



Kihívások az emlőrák patológiai diagnosztikájában

Ph. D. Tézis

Dr. ZOMBORI Tamás

Témavezető:

Dr. Cserni Gábor, Ph.D., D.Sc.

Pathológiai Intézet

Szegedi Tudományegyetem

Szeged, Magyarország

2018

BEVEZETÉS

Az emlőrák a leggyakoribb rosszindulatú daganat az európai nők körében. A szervezett emlőrákszűrések, a média reflektorfénye, a számos magas színvonalú tudományos konferencia felhívja a figyelmet a betegség epidemiológiai, szociológiai és pszichológiai fontosságára. A tézis írásakor a PubMed adatbázis a “breast cancer” szavakra keresés során 369900 különböző közleményt ajánlott fel. A tudományos publikációk óriási száma az emlőrákkutatás iránti nagy érdeklődésre világít rá. Munkánkban a tripla negatív emlőrások (TNBC) immunfenotípezálására, a primer szisztémás kezelés (PST) tumor ágyra és az axilláris nyirokcsomókra kifejtett hatásaira, valamint a potenciális neoductgenesis eseteire, azaz a comedo-szerű necrosist és amorf kalcifikációt mutató diffúz in situ ductalis carcinomára fókuszáltunk.

1.1. A TRIPLA NEGATÍV EMLŐRÁK, MINT DIAGNOSZTIKUS KIHÍVÁS

Az emlőrák áttétei vagy a nyirok- vagy a vérerek útján alakulnak ki a regionális nyirokcsomókban és a távoli szervekben. Néha az ismeretlen emlőrának az áttét az első klinikai jele. Ilyen áttéti carcinoma esetében a metasztatikus természet és a szervi eredet bizonyítása elengedhetetlenül fontos. Az alacsony specificitásuk miatti problémák ellenére az ösztrogén receptor (ER), progeszteron receptor (PR) és a humán epidermális növekedési faktor receptor (HER2) a legpraktikusabb markerek az emlő eredet immunhisztokémiai támogatására. Ezen antitestek a luminális A-szerű, luminális B-szerű és a HER2 pozitív esetekben segítségünkre lehetnek, de a TNBC eseteiben, melyek az összes emlőrák 15%-át teszik ki, definíció szerint negatívak. Amennyiben nincs klinikai információ megelőző emlőrákos betegségről vagy több daganata van / lehet a betegnek, egy TNBC, a különböző potenciális primer carcinomák immunfenotípusainak átfedése miatt, könnyen összezavarhatja a patológust. Metasztatikus carcinoma eseteiben az emlő eredet bizonyítására számos immunmarkert vizsgáltak, ilyen a GATA-3, a mammaglobin A (MG), a gross cystic disease fluid protein-15 (GCDFP-15), az NY-BR-1 és a BCA-225.

1.2. PRIMER SZISZTÉMÁS KEZELÉST KÖVETŐ TUMORREGRESSZIÓ EMLŐRÁKBAN

A PST-t jelenleg, elsősorban nagy méretű (>2 cm), illetve lokálisan előrehaladott emlőrákok esetén alkalmazzák. A nemzeti irányelvek, valamint az emlőrák leletezésének egységesítését célzó összefoglaló dolgozatok ellenére, számos ellentmondással szembesülünk

a témában, melyek leginkább a specimen feldolgozásban, a komplett patológiai regresszió (pCR) definiálásában, illetve a regresszió grádusának és mintázatainak megítélésében mutatkoznak meg. A PST-t követően a makroszkópos észlelést a klinikai és különösen a radiológiai észleletekkel kell egyeztetni, hogy a megfelelő területből történjen a szöveti mintavétel. A kezelés előtt tumorosan érintett területből szisztematikusan kell mintát venni, hogy az tartalmazza a makroszkóposan észlelt tumorágyat és/vagy a jelölő fém klip területét, valamint ezek szomszédos emlőállományát is.

A PST után kialakuló regresszió homogenitását vagy heterogenitását kevesebb dolgot vizsgálja. Provenzano és munkatársai a következő reziduális betegség mintázatokat definiálták: homogén regresszió (cellularitás csökkent, méret változatlan), inhomogén regresszió (cellularitás csökkent, méret változó, kis területeken nincs residuális betegség), "scatter pattern" (cellularitás csökkent, méret változó, a tumorágy nagy területein nincs reziduális betegség, máshol pedig van) és "concentric shrinkage" (CS) (méret csökkent, cellularitás lényegesen nem változott). Különösen a "scatter pattern" vezethet diagnosztikus tévedésekhez, ha a tumor területét nem szisztematikusan dolgozzák fel. A PST-t követően bizarr, és/vagy nagy magvú daganatos óriássejtek jelenhetnek meg a tumorágyban, melyeket általában a kemoterápia hatásának tulajdonítanak. Ezen bizarr sejtek növelhetik a kezelés utáni grádust, míg az osztódó sejtek számának csökkenése inkább csökkenti azt.

1.3. PRIMER SZISZTÉMÁS KEZELÉST KÖVETŐ TUMORREGRESSZIÓ AXILLÁRIS NYIROKCSOMÓKBAN

A szentinel nyirokcsomó (SLN) az első nyirokcsomó, amely a daganat nyirokúton történő terjedése során érintetté válhat. Általában ezt követően alakul ki a nem szentinel nyirokcsomókban (non-SNL) az áttétes betegség. A morfológiai és funkcionális eltéréseket magában foglaló tumor reaktív lymphadenopátia (TRL) egy komplex nyirokcsomó-reakció, amely még a metasztatikus tumorsejtek érkezése előtt elkezdődik. A morfológiai változásokat illetően, korábbi tanulmányok a tumort drenáló nyirokcsomók megnagyobbodását, a vér- és nyirokerek számának növekedését és strukturális remodellációját, valamint a magas endotélű venulák endotélsejtes proliferációját írták le. A funkcionális eltérések közül a megnövekedett vér perfúziót, a megváltozott immunológiai státuszt, azon belül a CD4 és CD8 pozitív T-lymphocyták CD28 és CD3 ζ expressziójának eltéréseit, az antigén prezentáló parakortikális dendritikus sejtek dendritikus denzitásának, valamint komplexitásának csökkenését emelték ki.

