

Immunhisztokémiai vizsgálatok alkalmazása az emlőrák-diagnosztikában

Ph.D. Tézis

Dr. Almási Szintia

Témavezetők:

Dr. Cserni Gábor, Ph.D., D.Sc.

Dr. Kuthi Levente, Ph.D.

Szegedi Tudományegyetem

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

Multidiszciplináris Doktori Iskola

Szeged, 2025

A PHD TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

- I. **Szintia Almási**, Levente Kuthi, Anita Sejben, András Vörös, Ákos Nagy, Tamás Zombori, Gábor Cserni. TRPS1 expression in cytokeratin 5 expressing triple negative breast cancers, its value as a marker of breast origin. *Virchows Arch.* 2023;482:861-868. doi:10.1007/s00428-023-03535-4

IF (2023): 3.4 Scimago (2024): Q1
- II. **Szintia Almási**, Gábor Cserni. The value of oestrogen receptor, progesterone receptor and keratins 5 and 14 immunohistochemistry in the evaluation of epithelial proliferations at cauterised margins in breast-conserving surgery specimens. *Pathol Res Pract.* 2024;257:155280. doi:10.1016/j.prp.2024.155280

IF 2023 (2024 update): 2.9 Scimago (2024): Q2
- III. **Szintia Almási**, Tibor Krenács, László Krenács, Gábor Cserni. Galectin-1 expression in breast cancer stroma – prognostic value in triple-negative breast cancer. *Pathobiology.* 2025; doi:10.1159/000546206

IF 2023 (2024 update): 3.5 Scimago (2024): Q1

1. BEVEZETÉS

Az emlőrák (BC) a leggyakoribb malignus daganat és vezető daganatos halálok nőkben. A tripla negatív emlőrákokra (TNBC) definíció szerint az ösztrogén- (ER) és progeszteronreceptor (PR), valamint a humán epidermális növekedési faktor receptor-2 (HER2) expresszió hiánya jellemző, és ezek általában magas grádusú, agresszív tumorok, jelentős áttétképző potenciállal. Áttétek esetén a primer tumor meghatározásában immunhisztokémiai (IHC) paneleket alkalmazunk a napi diagnosztikus munka során. A trichorhinophalangeal syndrome type 1 (TRPS1) a GATA családba tartozó transzkripciós faktor egy új, emlőspecifikus marker.

Az emlőrák prognosztikai tényezői közé sorolandó a tumor stádiuma (a tumor mérete, a nyirokcsomó-, ill. távoli áttétek fennállta), a tumor szövettani grádusa, a nyirokérinvázió jelenléte, az ER-, PR- és HER2-státusz, illetve a stromában a tumort infiltráló lymphocyták (sTIL) aránya. A galectin-1 negatív prognosztikus értékkel bír számos különböző típusú rosszindulatú tumorban, amit a tumor mikrokörnyezetében kifejtett immunszuppresszív hatásának tulajdonítanak. A galectin-1 expresszió szerepe TNBC-ben és HER2-pozitív

tumorokban még nem meghatározott, azonban a sTIL prognosztikai szerepe ezen típusú emlőkarcinómákban felveti az immunrendszer jelentőségét a prognózis tekintetében.

Manapság az emlőrák kezelésében a helyi besugárzás és a sebészeti eljárások mellett számos szisztémás kezelési lehetőség áll rendelkezésünkre. Az onkosebészeti eljárások célja a tumor eltávolítása tumormentes emlőállományt tartalmazó szegéllyel, azonban a sebészeti beavatkozás a szövetekben ú.n. kauterizációs szövetkárosodást okozhat. A kauterkárosodás miatt a morfológiai változások következtében a reszekciós felszínben elhelyezkedő hámszövet benignus vagy malignus volta bizonytalan maradhat. Ilyen esetekben a morfológia nem elegendő a döntéshozatalhoz, és kiegészítő vizsgálatokra lehet szükség.

1.1. TRPS1 EMLŐMARKER EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA ÉS ÉRTÉKELÉSE CYTOKERATIN 5 POZITÍV, TRIPLA-NEGATÍV EMLŐRÁKOKBAN

Az eddig ismert emlőmarkerek, mint a gross cystic disease fluid protein-15 (GCDFP-15), a GATA binding protein 3 (GATA3), a mammaglobin (MGB) és a SRY-related HMG-box 10 (SOX10) nem elég specifikusak a BC-re. A diffúz GCDFP-15 pozitivitás BC-ben apokrin differenciációra utal, így a TNBC-k egy alcsoportja is mutathat pozitivitást vele, azonban a nem-apokrin BC-k is jelölődhetnek. A MGB a GCDFP-15-nél szenzitívebbnek bizonyult BC tekintetében, azonban más tumorsejtben is kifejeződhet, főként endometrium karcinómákban írták le expresszióját. A GATA3 az egyik legszenzitívebb BC marker, de szintén több más malignus tumorban expresszálódhat, amelyek közül kiemelendő az urotheliális karcinóma. A korábbi markerekkel ellentétben a SOX10 megbízható TNBC markernek bizonyult, amely kifejeződik a myoepithel sejtekben is és specifikus melanocytás tumorokra. A TCGA (The Cancer Genome Atlas) adatbányászat során viszonylag specifikus BC markert a TRPS1-et azonosítottak, mely a GATA családba tartozó transzkripciós faktor. Nemcsak az ER-pozitív vagy HER2-pozitív BC-ben expresszálódik nagy arányában, hanem különböző típusú TNBC-kben is, beleértve a metaplasztikus karcinómákat is, míg más daganattípusokban kisebb mértékű vagy elhanyagolható a megjelenése.

