

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

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.

A doktori értekezés betétlapja

**Metodikai összehasonlító elemzések
az emlőrák HER-2 és őrszem nyirokcsomó diagnosztikájában**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a **klinikai orvostudományok** tudományágban

Írta: **Dr. Francz Monika**

Készült: a **Debreceni Egyetem Klinikai orvostudományok doktori iskolája (Experimentális és klinikai onkológia doktori programja)**
keretében

Témavezető: **Dr. Szöllősi Zoltán Ph.D.**

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: **Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora**

tagok: **Prof. Dr. Póka Róbert kandidátus**
Prof. Dr. Szentirmay Zoltán Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: **2011. december 13. 11:00 óra**

Az értekezés bírálói: **Dr. Mágori Anikó Ph.D.**
Dr. Kovács Judit Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: **Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora**
tagok: **Prof. Dr. Póka Róbert kandidátus**
Prof. Dr. Szentirmay Zoltán Ph.D.
Dr. Mágori Anikó Ph.D.
Dr. Kovács Judit Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: **2011. december 13. 13:00**

1 Bevezetés

A magyar nők körében magasan a leggyakoribb daganatos betegség az emlőrák. 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.

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. A HER-2 proteint túltermelő tumorok célzott

trastuzumab (HERCEPTIN) terápiájának 1998-as bevezetésével szükségessé vált a HER-2 status meghatározása. A jelenleg nemzetközileg elfogadott, és hazánkban is érvényes protokoll szerint első lépésben immunhisztokémiai vizsgálatot kell végezni. Ennek pozitívása esetén a trastuzumab terápiára alkalmasnak tartható a daganat. Negatívása 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. Erre 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 pozitívása esetén 30-60%-ban mutatható ki áttét a mögöttes

nyirokcsomókban. 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. 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.

2 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 műtete 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

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 elérhetőek. A metszetek alapján választottuk ki a rendelkezésre álló paraffinos blokkokból a tovább vizsgálendő, tumort tartalmazó részletet.

3.1.2 Szöveti microarray blokk

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, a core-okat az eredeti, HE metszetek alapján

a tumor centrumából és két átellenes széléből vettük. A TMA blokkokból 4 µm vastag metszetet húztunk le felületkezelt tárgylemezre. Minden blokkból készültek HE festett metszetek .

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 °C-os vízfürdőben 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 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°C-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 hibridizáltuk. 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 filter párt a PathVysion kithoz optimalizáltuk. A HER2 locus specifikus azonosító jel és a centromér azonosító szignál (CEP17 és SE17) arányát tumoronként 60 tumor sejten, 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) és Bland–Altman-féle 95%-os egyezési határok kiszámításával értékeltük.

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

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. Preoperatív 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 citológailag 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

^{99m}Tc -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. axillaris nyirokcsomószint eltávolítását.

3.2.3 Patológiai vizsgálat

3.2.3.1 Lenyomati kenetek készítése:

Az őrszem nyirokcsomót 1,5-2 mm vastag szeletekre vágjuk a hosszanti tengelyére merőleges síkban. Minden metszéslapról egyszerre két lenyomatot készítettünk két különböző felületkezelt tárgylemezre úgy,

hogy a frissen vágott metszészlapra finoman rányomtuk az üveget. Ügyeltünk, hogy az azonos metszési síkokból származó lenyomat azonos helyre kerüljön mindkét lemezen. Így két egyforma mintázatú lenyomatot nyertünk.

Az egyik lenyomati kenetet Hemacolorral (Merck, Darmstadt, Germany) festettük, a másikon intraoperatív (rapid) immuncitokémiai vizsgálatot végeztünk.

3.2.3.2 Hemacolor festés:

A levegőn megszárított kenetet Mercofix (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) fixáló sprayvel 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 acetóban, 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°C 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°C 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

Az 5 mm-es, vagy annál nagyobb nyirokcsomó egyik szeletéből 10 µm-es fagyasztott metszetek is készültek hematoxylin-eosin festéssel.