A fent leírt tényezők a PST után teoretikusan megváltoztathatják az SLN-ben észlelt reakciókat a tumorról nem közvetlenül kapcsolódó, non-SLN-ekeké képest. A TRL által érintett nyirokcsomókban a megnövekedett perfúzió és a sűrűbb érálózat megnövelheti a kemoterápiás szerek, valamint a célzott terápiás gyógyszerek (pl.: hormon receptor modulátorok vagy trastuzumab) hatását. A szentinel nyirokcsomókban megvalósuló kifejezettebb regresszió akár komplett regresszióhoz is vezethet az SLN-ben, miközben a non-SLN-k tumorosan érintettek maradhatnak. Mindez befolyásolhatja az SLN biopszia esetén észlelt álnegatív esetek arányát is. Egy másik lehetőség szerint az SLN-ekben immunszuprimált állapot alakul ki a non-SLN-ekké képest, ami a cytotoxikus szerek hatását csökkentheti. A szelektív regresszió, vagy épp ennek ellentéte befolyásolhatja a jelölt, a PST előtt pozitívnak bizonyult nyirokcsomó eltávolításának a stádium meghatározásban betöltött szerepét.

1.4. DIFFÚZ DCIS COMEDO SZERŰ NECROSISSAL ÉS AMORF MESZESEDÉSSEL – A NEODUCTGENESIS TEÓRIÁJA

Az emlő parenchymát felépítő anatómiai egységeket lebenynek nevezzük. A lobuláris szerveződés hasonló egy fához, melyben a ductus lactiferus alkotja a fa törzsét, a ductusok a fa ágait, a lobulusok pedig a fa leveleit. A lobulusok acinusait és a ductusokat egyszerű elkülöníteni egymástól. Míg mind a ductusoknak, mind a lobulusoknak közös jellemzője a külső myoepithel sejtréteg és a basalis membrán, addig az elasztikus rostréteg csak a ductusok körül észlelhető.

Amikor DCIS alakul ki a ductalis fában és a végeit képző terminális ductulobularis egységben, ezen normális anatómiai struktúrák gyakran kitágulnak. Amikor az emlőre jellemző szerkezet fennmarad, könnyen felismerhető a ductusokat és néha a lobulusokat érintő DCIS. Ez utóbbi jelenséget nevezzük lobuláris cancerisationak. A DCIS bizonyos formái nem követik a fent leírt növekedési mintázatot, hanem a normálisnál sűrűbb eloszlású, többnyire monomorf és tágult lumen képződik. Habár egyesek úgy gondolják, hogy ezen mintázat már meglévő struktúrák abnormális tágulatai során jönnek létre, az emlő lobuláris szerkezete már nem ismerhető fel egyértelműen. Ezen emlőtumorok morfológiájának értelmezését segíti a neoductgenesis teóriája, amely szerint új ductusok képződnek a már meglévő ductusokból és belenőnek a strómába. Az új ductusok (neoduct-ok) “pushing” széllel és myoepithel-, valamint basalis membránborítással terjednek be a strómába. Ez utóbbi sajátosság az in situ carcinoma jellemzője, és az invazivitás kizárására használják az emlő

patológiában. A neoductgenesis magyarázatot adhat a diffúz DCIS-t tartalmazó, kis invazív komponensű emlőtumorok agresszív viselkedésére. A neoductgenesis-t mutató, invazív komponens nélküli, tisztán DCIS-ből álló tumoroknak rosszabb a lokális recidívaaránya és a teljes túlélése, amit a nagyobb extenzióval és a diffúz növekedéssel hoznak párhuzamba. A neoductgenesis eseteinek többségében a mammográfiás felvételen öntvényyszerű, "casting" típusú meszesedést írtak le, melyet több tanulmány kedvezőtlenebb prognózissal társított. A neoductgenesis kórszövettani definiálását a Zhou és munkatársai által javasolt pontrendszer teszi lehetővé, melynek elemei a ductus koncentráció, a periductalis fibrosis és lymphocytá infiltratio mértéke.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A tézis célkitűzései a következők voltak:

Cytokeratin 5 (CK5) pozitív, ezért basalis szerűnek tartható TNBC-k immun-hisztokémiai (IHC) vizsgálata GATA-3, MG, GCDFP-15, NY-BR-1 és BCA-225 antitestekkel.

A PST-t követő regressziós mintázatok vizsgálata különös tekintettel a radiológiai és patológiai tumorméret korrelációjára, a tumorágy, illetve az axilláris nyirokcsomók regressziós heterogenitására és ezeknek az emlőrák molekuláris szubtypusaival való összefüggéseire, a biopsziában és a reszekátumban észlelt cellularitás változására, a cellularitás- és a méretváltozás korrelációjára, valamint a nagy magvú, bizarr daganatos óriássejtek terápiával való összefüggéseire.

A PST-t követő regresszió különbségeinek vizsgálata SLN-ekben és non-SLN-ekben olyan betegeken, akiknél PST után SLN biopsziát és axilláris nyirokcsomó disszekciót végeztek.

Potenciálisan neoductgenesis-t mutató diffúz DCIS eseteiben a lumenképző struktúrák vizsgálata orcein festéssel, mellyel detektáljuk, hogy a ductusok és acinusok, valamint a neoductusoknak tartott struktúrák elasztikus rost borítottsága milyen mértékű.

3. ANYAG ÉS MÓDSZEREK

3.1. A BAZÁLIS-SZERŰ TRIPLA NEGATÍV EMLŐRÁKOK IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATA

CK5 pozitív TNBC definíciójának megfelelő, a kecskeméti Bács-Kiskun Megyei Oktató Kórházban 2005 augusztusa és 2015 augusztusa között operált invazív emlőrákos eseteket választottuk ki "tissue microarray" (TMA) készítésére. A TMA-kat archivált, paraffin blokkokból képeztük, minden carcinomából 2 "core" kiemelése történt.

