metastaticus sejtjeinek azonosítására mi is hasznosnak ítéltük a cytokeratin vizsgálatot, de a relatíve kevés eset alapján szignifikáns előnyt nem tapasztaltunk.

Az 5.1. táblázat az egyes citokeratin pozitív elemek elkülönítési lehetőségét foglalja össze a fenti tapasztalataink alapján.

5.1. táblázat. Az egyes citokeratin pozitív sejtes elemek jellemzői

	Dendritikus sejt	**Lobularis carcinomából származó sejt**	**Ductalis carcinomából származó sejt**
Megjelenés	Szoliter	Többnyire szoliter, vagy laza csoportok	Kisebb-nagyobb kohezív csoportok
Viszonya a lymphoid elemekhez	lymphoid sejtek által szorosan közrevéve	A lymphoid sejtek közé lazán keveredve	A lymphoid sejtek közé lazán keveredve
A sejt kontúrja, mérete	Elmosott, vagy rövid nyúlványos, közép nagy*	Kerek, éles határú, közép nagy*	Lekerekedett, éles határú, többnyire egyértelműen nagy* sejt
Sejtmag	Kicsi, halványan festődik, kerek, centrális	Relatíve nagy, excentrikus, hyperchrom	Többnyire nagy, lehet bizarr megjelenésű, hyperchrom
CK pozitivitás	Halvány, néha szemcsés	Közepes / erős, élesen kirajzolja a sejt citoplazmáját	Erős, élesen kirajzolja a sejt citoplazmáját

*a jelenlévő lymphoid sejtekhez viszonyítva

5.2.2 Egyéb gyakorlati tapasztalataink a sentinel nyirokcsomó intraoperatív gyorsdiagnosztikájával kapcsolatban.

5.2.2.1 Tapasztalataink a lenyomatok készítésével kapcsolatban:

A nyirokcsomót a hossztengelyére merőleges párhuzamos szeletekben vágtuk fel. Minden szelet levágása után azonnal a vágási felületeiről 1-1 lenyomatot nyomunk két tárgylemez hasonló területére. Ügyelünk arra, hogy a lenyomatok minél szorosabban legyenek egymás mellett, így a legoptimálisabb a helykihasználás. Az átlagos méretű nyirokcsomó minden metszési felületéről készült egy-egy lenyomat

többnyire elfér egy tárgylemezen. A nagyobb, zsíros centrumú nyirokcsomókról nehezebb a megfelelő preparátum készítése. Itt különösen arra kell ügyelni, hogy a tárgylemez felülete érintkezzen a nyirokcsomó széli részeivel is, mert itt húzódik a néha alig észlelhető vékonyságú parenchyma. A leletben rögzíteni kell a nyirokcsomó méretét, azt, hogy hogyan történt a felvágása, hány szelet készült, ezek milyen vastagok, a teljes nyirokcsomót reprezentáló preparátum hány kenetet tölt be, és hogy melyik szelet került fagyasztásra. A teljes precizitás érdekében célszerű a szeleteket külön számozva rakni a fixáló folyadékba a végleges feldolgozáshoz.

Ennek a feldolgozásnak a következő előnyeit tapasztaltuk:

- A lehető legkisebb felületre, kevesebb tárgylemezre koncentrálódik a preparátum, így gyorsabban lehet megfesteni, áttekinteni.
- Kisebb a veszélye annak, hogy a gyors screenelésnél kimaradnak látóterek.
- A kisebb felületre kevesebb reagens mennyiséget kell felhasználni.
- A két azonos lenyomat egymással összevethető, így az egymással párhuzamosan alkalmazott festésekkel (akár több tárgylemezen alkalmazott azonos festéssel is) jól lokalizálható az elváltozás.
- Az ismert szeletvastagságok alapján pontosabban becsülhető meg az elváltozás kiterjedése.

5.2.2.2 Az áttét méretének meghatározása:

A jól elkészített lenyomaton belül behatárolható annak a területnek a körvonala, melyen belül a sejtek előfordulnak. Ha ezen belül elszórtan csak daganatsejtek láthatók, minimális nyiroksejttel keveredve, akkor valószínűsíthető, hogy azon a területen egybefüggő tumor szövet van a nyirokcsomóban. Tovább emeli ennek valószínűségét, ha több egymás utáni szeletet reprezentáló lenyomatban azonosítjuk a daganatsejteket. A terület lemérésével 3 irányú átmérője is megjósolható. Ha a

