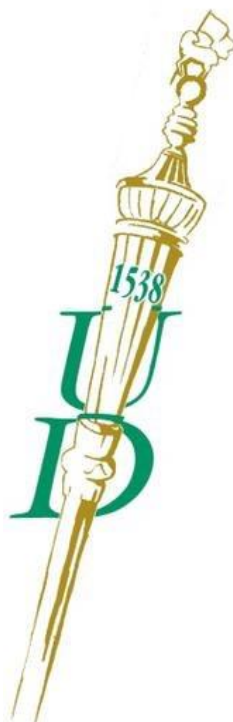


**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

# **Összehasonlító elemzések az emlőrák HER-2 státuszának meghatározásában**

**Dr. Kósa Csaba**



**DEBRECENI EGYETEM**

**Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola**

**Debrecen, 2017**

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

# **Összehasonlító elemzések az emlőrák HER-2 státuszának meghatározásában**

**Dr. Kósa Csaba**

**Témavezető: Dr. Szöllősi Zoltán PhD**



**DEBRECENI EGYETEM**

**Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola**

**Debrecen, 2017**

A doktori tézis betétlapja

**ÖSSZEHASONLÍTÓ ELEMZÉSEK AZ EMLŐRÁK HER-2 STÁTUSZÁNAK  
MEGHATÁROZÁSÁBAN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Kósa Csaba, szakorvos

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája  
(Experimentális és Klinikai Onkológia doktori programja) keretében

Témavezető: Dr. Szöllősi Zoltán, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Hernádi Zoltán, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora

Dr. Paszt Attila, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet könyvtára  
2017. április 28. 11 óra.

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Nemes Zoltán, az MTA doktora

Dr. Sávolt Ákos, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Hernádi Zoltán, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Nemes Zoltán, az MTA doktora

Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora

Dr. Paszt Attila, PhD

Dr. Sávolt Ákos, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme,  
2017. április 28. 13 óra.

## **1. Bevezetés**

Az emlőrák a harmadik leggyakoribb daganatos halálok a nők körében. Magyarországon megközelítőleg 7000 diagnosztizált eset mellett 2200-2400 halálesetért felelős minden évben. A daganat diagnózisának felállítása és a kezelési terv elkészítése bonyolult algoritmusok által meghatározott multidiszciplináris folyamat. A diagnózis legtöbbször valamilyen patológiai leleten alapszik.

A helyes diagnózis felállítása céljából patológiai módszerek gazdag tárháza áll rendelkezésünkre, mint például a citológia, a klasszikus szövettani vizsgálat, immunhisztokémia és molekuláris vizsgálatok. Ezen módszerek birtokában meg kell határozni a daganat méretét, a többgócúság meglétét, a pontos szövettani típust, a daganat differenciáltsági fokát (grádus), a vér- és nyirokérben való terjedést, a sebészi reszekciós szélek állapotát, valamint a regionális nyirokcsomók státuszát. Ezen felül minden esetben meg kell határozni a daganat proliferációs rátáját, a hormonreceptor és HER-2 státuszát, valamint a daganat fontos prognosztikai információkkal bíró genetikai tulajdonságait, melyekre egyre nagyobb igény mutatkozik. A folyamat kivitelezésében nemzetközi és hazai ajánlások vannak segítségünkre, melyek választható módszereket tartalmaznak, így rajtunk áll, hogy ezeket, avagy megfelelő áttekintés után egy, az ajánlásban nem szereplő másik módszert választunk.

A HER-2 pozitív emlő daganatokban HER-2 protein túltermelés mutatható ki, mely lényeges negatív prognosztikai jel, mivel ezek a daganatok gyorsabban nőnek, hamarabb adnak távoli áttéteket, gyakrabban recidiválnak és a hagyományos terápiás módszereknek jobban ellenállnak. A HER-2 pozitív daganatok célzott trastuzumab (HERCEPTIN) terápiájának bevezetésével, 1998-tól szükséges a HER-2 státusz meghatározása. Az első szövettani diagnóziskor - ha emlőrák igazolódik - a HER-2 tesztet rutinszerűen kell elvégezni minden egyes esetben. Ennek gyakorlati jelentősége egyre

nagyobb a HER-2 pozitív emlőrákok gyors felismerésében a klinikai kezelési gyakorlat megváltozásával. A modern emlőrák kezelésben, a személyre szabott kezelési mechanizmus meghatározásában az aspirációs citológiát jelentősen háttérbe szorította a részletesebb információkkal bíró core biopsziás mintavétel. Ennek eredményeképpen már a kezelés megkezdése előtt lényeges információkkal bírhatunk a daganatok biológiai viselkedése tekintetében és ez például a HER-2 pozitív emlőrákok esetében is a kezelési terv megváltoztatásával járhat. Egyre gyakrabban döntünk HER-2 pozitív emlőrák esetén a primer szisztémás kezelés megkezdéséről a műtéti ellátás előtt.

A hazai és nemzetközileg is elfogadott protokoll szerint az elsőként választandó módszer az immunhisztokémiai (IHK) vizsgálat, melyet három kereszttel szokás értékelni. A teszt 3+ esetén tekintendő pozitívnak, illetve 0 vagy 1+ esetén negatívnak. A 2+ esetekben bizonytalan az eredmény, így ennek tisztázása céljából újabb vizsgálatokat kell végezni, mely általában valamilyen *in situ* hibridizációs technika, ezzel kell feltárni az esetleges HER-2 génszakasz sokszorozódásának jelenlétét.