A GATA-3, az MG, a GCDFP-15, az NY-BR-1 (és a BCA-225) IHC festést a TMA-kon végeztük. A metszeteken a tumorsejtek nukleáris (GATA-3) és a citoplazmatikus (MG, GCDFP-15 és BCA-225) vagy nukleáris és citoplazmatikus (NY-BR-1) pozitivitásának arányát két patológus értékelte. Az 5% feletti festődést definiáltuk pozitívnak.

3.2. PST-T KÖVETŐ TUMORREGRESSZIÓ MINTÁZATAINAK ELEMZÉSE EMLŐRÁKOK ESETÉBEN

Konszekutív vizsgálati anyagunkba PST-vel kezelt a kecskeméti Bács-Kiskun Megyei Oktatókórházban vagy a szegedi Sebészeti Klinikán operált invazív emlőrákos betegeket vontunk be. Mindkét intézmény a 3. Magyar Emlőrák Konszenzus Konferencia ajánlásait követte, különös tekintettel a radiológiai lokalizációra, a szisztematikus feldolgozásra és a klinikopatológiai korreláltatásra.

A reszekátumból készült valamennyi tumor(ágy) és a megelőző "core" biopszia hematoxilín-eozin (HE) festett metszetét áttekintettük. A cellularitás arányát két patológus becsülte meg a biopsziás anyagon és a reszekátumon. A komplett regressziós mintázatot, valamint a regresszió teljes hiányát teljes metszeten, kis (4x, 0,24 mm²) és közepes (10x, 0,005 mm²) látótérben jelenlevőként vagy hiányzóként értékeltük. Homogén regressziónak tekintettük a pCR-t, a regresszió hiányát valamennyi metszeten és az egyenletes cellularitáscsökkenést valamennyi metszeten. Minden más mintázatot inhomogénnek tartottunk, melyek közül kiemeljük a "scatter pattern"-t és a CS-t. A kezelés előtti és utáni cellularitás- és méretváltozást, valamint a radiológiai és a patológiai méret korrelációját Spearman rank modellel vizsgáltuk.

Azon sejteket, melyek bőséges citoplazmával, több és/vagy megnagyobbodott hiperkromatikus, változó alakú és méretű sejtmaggal rendelkeztek, "monster" sejteknek

neveztük el, és a kezelés utáni reszekátum kimetszéseiben kerestük. Az axilláris nyirokcsomók metszeteiben az áttét és a regresszió jelenlétét, hiányát dokumentáltuk. Inhomogén axilláris regressziót definiáltunk, ha metasztatikus nyirokcsomók voltak jelen mind regresszió jeleivel mind anélkül.

3.3 A PST UTÁNI TUMORREGRESSZIÓ HETEROGENITÁSÁNAK VIZSGÁLATA AXILLÁRIS NYIROKCSOMÓKBAN

Multicentrikus retrospektív vizsgálatunkba olyan emlőrákos betegek nyirokcsomóit elemztük, akiknél PST után SLN biopsziát és axilláris nyirokcsomó-disszekciót végeztek. A regresszió jelenlétét és fokát vizsgáltuk valamennyi SLN és non-SLN esetében. Ezen eredmények szerint kategorizáltuk az egyes eseteket az alapján, hogy támogatják-e a szelektív / kifejezettebb SLN (versus non-SLN) regresszió teóriáját vagy nem.

3.4. LUMENKÉPZŐ STRUKTÚRÁK VIZSGÁLATA COMEDO-SZERŰ NECROSIS ÉS “CASTING” TÍPUSÚ MESZESÉDÉST MUTATÓ, DIFFÚZ DCIS ESETEIBEN

Retrospektív vizsgálatunkba comedo szerű necrosist és “casting” típusú meszesedést mutató, diffúz DCIS eseteinek metszeteit választottuk be a szegedi Pathológiai Intézetből és a kecskeméti Bács-Kiskun Megyei Oktató Kórházból. A HE festést az egyes, neoplasztikus sejtek által érintett anatómiai struktúrák identifikálásához használtuk, mellyel eldöntöttük, hogy a struktúra biztosan vagy bizonytalanul ductus vagy acinus. Az orcein-festést (ORC) arra alkalmaztuk, hogy a már korábban annotált anatómiai struktúrák körül az elasztikus rostok jelenlétét detektáljuk.

Esetenként egy vagy két metszetet digitalizáltunk a 3DHistec Panoramic 250 szkennelvel. A struktúrákat parallel módon, mind a HE, mind az ORC festett digitalizált metszeten azonosítottuk a Panoramic Viewer software (3DHistec, Budapest, Hungary) segítségével.

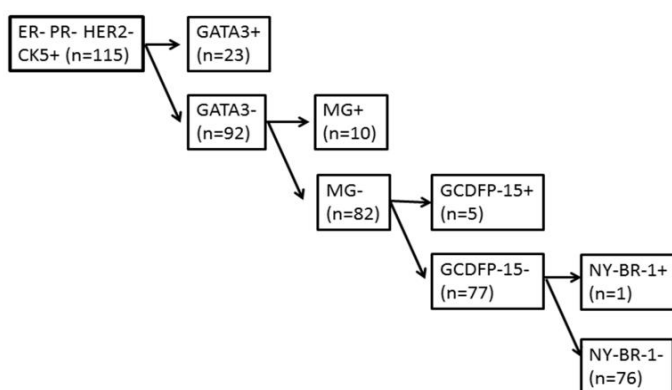
Minden egyes lument képző struktúrát a normális mikroanatómiai struktúrákkal való hasonlatossága alapján a következő kategóriák egyikébe soroltuk: egyértelműen ductus, valószínűleg ductus, osztályozhatatlan, valószínűleg acinus, egyértelműen acinus. Ezen annotált és klasszifikált struktúrák körül az elasztikus rostok mennyiségét a következőképpen jellemeztük: koncentrikus pozitivitás, inkább pozitív (az elasztikus rostok a struktúra területének több, mint felénél jelen vannak), inkább negatív (az elasztikus rostok a struktúra területének kevesebb, mint felénél vannak jelen) és negatív. Az elasztikus rostok mennyiségét