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. 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. 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 nottinghami histológiai grádusát az Elston-Ellis által módosított Scarff–Bloom–Richardson gradálás szerint

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 Eredmények, tapasztalatok

4.1 Eredmények a Poseidon HER2/SE17 FISH kit validációs vizsgálatán

4.1.1 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+.

4.1.2 Fluorescens in situ hibridizáció

A 122 emlőrákos eseten a HER-2 FISH analízist is sikerrel elvégeztük. 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.

4.1.3 A két FISH próba összehasonlítása

A reakciók szubjektív megítélés alapján közel hasonló mértékben voltak értékelhetők. A statisztikai elemzések során a Poseidon FISH kit-tel történt méréshez a PathVysion FISH eredményeket tekintettük referencia alapnak. 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. 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. A HER2 és centromér szignálok sejtenkénti átlagos számát, valamint a HER2/centromér arányt, mint folytonos változót statisztikailag elemeztük. 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, $p < 0,0001$). 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 nem mutatott amplifikációt, egy másik pedig 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, $p < 0,0001$)

4.1.4 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 jóslta 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; $p < 0,0001$).

4.2 *Eredmények az őrszem nyirokcsomó intraoperatív vizsgálati módszereinek összehasonlításában*

A végleges szövettani vizsgálattal 36 nyirokcsomóban találtunk daganatsejtet, ebből 27 nyirokcsomóban macrometastasis. Imprint citológiával és rapid ICK-val 23-23 esetben, fagyasztásos vizsgálattal csupán 21 esetben mondtunk ezekre pozitívást. A végleges vizsgálat 9 nyirokcsomóban azonosított micrometastasis, 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.

Imprint citológiával 2, rapid immuncitokémiával 1 esetben adtunk álpozitív eredményt. Fagyasztással álpozitív eset nem volt.

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.

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. 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. 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 gold standardnak tekinthető az elérhető HER2 FISH assay-k között.

Másrészt viszont a PathVysion FISH kittel végzett HER2 kimutatás költsége meglehetősen magas. 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. Megjegyzendő, hogy a PathVysion HER2 tesztje ennél szélesebb sávot jelöl a kromozómán (17q11.2-q12). A Poseidon kitben HER2 próba PlatinumBright 550 fluoreszkáló festékkel jelölt, míg az SE17 próbát PlatinumBright 495 fluorochrommal jelölték, A festékek excitációs és emissziós hullámhosszaik alapján detektálhatók ugyanazzal a szűrő párral, melyet a PathVysion assay-ben használt Spectrum Orange és Spectrum Green fluorochromokhoz fejlesztettek ki. 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. Itt a 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 ebben az esetben a két reagens között a HER-2 gén azonosításában volt jelentős különbség. Egyéb ilyen mértékű eltérést nem tapasztaltunk. 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.

Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a két FISH reagens csaknem egyenrangú. Ráadásul nincs szükség metodikai módosításra ahhoz, hogy a Poseidon kit számára is hasonló optimális

hibridizációs körülményeket biztosítsunk. Viszont a költségek terén jelentős különbség van a két assay között. A PathVysion HER2 DNA Probe Kit majdnem kétszer olyan drága, mint a Poseidon megfelelője. Éppen ezért az utóbbi használatával jelentős költségmegtakarítást lehet elérni a HER2 vizsgálat terén.

5.1.1 Új megállapítások a validációs vizsgálat során

- 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 immunhisztokémiaileg 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, reális lehetőség nyílik arra, hogy minden emlőrákos esetben el lehessen végezni a FISH vizsgálatot.