Számos *in situ* hibridizációs módszer létezik, mint például chromogenic *in situ* hibridizáció (CISH), metallographic *in situ* hibridizáció, gold-facilitated *in situ* hibridizáció (GOLDFISH), silver *in situ* hibridizáció (SISH), de a leginkább elterjedt manapság a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH). A lehetőségek bőséges tárházában szerepelnek a dual-color *in situ* hibridizációs módszerek (DISH) is, mint a dual-color chromogenic *in situ* hibridizáció, vagy a dual-color dual-hapten brightfield *in situ* hibridizáció (DDISH). Ennek használatával megbízhatóbb eredményekhez juthatunk, mivel egyidejűleg vizsgálható a HER-2 státusz és a 17-es poliszómia jelensége, valamint a szöveti struktúra, magasabb a térbeli felbontása, nem igényel speciális berendezést, csak hagyományos fénymikroszkópot, magas megbízhatóságú és jól reprodukálható, illetve

nem utolsó sorban költséghatékonyabb is a mindennapi gyakorlatban elterjedt FISH-sel szemben.

A terápiát valamint a betegség kimenetelét nagymértékben meghatározó HER-2 génszakasz sokszorozódása, ezáltal a HER-2 protein túltermelése nemcsak génamplifikáció, hanem poliszómia következtében is létrejöhet. A HER-2 gén a 17-es kromoszóma hosszú karján, a centromer régió közelében foglal helyet. Génamplifikáció esetében a HER-2-t tartalmazó szakasz sokszorozódik meg, poliszómia esetében pedig a kromoszómák száma növekszik, vele együtt a centromer régiók és az annak közelében lévő HER-2 szakaszok száma is. Génamplifikáció az emlőrákos esetek kb. 20%-ában fordul elő, míg poliszómiát az esetek egyharmadában, 10% és 50% között mutattak ki attól függően, hogy milyen kritériumrendszert használtak. Ennek elkülönítése végső soron a beteg sorsát befolyásolja. Egyrészt prognosztikai faktorként is értékelhető, másrészt a gyógyszeres terápia hatékonyságát is jelentősen meghatározza. 17-es poliszómia esetén rosszabb prognózis várható és a célzott trastuzumab kezelés is hatástalan marad, ami nem elhanyagolható, a terápiával járó jelentős citotoxicitás és a költségek miatt. A poliszómia vizsgálatára számos módszer létezik: in situ hibridizáció (ISH), spectral karyotyping (SKY), microarray analysis, restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP), áramlási citometria stb. A génamplifikáció és poliszómia elkülönítése vagy két in situ hibridizációs vizsgálat összehasonlításával történik, ahol az egyik esetben a HER-2 génszakasz festődik a másikon pedig a 17-es kromoszóma centromer régiója, vagy dual-color in situ hibridizációs módszerekkel lehetséges sokkal egyszerűbben, melynek lényege, hogy a kromoszóma centromer régiója és a HER-2 gén külön, más színnel festődik, így ezek arányából megállapítható, az amplifikáció és/vagy poliszómia jelenléte. Dolgozatomban emlőrákos esetek HER-2 státuszának újra osztályozását végeztem el, a 17-es poliszómia jelenlétének figyelembevételével.

## 2. Célkitűzések

2.1. *A dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) és a fluorescence in situ hibridizáció (FISH) módszerek összehasonlítása az emlőrák HER-2 amplifikációjának vizsgálatában.*

2.1.1. A dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) és a fluorescens in situ hibridizáció (FISH) módszerek eredményeinek összehasonlítása.

2.1.2. A dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) használatával kapcsolatos tapasztalatok összefoglalása.

2.2. *Az emlőrákos betegek HER-2 státuszának újra osztályozása a 17-es kromoszóma centromer régiójának vizsgálatával.*

2.2.1. Irodalmi áttekintés: A 17-es poliszómia jelentősége a HER-2 status meghatározásban.

2.2.2. Emlőrákos betegek HER-2 státuszának összehasonlítása génamplifikáció- és a 17-es kromoszóma centromer régiójának vizsgálatával, alternatív módszer alkalmazásával, mely terápiás következményekkel járhat és pontosíthatja a bizonytalan esetek megítélését.

### **3. Anyag és módszer**

#### **3.1. Anyag és módszer a dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) validálásában**

##### **3.1.1. A tumoros minták kiválasztása**

2010 és 2011 között diagnosztizált 105 invazív emlőrákos beteget választottunk ki a vizsgálatra. Valamennyi esetben a műtéti preparátumból paraffinos blokkok álltak rendelkezésre, mely a beválaszthatóság előfeltétele volt. A rendelkezésre álló paraffinos blokkokból készült metszetek alapján választottuk ki a további vizsgálatnak alávetett tumort tartalmazó részeket. A korábban készült hematoxin-eosin (HE) metszeteket és az immunreakciókat valamennyi esetben patológus vizsgálta felül, és ellenőrizte a korábbi diagnózis helyességét. A munka során a mintákat kódokkal jelöltük, hogy a mindenkorai orvosi etikai szabályzatban foglaltaknak megfelelően a minták kapcsán a betegeket azonosítani ne lehessen.

##### **3.1.2. Fluoreszcens in situ hibridizáció**

A metszeteket xilolban deparaffináltuk és etanolban rehidráltuk. A tárgylemezeket Paraffin Treatment II kittel (Abbot-Vysis, Downers Grove, IL, USA) kezeltük a használati útmutató szerint. Röviden, a lemezeket 6 percig proteináz-K oldattal kezeltük 37 °C-os vízfürdőben. Öblítés és levegőn történő szárítást követően 10 µl dual-color próbát (PathVysion, Vysis) tettünk mindegyik lemezre. Fedés és gumi tömítővel való lezárás után a metszeteket 5 percig 73 °C-on denaturáltuk, majd ezt követően egy éjszakán át 37 °C-on hibridizáltuk. A hibridizációt StatSpin Thermobrite hibridizációs készülékkel végeztük (Abbott-Vysis, Downers Grove, IL, USA). A metszetek hibridizáció utáni mosását követően 20 µl 4,6-diamino-2-phenilindollal (DAPI) festettük.