eszerint pontoztuk 3-tól (koncentrikus pozitivitás) 0-ig (negatív). A Zhou és munkatársai által kidolgozott „neoductgenesis score”-t (Int J Breast Cancer 2014; 2014: 581706) alkalmaztuk az egyes eseteken a jelenség identifikálása céljából. Habár az eredeti leírásban a pontrendszer minden egyes komponensét pontozták, és a pontok összege jellemzett egy adott esetet, munkánkban ezt alkalmaztuk minden egyes annotált struktúrára vonatkozólag is. Ecélből a kombinált pontrendszer első komponensét az egész metszetre vonatkoztattuk, míg a megmaradó két komponens az egyes annotált struktúrák körüli lymphocytá infiltráció és fibrózis mértéke alapján kalkuláltuk. Mann-Whitney és khi-négyzet próbát alkalmaztunk az SPSS Statistics software (IBM, SSPS 22.0, Armonk, NY USA) segítségével.

4. EREDMÉNYEK

4.1. BAZÁLIS SZERŰ TNBC-K IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATA

A 118 tumoros esetből 115-ben tudtuk értékelni az immunfestést. Három esetben a core mintákban necrosis vagy a tumorsejtek hiánya akadályozta meg a vizsgálatot. A GATA-3 festést a tumorsejtekben nuclearis, míg az MG, GCDFP-15, NY-BR-1 és BCA-125 esetében citoplazmatikus jelölődés jellemezte. Amennyiben bármilyen fokú festődést figyelembe vettünk, az esetek többségében GATA3 és BCA-225 pozitivitás mutatkozott, amit az MG és GCDFP-15 követett csökkenő sorrendben. NY-BR-1 immunreaktivitást nagyon kevés esetben észleltük. Ha a pozitivitásra vonatkozó 5%-os cut off értéket alkalmaztuk, akkor valamennyi marker esetében csökkent a pozitív esetek aránya, de a gyakoriság sorrendje nem változott:



1. ábra: Az egyes festődések hierarchikus ábrázolása

Csak az esetek egy harmada mutatott figyelemre méltó festődést (legalább 5%-ot) az emlő specifikusnak tartott négy marker bármelyikével. Az 1. ábra hierarchikusan mutatja be az egyes festődések gyakoriságát és azt, hogy mennyiben tud egy-egy marker hozzájárulni az emlő eredet bizonyításához CK5 pozitív TNBC-k esetében. Az ábrából kitűnik, hogy az NY-BR-1 tud a legkevesebbet segíteni ebben a kérdésben.

4.2. PST-T KÖVETŐ TUMORREGRESSZIÓ MINTÁZATAINAK ELEMZÉSE EMLŐRÁKOK ESETÉBEN

Vizsgálatunkba 106 esetet tudtunk bevonni: 56 esetet a szegedi Pathologiai Intézet, 50 esetet a kecskeméti Bács-Kiskun Megyei Oktató Kórház anyagából. A regresszió homogenitását illetően a luminális A szerű, a HER-2 és a TNBC csoportok inkább homogén, a luminiális B szerű esetek inkább inhomogén regressziót mutattak. Sajnos a csoportok alacsony elemszáma statisztikai próbákat nem tett lehetővé. A regresszió teljes hiánya 7,5%-os, az egyenletes cellularitás csökkenés 18,8%-os és a pCR 28,3%-os volt. Az inhomogenitás túlnyomó többsége kisebb területekre korlátozódó minor inhomogenitásnak bizonyult (36,7%). A „scatter pattern” mindösszesen 7 esetben volt jelen (6,6%), míg a „CS” volt a legritkább (n=2; 1,8%). Az axilláris nyirokcsomókban a homogenitás volt a gyakoribb (homogenitás: 45,3% versus inhomogenitás: 23,5%). Azon esetekben, amikor sem áttét, sem regresszió nem mutatkozott, a homogenitásról állást foglalni nem tudtunk (31,2%).

A cellularitás csökkenését észleltük az esetek két harmadában, míg egy jelentős kisebbségben (15,1%) növekedést azonosítottunk. A cellularitás változásának, valamint a PST előtti radiológiai mérethez képest kialakult, PST utáni radiológiai és patológiai méretváltozás közötti korrelációnak a vizsgálata során szignifikáns konkordanciákat észleltünk ($p=0.04$ és $p=0.03$). A grádus az esetek 72,4%-ában nem változott. "Upgrading" és "downgrading" 10-10 esetben fordult elő (13,8% és 13,8%). Az utóbbira a TNBC-k esetében nem volt példa. A Spearman rank korreláció alapján a PST utáni patológiai és radiológiai méretek szignifikáns konkordanciát mutattak ($p=0.002$).

"Monster" sejteket 19 esetben észleltünk (17,9%), ezek kizárólag (y)grade 2 és 3 tumorokban fordultak elő. Öt esetben történt "upgrading" (grade 2-ből y-grade 3) a "monster" sejtek jelenlétében. Ezen neoplasztikus sejtek egy kivételével, csaknem kizárólag taxán tartamú PST-t követően jelentkezték. A molekuláris szubtypusok, valamint a PST indukálta méret-, cellularitás- és grade-változás, illetve a regresszió homogenitása és a "monster" sejtek jelenléte között nem észleltünk korrelációt.

4.3. A PST UTÁNI TUMORREGRESSZIÓ HETEROGENITÁSÁNAK VIZSGÁLATA AXILLÁRIS NYIROKCSOMÓKBAN

Az összesen 142 elemzett eset közül 110 ER pozitív (25 egyben HER2 pozitív) és 32 ER negatív (12 emellett HER2 pozitív) volt. Huszonnégy esetben komplett patológiai regresszió állt fenn residuális in situ carcinomával vagy anélkül, és 16 esetben egyáltalán nem volt regressziós jel a tumorágyban. Mindösszesen 19 nyirokcsomó pozitív esetben nem detektáltunk semmilyen nyirokcsomóáttét-regressziót, míg 55 esetben legalább egy metasztatikus nyirokcsomóból hiányoztak a regresszió jelei (NR4). Páciensenként medián 2 SLN-t (1-8) és 14 non-SLN-t (2-42) távolítottak el.