1.2. AZ ÖSZTROGÉN-, ÉS PROGESZTERON RECEPTOR, A CYTOKERATIN 5 ÉS 14 IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATOK HASZNA EMLŐMEGTARTÓ MŰTÉTEK ESETÉN A KAUTER KÁROSODOTT RESZEKCIÓS FELSZÍNBEN ELHELYEZKEDŐ HÁMPROLIFERÁCIÓK ESETÉN

Az emlőmegtartó műtétek biztonságossága még az onkoplasztikus technikák esetében is igazolt. A lokális recidíva szempontjából kiemelt jelentőséggel, magas rizikóval bír a tumort

kettészélő, azaz pozitív sebési reszekciós felszín, és az ebből következő visszamaradt tumor jelenléte. A gyakorlatban alkalmazott megközelítés és az, hogy mit tekintünk negatív (daganatmentes) reszekciós szélnek idővel változott. Napjainkban a legelfogadottabb megközelítés az, hogy „nincs reszekciós szél jelölő festék a tumorsejteken”, de létezik legalább 2 mm széles ép szegély ajánlás is mind az invazív, nem speciális típusú (NST), mind a duktális karcinóma in situ (DCIS) tekintetében, illetve ismert minimum 1 mm-es szegélyre vonatkozó ajánlás is a reszekciós felszín negatívként való értékelésére. Míg a hagyományos szikével végzett műtétek nyújtják a szövettani értékelésre legalkalmasabb mintát, ezeket ma már széles körben felváltották az elektromos vágó és záró eszközök. Bár ezek megkönnyítik a műtétet, csökkentve a műtét alatt jelentkező vérvesztést, nagyobb gyakorisággal és súlyosabb mértékben károsítják a szöveteket, ami megnehezíti a reszekciós szél patológiai értékelését. Előfordul, hogy nehéz eldönteni, hogy a festékekkel jelölt reszekciós szél mentén található égett szövet normális, hiperpláziás vagy neoplasztikus eredetű.

Az ép emlőhám és a közönséges duktális hiperplázia (UDH) mozaikszerű festődést mutat ER-rel, PR-rel és egyes keratinokkal, mint a keratin 5 és 14 (CK5, CK14). Az alacsony grádusú neoplasztikus elváltozások, mint az atípusos duktális hiperplázia és az alacsony nukleáris grádusú DCIS általában ER és PR diffúz pozitív, míg CK5 és CK14 negatív. A magas grádusú karcinómák különböző mintázatban expresszálhatnak ER-t vagy PR-t, azonban általában CK5 és CK14 negatívak, de előfordulhat – például TNBC esetén - diffúz pozitivitás is az utóbbi ellenanyagokkal.

1.3. EMLŐRÁKOK STROMÁLIS GALECTIN-1 EXPRESSZIÓJA – A PROGNOSZTIKUS ÉRTÉK VIZSGÁLATA TRIPLA-NEGATÍV EMLŐRÁKBAN

A galectin-1 egy β -galaktozid-kötő emlős lektin, amely egy szénhidrát-felismerő doménnel rendelkezik, így β -galaktozid-tartalmú glikánokkal léphet kölcsönhatásba; szerepet játszik a sejtek adhéziójában, a sejtnövekedés szabályozásában, a sejtek motilitásában és az inváziójában. Számos normál emberi szövetben és többféle rosszindulatú daganatban, köztük BC-ben is kifejeződik. A galectin-1 részt vesz a tumorok immunrendszert elkerülő mechanizmusában, így a daganatok immunrendszer elől való elrejtőzésében, amelynek módja daganattípustól függően eltérő lehet. A galectin-1 expresszió rosszabb prognózissal társul és a betegek számára előnyt nyújthat a galectin-1 ellenes célzott kezelés.

Dalotto-Moreno és munkatársai vizsgálatai szerint a galectin-1 elősegíti az immunszuppresszív mikrokörnyezet kialakulását BC esetén, azáltal, hogy CD4-, CD25- és forkhead box P3

(FoxP3) pozitív regulatórikus T-sejtek felhalmozódását idézi elő a tumor stromájában. A galectin-1 továbbá gátolja az aktinfilamentum sejtvázas újraszerveződését a T-sejtekben, ami a T-sejt adhéziójának elégtelenségéhez vezet. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a galectin-1 immunszuppresszív szerepet tölt be, amely kedvezőtlenül befolyásolhatja azoknak a daganatoknak a prognózisát, amelyeknél magas ennek a molekulának az expressziója.

2. CÉLKITŰZÉSEK

- I. A TRPS1 expresszió meghatározása CK5-pozitív TNBC-ben, valamint diagnosztikai teljesítményének összehasonlítása más jól ismert emlőmarkerekkel, köztük a SOX10, GATA3, MGB és GCDFP-15 markerekkel.
- II. Az ER, PR, CK5 és CK14 IHC vizsgálatok retrospektív értékelése a reszekciós szél mentén található kauterizált szövetek természetének meghatározásában.
- III. A galectin-1 expresszió vizsgálata TNBC-ben, valamint prognosztikai értékének meghatározása.

3. ANYAG ÉS MÓDSZEREK

3.1. TRPS1 EMLŐMARKER EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA ÉS ÉRTÉKELÉSE CYTOKERATIN 5 POZITÍV, TRIPLA-NEGATÍV EMLŐRÁKOKBAN

A kutatás a Szegedi Tudományegyetem Regionális Humán Orvosbiológiai Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével történt (133/2019-SZTE RKEB).

A CK5 pozitív TNBC-kből készült tissue microarray (TMA) blokkon elvégeztük az IHC vizsgálatokat, amelyek metodikája a korábbi publikációnkban leírásra került. A többi marker IHC eredményét, a vonatkozó adatokat, antitesteket a TRPS1 kivételével (poliklonális nyúl TRPS1 klón, Invitrogen, Waltham, MA, 1:250 hígítás) a korábbi publikációnkból nyertük. A GATA3, GCDFP-15, MGB, SOX10 esetében a pozitivitás a korábban alkalmazott 5%-os küszöbérték mellett $\geq 10\%$ -os küszöbértékkel is meghatározásra került. A TRPS1 IHC vizsgálatának tekintetében a pozitivitás határértéke legalább 10%-os sejtmagi jelölődés volt. Hat patológus értékelte ki az IHC-t egymástól függetlenül. Az esetek végső soron pozitív vagy negatívként kerültek interpretációra a többség véleménye alapján.