### 3.1.3. Dual-color dual-hapten in situ hibridizáció (DDISH)

A DDISH teljesen automatizált folyamat, melyet Roche Diagnostics BenchMarkXT™ készülék segítségével végeztünk (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) a használati útmutató szerint. Tömören, a metszeteket deparaffináltuk, ezután két ciklusban 8 és 12 percre citrát pufferben (pH 6) kezeltük 90 °C-on majd ezt követően proteináz 3-mal kezeltük 16 percre. Haptén jelölt próbát, dinitrophenol (DNP) jelölt HER-2 próbát és digoxigenin (DIG) jelölt 17. kromoszóma centromer specifikus próbát alkalmaztunk. A próbát és a mintát 80 °C-on 20 percre denaturáltuk, amit 6 órás hibridizáció követett 44 °C-on. A jelek detektálását egymás után végeztük el a 17. kromoszóma centromer és HER-2 lókusznál egyaránt. Mosást követően a HER-2 szignált 20 perces nyúl anti-DNP monoklonális antitesttel történő inkubáció után HRP-konjugált kecske, nyúl-ellenes antitesttel kezeltük 16 percre, majd ezüst-detektálási reakciót használtunk, mely fekete színű jelet eredményezett. A 17. kromoszóma centromerjét egér anti-DIG monoklonális antitesttel kezeltük 20 percre, majd alkalikus foszfatáz-konjugált kecske, egér ellenes antitesttel 24 percre, végül FastRed/Naphthol detektálási reakciót alkalmaztunk, mely piros szignált eredményezett. A tárgylemezre pár csepp csapvíz tartalmú tisztítószer került, majd három öblítés történt ultratiszta vízzel. Ezután 15 percre 37 °C-on szárítottuk, végül fedtük. Minden mintában 30 különálló, fedésben nem lévő sejtmagot vizsgáltunk meg, a HER2/CEP17 hányados, illetve a HER2 és a 17. kromoszóma szignálok számának meghatározására. A SISH szignálokat referencia jel használatával becsültük meg. Negatívnak, HER-2 nem amplifikáltnak tekintettük az esetet, ha a HER2/CEP17 arány kevesebb, mint 1,8 volt, illetve pozitívnak tekintettünk egy esetet, amikor ez a hányados 2,2 fölött volt. Bizonytalan esetekben, azaz 1,8 és 2,2 közötti értékeknél újabb 20-40 sejtet vizsgáltunk meg, melyek alapján újra számoltuk az eredményt. Ha a 17. kromoszóma sejtenkénti számának átlaga 2,5 fölött volt, poliszómiát állapítottunk meg.

### **3.1.4. Statisztikai analízis**

Konkordancia korrelációs együtthatók (RC) és Bland-Altman-féle 95%-os egyezési határok kiszámításának segítségével értékeltük az eljárások közötti egyezést, a folytonos változóként kifejezett eredményekre vonatkozóan. Az adathalmaz centrumának megjelenítéséhez az átlagok metszéspontján a szórások hányadosának megfelelő meredekséggel áthaladó egyenest, azaz redukált fő tengelyt alkalmaztunk. A kategorikus kimenetek közötti egyezést Kappa-statisztikával vizsgáltuk, bootstrap-alapú, tehát az osztályok számának megfelelően analitikus eljárással képezve annak konfidencia-intervallumát. (CI)

## **3.2. Anyag és módszer az emlőrákos betegek HER-2 státuszának újra osztályozása során**

### **3.2.1. Betegek kiválasztása**

405 ismert HER2 státuszú emlőrákos beteget választottunk ki. Az összes esethez tartozó korábbi FISH lelet rendelkezésre állt a patológia adatbázisában. A tumoros minták az esetek nagy többségében szöveti multiblokkokban (TMA) voltak vizsgálva, melyeket előzőleg FISH segítségével teszteltünk. A fennmaradó esetekben hagyományos blokkokból történt a meghatározás. A TMA blokkokból és a többi blokkból hagyományos metszeteket húztunk le felületkezelt tárgylemezekre.

### **3.2.2. A fluoreszcens in situ hibridizáció értékelése**

A filterpárt a PathVysion kithez optimalizáltuk. A HER2 lókuszt specifikus azonosító jel és a centromer azonosító jel arányát (HER2:CEP17) tumoronként 60 tumorsejten, 100-szoros immerziós nagyítással számoltuk le. Pozitív HER2 amplifikációnak tartottuk, ha a HER2 szignál és a 17. kromoszóma aránya 2,2 vagy annál több volt, míg negatív eredményt 1,8 alatti értéknél állapítottunk meg. Low-grade (LG) amplifikációt állapítottunk meg, ha az arány 4 alatt volt és a 4, vagy az e fölötti arányt high-grade (HG) amplifikációnak tekintettük. Bizonytalan esetekben - amikor az arány 1,8 és 2,2 közötti érték volt - további 20-40 sejtet vizsgáltunk meg és ennek megfelelően értékeltük újra az eredményt.

## **4. Eredmények**

### **4.1. Eredmények a dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) validációs vizsgálata során**

#### **4.1.1. Fluoreszcens in situ hibridizáció**

A HER-2 FISH analízis a PathVysion segítségével valamennyi emlőrákos esetben sikeres volt. Technikai hibából kifolyólag egy esetet sem kellett kizárnunk a vizsgálatból. A festődés és a szignál minősége kiváló volt. PathVysion reagenssel 71 esetben nem volt amplifikáció, míg 28 esetben pozitív reakciót láttunk.

#### **4.1.2. Dual-color dual-hapten in situ hibridizáció (DDISH)**

A DDISH protokoll módosítása a protokoll optimalizáció során minimális hatással volt az eredményekre. A protokoll szerint 16 perces proteáz emésztés és 72 °C-os mosás szükséges. Ezután 8 mintában nem láttunk piros szignált. Az előkezelési módosítások elvégzése után az ismételt hibridizációval 6 mintára csökkent a piros szignálok hiánya. Ezeket a mintákat a vizsgálatból kizártuk. DDISH-el 75 esetben nem láttunk amplifikációt és 24 esetben kaptunk pozitív reakciót.