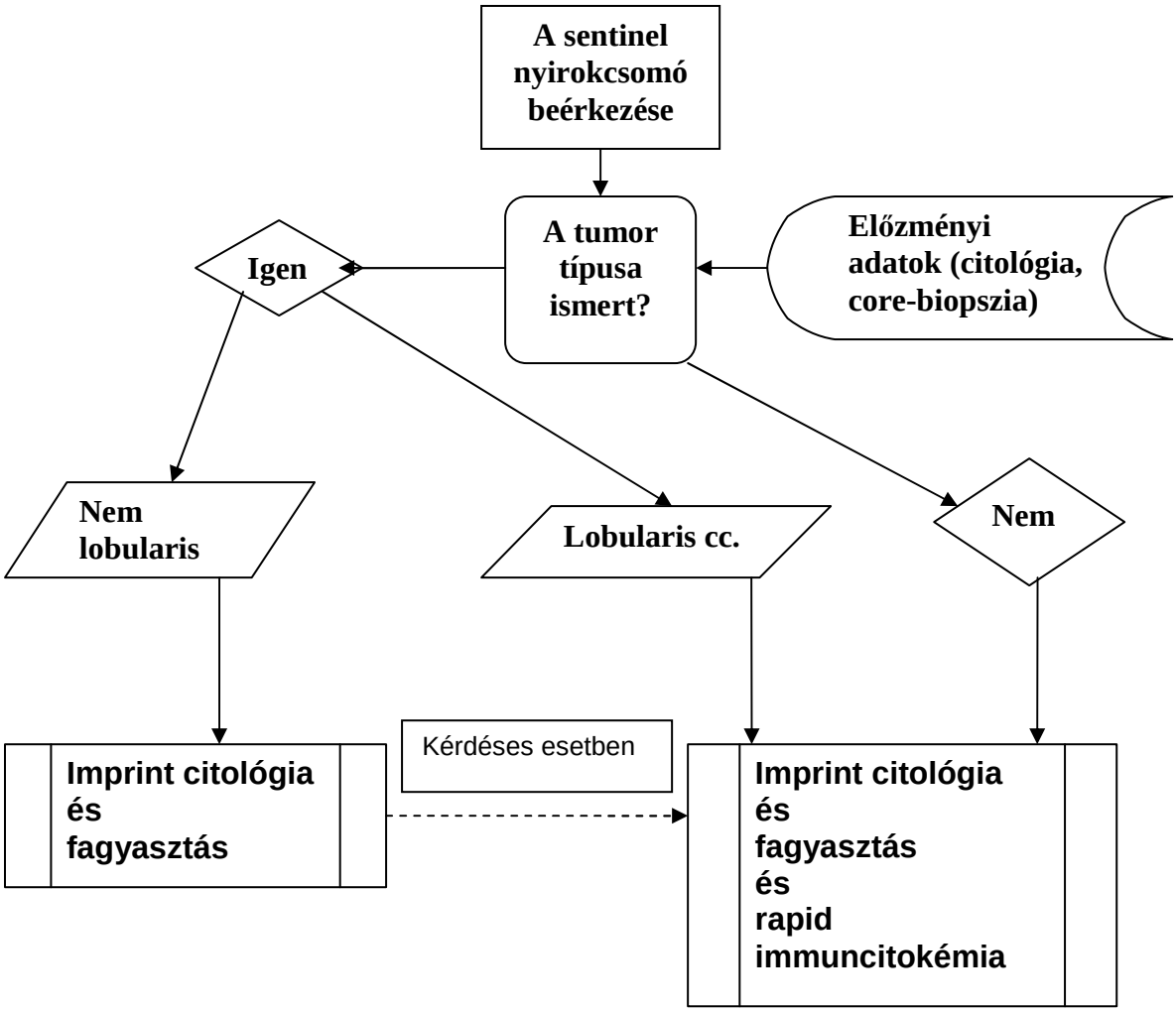
daganatsejt csoportok között nagytömegű nyiroksejt látható, akkor elszórt ITC a valószínűbb. Ezek természetesen csupán tapasztalati megfigyelések, de kétséges helyzetben, vagy ha a fagyasztásra került preparátumban nem látható daganatsejt, esetleg nem készült fagyasztott metszet, támpontot adhatnak. A kérdésnek mindenesetre komoly jelentősége van, mert jelen protokoll szerint ITC-re nem kell hónalji nyirokcsomó ablatiót végezni.

5.2.2.3 Javasolt algoritmus:

A fenti adataink, és tapasztalataink alapján egyértelmű, hogy a nem molekuláris módszerek közül a dolgozatban leírt vizsgálattípusok együttes alkalmazása adja a legnagyobb biztonságot.

Amennyiben azonban valamilyen oknál fogva mérlegelni kell, hogy melyik vizsgálatot végezzük, az alábbi folyamatábrán (5.9. ábra) szemléltetett algoritmust javasoljuk követésre. A döntés alapja az, hogy ismerjük-e annak a tumornak a szöveti típusát, melynek sentinel nyirokcsomóját vizsgálnunk kell. Amennyiben gyanítjuk, vagy biztosan tudjuk, hogy lobularis carcinomáról van szó, vagy nem tudunk semmit a primer tumorról, mindenképpen javasoljuk a hármas vizsgálatkombináció alkalmazását.