A reprodukálhatóságot az ONEST-el (observers needed to evaluate subjective tests) vizsgáltuk, illetve kappa statisztikai vizsgálatot is végeztünk. A 95%-os konfidencia-intervallum kiszámítására a VassarStats szoftverrel került sor (vassarstats.net).

3.2. AZ ÖSZTROGÉN-, ÉS PROGESZTERON RECEPTOR, A CYTOKERATIN 5 ÉS 14 IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATOK HASZNA EMLŐMEGTARTÓ MŰTÉTEK ESETÉN A KAUTER KÁROSODOTT RESZEKCIÓS FELSZÍNBEN ELHELYEZKEDŐ HÁMPROLIFERÁCIÓK ESETÉN

A Bács-Kiskun Vármegyei Oktatókórház Sebészeti részlegén 2020 és 2023 között elsődlegesen sebészetileg kezelt emlőtumoros betegek mintáit vizsgáltuk. Az összes minta frissen érkezett a Patológiai Osztályra. A nagyobb mintákat befestést követően párhuzamos szeletekre vágtuk, míg a kisebb minták egészben kerültek a fixáló oldatba (10%-os, semleges puffert formalin) legalább egy napra. Az összes reszekciós szél egy vagy több blokkban került feldolgozásra, kivéve azokat, amelyek a vizsgált elváltozástól távol helyezkedtek el.

A rutin mikroszkópos vizsgálat során ER, PR, CK5 és CK14 IHC vizsgálatokra került sor a kauter által károsodott reszekciós felszínre elérő vagy közvetlen közelében elhelyezkedő elváltozások természetének tisztázására. A vizsgált esetek között volt pozitív reszekciós felszín („festék a tumor sejten”), negatív reszekciós felszín (festék a nem tumoros epitheliumon) és bizonytalan sebési szélek. Az eseteket retrospektíven gyűjtöttük és értékeltük ki, hogy meghatározzuk az egyes markerek önálló, illetve együttes hasznát a diagnózisalkotás szempontjából. A fotókat Nikon digitális kamerával készítettük Nikon Eclipse Ci-l mikroszkópra építve, így a fotódokumentációból archívum készülhetett.

A következő antitesteket használtuk: ER: klón 6F11, Leica Biosystems Newcastle, UK, 1:200; PR: klón PgR312, Leica Biosystems Newcastle, UK, 1:400; CK5: klón XM26 ThermoFisherEpredia-LabVision, Kalamazoo, MI, USA, 1:40 (vagy korábban Labvision, Fremont, CA, USA, 1:25, manuálisan kivitelezve); CK14, klón LL002, Leica Biosystems Newcastle, UK, használatra kész formában; korábbi esetekben azonosan, de manuálisan kivitelezve. A IHC-hoz Leica Bond Max festőautomatát használtunk, az ER, PR és CK14 esetén ER1 (pH=6), CK5 esetén ER2 (pH=9) epitóp feltáró oldattal. Az inkubációs idő 20 perc volt. Az összes esetet retrospektíven értékeltük ki, és konszenzus véleményt alakítottunk ki minden esetben. Egy-egy eset több szövettani metszettel is rendelkezett, amelyek között a kérdéses terület akár egy metszeten belül vagy több metszetben is megtalálható volt. Az eltérések egy része IHC nélkül is klasszifikálható volt, azonban tekintve, hogy az általunk vizsgált kérdéses területtel egy metszeten helyezkedtek el, illetve bizonyos szintű kauter károsodást mutattak, belső kontrollként használtuk őket. Az eseteket öt kategóriába soroltuk: neoplasztikus, valószínű neoplasztikus, bizonytalan, valószínűleg nem neoplasztikus és nem neoplasztikus kategóriákat állítottunk fel a morfológiai kép és az IHC vizsgálatok segítségével.

Etikai engedély nem volt szükséges, hiszen beavatkozás nem történt, beteg adatokat nem elemeztünk; kizárólag a hematoxinin és eozin (HE) festett metszetek és az IHC metszetek utólagos áttekintése történt.

3.3. EMLŐRÁKOK STROMÁLIS GALECTIN-1 EXPRESSZIÓJA – A PROGNOSZTIKUS ÉRTÉK VIZSGÁLATA TRIPLA-NEGATÍV EMLŐRÁKBAN

A kutatás a Szegedi Tudományegyetem Regionális Humán Orvosbiológiai Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével történt (91/2021 SZTE RKEB).

A Bács-Kiskun Vármegyei Oktatókórház-ban 2005 és 2016 között kezelt TNBC eseteket vizsgáltuk. Azok a betegek kerültek bevonásra, akiknél elegendő BC szövet állt rendelkezésre TMA készítéséhez, valamint legalább 6 hónapos követési idejük volt. Kizártuk azokat, akiknél a daganat diagnózisának idején vagy azt követő 6 hónapon belül áttétes betegség alakult ki. A kiválasztott formalinnal fixált, paraffinba ágyazott tumor blokkokból kettő-négy TMA core-t vettünk ki.

A galectin-1 IHC vizsgálatot 2 µm vastag TMA metszeteken végeztük. A festett tárgylemezeket Pannoramic Midi szkennelrel (3DHistech, Budapest) digitalizáltuk.