#### **4.1.3. A két vizsgálati módszer összehasonlítása**

A különböző reakciók szubjektív megítélés mellett hasonló mértékben voltak értékelhetőek. A HER-2/CEP17 arányt folytonos változóként vizsgáltuk. 99-ből 4 minta mutatott eltérést a FISH eredményekhez képest. Ez a négy minta álnegatív volt DDISH-el vizsgálva. A konkordancia korrelációs együttható (RC) közel tökéletes egyezést mutatott a HER-2/CEP17 arányok vizsgálata esetén PathVysion és DDISH módszerek esetén. (RC=0.959, P<0.0001) A redukált főtengety ábrázoló grafikonról is hasonló eredmény volt leolvasható, miszerint a főtengety a tökéletes konkordanciát jelölő egyenes közvetlen

szomszédságában haladt. A két módszer egyezésének mértéke Kappa statisztikával igen jelentős, 95.9%. (Kappa=0.8712, P<0.0001)

#### **4.2. Eredmények az emlőrákos betegek HER-2 státuszának újra osztályozása során**

A 405 emlőrákos eset HER-2 státuszának újra osztályozása során a HER-2 lókuszok sejtenkénti száma 6 fölött volt, úgy HER-2 pozitívnak tekintettük. Amennyiben viszont a lókuszok száma 6 vagy attól kevesebb volt, az esetet negatívnak véleményeztük. A 405 megvizsgált esetből 143 mutatott amplifikációt és 243 pedig negatívnak bizonyult az alkalmazott FISH módszerekkel. Összesen 19 (4,69%) ellentmondásos eset fordult elő, amiből 5 (1,23%) eredetileg nem mutatott amplifikációt, de a HER-2 lokuszok sejtenkénti száma 6 fölött volt. Ennek megfelelően újra osztályoztuk őket, mint HER-2 pozitív eseteket. Ezen felül 14 esetben (3,46%) eredetileg amplifikáció volt kimutatható 6, vagy az alatti HER-2 lokusz számok mellett.

## 5. Megbeszélés

### 5.1. A dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) validációs vizsgálata

Emlőrákok esetében a patológiai diagnosztikus lehetőségek egyre gazdagabb tárháza áll rendelkezésünkre, mely miatt a folyamat jóval összetettebb lett az elmúlt évek során. Kiemelkedően fontos szerepet kaptak az emlőrákok molekuláris típusát meghatározó tényezők, mint például az ösztrogénreceptor, progeszteronreceptor, HER-2 státusz, bazális és proliferációs markerek. Ezek segítségével átfogóbb képet kaphatunk az egyes daganatok tulajdonságairól, így téve könnyebbé a megfelelő terápiás módszer megválasztásához szükséges döntések meghozatalát. Ezek között a HER-2 státusz még inkább kiemelkedik, mivel a HER-2 pozitív daganatokban a túlzott HER-2 fehérje termelés ellen célzott trastuzumab (HERCEPTIN) kezelés alkalmazható.

Az epidermális növekedési faktor receptor 2. típusa (EGFR-2), más néven: c-ERBB-2, vagy HER-2/neu gén amplifikációja, a HER-2 fehérje túltermeléséhez vezet, mely különböző módszerekkel kimutathatók. A mindennapi gyakorlatban az immunhisztokémia (IHK) terjedt el, valószínűleg azért, mert a vizsgálat paraffinos blokkon kivitelezhető és illeszkedik a rutin patológiai munkafolyamatokba. Az immunhisztokémiai eredményeket az FDA által jóváhagyott protokoll szerint négy csoportba szokás osztályozni, erősségük szerint, melyet keresztekkel jelölünk. (0, 1+, 2+, 3+) 0 és 1+ esetén a minta negatívnak tekintendő. A 3+-es esetek pozitívnak véleményezhetőek. A 2+-es esetek megítélése bizonytalan, mivel beszámoltak olyan esetekről, ahol az immunhisztokémiai reakció pozitivitása mellett a daganat célzott trastuzumab kezelésre adott válasza nem volt megfelelő. Ennek háttérében az állt, hogy bizonyos esetekben a HER-2 génszakasz megsokszorozódása nem amplifikáció útján jön létre, hanem a 17-es kromoszóma poliszómiája révén, ami azt jelenti, hogy több 17-es kromoszóma van jelen a sejtben,

ezáltal több a HER-2-t kódoló gén szakasz és az immunhisztokémiailag kimutatható fehérjék mennyisége, ily módon hamisítva meg az immunhisztokémiai eredményeket. Ilyenkor a HER-2 státusz pontos feltárásának és az esetleges génamplifikáció kimutatásának céljából további vizsgálatokat kell végezni, mely általában valamilyen in situ hibridizációs módszer. A mindennapokban leginkább elterjedt módszer a fluorescence in situ hibridizáció (FISH), mely paraffinos szöveti blokkból kivitelezhető és szintén jól illeszkedik a rutin patológiai diagnosztikába, azonban a vizsgálatok kiértékeléséhez fluoreszcens mikroszkóp is szükséges. Az immunhisztokémiai vizsgálatot előszűrő tesztként lehet alkalmazni, mivel Her-2 pozitív 3+-es esetekben 89-100%-ban, negatív 0, illetve 1+ esetekben 92-98%-ban mutattak egyezést FISH vizsgálattal az összehasonlító elemzések alapján, míg bizonytalan 2+ esetekben csak 23-25%-ában volt kimutatható génamplifikáció. Manapság számos in situ hibridizációs módszer létezik, melyek hatékonyságát és megbízhatóságát a szakirodalom igen intenzíven tárgyalja. Izgalmas új területként bukkantak fel az úgynevezett dual-color in situ hibridizációs módszerek, melyek segítségével összetettebb képet kaphatunk az egyes daganatok HER-2 státuszáról. A dual-color módszerek lényege, hogy egyszerre jelzi külön színnel a 17-es kromoszóma centromer régióját és a Her-2-t kódoló génszakaszt. Ezáltal elkülöníthetjük, hogy valódi génkópia szám megsokszorozódásról, génamplifikációról, vagy 17-es kromoszóma számának megsokszorozódásáról, poliszómiáról van-e szó. Ez kiemelkedő fontosságú lehet a megfelelő terápiás módszer megválasztásában, ugyanis 17-es poliszómia esetén a daganat nem fog kellőképpen reagálni a célzott trastuzumab terápiára, ugyanakkor a beteget feleslegesen tesszük ki jelentős mellékhatásoknak, mint például a kardiotoxicitás. Számos dual-color módszer létezik, dolgozatomban a dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) validálását végeztem el, melynek során a fluoreszkáló festékekkel direkt jelölt DNS próbák alkalmazásával, a HER-2 génkópia