5.9. ábra Javasolt algoritmus a vizsgálati metódus kiválasztására



5.2.3 Új megállapítások az intraoperatív őrszem nyirokcsomó diagnosztikával kapcsolatban

Abból a célból, hogy növeljük az őrszem nyirokcsomó metastasis detektálásának megbízhatóságát, egyszerre háromféle metódussal végeztük az őrszemnyirokcsomó intraoperatív vizsgálatát: a hagyományos fagyasztásos, és imprint citológia mellett alkalmaztuk a lenyomati keneteken kivitelezhető cytokeratin rapid immuncitokémiai módszert. A talált leleteket összevetettük a nyirokcsomó végleges szövettani

eredményeivel. A vizsgálatsorozat kivitelezése és értékelés közben az alábbi új megállapításokat tettük:

- Az általunk kidolgozott standardizált kenetkészítési technika kifejezetten előnyös, mert
    - többféle technika együttes alkalmazása esetén a kenetek egymással összevethetők.
    - ez vizsgáló módszerenként 1-max 2 kenet készítésével jár, így lerövidíti a preparátumok elkészítésének, átnézésének idejét, csökkenti a költségeket.
    - ugyanakkor az egész nyirokcsomóról ad felvilágosítást.
    - segítséget ad a metastasis méretének megállapításában.
- Kimutattuk, hogy a technikák kombinációja sokkal eredményesebb, mint önálló alkalmazásuk. Legmegbízhatóbb eredmény elérése érdekében javasoljuk az imprint citológia kombinálását akár a fagyasztásos vizsgálattal, akár a rapid immuncitokémiával.
- Az általunk javasolt metodikai algoritmus figyelembe veszi a daganat előzetesen megállapított szöveti típusát.
- Felhívtuk a figyelmet az intraoperatív diagnosztikával fellelt, de a végleges preparátumokban ki nem mutatható daganatsejtek jelentőségére.
- Összegeztük a keratin pozitív sejtek, közöttük a dendritikus sejtek differenciáldiagnosztikai jellemzőit.

6 Összefoglalás

Az emlőrák kezelése a szövettani vizsgálatok során feltárt prognosztikai és prediktív faktorokon múlik, így alapvető fontosságú az ezeket vizsgáló megfelelő metodika kiválasztása. Dolgozatomban a sebészi, és az onkológiai terápiát jelentősen befolyásoló két kulcsfontosságú tényező, a nyirokcsomóstátusz és a dagnat HER2 expressziójának meghatározásával foglalkoztam.

Az első részben a piacon újonnan megjelent, regisztrált IVD státusszal rendelkező, de FDA által nem jóváhagyott, és valószínűleg ezért jóval olcsóbb Poseidon HER2/SE17 dual color FISH kit validációs vizsgálatát végeztük el a gold standardnak tartható PathVysion HER2/CEP17 FISH kithez viszonyítva. A statisztikai analízis bebizonyította, hogy a két FISH próba hasonló értékű a HER2 gén amplifikáció detektálása terén, így a Poseidon kittel nyert leletek ugyanolyan értékűnek tarthatók, mint az FDA által akkreditált PathVysion próba eredményei.

A második részben a sentinel nyirokcsomók intraoperatív vizsgáló módszereit hasonlítottuk össze, különös figyelmet szentelve a lenyomati keneteken alkalmazható rapid immuncitokémiai vizsgálat elemzésére. Az őrszemnyirokcsomó daganatának intraoperatív vizsgálata szempontjából leghatékonyabbnak a lenyomati kenet és akár a fagyasztásos vizsgálat, akár a rapid immuncitokémia kombinációja, vagy mindhárom módszer együttes alkalmazása tűnik. A lenyomati kenetek elkészítésének standardizált technikája jelentősen csökkentette azt az időt, mely a kenetek áttekintésével telik, csökkentette a vizsgálat költségeit, hasznosnak bizonyult az áttét méretének megbecsülésében.

Munkámmal az emlőrák rutin szövettani diagnosztikájában közvetlenül hasznosítható tapasztalatokat foglaltam össze.

Summary

Breast cancer therapy is determined by prognostic and predictive factors revealed by various histological examinations. Therefore, the most appropriate diagnostic method has a great importance of choosing the optimal treatment. The objectives of this work are HER2 amplification and sentinel lymph node status assessment in breast cancer cases.

Comparison of two commercially available FISH assays (PathVysion assay and newly introduced Poseidon HER2 dual color FISH kit) demonstrated nearly identical results. Considering costs, the PathVysion assay is almost twice as expensive as the Poseidon kit. Therefore, using the new HER2 kit in routine pathological testing of HER2 gene status provides reliable results with a remarkable reduction of costs.

We have also described our experiences in combination of intraoperative immunocytochemistry technique with frozen sections and touch imprint cytology in breast cancer sentinel node assessment. The combined accuracy of three methods was the same as combining touch imprint plus frozen section or touch imprint plus rapid immunocytochemistry. In conclusion, touch imprint cytology in combination with either frozen section analysis or rapid immunocytochemistry are recommended for routine practice. The novel standard imprint technique has showed time and cost saving, and it can also be well utilized in appreciating the size of metastasis

7 Irodalomjegyzék

7.1 A hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.** Science 1987; 235: 177–182.

2. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. **Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer.** Science 1989; 244: 707–712.

3. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. **Prognostic factors in breast cancer: College of American Pathologists Consensus Statement** 1999. Arch Pathol Lab Med 2000; 124: 966–978.

4. Piccart M, Lohrisch C, Di Leo A, Larismont D. **The predictive value of HER2 in breast cancer.** Oncology 2001; 61 (Suppl 2): 73–82.

5. Ross JS, Fletcher JA. **The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy.** Stem Cells 1998; 16: 413–428.

6. Dowsett M, Cooke T, Ellis I, Gullick WJ, Gusterson B, Mallon E, et al. **Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how?** Eur J Cancer 2000; 36: 170–176.

7. Cserni G, Francz M, Járay B, Kálmán E, Kovács I, Kulka J, Orosz Z, Udvarhelyi N, Vass L. **Az emlőrák patológiai diagnosztikája, feldolgozása és kórszövettani leletezése** Magy Onkol 2010;54(3):217-26

8. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. **The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity**. Science 1986; 232 (4758):1644–1646.

9. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. **ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all. ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling**. EMBO Journal 1997;16(7):1647–1655.

10. Yarden Y, Sliwkowski MX. **Untangling the ErbB signalling network**. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2001;2(2):127–137.

11. Moasser MM. **The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis.** Oncogene 2007;26(45):6469–6487.

12. Fukushige SI, Matsubara KI, Yoshida M et al. **Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line.** Molecular and Cellular Biology1986;6(3):955–958.

13. King CR, Kraus MH, Aaronson SA et al. **Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma.** Science 1985; 229 (4717):974–976.

14. Umemura S, Sakamoto G, Sasano H, Tsuda H, Akiyama F, Kurosumi M, et al. **Evaluation of HER2 status: for the treatment of metastatic breast cancers by humanized anti-HER2 monoclonal antibody (trastuzumab) (Pathological Committee for Optimal use of Trastuzumab).** Breast Cancer 2001; 8: 316–320.

15. Bast RC, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche HJr, Jessup JM, et al. **2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology**. J Clin Oncol 2001; 19: 1865–1878.

16. Rhodes A, Jasani B, Couturier J, McKinley MJ, Morgan JM, Dodson AR, et al. **A formalin-fixed, paraffin-processed cell line standard for quality control of immunohistochemical assay of HER-2/neu expression in breast cancer.** Am J Clin Pathol 2002; 117: 81–89.

17. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. **Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status in breast cancer using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system.** J Clin Oncol 1999; 17: 1983–1987.

18. Penault-Llorca F, Balaton A, Sabourin JC, Le Doussal V**. Immunohistochemical evaluation of HER2 status in infiltrating breast cancers: development of technical protocol and reading of results—recommendations.** Ann Pathol 2002; 22: 150–157.

19. Cserni G, Kálmán E, Kulka J, Orosz Z, Udvarhelyi N, Krenács T. **HER2 immunhisztokémiai vizsgálatok minőségellenőrzése. Egy magyarországi körvizsgálat eredményei.** Magy Onkol. 2007;51(1):23-9.

20. Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan TM. **Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical falsepositives do not get the message**. J Clin Oncol 2001; 19: 2714–2721.

21. Wang S, Hossein Saboorian M, Frenkel EP, Haley BB, Siddiqui MT, Gokaslan S, et al**. Aneusomy 17 in breast cancer: its role in HER-2/neu protein expression and implication for clinical assessment of HER-2/neu status.** Mod Pathol 2002; 15(2):137-145.

22. Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, Paesmans M, Desmedt C, Gomez-Galdon M, et al. **Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice.** Clin Cancer Res 2005; 11(12):4393-4399.

23. Varshney D, Zhou YY, Geller SA, Alsabeh R**. Determination of HER-2 status and chromosome 17 polysomy in breast carcinomas comparing HercepTest and PathVysion FISH assay.** Am J Clin Pathol 2004; 121(1):70-77.

24. Persons DL, Bui MM, Lowery MC, Mark HF, Yung JF, Birkmeier JM, et al. **Fluorescence in situ hybridization (FISH) for the detection of HER-2/neu amplification in breast cancer: a multicenter portability study.** Ann Clin Lab Sci 2000; 30: 41–48.

25. Mass RD, Press M, Anderson S, Murphy M, Slamon D. **Improved survival benefit from Herceptin (trastuzumab) in patients selected by fluorescence in situ hybridization (FISH).** Proc Am Soc Clin Oncol 2001; 20: 22a.

26. Vogel CL, Cobleigh D, Tripathy D, Mass R, Murphy M, Stewart SJ. **Superior outcomes with Herceptin (trastuzumab) (H) in fluorescence in situ hybridization (FISH)-selected patients.** Proc Am Soc Clin Oncol 2001; 20: 22a.

27. Tubbs RR, Hicks DG, Cook J, et al. **Fluorescence in situ hybridization (FISH) as primary methodology for the assessment of HER2 Status in adenocarcinoma of the breast: a single institution experience.** Diagn Mol Pathol 2007; 16: 207-10.