Mivel a galectin-1 által létrehozott immunszuppresszív pajzsot szeretnénk volna értékelni, így kifejezetten a tumorsejt-fészkek körüli stromális festődést értékeltük. A stromális galectin-1 festődés intenzitását az alábbi kategóriákba soroltuk: negatív, gyenge, közepes, erős, illetve nagyon erős. Mivel az egyes kategóriákban viszonylag alacsony esetszámok jutottak, a negatív, a gyenge és a közepes intenzitású eseteket összevontuk egy „nem intenzív” kategóriába, míg az erős és nagyon erős festődési mintázatú eseteket egy „intenzív” kategóriába soroltuk be. Ezen kívül megbecsültük, hogy a peritumorális stroma hány százaléka mutatott jelölődést: alacsony (<50%) és magas (≥ 50%) arányú stromális festődést különböztettünk meg.

Az sTIL mennyiségét a Nemzetközi Immuno-Onkológiai Munkacsoport ajánlásai szerint határoztuk meg, és a ≥30%-os értéket alkalmaztuk a magas és alacsony sTIL szinttel jellemezhető tumorok elkülönítésére. Az sTIL kiértékelését minden esetben teljes metszeteken végeztük el.

Összehasonlítottuk a galectin-1 pozitív és negatív esetek teljes túlélését (OS) és progresszió mentes túlélését (PFS). Az utánkövetési adatokat a betegek kórlapjaiból gyűjtöttük ki. A statisztikai elemzéseket, a Kaplan–Meier-görbék elkészítését, a túlélési görbék összehasonlításához a log-rank tesztet az SPSS (IBM, SPSS 23.0, Armonk, NY, USA)

szoftverrel végeztük el. A statisztikai szignifikancia szintjét $p < 0,05$ -ben határoztuk meg. Amennyiben a beteg elveszett az utánkövetés során, vagy életben volt, az utolsó kontroll időpontját tekintettük az utánkövetés végének.

Egyváltozós és többváltozós Cox-regressziós analízist végeztünk a független prognosztikai tényezők azonosítására. Azokat a változókat, amelyek az egyváltozós elemzésben statisztikailag szignifikáns hatást mutattak a túlélésre, bevontuk a többváltozós analízisbe. Amikor több galectin-1 értékelési mód is szignifikánsnak bizonyult az egyváltozós elemzésben, kezdetben mindet bevontuk a többszemponatos modellbe, de mivel ezek a változók ugyanazt a jellemzőt tükrözték, egy második számítást is végeztünk, kizárólag azzal a galectin-1 értékelési módszerrel (intenzitás vs százalékos arány), amely a legalacsonyabb p -értéket mutatta az egyváltozós analízisben. Az ismert BC prognosztikai tényezők és a galectin-1 festődés közötti kapcsolatot Fisher-féle egzakt próba segítségével vizsgáltuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. TRPS1 EMLŐMARKER EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA ÉS ÉRTÉKELÉSE CYTOKERATIN 5 POZITÍV, TRIPLA-NEGATÍV EMLŐRÁKOKBAN

A kiválasztott 120 eset közül 117 minta volt értékelhető. Szövettani vizsgálattal ebből 112 NST BC-nek bizonyult, melyből 6-ban medulláris mintázat és 2-ben kevert micropapilláris komponens is megfigyelhető volt. A fennmaradó 5 eset metaplasztikus emlőkarcinóma volt, amelyből négyben laphám- és egyben heterológ mesenchymális differenciációt figyeltünk meg.

ONEST elemzéssel 72,6%-os teljes véleményegyezést azonosítottunk, és legalább 4 vizsgálóra volt szükség a reprodukálhatóság meghatározásához. A Cohen-kappa 0,67-nek bizonyult, ami jelentős véleményegyezést tükröz. Ahol a vizsgálók fele-fele pozitívnak vagy negatívnak véleményeztek egy esetet, revíziót követően kerültek az esetek a pozitív vagy a negatív kategóriába. TRPS1 pozitivitás 92 (79%; 95% CI 70-85%) esetben mutatkozott a tumorsejtek 10-100%-ában, ami felülmúlja a korábban tesztelt markereket. Az esetek túlnyomó többségében (78/92 eset; 85%; 95% CI 75-91%) diffúz pozitivitást láttunk; az 5 metaplasztikus karcinómából háromban szintén diffúz TRPS1 pozitivitás volt kimutatható, a fennmaradó két laphám-metapláziát mutató esetben azonban nem volt detektálható expresszió. A fennmaradó 25 esetben nem észleltünk sejtmagi pozitivitást. A teljesen negatív esetek mellett, előfordult fals citoplazmatikus expresszió is. Egyetlen egy esetben a sejtmagban észlelhető pozitivitás nem érte el az általunk használt 10%-os küszöbértéket, így ezen eset is negatívként került

kiértékelésre. A többi vizsgált marker esetén a következőképpen alakult a pozitivitás: SOX10: 82 (70%; 95% CI 61–78%), GATA3: 11 (9%; 95% CI 5–17%), MGB: 10 (9%; 95% CI, 4–16%) és GCDFP-15: 7 (6%; 95% CI 3–12%). Egy hierarchikus sorrendet felállítva a 25 TRPS1 negatív esetből 11 pozitívnak bizonyult SOX10-zel. A TRPS1, illetve SOX10 kettős negatív esetekből egy sem mutatott GATA3 expressziót. Ezen tripla negatív (TRPS1, SOX10, GATA3) esetek közül egy mutatott MGB pozitivitást. A fennmaradó 11 esetből pedig 3 volt GCDFP-15 pozitív. A 92 TRPS1 pozitív eset közül 20 csupán TRPS1-gyel mutatott pozitivitást (22%; 95% CI 14–32%). A fennmaradó esetekben kettős vagy hármas együttes expresszió, illetőleg egy esetben mind az 5 marker expressziója megfigyelhető volt.