szám és a 17-es kromoszóma centromer régiójának arányát is vizsgáltuk. A FISH, mint a nemzetközi szakirodalomból kiderül, egy igen elterjedten használt, bevett módszer, viszont magas költsége, időigényessége, egyéb technikai feltételei miatt a legtöbb patológiai laborban a berendezések üzemeltetése és karbantartása miatt nem fenntartható, vagy nem áll rendelkezésre. Ilyen formán joggal merül fel a kérdés, hogy egy alacsonyabb költségű, gyorsabban, egyszerűbben kivitelezhető módszer adhat-e ugyanolyan megbízható és jó eredményeket? A dual-color módszerek nagy előnye, hogy scoring rendszerük gyakorlatilag megegyezik a többi módszerével, teljesen automatizáltak, nem igényelnek különösebb technikai berendezést, kevesebb idő alatt több információt kapunk a HER-2 lokuszok és a centromer régiók festődése és ezek arányainak értékelése kapcsán és nem utolsó sorban költséghatékonyabbak is a FISH vizsgálathoz képest. További nagy előnye, hogy hosszú szobahőmérsékletű tárolás esetén sem csökken számottevően a jelintenzitás, tehát egy-egy problémás eset elővételekor is megbízható információkhoz juthatunk. A dual-color módszerek konkordanciája kiemelkedő 90% fölötti. Ha a módszer megbízhatósága megfelelő, gazdaságosabbá, gyorsabbá és hatékonyabbá tehetné a HER-2 státusz meghatározását emlőrákok esetében.

A dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció módszert a HER-2 génkópia szám meghatározására optimalizálták, mely mellett az adatok a 17-es kromoszóma centromer régiók száma (CEP17) alapján korrigálhatók. A vizsgálat során az excitációs és emissziós hullámhosszok ugyanazzal a szűrőpárral detektálhatók, melyeket a PathVysion kithez fejlesztettek ki. Ezek mellett azt tapasztaltuk, hogy a dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció során könnyen értékelhető, szép, egyértelmű jeleket kaptunk. A HER-2 és CEP17 számok és a HER-2/CEP17 arány alapján kalkulált konkordancia korrelációs koefficiens majdnem tökéletes egyezést mutatott a két vizsgálat között. Ezen túl Kappa

statisztika során, kategorizált változókkal hasonló eredményt kaptunk. Az értékelés során 8 mintában nem láttunk piros szignált. Az előkezelési módosítások elvégzése után az ismételt hibridizációval 6 mintára csökkent a piros szignálok hiánya. Ezeket a mintákat a vizsgálatból kizártuk. DDISH-el 75 esetben nem láttunk amplifikációt és 24 esetben kaptunk pozitív reakciót. A 99 megvizsgált esetből 4 volt, melynek amplifikációs státusza eltért a két módszer között. 4 esetben DDISH-sel álnegatív eredményt kaptunk. Mivel ideális, 100%-os biztonságú vizsgálat nincs, általában a „gold standardként” aposztrofált PathVysion FISH eredményeit alapul véve határozzák meg az új módszerek használhatóságát, értékét. Ez alapján eredményeink szerint a DDISH módszer magas specificitást (100%), szenzitivitást (85,8%), magas pozitív (100%) és negatív prediktív értéket (94,7%) mutatott. Az immunhisztokémia és a FISH eredményeket összevetve hasonló eredményeket kapunk, így elmondhatjuk, hogy a HercepTest megközelítőleg hasonló pontosságra képes.

A DDISH költséghatékonysága abban áll, hogy – bár a próba költsége alig kisebb a FISH-hez képest – nem igényel igen költséges fluorescens mikroszkópot, rövidebb az inkubációs ideje, teljesen automatizált a folyamat. További előny, hogy egyazon metszeten a szöveti struktúra is vizsgálható, könnyebben, rövidebb idő alatt tanulható meg, így mind ezek jelentős munkaidő- és humánerőforrás megtakarítást jelentenek annak anyagi vonzatával együtt (sajnos ez Magyarországon még nem meghatározó szempont). Tekintettel az archiválhatóságra, ez szintén költség-megtakarítást jelent, mert nem kell ismételní a vizsgálatot, ellentétben a FISH-sel.

### **5.1.1. Új megállapítások a validációs vizsgálat során**

A Dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) megbízhatóan alkalmazható a klinikai gyakorlatban.