28. Gancberg D, Lespagnard L, Rouas G, Paesmans M, Piccart M, Di Leo A, et al. **Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples of invasive breast carcinomas. Correlation with oncogene amplification in 160 cases.** Am J Clin Pathol 2000; 113: 675–682.

29. Jimenez RE, Wallis T, Tabasczka P, Visscher DW. **Determination of Her-2/neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization.** Mod Pathol 2000; 13: 37–45.

30. Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B, et al. **Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization.** J Clin Oncol 2001; 19: 354–363.

31. Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. **HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues.** Clin Breast Cancer. 2004;5:63–9.

32. Dybdal N, Leiberman G, Anderson S, McCune B, Bajamonde A, Cohen RL, et al. **Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical trials immunohistochemicalassay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab**. Breast Cancer Res Treat 2005; 93(1):3-11.

33. Hanna W, O'Malley FP, Barnes P. et al. **MD Updated recommendations from the Canadian National Consensus Meeting on HER2/neu testing in breast cancer** Curr Oncol. 2007 August; 14(4): 149–153.

34. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz IN, et.al**. American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists guideline recommendations for**

human epdermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol 2007;25:118-145,

35. Walker RA, Bartlett JM, Dowsett M, Ellis IO, Hanby AM, Jasani B, Miller K, Pinder SE. **HER2 testing in the UK: further update to recommendations**. J Clin Pathol 2008; 61: 818–824.

36. Middleton LP, et al. **Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases.** Arch Pathol Lab Med. 2009;133:775-780.

37. Bartlett JM, Campbell FM, Ibrahim M, et al. **A UK NEQAS ICC and ISH multicentre study using the Kreatech Poseidon HER2 FISH probe: intersite variation can be rigorously controlled using FISH.** Histopathol 2010;56(3):297-304.

38. Kononen J, Budendorf L, Kallioniemi A, Barlund M,, Schraml P,et al. **Tissue microarrays for high-throughput mulecular profiling of tumor specimens**. Nat Med 1998;4:844-847.

39. Lin LI. **A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility.** Biometrics. 1989; 45: 255-68.

40. Liao JJ, Lewis JW. **A note on concordance correlation coefficient.** PDA J Pharm Sci Technol 2000; 54: 23-26.

41. Bland JM, Altman DG. **Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement.** Lancet 1986; 1: 307-10.

42. Lee J, Fung KP. **Confidence interval of the kappa coefficient by bootstrap resampling.** Psychiatry Res 1993; 49: 97-8.

43. Kakar S, Puangsuvan N, Stevens JM, Serenas R, Mangan G, Sahai S, Mihalov ML. **Comparison of PathVysion and INFORM fluorescence in situ hybridization kits for assessment of HER-2/neu status in breast carcinoma.** Mol Diagn. 2000 Sep;5(3):193-7.

44. Roche PC, Suman VJ, Jenkins RB, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, Addo FK, Murphy B, Ingle JN, Perez EA. **Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial** N9831. J Natl Cancer Inst. 2002 Jun 5;94(11):855-7.

45. Cayre A, Mishellany F, Lagarde N, Penault-Llorca F. **Comparison of different commercial kits for HER2 testing in breast cancer: looking for the accurate cutoff for amplification.** Breast Cancer Res. 2007;9(5):R64.

46. Ruffin WK, Stacey-Clear A, Younger J, et al. **Rationale for routine axillary dissection in carcinoma of the breast.** J Am Coll Surg 1995;180:245–51.

47. Ivens D, Hoe Al, Podd TJ, et al. **Assessment of morbidity from complete axillary dissection.** Br J Cancer 1992;66:136–8.

48. Turner RR, Ollila DW, Krasne DL, et al. **Histopathologic validation of the sentinel node hypothesis for breast carcinoma.** Ann Surg 1997;226:271–6.

49. Giuliano AE. **Sentinel lymphadenectomy in primary breast carcinoma: an alternative to routine axillary dissection.** J Surg Oncol 1996;62:75–6.

50. Chua B, Ung O, Taylor R, Boyages J. **Is there a role for axillary dissection for patients with operable breast cancer in this era of conservatism?** ANZ J Surg. 2002 Nov;72(11):786-92. PubMed PMID: 12437688.

51. Cady B, Stone MD, Schuler JG, et al. **The new era in breast cancer: invasion, size and nodal involvement dramatically decreasing as a result of mammographic screening.** Arch Surg 1996;131:301–8.

52. Copeland EM. **Is axillary dissection necessary for T1 carcinoma of the breast?** J Am Coll Surg 1997;184:397–8.

53. Tabár L, Duffy SW, Vitak B, et al. **The natural history of breast carcinoma. What have we learned from screening?** Cancer 1999;86:449–62

54. Gould EA, Winship T, Philbin PH, Kerr HH. **Observations on a „sentinel node" in cancer of the parotid** Cancer. 1960 Jan-Feb;13:77-8.