A 25 TRPS1 negatív eset különböző expressziós mintázatot mutatott az általunk vizsgált markerekkel. Egy eset vizsgálatakor nem állt rendelkezésünkre a többi markerrel végzett IHC eredménye, illetve egy eset a TRPS1-en felül csak SOX10 pozitív IHC-t tartalmazott. A 10%-os határértékkel 7 eset volt kizárólag SOX10 pozitív. Egy eset volt SOX10 és GATA3 kettős pozitív és 2 eset volt SOX10 és MGB kettős pozitív. Egy esetben csak MGB expressziót láttunk. Négy eset bizonyult GCDFP-15 pozitívnak. Összességében nyolc eset volt, amely egyik markerrel sem bizonyult pozitívnak. A küszöbértéket 5%-ra csökkentve a GATA3, MGB és GCDFP-15 tekintetében az eredmények igen kis mértékben módosultak, így hét eset maradt, amely egyik marker expresszióját sem mutatta.

4.2. AZ ÖSZTROGÉN- ÉS PROGESZTERON RECEPTOR, A CYTOKERATIN 5 ÉS 14 IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATOK HASZNA EMLŐMEGTARTÓ MŰTÉTEK ESETÉN A KAUTER KÁROSODOTT RESZEKCIÓS FELSZÍNBEN ELHELYEZKEDŐ HÁMPROLIFERÁCIÓK ESETÉN

Összességében 23 beteg 34 elváltozását vizsgáltuk meg. Az esetek között 14 invazív NST BC (6 eset extenzív intraduktális komponenssel (EIC)), 4 tisztán DCIS, 1 tubuláris karcinóma EIC-vel, 1 microinvazív emlőbimbó Paget-kór EIC-vel és egy neoadjuváns kezelést követő - kiindulási szövettani diagnózis NST - tumorágy szerepelt. Továbbá egy eset atípusos duktális hiperpláziával és egy eset intraduktális papillomával is bekerült a vizsgálatba, azzal a céllal, hogy a kauter károsodott terület további vizsgálata során esetlegesen módosításra kerüljön a felállított diagnózis. Az invazív BC-k összessége, valamint a DCIS esetek háromnegyede ER és PR pozitív volt, míg egy DCIS eset ER és PR negatív, viszont HER2 pozitívnak bizonyult. Ezen DCIS-ben apokrin differenciációt láttunk, amelyben androgénreceptor expresszió és GCDFP-15 pozitivitás is megfigyelhető volt. A mamilla Paget-kórban HER2

pozitivitás volt kimutatható a hormon receptor pozitivitás mellett. A neoadjuváns kezelésen átesett beteg esetén a reziduális invazív NST HER2 és ER pozitív volt, de PR státusza nem került meghatározásra.

Hét elváltozás szolgált kontrollként, amelyből 3 egyértelmű kauter által károsodott neoplasztikus elváltozás, illetve 4 eset nem neoplasztikus elváltozás volt. A fennmaradó 27 lézió biológiai természete nem volt egyértelműen meghatározható csupán a HE metszet vizsgálatával. A négy IHC-t követően a kontroll esetek közül egyetlen egy (ER és CK14 negatív, továbbá CK5 és PR mozaikszerű expressziót mutató) kivételével az összes az elvárt mintázatot mutatta a keratinokkal. A hormonreceptorok IHC vizsgálata kevésbé segített a károsodott hám besorolásában, ugyanis a neoplasztikus elváltozásokban negativitás, részleges pozitivitás vagy az expresszió teljes hiánya volt megfigyelhető a kauter károsította szövetben. A HE metszetek vizsgálata alapján az esetek egy részét nem lehetett besorolni; IHC segítségével kétharmaduk nem neoplasztikus vagy neoplasztikus, valamint a fennmaradó esetek közül kétharmad valószínűsíthetően neoplasztikus vagy nem neoplasztikus kategóriába sorolhatóvá vált. Mindezt figyelembe véve, 3/27 eset maradt, amelyekről állást foglalni az IHC-t követően sem tudtunk.

A károsodott hám besorolásához mind a 4 IHC hasznosnak bizonyult az esetek közel felében. A 4 IHC reakcióból 3 volt segítségünkre az esetek klasszifikációjában 19 esetben (0,70; 95%-os CI 0.50–0.86). A leghasznosabbak a keratinok voltak, az esetek többségében azonos jelölődési mintázattal. Négy esetben láttunk eltérést a két keratin között. Az ER és PR kevésbé bizonyultak hasznosnak.

Összességében a 27 kérdéses elváltozás négy IHC vizsgálata 23 esetben tisztázta a kauter károsította területen látott elváltozás benignus vagy malignus voltát (0,85; 95%-os CI 0.66–0.96), illetve egy további esetben (ER+, PR+ és HER2+ DCIS Paget-kórral és mikroinvázióval) a 4 vizsgált marker negatívnak bizonyult, azonban az erős HER2 pozitivitás a kontextus figyelembevételével tisztázta az elváltozás neoplasztikus eredetét.

4.3. EMLŐRÁKOK STROMÁLIS GALECTIN-1 EXPRESSZIÓJA – A PROGNOZTIKUS ÉRTÉK VIZSGÁLATA TRIPLA-NEGATÍV EMLŐRÁKBAN

Vizsgálatunk során 95 a diagnózis időpontjában áttétmentes nőbetegből származó TNBC-t elemeztünk. A betegek medián életkora 69 év volt (29–91 év). Az esetek csaknem azonos számban tartoztak a pT1c (40 eset) és a pT2 (43 eset) kategóriába. Három kivételével minden

eset grade 3-as volt. A vizsgált esetek többsége pN0 kategóriájú volt, és a nyirokcsomóáttétet tartalmazó esetek közül a legtöbb eset a pN1 csoportba tartozott. A medián utánkövetési idő 62 hónap volt (11–220 hónap). Az utánkövetés során 37 haláleset került regisztrálásra, és ebből 22 BC miatt történt. Helyi kiújulás vagy távoli áttét 57 betegnél került leírásra. Ennek megfelelően 38 beteg volt betegségmentes a követés végpontjáig.