- Magas konkordanciával bír a hagyományos FISH vizsgálattal összehasonlítva, mind az amplifikáció azonosításában, mind az amplifikáció mértékének meghatározásában.
- A standard próbákhoz hasonló arányban mutat amplifikációt az immunhisztokémiailag pozitív és negatív emlőrákokban.
- A módszer kisebb technikai háttérrel igényel a FISH-hez viszonyítva.
- Jelentős mértékű költségmegtakarítást lehet elérni az alkalmazásával, illetve emellett több információt is kapunk az adott daganat genetikai tulajdonságairól.

## **5.2. A 17-es kromoszóma centromer régió vizsgálatának jelentősége az emlőrákok Her-2 státuszának meghatározásában.**

A HER-2 amplifikáció az emlődaganatok 20-30%-ában vezet a HER-2 fehérje túltermeléshez, mely a sejtfelszínen megjelenik. Az immunhisztokémiailag pozitív (3+) esetekben FISH vizsgálattal nem mindig mutatható ki Her-2 amplifikáció. Ennek oka a 17-es kromoszóma poliszómiájának jelensége. Amikor a 17-es kromoszóma hosszú karján a Her-2 lokusz (17q12) megsokszorozódik, valódi génamplifikációról beszélünk. Azonban ha a 17-es kromoszómák száma nő és ezáltal a HER-2 lokuszok száma is, poliszómia áll fenn. Ezekben az esetekben immunhisztokémiailag pozitív, FISH negatív eredmények születnek és az irodalmi adatok alapján ezek a daganatok nem rendelkeznek megfelelő terápiás válasszal trastuzumab kezelésre. A költségek és a kardiotoxikus mellékhatások, valamint a leghatékonyabb kezelés megválasztása miatt is lényeges a poliszómia elkülönítése a génamplifikációtól. Számos tanulmány vizsgálja a 17-es poliszómia jelenségét és jelentőségét, eltérő eredményekkel. Ennek háttérében a poliszómia definíciójának meghatározása áll a legtöbb esetben. A kérdés az, hogy hány CEP17

jel/sejtmag-tól beszélünk poliszómiáról. Bizonyos vizsgálatok szerint relatíve gyakorinak mondható a 17-es poliszómia, az emlőrákos esetek 3-46%-ában észlelhető. Vizsgálatunk idején messze nem volt egységes a poliszómia kvantitatív definíciója, számos tanulmány született, melyek különböző értékeket használtak 2,1 és 4 között, így ennek következtében illetve a kritériumok különbözősége folytán alakulhatott ki az a helyzet, hogy a poliszómia előfordulása ilyen tág határok között mozoghatott. Tanulmányunkban 2,5-ös értéket használtunk, de azóta talán a  $\geq 3$  CEP17 jel/sejtmag kópiaszám mellett alakul ki a legnagyobb konszenzus. Valójában a munkám során alkalmazott besorolási kritériumokat nem befolyásolta, hogy az eset poliszómiának bizonyult-e vagy sem, így az eredményeinket sem változtatná meg egy másik határérték választása.

A nemzetközi irodalom szerint a poliszómiás esetek nagy részében nem figyelhető meg génamplifikáció, mely arra enged következtetni, hogy a két genetikai jelenség keletkezési mechanizmusa nem megegyező. Mindazonáltal 17-es poliszómia emlőrákok esetében rosszabb prognózist jelent, mivel a 17-es kromoszóma aneuploiditása egy genetikai instabilitásnak tekinthető, mely hozzájárul az emlőrák kialakulásához a genetikai hibák felhalmozásán keresztül. Ebből kifolyólag számos tanulmány adatai szerint magasabb nukleáris atípiá, magasabb arányú limfogén metasztázis, emelkedett proliferációs index és magasabb Nottingham Prognosztikus Index (NPI) társul azon emlőrákokhoz, melyekben a 17-es kromoszóma poliszómiája kimutatható, ezáltal alacsonyabb túlélési idő. A poliszómia kimutatására számos módszer létezik, azonban manapság legjobban elterjedt, valamely in situ hibridizációs technika, mely a 17-es kromoszóma centromer régióját festi, ezáltal ad információt a kromoszómák számáról. Léteznek erre a célra úgynevezett dual-color in situ módszerek is, melyek lényege, hogy egyszerre festik külön színnel a 17-es kromoszóma hosszú karján a HER-2-t kódoló szakaszt (piros) és a 17-es kromoszóma centromer régióját (zöld). Ez lehetőséget ad arra, hogy együtt, arányaiban

vizsgálhassuk a HER-2 és CEP17 arányokat, egy sejtmagon belül. A nemzetközi irodalomban számos ajánlást találunk, hogy hány jel/sejtmag esetén beszélhetünk génamplifikációról, vagy poliszómiáról. Génamplifikációt általában 6 jel/sejtmag fölött véleményezünk. Poliszómia esetén nincs egyértelmű állásfoglalás, azonban a 4 jel/sejtmag, illetve e fölötti egy általánosságban elfogadott és használt érték. E definíció szerint a vizsgálatok során relatíve gyakorinak mondható a 17-es poliszómia, az emlőrákos esetek 3%-46%-ban észlelhető. A vizsgálat buktatója, hogy ritka esetekben a HER-2 génszakasz és a 17-es kromoszóma centromer régiójának koamplifikációja áll fenn, ami azt jelenti, hogy egy dual-color in situ módszerrel magas CEP17 és Her-2 számot látunk, amiből poliszómiára következtetnénk, azonban mindkét génszakasz valódi amplifikációjáról van szó. Ilyen formán hibás eredményeket kaphatunk. A probléma megoldására alternatív 17-es kromoszóma próbákat fejlesztettek ki, mint például SMS (Smith-Magenis syndrome, 17p11.2) és RARA (retinoic acid receptor, 17q21.2), melyek használatával biztonságosabban megítélhető az adott daganat génstátusza.