5.2 Az őrszem nyirokcsomó vizsgálatok eredményeinek megbeszélése

Adataink azt mutatták, hogy a hagyományos fagyasztásos vizsgálat rendelkezett a legalacsonyabb szenzitivitással, tehát a legkisebb valószínűséggel ezzel ismertük fel a pozitív eseteket. Az önállóan alkalmazott módszerek közül az imprint citológiával adtunk legtöbb valódi pozitív véleményt. Ez a módszer bizonyult a valamivel eredményesebbnek a néhány sejtes daganatmennyiség detektálásában. A macrometastasisok észlelése bármelyik kettős, vagy a hármas metódus kombináció alkalmazásával teljesen egyforma pontossággal történt. 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.

5.2.1 Részletes tapasztalataink az egyes vizsgálat típusokkal kapcsolatban

A *fagyasztott mintából* a macrometastasis meglehetősen biztonsággal azonosítható. Kisméretű nyirokcsomóból nem célszerű megcsinálni, mert fennáll a veszélye, hogy releváns területek mennek tönkre és maradnak így korrekt vélemény nélkül. Felmerül a veszélye annak, hogy a véletlenül a fagyasztott 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.

Az *imprint citológia* önálló metódusként a legmagasabb szenzitivitású módszernek bizonyult. Óriási előnye, hogy a nagyobb nyirokcsomóról is átfogó képet ad. Azonban ezzel a módszerrel két álpozitív esetünk is volt, és viszonylag sok a bizonytalan eredmény.

A *rapid immuncitokémia* szenzitivitását és specificitását tekintve is az önállóan értékelt három teszt közül a középső volt. Jól begyakorlott technikai kivitelezés mellett megbízható, és elfogadhatóan gyors vizsgálómódszer. A technikai hibák mellett a nyirokcsomó *dendriticus sejteinek* citokeratin pozitivitása jelentkezhet hibaforrásként. Ez utóbbi különösen lobularis carcinomából származó viszonylag kicsi, és disszociálódott daganatsejtektől különíthető el nehezen. Dolgozatomban összefoglaltam azokat a jellemzőket, melyek segíthetnek a citokeratin pozitív sejtek differenciálásában.

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.

5.2.2 Egyéb gyakorlati tapasztalataink a sentinel nyirokcsomó intraoperatív gyorsdiagnosztikájával kapcsolatban.

A vizsgálatok minél pontosabb kivitelezése és az összehasonlíthatóság biztosítása érdekében *precíz kenetkészítési technikát dolgoztam ki*, mely a következő előnyökkel jár:

- A lehető legkisebb felületre, kevesebb tárgylemezre koncentráldódik 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.

Összegeztem tapasztalatainkat a lenyomati kenetekben detektált *daganatos metastasis várható méretével* kapcsolatban. Macrometastasisra utal, ha több szeletből készült lenyomatban látjuk a daganat sejteket, és közöttük csak kevés nyiroksejt látható. Ha a daganatsejt csoportok között nagytömegű nyiroksejt látható, akkor elszórt ITC a valószínűbb. A kérdésnek mindenesetre komoly jelentősége van, mert a jelenleg alkalmazott protokoll szerint ITC-re nem kell hónalji nyirokcsomó ablatiót végezni.

Az általam *javasolt algoritmussal* a technika költséghatékonyan illeszthető be a napi rutin diagnosztikába.

5.2.3 Új megállapítások az intraoperatív őrszem nyirokcsomó diagnosztikával kapcsolatban

- Az általunk kidolgozott standardizált kenetkészítési technika kifejezetten előnyös, mert
 - többféle technika együttes alkalmazása esetén a kenetek egymással összevethetők.

- ez vizsgáló módszerként 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 daganat 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.

Kulcsszavak: emlőrák, HER2, őrszem nyirokcsomó

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

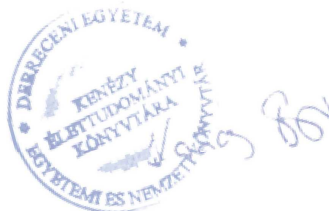
Jelölt: Francz Mónika

Neptun kód: CPCB6H

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Francz, M.**, Egervári, K., Szöllösi, 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., Szöllösi, 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



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