A PST-t kapó, lokálisan előrehaladott emlőrákos betegek esetében az SLN biopszia gyakorlata számos kérdést vet fel. A PST előtt az esetek egy részében történt SLN biopszia, míg más esetekben elmaradt a bizonyítottan metasztatikus nyirokcsomók jelenléte miatt. A szelektív SLN-áttét regresszió teóriája szempontjából indifferens volt 87/142 eset. A 89 nodalis regressziót mutató esetből 22 betegnél (25%) volt kifejezettebb a regresszió a non-SLN-ekben. Az SLN-ekben kifejezettebb regresszió 18 esetben mutatkozott (20%).

4.4. LUMENKÉPZŐ STRUKTÚRÁK VIZSGÁLATA COMEDO-SZERŰ NECROSIS ÉS “CASTING” TÍPUSÚ MESZESEDÉST MUTATÓ, DIFFÚZ DCIS ESETEIBEN

Retrospektív vizsgálatunkban 21 nőbeteg 27 metszetét vizsgáltuk. Mindösszesen 1220 struktúrát osztályoztunk különböző bizonyossággal ductusnak vagy acinusnak. A struktúrák kétharmada nem osztályozható kategóriába került, és a fennmaradók 7,4%-13,6%-a a korábban ismertetett további 4 kategória valamelyikébe esett. Azon struktúrák körül, melyeket ductusok, vagy valószínű ductusok közé soroltunk, illetve a nem osztályozható struktúrák egy kisebb csoportjánál koncentrikus elasztikus rostozatot láttunk. A spektrum másik végén az acinusok és a valószínű acinusok helyezkedtek el, amelyek körül elasztikus rostozatot nem detektáltunk. A legtöbb nem osztályozható struktúra körül teljesen vagy részben (inkább negatív) hiányzott a peristrukturális elasztikus rostréteg. Szignifikáns különbséget észleltünk a ductusok és az acinusok elasztikus rostozata között: az előbbieknél koncentrikus elasztikus rostok mutatkoznak, míg az utóbbiaknál ezek hiányoznak ($p < 0,001$).

Hat eset (25,5%) bizonyult neoductgenesisre pozitívnak a “neoductgenesis score” alkalmazásával. A pontrendszer minden egyes struktúrára való kiterjesztésével, a neoductgenesis pozitív tumorok struktúráinak 27,3%-át azonosítottuk neoductnak, míg a

neoductgenesis negatív tumorokban alig észleltünk neoductokat (0,75%). Az annotált struktúrák neoduct pontszámainak átlagát is vizsgáltuk esetenként: a neoductogenesis pozitív esetekben (n=6) az egyes struktúrákra vonatkoztatott “neoductgenesis score” magasabb volt (átlag±S.D.: 3.87±0.35, terjedeleme: 3.49-4.39), mint a neoductgenesis negatív tumorok eseteiben (átlag±S.D.: 1.97±1.11, terjedeleme: 0-3.1). Az egyes struktúrákra vonatkoztatott “neoductgenesis score” által identifikált neoductok kétharmada szabálytalan és nem osztályozható struktúrának bizonyult, továbbá 80%-uk esetében nem vagy inkább nem volt elasztikus rostréteg. Szignifikáns különbséget tudtunk kimutatni a normális struktúrák és a neoductok között a chí-négyzet próba segítségével; utóbbiak esetében nem volt elasztikus rostréteg (p<0.001). Az elasztikus rostok jelenlétét ORC festett metszeteken vizsgáltuk: minden egyes struktúrát pontoztuk a módszerekben leírtak alapján. Neoductgenesis pozitív tumorok esetében alacsonyabb pontokat észleltünk (átlag±S.D.: 0.57±0.32, terjedeleme: 0.28-0.91), mint a neoductgenesis negatív tumorok eseteiben (átlag±S.D.: 0.89±0.54, terjedeleme: 0.1-2.1).

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A BAZÁLIS SZERŰ TRIPLA NEGATÍV EMLŐRÁKOK IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATA

A TNBC-eket az ER, PR és HER2 immunhisztokémiai negativitásuk alapján definiáljuk. Habár az emlőbe adott áttétek ritkák, a TNBC áttéteivel más szerveknél gyakran találkozunk. Egy TNBC-áttét emlő eredetének megerősítése diagnosztikus kihívás, mivel a gyakran használt, ám az emlő eredetére nézve korántsem specifikus ER definíció szerint negatív ezen daganatokban. Jelen vizsgálatunkban 5 IHC marker expresszióját vizsgáltuk, melyek legalábbis az adatlapjuk leírása szerint emlő eredetet támogatnak. Az IHC vizsgálatainkat CK5 expressziót mutató, tehát bazális szerű TNBC-ken végeztük.

A GATA3, MG, GCDFP-15 és NY-BR-1 expresszióját TNBC-ben kevés dolgozat taglalja. Eredményeink alapján az emlő eredetet támogató IHC markerek szenzitivitása a következő: GATA-3: 43,5% (95%CI 39,6-47,6), MG: 16,4% (95%CI: 13,6-19,6), GCDFP-15: 15,1% (95%CI: 12,7-17,9) és NY-BR-1: 5,4% (95%CI: 2,7-10,3). Amennyiben figyelembe vesszük, hogy a BCA-225 alacsony emlő specifikusságát már leírták, a további 4 emlő marker a CK5 expresszáló TNBC-k 15%-ában nem mutatott egyáltalán festődést. Ha a pozitivitást $\geq 5\%$ expresszió alapján definiáljuk, akkor ezen négy marker az esetek

egyharmadában szólt emlő eredet mellett, míg az esetek kétharmadában nem volt ilyen mértékű festődés.