Magának a poliszómiának illetve a poliszómiás esetek HER2 státuszának a megítélése igen nehéz feladat. Ebben nyújt segítséget az a 2014-ben megjelent konszenzusos javaslat, mely poliszómia (CEP17-jel sokszorozódás) esetén – az általunk alkalmazott módszerhez hasonlóan – csak a HER2 jelszámot veszi figyelembe és 6 vagy a felett pozitivitást véleményez.(81) Eszerint amennyiben a CEP17 szám magas, akkor a HER-2 kópiaszám alapján 4/sejtmag alatt nem amplifikált, 6/sejtmag vagy e felett amplifikált a HER-2 státusz. A két érték közötti HER-2 szám esetén – amennyiben korábban nem történt – IHK vizsgálat javasolt és az ismert osztályozás szerinti besorolás. Továbbra is bizonytalan – IHK-val 2+ - esetekben a klinikumban egy másik szöveti blokk vizsgálata javasolt immunhisztokémiával. Amennyiben az azonos eredményt hoz, akkor negatívnak kell

tekinteni az esetet. Kutatási vizsgálat esetén az alternatív 17-es kromoszóma próbák ISH vizsgálata (SMS, RARA) vagy molekuláris kariotipizálás javasolt.

Dolgozatomban emlődaganatok HER-2 státuszának újra osztályozását végeztem el, a 17-es kromoszóma poliszómiájának figyelembevételével. A megvizsgált 405 emlődaganatos eset rutin FISH vizsgálatát ellenőriztük, illetve elvégeztük a centromer régiók vizsgálatát is. Összesen 143 (35,31%) mutatott amplifikációt mindkét vizsgálómódszerrel és 243 (60,00%) negatív esetet regisztráltunk. Mindössze 19 esetben találtunk eltérő eredményeket, ahol 5 eset (1,23%) mely eredetileg nem mutatott amplifikációt 6 fölötti HER-2 szignállal, ezeket újra osztályoztuk, mint HER-2 amplifikált eseteket. 14 esetet (3,46%) soroltunk át a HER-2 negatív esetekhez, mely eredetileg amplifikációt mutatott 6 alatti HER-2 szignál mellett. Ez azt jelenti, hogy a betegek 1,23%-a nem kapott biológiai kezelést, bár indokolt lett volna és 3,46%-ban valószínűleg hatástalan volt az egyébként engedélyezett és alkalmazott anti-HER-2 kezelés. A vizsgálat elvégzése által a HER-2 státusz pontosabb megítélését tettünk lehetővé, mely nagyban hozzájárul a sikeres célzott terápiák kivitelezéséhez.

Az ellentmondásos eseteket két csoportra osztva vizsgáltuk. 5 esetben az eredetileg negatív (HER-2/CEP17 arány  $<1,8$ ) státuszt 6 feletti HER-2 jelszám miatt módosítottuk pozitívrá. 4 betegről sikerült adatokat gyűjteni. Érdekes módon az eredeti besorolás ellenére 2 beteg részesült Herceptin kezelésben, egyik esetben a 3+ immunhisztokémiai lelet volt a kezelés indoka, ez a beteg jelenleg is daganatmentes, egyedül ő van életben ebből a csoportból. A másik esetben az igen magas (12 feletti) HER-2 kópiaszám volt az indoka a kezelésnek, ezt a beteget igen rapid lefolyású betegség miatt 14 hónappal később elvesztettük. Az 5 éves túlélés 75%-os (3/4).

A másik csoportban (14 eset) az eredetileg pozitív (HER-2/CEP17 arány  $>2,2$ ) értékelést módosítottuk negatívra a HER2 $<6$  kópiaszám miatt. 11 esetről sikerült az adatokat

begyűjteni. Közülük – a pozitív HER-2 státusz ellenére – csak 4 beteg részesült Herceptin kezelésben. Ennek hátterében több okot is sikerült azonosítani: a daganatok korai stádiuma (trastuzumab kezelés nélkül csak további 3 beteg kapott kemoterápiát), a betegek kora, gyenge általános állapota és a mintavételek, műtétek időpontjában érvényes finanszírozási környezet (egyedi elbírálás alapján) mind hozzájárult ahhoz, hogy csak a betegek bizonyos hányada részesült anti-HER-2 kezelésben. 6 beteget vesztettünk el, 3 esetben daganatmentes állapotban más betegség vezetett halálhoz. Az 5 éves túlélés 82%-os (9/11), az átlagos túlélés közel 7 év (6 év 10 hó).

Az előbbieken részletezett betegadatokat még nem kerültek publikálásra. Természetesen már a kis esetszám is alkalmatlanná teszi az adatokat bármilyen következtetés levonására, de az esetek és az alkalmazott kezelések heterogenitása ezt nem is indokolja. Egy nagyobb esetszámon végzett, prospektív, randomizált vizsgálat adhat választ arra a kérdésre, hogy az újra osztályozással klinikailag bizonyíthatóan - a betegségmentes és teljes túlélést figyelembe véve - nyernek-e a betegek részben a hatásos terápia alkalmazásával, részben a felesleges terápia mellékhatásainak elkerülésével.

### **5.2.1. Új megállapítások a HER-2 státusz újra osztályozása során**

A HER-2 génstátusz pontosabb meghatározásában jelentős szerepe van a részletesebb 17-es kromoszóma centromer régió vizsgálatoknak.

- A célzott terápia sikerességének érdekében elengedhetetlen a fals pozitív és fals negatív eredmények kiszűrése.
- A vizsgálattal a 17-es poliszómia által okozott fals pozitív eredmények kiszűrhetők.

- A fals negatív eredmények feltárhatók, így a betegek számára engedélyezik a célzott terápiát, mely gyógyulásuk kulcsfontosságú momentuma.

## 6. Összefoglalás

Az emlőrákok kezelésének sikeres megtervezéséhez és kivitelezéséhez elengedhetetlen fontosságú a daganat genetikai tulajdonságainak, ezen belül a HER-2 státuszának feltárása. Dolgozatomban az emlőrák kezelését alapvetően meghatározó HER-2 expresszió meghatározásának technikáival foglalkoztam.