55. Krag DN, Weaver DL, Alex JC, et al. **Surgical resection and radiolocalization of the sentinel node in breast cancer using a gamma probe.** Surg Oncol 1993;2:335–9.

56. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, et al. **Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer.** Ann Surg 1994;220:391–401.

57. Turner RR, Ollila DW, Krasne DE, Giuliano AE**. Histopathologic Validation of the Sentinel Lymph Node Hypothesis for Breast Carcinoma.** Ann Surg 1997;226:271-278

58. Giuliano AE, Dale PS, Turner RR, et al**. Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy.** Ann Surg 1995;222:394–9.

59. Giuliano AE, Jones RC, Brennan M, et al. **Sentinel lymphadenectomy in breast cancer.** J Clin Oncol 1997;15:2345–50.

60. Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, et al. **Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes.** Lancet 1997;349:1864–67

61. Cox CE, Pendas S, Cox JM,et al. **Guidelines for sentinel node biopsy and lymphatic mapping of patients with breast cancer.** Ann Surg 1998;227:645–53.

62. Koller M, Barsuk D, Zippel D, et al**. Sentinel lymph node involvement: a predictor for axillary node status with breast cancer: has the time come?** Eur J Surg Oncol 1998;24:166–8.

63. Kootstra JJ, Hoekstra-Weebers JE, Rietman JS, et al. **A longitudinal comparison of arm morbidity in stage I-II breast cancer patients treated with sentinel lymph node biopsy, sentinel lymph node biopsy followed by completion lymph node dissection, or axillary lymph node dissection.** *Ann Surg Oncol.* 2010;17(9):2384–2394.

64. Van Diest PJ,Torrenga H,Borgstein PJ, et al. **Reliability of intraoperative frozen section and imprint cytological investigation of sentinel lymph nodes in breast cancer**. Histopathology 1999;35:14–8.

65. Chao C, Wong SL,Ackermann D, et al. **Utility of intraoperative frozen section analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer**. Am J Surg 2001;182:609–15.

66. Menes TS, Tartter PI,Mizrachi H,et al. **Touch preparation or frozen section of sentinel lymph node metastases from breast cancer.** Ann Surg Oncol 2003;10:1166–70.

67. Motomura K, Inaji H,Komoike Y, et al**. Intraoperative sentinel lymph node examination by imprint cytology and frozen sectioning during breast surgery.** Br J Surg 2003;87:597–601.

68. Dabbs DJ, Fung M, Johnson R. **Intraoperative cytologic examination of breast sentinel lymph nodes: test utility and patient impact.** Breast J 2004;10:190–4.

69. Cox C, Centeno B,Dickson D,Clark J, et al. **Accuracy of intraoperative imprint cytology for sentinel lymph node evaluation in the treatment of breast carcinoma, a 6 year study.** Cancer 2005;105:13–20.

70. Pogacnik A,Klopcic V,Grazio-Frkovics, et al. **The reliability and accuracy of intraoperative imprint cytology of sentinel lymph nodes in breast cancer.** Cytopathology 2005;16:71–6.

71. Tew K,Irwig L,Matthews A, et al**. Meta-analysis of sentinel lymph imprint cytology in breast cancer.** Br J Surg 2005;92:1068–80.

72. Brogi E, Torres-Matundan E, Tan LK, et al. **The results of frozen section, touch preparation, and cytological smear are comparable for intraoperative examination of sentinel lymph nodes: a study in 133 breast cancer patients.** Ann Surg Oncol 2005;12:173–80.

73. Pugliese MS, Tickman R, Wang NP, et al. **The utility of intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer.** Ann Surg Oncol 2007;14:1024–30.

74. Tamiolakis D, Papadopoulos N, Venizelos J, et al. **Intraoperative touch imprint cytological analysis of sentinel lymph nodes for the presence of metastases in breast cancer.** Onkologie 2007;29:372–5.

75. Tarján M. **Őrszem nyirokcsomó-biopszia Magyarországon. A sebészi onkológia forradalmi újításának hazai eredményei.** Magy Onkol. 2002;46(4):315-21

76. Cserni G, Amendoeira I, Apostolikas N, et al. **Discrepancies in current practice of pathological evaluation of sentinel lymh nodes in breast cancer. Results of a questionaire based survey by the European Working Group for Breast Screening** Pathology. J Clin Pathol 2004;57(7):695-701.

77. Viale G, Bosari S, Mazzarol G, Galimberti V, Luini A, Veronesi P, Paganelli G, Bedoni M, Orvieto E**. Intraoperative examination of axillary sentinel lymph nodes in breast carcinoma patients.** Cancer 1999;85:2433-8.

78. Karsten U, Stosiek P. **Fast and sensitive immunodetection of carcinoma cells in sentinel nodes.** Virchows Arch 2002;440:325-9.

79. Beach RA, Lawson D,Waldrop SM, et al. **Rapid immunohistochemistry for cytokeratin in the intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes for metastatic breast carcinoma.** Appl Immunohistochem Mol Morphol 2003;11:45–50.