Az esetek körülbelül egynegyedében masztektómiára került sor ($n=26$), míg a betegek többsége emlőmegtartó műtéten (BCS) esett át ($n=69$). Az axilláris státusz meghatározására 50 esetben sentinel nyirokcsomó-biopsziát alkalmaztak, míg 43 betegnél axilláris nyirokcsomó-blokkdisszekció történt. Két betegnél nem történt axilláris beavatkozás. Hét beteg részesült neoadjuváns kemoterápiás kezelésben, de ezen esetekben nem észleltek regressziót, ellenkezőképp, progresszió került leírásra. A legtöbb beteg adjuváns kemoterápiában részesült (vagy taxán-tartalmú, vagy antraciklin-alapú kezelés formájában). A betegek egy csoportja nem kapott adjuváns kemoterápiás kezelést az ismert társbetegségek miatt, vagy mert elutasították az ajánlott kezelést.

A log-rank teszt szignifikáns különbséget igazolt az OS-ben az öt kategóriára bontott festődési intenzitás (negatív/gyenge/közepes/erős/nagyon erős) esetén (szabadságfok: 4, $p=0,006$). Amikor a két tágabb festődési intenzitás csoportot hasonlítottunk össze, szintén szignifikáns különbség mutatkozott az OS-ben ($p=0,008$). Az alacsony sTIL alcsoport esetén ugyanezen kategorizálással szignifikáns különbség mutatkozott az OS-ben az intenzíven festődő esetek és a gyenge vagy közepes festődést mutató esetek között ($p=0,005$). A peritumorális stromális festődésre vonatkozó $\geq 50\%$ -os küszöbérték alkalmazásával a log-rank elemzés szignifikáns különbséget mutatott mind az OS ($p=0,020$), mind a PFS ($p=0,007$) tekintetében. Az alacsony sTIL alcsoportban a PFS esetében azonosítottunk szignifikáns különbséget ($p=0,025$).

Az egyváltozós Cox-regressziós analízist követő többváltozós elemzésben csak a pN kategória bizonyult független prognosztikai tényezőnek az OS szempontjából, ha minden szignifikáns változót bevontunk a modellbe, amely az egyváltozós analízisben szignifikánsnak bizonyult. Ha a két galectin-1 festődési paraméter közül csak azt vettük figyelembe, amelyik alacsonyabb p -értékkel bírt (azaz a kétfokozatú intenzitási kategorizálást), akkor a pN és a galectin-1 festődési intenzitás is független prognosztikai tényezőnek bizonyult.

Az alacsony sTIL csoportban (n=43), az egyváltozós Cox-regressziós analízist követő többváltozós elemzés kapcsán csak az intenzív galectin-1 festődés mutatott szignifikáns hatást a túlélésre ($p=0,009$).

PFS tekintetében, az egyváltozós Cox-regressziós analízis kapcsán kiemelt szignifikáns változók közül a többváltozós analízis alapján a pN kategória ($p=0,004$) és a galectin-1 stromális festődési százalékos arány ($p=0,008$) bizonyult független prognosztikai tényezőnek. Az alacsony sTIL csoportban csak a pN kategória és a galectin-1 festődés százalékos aránya ($\geq 50\%$ -os stromális galectin-1 expresszió) volt szignifikáns prognosztikai tényező az egyváltozós elemzésben, és mindkettő független tényezőként jelent meg a többváltozós modellben is.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. TRPS1 EMLŐMARKER EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA ÉS ÉRTÉKELÉSE CYTOKERATIN 5 POZITÍV, TRIPLA-NEGATÍV EMLŐRÁKOKBAN

A GCDFP-15, a MGB és a GATA3, az elsőként leírt emlőmarkerek csökkent szenzitivitással bírnak TNBC-k esetén. A kis százalékban látott, halvány festődésű sejtek IHC vizsgálatakor sokszor nehézségbe ütközünk az IHC interpretációjakor, annak ellenére, hogy akár a kis százalékban látott, gyenge expresszió is emlő eredetre utalhat TNBC esetén. Amennyiben a határértéket 10%-ról 5%-ra csökkentjük, kis mértékben változik a SOX10 és a TRPS1 pozitív esetek aránya, 82 vs 86/117 és 92 vs 93/117. Az eredmények antitest klónonként változóak lehetnek. A különböző antitest klónok vizsgálatát és a szakirodalmi adatokat is figyelembe véve, összességében a SOX10 és a TRPS1 bizonyult a szenzitívebb emlő eredetet igazoló markernek összevetve a GATA3-mal, MGB-vel, és a GCDFP-15-tel a CK5 pozitív TNBC-k esetében.

Jelen vizsgálatban a TRPS1 volt a legtöbb esetben expresszált emlőmarker, amelyet követ a SOX10, a GATA3, a MGB és végül a GCDFP-15. A szenzitivitása 0,86, amely a SOX10 esetén 0,69 volt a 10%-os határértéket alkalmazva (az 5%-os határérték esetén 0,87, illetve 0,72).

Jelentős véleményegyeezést azonosítottunk a TRPS1 IHC értékelésekor, a pozitív és negatív esetek meghatározásában. Az ONEST analízis >70%-os teljes egyetértést jelzett. Legalább 4 vizsgálóra volt szükség, hogy megbízhatóan meghatározzuk a reprodukálhatóságot.

5.2. AZ ÖSZTROGÉN- ÉS PROGESZTERON RECEPTOR, A CYTOKERATIN 5 ÉS 14 IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATOK HASZNA EMLŐMEGTARTÓ

MŰTÉTEK ESETÉN A KAUTER KÁROSODOTT RESZEKCIÓS FELSZÍNBEN ELHELYEZKEDŐ HÁMPROLIFERÁCIÓK ESETÉN

Napjainkban a BCS-k során azt tekintjük tumormentes reszekciós felszínnek, ha a „nincs festék a tumorsejten” elv érvényesül, vagy 1-2 mm-es tumormentes emlőállomány látható a tumor és a festékkel jelölt reszekciós felszín között. A kauter okozta károsodás megnehezíti a mindennapi munka során a reszekciós felszín megítélését, és sokszor nehézségekbe ütközünk annak meghatározásában, hogy a károsodott szélben neoplasztikus folyamat vagy nem neoplasztikus elváltozások vannak-e jelen.