Az első részben a FISH vizsgálat került összehasonlításra egy ún. dual-color módszerrel, a DDISH-sel. A validációs vizsgálat során azt tapasztaltuk a statisztikai analízis alapján, hogy a DDSIH magas konkordanciával bír, tehát a két módszer megbízhatósága közel azonos, így a dual-color dual-hapten in situ hibridizáció alacsony ára, kisebb technikai háttere miatt megfelelő alternatíva lehet olyan laborok számára ahol FISH vizsgálat nem áll rendelkezésre.

A második részben az emlőrákok HER-2 státuszának meghatározását megnehezítő genetikai jelenséggel a 17-es kromoszóma poliszómiájával foglalkoztam. Ha a 17-es kromoszómák száma megsokszorozódik és ezzel együtt a HER-2-t kódoló szakaszok száma is, az FISH vizsgálattal álpozitív eredményt adhat. Dolgozatomban emlődaganatok HER-2 státuszát osztályoztam újra a HER-2/CEP17 arány figyelembevételével. A statisztikai analízis fényében elmondhatjuk, hogy a két vizsgálómódszer érzékenysége eltér, így van létjogosultsága a CEP17-et vizsgáló módszereknek a HER-2 meghatározásban.

Dolgozatomban az emlődaganatok HER-2 státuszának meghatározásával kapcsolatos hasznosítható tapasztalatokat foglaltam össze.

## **7. Köszönetnyilvánítás**

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Szöllősi Zoltánnak, aki útmutatásával, értékes tanácsaival és a patológiai vizsgálatok koordinálásával segítette jelen értekezés és az alapjául szolgáló közlemények megírását, publikációját.

Hálásan köszönöm Prof. Dr. Szántó János és az Onkológiai Tanszék támogatását, mely nélkül munkánk nem jöhetett volna létre.

Külön köszönet illeti Dr. Kovács Judit főorvos asszonyt, aki lehetővé tette, hogy a vizsgálatok patológiai jellegű kérdéseit osztályán tisztázzuk.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Damjanovich László intézetvezetőnek, aki lehetővé tették, hogy munkámat a Sebészeti Intézetben végezhessem.

Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok családomnak, hogy rendületlenül igyekeznek munkámhoz nyugodt, szerető háttérrel biztosítani, mely felbecsülhetetlen.



Nyilvántartási szám: DEENK/244/2016.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

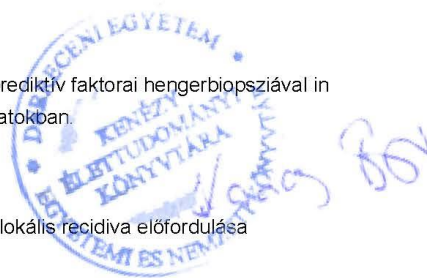
Jelölt: Kósa Csaba  
Neptun kód: GB63HJ  
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kósa, C.**, Kardos, L., Kovács, J., Szöllősi, Z.: Comparison of dual-color dual-hapten brightfield in situ hybridization (DDISH) and fluorescence in situ hybridization in breast cancer HER2 assessment.  
*Pathol. Res. Pract.* 209 (3), 147-150, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2013.01.006>  
IF: 1.562
2. Egervári, K., **Kósa, C.**, Szöllősi, Z.: Impact of chromosome 17 centromere region assessment on HER2 status reported in breast cancer.  
*Pathol. Res. Pract.* 207 (8), 468-471, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2011.05.008>  
IF: 1.213

### További közlemények

3. Lázár, G., Bursics, A., Farsang, Z., Harsányi, L., **Kósa, C.**, Maráz, R., Mátrai, Z., Paszt, A., Pavlovics, G., Tamás, R.: III. Emlőrák Konszenzus Konferencia: az emlőrák korszerű sebészi kezelése.  
*Magyar Onkol.* 60, 194-207, 2016.
4. **Kósa, C.**, Garami, Z., Dinya, T., Fülöp, B.: Az invazivitás prediktív faktora hengerbiopsziával in situ ductalis carcinomának diagnosztizált emlődaganatokban.  
*Magyar Seb.* 65 (4), 216-219, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/MaSeb.65.2012.4.8>
5. Garami, Z., Szluha, K., **Kósa, C.**, Fülöp, B., Lukács, G.: A lokális recidiva előfordulása emlőmegtartásos műtéteink után.  
*Magyar Seb.* 59, 179-183, 2006.





6. Garami, Z., Benkő, K., **Kósa, C.**, Fülöp, B., Lukács, G.: A mammográfiás emlőrákszűrés hatása a tumorméretre, a hónalji nyirokcsomó státuszra és a szövettani anaplázia fokára.  
*Magyar Seb. 59, 383-387, 2006.*
7. Damjanovich, L., **Kósa, C.**, Bartha, I.: A hereditár nonpolyposis colon carcinoma felismerésének gyakorlati jelentősége = The importance of the recognition of hereditary nonpolyposis colon carcinoma.  
*Magyar Seb. 54 (2), 88-90, 2001.*
8. Kincses, Z., Kanyári, Z., Asztalos, L., **Kósa, C.**, Bodrogi, P., Balázs, G.: A vastagbél diverticulitisek sebészi kezelése.  
*Magyar Seb. 54, 84-85, 2001.*
9. Bartha, I., Damjanovich, L., **Kósa, C.**, Németh, A.: Enterovaginális sipoly kezelése mucous fistulával.  
*Magyar Seb. 54 (2), 86-87, 2001.*
10. Szegedi, Z., **Kósa, C.**: A peritoneovenosus (Denver) shunt alkalmazása az ascites sebészi kezelésben.  
*Magyar Seb. 49, 195-202, 1996.*

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 2,775**

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 2,775**

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.10.04.