80. Nahrig JM, Richter T, Kuhn W, Avril N, Flatau B, Kowolik J, et al. **Intraoperative examination of sentinel lymph nodes by ultrarapid immunohistochemistry**. Breast J 2003;9:277–81.

81. Lee IK, Lee HD, Jeong J, Park BW, Jung WH, Hong SW, Oh KK, Ryu YH. **Intraoperative examination of sentinel lymph nodes by immunohistochemical staining in patients with breast cancer.** Eur J Surg Oncol 2006;32:405-9.

82. Upender S, Mohan H, Handa U, Attri AK. **Intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes in breast carcinoma by imprint cytology, frozen section and rapid immunohistochemistry.** Diagn Cytopathol 2009;37:871-5.

83. Leikola JP, Toivonen TS, Krogerus LA, von Smitten KA, Leidenius MH. **Rapid immunohistochemistry enhances the intraoperative diagnosis of sentinel lymph node metastases in invasive lobular breast carcinoma.** Cancer 2005;104:14-9.

84. Choi YJ, Yun HR, Yoo KE et al. **Intraoperative Examination of Sentinel Lymph Nodes by Ultrarapid Immunohistochemistry in Breast Cancer.** Jpn J Clin Oncol 2006;36:489-93.

85. Salem AA, Douglas-Jones AG, Sweetland HM, Newcombe RG, Mansel RE. **Evaluation of axillary lymph nodes using touch imprint cytology and immunohistochemistry.** Br J Surg 2002;89:1386-9.

86. Salem AA, Douglas-Jones AG, Sweetland HM, Mansel RE. **Intraoperative evaluation of axillary sentinel lymph nodes using touch imprint cytology and immunohistochemistry: I. Protocol of rapid immunostaining of touch imprints.** Eur J Surg Oncol 2003;29:25-8.

87. Salem AA, Douglas-Jones AG, Sweetland HM, Mansel RE. **Intraoperative evaluation of axillary sentinel lymph nodes using touch imprint cytology and immunohistochemistry.** Part II. Results. Eur J Surg Oncol 2006;32:484-7.

88. Munakata S, Aihara T, Morino H, Takatsuka Y. **Application of immunofluorescence for intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes in patients with breast carcinoma.** Cancer 2003;98:1562-8.

89. Blumencranz P, Whitworth PW, Deck K, et al. **Sentinel node staging for breast cancer: intra operative molecular pathology overcomes conventional histologic sampling errors.** Am J Surg 2007;194:426–32.

90. Tsujimoto M, Nakabayashi K,Yoshidome K, et al. **One step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients.** Clin Cancer Res 2007;13:4807–16.

91. Austwick MR, Clark B, Mosse CA, Johnson K. **Scanning elastic scattering spectroscopy detects metastatic breast cancer in sentinel lymph nodes** J. Biomed. Opt 2010;15,doi:10.1117/1.3463005

92. Silverberg SG, Mutter GL, Kurman RJ, et al**. WHO Classification of Tumors: Pathology and Genetics, Tumors of the Breast and Female Genital Organs.** Ed. Tavassoli FA, Devilee P. IARC Press, Lyon-France 2003; 11.

93. Elston CW, Ellis IO. **Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer.** Histopathol 1991; 19:403-410, 1991.

94. Singletary SE, Allred C, Ashley P, et al. **Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer**. J Clin Oncol 2002; 20:3628–36.

95. Weinberg ES, Dickson D, White L, et al. **Cytokeratin staining for intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes in patients with invasive lobular carcinoma.** Am JSurg 2004;188:419–22.

96. Cserni G, Bianchi S, Vezzosi V, Peterse H, et al. **The value of cytokeratin immunohistochemistry in the evaluation of axillary sentinel lymph nodes in patients with lobular breast carcinoma** J Clin Pathol 2006;59:518–522.

7.2 A munka alapjául szolgáló saját közlemények jegyzéke

DEENK www.lib.unideb.hu
DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /212/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Francz Mónika

Neptun kód: CPCB6H

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Francz, M.**, Egervári, K., Szöllősi, Z.: Intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: Comparison of frozen sections, imprint cytology and immunocytochemistry.
   Cytopathology. 22 (1), 36-42, 2011.
   DOI: http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2303.2010.00818.x
   IF:1.097 (2010)

2. **Francz, M.**, Egervári, K., Kardos, L., Tóth, J., Nemes, Z., Szántó, J., Szöllősi, Z.: Comparison of Pathvysion and Poseidon HER2 FISH assays in measuring HER2 amplification in breast cancer: A validation study.
   J. Clin. Pathol. 63 (4), 341-346, 2010.
   DOI: http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2009.066852
   IF:2.475