A 4 IHC alkalmazása sem minden esetben segít az esetek pontos azonosításában. Azonban az esetek többségében (kétharmad) egyértelműen segítségünkre voltak a markerek, valamint a fennmaradó esetek további kétharmadában a neoplasztikus vagy nem neoplasztikus eredet valószínűsíteni tudtuk, aminek jelentősége a további kezelési terv befolyásolásában van. Az esetek körülbelül egy tizedében az IHC nem segített.

Az antitestek nem egyforma arányban bizonyultak hasznosnak a döntéshozatalban, és a tumorok 40%-ában vettük hasznát mind a négy markernek. Összességében a keratinok bizonyultak az esetek többségében segítségnek. Nem volt olyan eset, ahol egyik keratin sem bizonyult hasznosnak a károsodott sebészi szél pontosabb megítélésében úgy, hogy a szteroid hormonreceptorok valamelyike viszont hasznos lett volna; igaz, előfordult pár eset, amelyekben az egyik keratin nem nyújtott segítséget a neoplasztikus vagy nem neoplasztikus eredet meghatározásában, és ezen esetekben vettük hasznát az ER és PR IHC-nak. A keratinok további előnye, hogy segítenek az in situ és az invazív tumorok elkülönítésében a myoepithel sejtek jelölődése miatt.

5.3. EMLŐRÁKOK STROMÁLIS GALECTIN-1 EXPRESSZIÓJA – A PROGNOSZTIKUS ÉRTÉK VIZSGÁLATA TRIPLA-NEGATÍV EMLŐRÁKBAN

A kutatási témánk szempontjából kiemelendő tény, hogy az sTIL aránya általánosságban magasabb TNBC-kben és HER2-pozitív BC-ben, a lúminális típusú karcinómákhoz képest. Azon TNBC-kben jobb a prognózis, amelyekben magasabb az sTIL aránya. Azon tumorokban, ahol alacsonyabb, ott a gyulladásos sejtinfiltráció tumorelles hatása nagyobb, mint tumorprogressziót elősegítőé. Mindezek alapján egy immunszuppresszív molekulának feltételezhető a prognosztikai jelentősége ezen BC szubtypusban.

Az erős és diffúz ($\geq 50\%$ -os) galectin-1 stromális expresszió rosszabb túléléssel társul, aminek a hátterében a galectin-1 tumor mikrokörnyezetben kiváltott immunszuppresszív hatása állhat. A kutatásunkban a galectin-1 intenzív (erős) expresszió és a rövidebb OS között szignifikáns összefüggést azonosítottunk, azonban ezt a különbséget PFS esetén nem láttuk. A galectin-1 diffúz ($\geq 50\%$ -os) expressziója rövidebb OS-sel, ill. rövidebb PFS-sel társult. Összességében az eredményeink a galectin-1 negatív prognosztikai szerepét támogatják TNBC-ben.

Külön is megvizsgálatuk a magas és az alacsony sTIL tumorokat. Az alacsony sTIL csoportban a statisztikai analízissel szignifikáns különbséget azonosítottunk a galectin-1 intenzitás és az OS között, valamint a galectin-1 százalékos aránya ($\geq 50\%$ -os határérték) és a PFS között. Ezen esetekben az alacsonyabb sTIL szám, valamint a magasabb galectin-1 expresszió is magyarázhatja a rosszabb túlélési adatokat. Úgy tűnik, hogy a mi kutatásunk az első, amely a galectin-1 expresszió túlélésre gyakorolt hatását vizsgálta TNBC-ben, ahol az immunrendszert elkerülő mechanizmusok fontos jellemzői a malignus fenotípusnak, és befolyásolják a kimenetelt. A megfigyelések, amelyek szerint a magas sTIL szám jobb prognózissal társul TNBC-ben, azt vetik fel, hogy az immunrendszer anti-tumorális aktivitású. Ezek alapján a galectin-1 immunszuppresszív hatása a tumorsejtek számára egy immunrendszer elkerülési mechanizmust biztosíthat, és ez magyarázhatja a rosszabb OS-t (és egyes megközelítésekben a PFS-t is), amelyet mi is alátámasztottunk TNBC-ben.

Az egy-, és többváltozós Cox-regressziós elemzések eredményei a túlélési görbék analízisének eredményeit támogatták, és eszerint az erős és a diffúz galectin-1 expresszió TNBC-ben független prognosztikai tényező. Az eredményeink alapján nem csak a galectin-1 stromában észlelt százalékos expressziója befolyásolja a túlélést, hanem minél intenzívebb a jelölődés a tumorsejtfészkek környezetében, annál rosszabb az OS. Az alacsony sTIL csoportban a galectin-1 expresszió (százalékos aránya) szignifikáns prognosztikai jelentőségűnek bizonyult a többváltozós analízisben PFS tekintetében.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Az eredményeink alapján az 5 vizsgált markerből a TRPS1 bizonyult a legszenzitívebb emlő eredetet igazoló markernek CK5-expresszáló TNBC-kben (amelyek nagy része a bazális-szerű alcsoporthoz tartozik); ennek legnagyobb hasznát a metasztatikus esetekben tudjuk venni. A TRPS1 negatív esetek többsége SOX10 pozitivitást mutatott, a fennmaradó dupla negatív

esetek más emlőmarkerrel pozitívak lehetnek. A TRPS1 értékelés reprodukálhatósága is kielégítőnek bizonyult, eszerint egy megbízható és könnyen értékelhető markerről van szó.