Tudomásunk szerint vizsgálatunk, a legnagyobb elemszámú olyan dolgozat, melyben 4 emlő eredetet támogató IHC marker expresszióját vizsgálták TNBC-k eseteiben, sőt munkánkban a TNBC-k egy speciális szubtípusára, a CK5-öt expresszáló bazális szerű emlőrákokra fókuszáltunk. A GATA3, az MG, a GCDFP-15 és a NY-BR-1 expressziója alacsonyabb TNBC-kben, mint általában az emlőrákokban. Habár ezen markerek más tumorokban is pozitívak lehetnek, használatukkal a bazális szerű emlőrákok egy részénél az emlő eredet alátámasztható. Habár a pozitív festődés emlő eredetet támogat, a negativitás sem zárja ezt ki egyértelműen. Úgy gondoljuk, hogy metasztatikus tumorok esetén a GATA-3, az MG és a GCDFP-15, mint IHC panell használata segíthet az elő eredet megerősítésében, ha az ER és PR negatív.

5.2. PST-T KÖVETŐ TUMORREGRESSZIÓ MINTÁZATAINAK ELEMZÉSE EMLŐRÁKOK ESETÉBEN

A PST vizsgálatok végpontjainak meghatározásában a patológiai észlelés döntő szerepet játszik. A PST-t követő szövettani eltérések összetettek, ezért a minták szisztematikus vizsgálata elengedhetetlen a pontos diagnózis és a legmegfelelőbb kezelés meghatározásához. A minták kezelésének és kórszövettani interpretációjának standardizálása kiemelten fontos a PST vizsgálatok egyik indikátorának a pCR-nek és a reziduális betegségnek a detektálásában.

Habár a cellularitás változása a PST egyik legjellemzőbb hatása, vizsgálata mégsem része a rutin szövettani leletezésnek. Jelen munkánkban a PST előtti biopsziákon és posztoperatív mintákon vizsgáltuk a cellularitás változását. Az esetek döntő többségében a becsült cellularitás csökkent, és szignifikáns korrelációt észleltünk a cellularitás- és a méret-változás között.

Eredményeink alapján a regresszió homogenitása és inhomogenitása nem függ a molekuláris szubtípustól: az esetek fele homogén, fele inhomogén regressziót mutat. Az inhomogén regresszió többsége minor inhomogenitásnak bizonyult, mely közepes vagy kis nagyságú látótérben látszott. A „scatter pattern” illetve a „CS” kivételesen ritka volt. Habár a diagnosztikus diszkrepanciákat okozó „scatter pattern” (ahol egész metszeteken lehet komplett regresszió reziduális daganat ellenére) a legjelentősebb mintázat, a minor

heterogenitás is vezethet téves interpretációhoz, amennyiben csak „core” biopsziákkal vizsgálják a regressziót PST után.

Számos befejezett és jelenleg is folyó klinikai vizsgálat van, amelynél menet közben a „core” biopsziás mintavétel a protokoll része. Ezen vizsgálatokra kiemelkedő hatással lehet a tumornak és regressziós mintázatnak a heterogenitása, különösen a „scatter pattern”. Az inhomogén regressziót mutató esetekben végzett limitált időközi, illetve PST utáni „core” biopsziás mintavétel diszkrpanciák forrása lehet, amennyiben a mintát a tumorágy azon részéből vették, ahol komplett regresszió vagy épp a regressziós jelek teljes hiánya mutatkozik. Ezen diagnosztikus hibák elkerülése érdekében többes „core” biopsziás mintavételre van szükség, amennyiben a teljes tumorágy vizsgálata nem lehetséges.

A “monster” sejtek nagy neoplasztikus sejtek, melyeket a PST hatásának tulajdonítanak. Ezen sejtek csaknem kizárólag taxán tartalmú kezelés mellett jelentkeztek. A taxán fő hatása a mikrotubulus funkció megszűnése, ami a mitotikus orsó kialakulását gátolja. Eredményeink alapján a “monster” sejtek jelenléte növelheti a nukleáris atípiát, és ezen keresztül PST-t követően “upgrading” valósulhat meg. A poliploidizáció miatt ezekben a sejtekben számos gén kópiaszáma megnövekedhet, akár a HER2-é is, aminek a terápiás konzekvenciái nem ismertek.

Tudomásunk szerint munkánk az első dolgozat, amelyben a regresszió heterogenitásának molekuláris szubtypusokkal való összefüggéseit vizsgálták. Eredményeink alapján az esetek fele inhomogén és nem mutat összefüggést a molekuláris szubtypusokkal. A teljes tumorágy vizsgálata szükséges a regresszió megítéléséhez. A PST hatásának tulajdonított “monster” sejtek a taxán kezelés hatására alakulnak ki és “upgrading”-hez vezethetnek a PST előtt nem kifejezett nukleáris atípiát mutató esetekben.

5.3. A PST UTÁNI TUMORREGRESSZIÓ HETEROGENITÁSÁNAK VIZSGÁLATA AXILLÁRIS NYIROKCSOMÓKBAN

Limitált esetszámú eredményeink alapján az esetek eloszlása nem támogatta az SLN-ekben kialakuló szelektív regressziót. A nyirokcsomókban kialakuló fibrotikus gócot általában a regresszió jelének tulajdonítják, noha ezen eltérések nem specifikusak és más folyamat is eredményezheti őket. Mivel PST esetén ezen gócok kialakulásának legvalószínűbb oka maga a kezelés, ezért ezeket egyöntetűen regressziós jelnek definiáltuk. Az SLN-ekben elméletileg egy időben alakul ki immunszuppresszió, illetve TRL. Adataink

alapján a regresszió fokát illetően nincs olyan szignifikáns különbség az SLN-ek és a non-SLN-ek között, amely az SLN-ekben megvalósuló szelektív regressziót támogatná. Ezért a szelektív SLN regresszió nem magyarázhatja a PST utáni SLN biopsziák magasabb álnegatív arányát.