DEBRECENI EGYETEM KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR

4032 Debrecen, Egyetem tér 1. e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

7.3 Egyéb, a jelen munkában nem használt saját közlemények jegyzéke

DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

További Közlemények

3. Cserni, G., **Francz, M.**, Kálmán, E., Kelemen, G., Komjáthy Detre, C., Kovács, I., Kulka, J., Sarkadi, L., Udvarhelyi, N., Vass, L., Vörös, A.: Estrogen receptor negative and progesterone receptor positive breast carcinomas-how frequent are they?
Pathol. Oncol. Res. 17 (3), 663-668, 2011.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s12253-011-9366-y
IF:1.483 (2010)

4. Cserni G., **Francz M.**, Járay B., Kálmán E., Kovács I., Kulka J., Orosz Z., Udvarhelyi N., Vass L.: Az emlőrák patológiai diagnosztikája, feldolgozása és kórszövettani leletezése.
Magyar Onkol. 54 (3), 217-226, 2010.
DOI: http://dx.doi.org/10.1556/MOnkol.54.2010.3.3

5. **Francz M.**: Az endometrium rákmegelőző állapota: Endometrialis intraepithelialis neoplasia.
Magyar Onkol. 52 (1), 35-40, 2008.
DOI: http://dx.doi.org/10.1556/MOnkol .52.2008.1.1

6. Olajos, J., Füle, E., Erfán, J., Krenács, L., Stelkovics, É., **Francz, M.**, Lengyel, E., Al-Farhat, Y., Ésik, O.: Familial clustering of nasopharyngeal carcinoma in a non-endemic geographical region. Report of two Hungarian cases and a review of the literature.
Acta Oto-Laryngol. 125 (9), 1008-1013, 2005.
DOI: http://dx.doi.org/10.1080/00016480510040155
IF:0.791

7. Varga S., Konczili V., Zemanek P., **Francz M.**, Nábrádi Z.: Meglepetést okozó appendix, avagy primer emlőrák metasztázisa okozta appendicitis.
Magyar Seb. 58, 334-336, 2005.

Összesített impakt faktor: 5,846

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 3,572

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.10.12

4032 Debrecen, Egyetem tér 1. e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

8 Tárgyszavak

Tárgyszavak:	**Keywords:**
Emlőrák	Breast cancer
HER2	HER2
FISH vizsgálat	FISH assay
Validációs vizsgálat	Validation study
Őrszem nyirokcsomó	Sentinel lymph node
Lenyomati citológiai vizsgálat	Imprint cytology
Fagyasztott metszet	Frozen section
Gyors immuncitokémia	Rapid immunocytochemistry
Izolált tumorsejtek	Isolated tumor cells
Micrometastasis	Micrometastase

9 Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Szöllősi Zoltánnak, hogy ötleteivel, lendületével, kitartásával és teljes szakmai tapasztalatával, szükséges mennyiségben adagolt kritikájával valamint aktív közreműködésével hozzásegített a publikációk és a dolgozatom megírásához.

Köszönöm Dr. Nemes Zoltán professzor úrnak, hogy az útkereséseimet szakmailag és emberileg is támogatta, és az intézetben, valamint a Terápiás célú daganat diagnosztikáért Alapítvány jóvoltából elérhető technikai és személyi hátteret munkánkhoz biztosította.

Köszönettel tartozom osztályom összes orvosának, különösen Dr. Tölgyesi Katalinnak és Dr. Kapin Mariannának amiért segítőkészen átvállalták tőlem azt a munkát, amire a kurzusokon való részvétel, a dolgozat írása közben már nem volt erőm.

Köszönöm asszisztenseimnek a gyönyörű preparátumokat, amikkel öröm volt dolgozni. Dr. Vikár Istvánné Marikának hálás vagyok a végtelen türelemmel beállított immuncitokémiai vizsgálatokért. Köszönöm Orosz Lászlóné Marikának az adminisztrációs segítséget, mely jelentősen megkönnyítette a dolgozat összeállítását és az intézni valók lebonyolítását.

Szeretném megköszönni mindenkori vezetőimnek, hogy a kórház erkölcsi és anyagi támogatását biztosítva engedélyezték számomra a PhD képzésben való részvételt.

És végül: köszönöm férjemnek, Dr.Kerényi Attilának és gyerekeimnek, Eszternek és Zsuzsának, valamint a tágabb családomnak, hogy erőt adó szeretetükkel, türelmükkel végig mellettem álltak.

10 Mellékletek: a munka alapjául szolgáló publikációk másolata

1. **Francz M**, Egervari K, Kardos L, Toth J, Nemes Z, Szanto J, Szollosi Z. Comparison of Pathvysion and Poseidon HER2 FISH assays in measuring HER2amplification in breast cancer: a validation study. J Clin Pathol. 2010 Apr;63(4):341-6. Epub 2009 Dec 3. PubMed PMID: 19965795.

2. **Francz M**, Egervari K, Szollosi Z. Intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: comparison of frozen sections, imprint cytology and immunocytochemistry. Cytopathology. 2011 Feb;22(1):36-42. doi:10.1111/j.1365-2303.2010.00818.x. Epub 2010 Oct 26. PubMed PMID: 20977506.