A TNBC-k esetén nehézségekbe ütközhetünk, ha egy emlőtumor kapcsán ki kell kizárnunk, vagy megerősítenünk a malignus sejtek emlőeredetét vagy metasztatikus voltát. Ezen esetekben számos tényező segítségünkre lehet, mint az in situ komponens jelenléte, a morfológiai jellemzők, speciális típusú BC-k, vagy éppen a nem konvencionális morfológia jelenléte. Ennek következtében - egyes esetekben - az emlőmarkerek használatának aránya csökkenhet. A core biopsziás minták sokszor kevésbé reprezentatívak, és szükség lehet további vizsgálatok elvégzésére. Természetesen, mind a primer, mind az áttéti folyamatok esetén a releváns klinikai információ a legfontosabb, de amennyiben szükségünk van további vizsgálatokra, IHC markert tartalmazó paneleknek vehetjük hasznát, hiszen a mi eredményeink is azt mutatják, hogy néha a legkevésbé szenzitív marker az egyedüli pozitív IHC TNBC-kben. Az általunk nyert eredmény és a szakirodalmi adatok alapján úgy gondoljuk, hogy a TRPS1-nek helye van az emlőeredet megerősítésére létrehozott IHC panelekben.

Figyelembe véve az eredményeinket, a CK5, CK14, ER és PR IHC segítséget nyújthat a kauter károsította reszekciós felszíneken elhelyezkedő neoplasztikus és nem neoplasztikus elváltozások elkülönítésében. Mind a négy IHC segítségünkre lehet a döntéshozatalban, azonban a leghasznosabbnak a CK5 és a CK14 bizonyult, amelyek akár önmagukban is hasznunkra lehetnek. Kiemelendő, hogy az IHC értékelése és az esetek véleményezése során figyelembe kell vennünk a páciens ismert betegségeit, a téves értelmezés elkerülése érdekében.

Az erős és/vagy diffúz galectin-1 stromális pozitivitás a tumorsejtfészkek környezetében TNBC-ben rosszabb OS-sel és/vagy PFS-sel társult, és független prognosztikai tényezőnek bizonyult a többváltozós analízis alapján. Az eredményeink szerint nem csak a galectin-1 stromában észlelt százalékos expressziója befolyásolja a túlélést, hanem minél intenzívebb a jelölődés a tumorsejtfészkek környezetében, annál rosszabb az OS. Az alacsony sTIL csoportban a galectin-1 expresszió (százalékos aránya) szignifikáns prognosztikai jelentőségűnek bizonyult a többváltozós analízisben PFS tekintetében.

Tájékoztató vizsgálatunk eredményei arra utalnak, hogy a galectin-1 immunszuppresszív hatása révén részt vesz a tumor immun-elkerülő mechanizmusában, ami a malignus tumorok egyik fő ismertető jege. Mivel a daganatellenes immunitást szabályozó mechanizmusok összetettek, további megerősítő vizsgálatokra lehet szükség, ahhoz, hogy az eredményeinket terápiás szempontból, ill. galectin-1 ellenes kezelés kidolgozás formájában hasznosítani lehessen.

7. JELENTŐS, ÚJ EREDMÉNYEK

A TRPS1 a legszenzitívebb emlőeredetet igazoló marker CK5 pozitív TNBC-kben (ez a csoport nagy fokban átfed a bazális-szerű alcsoporttal), és hasznát vehetjük metasztatikus esetekben is. A TRPS1 értékelés reprodukálhatósági vizsgálata arra utal, hogy jól reprodukálható, könnyen értékelhető markerről van szó.

A CK5, CK14, ER és PR IHC segítségével szolgálhat a kauter által károsított reszekciós felszínekben elhelyezkedő neoplasztikus és nem neoplasztikus elváltozások diagnosztikájában. Mind a négy IHC segítségünkre lehet a döntéshozatalban, azonban a leghasznosabbnak a CK5 és a CK14 bizonyult; ezek akár önmagukban is hasznunkra válhatnak.

Roszbabb túlélést (OS és PFS) mértünk azokban a TNBC-kben, amelyekben az IHC vizsgálattal intenzívebb, diffúz stromális galectin-1 expressziót azonosítottunk. Ezt magyarázhatja a galectin-1 immunszuppresszív hatása. A galectin-1 pajzsként veszi körül a tumorsejt fészkeket, ami immunválasz elkerülési mechanizmusra utalhat.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném szívből jövő hálámat kifejezni témavezetőimnek, Prof. Dr. Cserni Gábornak és Dr. Kuthi Leventének a kutatásom során nyújtott felbecsülhetetlen iránymutatásukért és támogatásukért.

Hálás vagyok a kutatásban közreműködő szerzőtársaimnak: Dr. Sejben Anitának, Dr. Vörös Andrásnak, Dr. Nagy Ákosnak, Dr. Zombori Tamásnak, Prof. Dr. Krenács Tibornak és Prof. Dr. Krenács Lászlónak az értékes hozzájárulásukért.

Külön köszönet illeti Prof. Dr. Tiszlavicz Lászlót és Dr. Vörös Andrást, akik kutatásom idején tanszékvezetőként biztosították a megfelelő munkakörnyezetet a tudományos tevékenységemhez.

Hálával tartozom a Szegedi Tudományegyetem Patológiai Intézet minden munkatársának, valamint a Bács-Kiskun Vármegyei Oktatókórház valamennyi kollégájának a hozzájárulásukért.

Hálás vagyok Intézetünk orvosainak, akik megismertették velem a patológia szépségeit és kihívásait.

Külön köszönet illeti Dr. Sejben Anitát az iránymutatásáért és bátorításáért, nemcsak a kutatásom során, hanem a mindennapi munkában is.

Köszönettel tartozom a Szegedi Tudományegyetem Open Access Alapjának és „A szegedi pathológiáért alapítvány” -nak a támogatásukért.

Végül, de nem utolsósorban, nagyon hálás vagyok a családomnak és barátaimnak, különösen férjemnek, Zónai Viktornak, aki minden nap mellettem állt ezen a kihívásokkal teli úton.