5.4. LUMENKÉPZŐ STRUKTÚRÁK VIZSGÁLATA COMEDO-SZERŰ NECROSIST ÉS “CASTING” TÍPUSÚ MESZESEDÉST MUTATÓ, DIFFÚZ DCIS ESETEIBEN

Eredményeink alapján a comedo-szerű necrosist mutató DCIS által érintett nagy denzitású struktúrák javát nem lehet a HE metszeten észlelt megjelenés alapján ductusnak vagy acinusnak nevezni. A munkánk során a változó bizonyossági fok alapján ductusnak vagy acinusnak besorolt struktúrák körül a normális anatómiai struktúrák alapján várt elasztikus rostokat tudtunk kimutatni. Másrészt a legtöbb, sem ductusnak sem acinusnak nem identifikálható struktúra, illetve a minden egyes elemre alkalmazott „neoductgenesis score” által „neoduct”-nak tartott struktúra körül hiányoztak az elasztikus rostok. Habár ezen tények a struktúrák acinus eredete mellett is szólhatnának, valószínűbb, hogy a korábban leírt periductalis tenascin-C akkumuláció mellett ez egy újabb különbség a már meglévő és az új eredetű ductusok között.

Korábban már bemutatták, hogy a myoepithel sejtek myoepithelialis immunmarker expressziója egyes DCIS esetekben megváltozik: egy vagy több myoepithel marker festődése elvész. Noha a myoepithel markereket nem vizsgáltuk jelen munkánkban, az elasztikus rostok eltűnését, mint egy további eltérést, észleltük a comedo-szerű necrosist mutató DCIS eseteiben.

A neoductgenesis teóriája olyan emlőrákok morfológiájára próbál magyarázatot adni, melyekben a neoplasztikus sejtek egymás melletti, szorosan elhelyezkedő struktúrákban mutatkoznak. Ezen képletek a bazális membrán és a myoepithel sejtek jelenléte alapján megfelelhetnek egyrészt már meglévő ductusoknak és acinusoknak, bár a normális emlőre jellemző fatörzs-faág architektúra egyáltalán nem észlelhető. A teória alapján ezen emlőrákokban a lument formáló struktúrák már meglévő ductalis struktúrákból “pushing” típusú infiltrációs széllel nőnek ki és képeznek új ductusokat, “neoduct”-okat. Ilyen esetek háromdimenziós vizsgálatáról szóló tanulmányok arra utaltak, hogy a ductusok és acinusok normális eloszlása hiányos. A zavart “arborizáció” háttérben egy hibás alveoláris “switch” állhat; ez egy olyan hormonok által vezérelt, fiziológias folyamat, amely során a ductushámból acinusok fejlődnek ki. Saját eredményeink alapján a neoductnak vélt struktúrák

körül hiányzik az elasztikus rostköpeny, és ez alapján az acinusokra hasonlítanak ebből a szempontból.

Több képletet észleltünk, melyeket egyértelműen nem tudunk ductusnak vagy acinusnak besorolni, mint amennyi struktúra “neoduct”-nak felelt meg az egyes struktúrákra vonatkoztatott „neoductgenesis score” alapján. Ezen osztályozhatatlan struktúrák általában nem rendelkeznek elasztikus rostokkal. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy azok a potenciális “neoduct”-ok, amelyek nem rendelkeznek elasztikus rostokkal és nem sorolhatók be egyértelműen a ductusok és az acinusok közé az architekturális mintázat alapján. Az elasztikus rostok vizsgálata segítséget nyújthat a neoductgenesis vizsgálatában.

6. JELENTŐS, ÚJ EREDMÉNYEK

- Tudomásunk szerint ezideig a legnagyobb számú TNBC-n, azon belül is CK5-öt expresszáló bazális szerű emlőrákon vizsgálatuk meg 5 emlő eredetet támogató IHC marker expresszióját.

- Megállapítottuk, hogy a GATA3, az MG, a GCDFP-15 és a NY-BR-1 expressziója alacsonyabb a vizsgált TNBC-kben, mint általában az emlőrákokban. Öt százalékos elvárt festődési arány mellett a 4 marker az esetek több mint a felét nem tudja emlőrákként azonosítani.

- Tudomásunk szerint először vizsgáltuk a regresszió heterogenitásának fokát és molekuláris szubtypusokkal való összefüggéseit. Eredményeink alapján az esetek közel fele inhomogén regressziót mutat, és ez nem mutat összefüggést a molekuláris szubtypusokkal.

- Eredményeink alapján utalunk arra, hogy optimálisan a teljes tumorágy vizsgálata szükséges a regresszió megítéléséhez és a korlátozott számú „core” biopsziás mintavétel nem minden esetben alkalmas a regresszió jelenlétének, fokának az értékelésére.

- A PST hatásának tulajdonított “monster” sejtek a taxán kezelés hatására alakulnak ki és “upgrading”-hez vezethetnek a PST előtt alacsony vagy közepes nukleáris atípiát mutató esetekben.

- Limitált esetszámú vizsgálatunkban a metasztázisok és a regresszió megoszlása nem támogatta az SLN-ekben kialakuló szelektív regressziót, ami alapján ez a jelenség nem állhat a PST után végzett SLN biopsziák valamivel magasabb álnegativitási aránya háttérében.

- A HE festés és a normális mikroanatómiai megjelenés alapján sem ductusnak, sem acinusnak be nem sorolható, DCIS által érintett struktúrák ORC festéssel nem mutatják a normális ductusokra jellemző körkörös elasztikus réteget, ezáltal acinusokra emlékeztetnek vagy jelzik, hogy atípusos ductusok. A „neoduct score” alapján neoductnak megfelelő struktúrák is ezt az elasztikus réteg nélküli morfológiát mutatják, továbbá nem sorolhatók be acinusnak vagy ductusnak a mikroszkópos megjelenés és megoszlás alapján. Az elasztikus rostok vizsgálata segítséget nyújthat a neoductgenesis vizsgálatában.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Külön köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Cserni Gábornak, tudományos munkám során nyújtott a támogatásáért és iránymutatásért.

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Iványi Béla és Prof. Dr. Tiszlavicz László intézetvezetőknek, akik kiváló munkafeltételeket biztosítottak az SZTE ÁOK Pathologiai Intézetben.

Külön köszönettel tartozom Dr. Hortobágyi Tibornak, aki a tézis elkészítésében nyújtott segítséget.

Hálás vagyok mentoraimnak, Kaiser Lászlónak, Hamar Sándornak és Vörös Andrásnak, akik bevezettek az emlőpatológia kihívásaiba.

Hálámat szeretném kifejezni az emlő “oncoteam” valamennyi tagjának: Prof. Dr. Kahán Zsuzsannának, Prof. Dr. Lázár Györgynek, Dr. Paszt Attilának, Dr. Simonka Zsoltnak, Dr. Ormándi Katalinnak, Dr. Hoffmann Csillának, Dr. Nikolényi Alízna, Dr. Ruzs Orsolyának, Prof. Dr. Cserni Gábornak, Dr. Hamar Sándornak, Dr. Kaizer Lászlónak, Dr. Vörös Andrásnak, és Dezső Mihálynak (az SZTE ÁOK Pathologiai Intézet fotografusának). Magas színvonalú munkájuk a tézis megírásához nélkülözhetetlen volt.

Külön köszönettel tartozom családomnak, mennyasszonyomnak és barátaimnak a támogatásukért és bátorításukért.

A tézis alapját szolgáló dolgozatokat részben a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal GINOP-2.3.2-15-2016-00020 számú ösztöndíja támogatta.

A PHD TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

I. **Zombori T**, Cserni G. Immunohistochemical analysis of the expression of breast markers in basal-like breast carcinomas defined as triple negative cancers expressing keratin 5. *Pathol Oncol Res.* 2018;24:259-267. doi: 10.1007/s12253-017-0246-y.

IF: 1.93

II. Cserni G, **Zombori T**, Andreu X, Bianchi S, Regitnig P, Amendoeira I, Balmativola D, Kovács A, Cordoba A, Reiner A, Kulka J, Kaya H, Liepniece-Karele I, Quinn C, Kővári B. Is Regression after neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer different in sentinel and non-sentinel nodes? *Pathol Oncol Res.* 2018;24:167-170. doi: 10.1007/s12253-017-0229-z.

IF: 1.93

III. **Zombori T**, Cserni G. Elastic stains in the evaluation of DCIS with comedo necrosis in breast cancers. *Virchows Arch.* 2018;472:1007-1014. doi: 10.1007/s00428-017-2259-z.

IF: 2.93

IV. **Zombori T**, Cserni G. Patterns of regression in breast cancer after primary systemic treatment. *Pathol Oncol Res.* [under consideration]

TOVÁBBI PUBLIKÁCIÓK

V. Janovszky Á, Szabó A, Varga R, Garab D, Boros M, Mester C, Beretka N, **Zombori T**, Wiesmann HP, Bernhardt R, Ocsovszki I, Balázs P, Piffkó J. Periosteal microcirculatory reactions in a zoledronate-induced osteonecrosis model of the jaw in rats. *Clin Oral Investig.* 2015;19:1279-88. doi: 10.1007/s00784-014-1347-6.

IF: 2.38

VI. **Zombori T**, Furák J, Nyári T, Cserni G, Tiszlavicz L. Evaluation of grading systems in stage I lung adenocarcinomas: a retrospective cohort study. *J Clin Pathol.* 2018;71:135-140. doi: 10.1136/jclinpath-2016-204302.

IF: 2.89

VII. **Zombori T**, Lehóczky L, Cserni B, Nyári T, Cserni G. [Evaluation of anatomic and prognostic stages of breast cancer according to the 8th edition of the TNM staging system - Retrospective analysis based on data from deceased patients once diagnosed with breast cancer]. *Orv Hetil.* 2017;158:1373-1381. doi: 10.1556/650.2017.30849. [Hungarian]

IF: 0.32

VIII. Maráz R, **Zombori T**, Ambrózay É, Cserni G. The role of preoperative axillary ultrasound and fine-needle aspiration cytology in identifying patients with extensive axillary lymph node involvement. *Eur J Surg Oncol.* 2017;43:2021-2028. doi: 10.1016/j.ejso.2017.08.007.

IF: 3.68

IX. Vöröslakos M, Takeuchi Y, Brinyiczki K, **Zombori T**, Oliva A, Fernández-Ruiz A, Kozák G, Kincses ZT, Iványi B, Buzsáki G, Berényi A. Direct effects of transcranial electric stimulation on brain circuits in rats and humans. *Nat Commun.* 2018;9:483. doi: 10.1038/s41467-018-02928-3.

IF: 12.32

X. **Zombori T**, Nyári T, Tiszlavicz L, Pálföldi R, Csada E, Géczi T, Ottlakán A, Pécsy B, Cserni G, Furák J. The more the micropapillary pattern in stage I lung adenocarcinoma, the worse the prognosis-a retrospective study on digitalized slides. *Virchows Arch.* 2018;472:949-958. doi: 10.1007/s00428-018-2337-x.

IF: 2.93

XI. Diossy M, Reiniger L, Sztupinszki Z, Krzystanek M, Timms KM, Neff C, Solimeno C, Pruss D, Eklund AC, Tóth E, Kiss O, Ruzs O, Cserni G, **Zombori T**, Székely B, Tímár J, Csabai I, Szallasi Z. Breast cancer brain metastases show increased levels of genomic aberration-based homologous recombination deficiency scores relative to their corresponding primary tumors. *Ann Oncol.* 2018;29:1948-1954. doi: 10.1093/annonc/mdy216.

IF: 13.92

XII. **Zombori T**, Tóth N, Furák J, Berényi Z, Tiszlavicz L. [Tumor of posterior mediastinum - rare case of extramedullary myelolipoma]. *Magy Seb.* 2017;70:74-77. doi: 10.1556/1046.70.2017.1.11. [Hungarian.]