



# Neuroendokrin neoplasmák molekuláris karakterizálása

Ph. D. Tézis

dr. Turkevi-Nagy Sándor

Témavezető:

dr. Kővári Bence Ph.D.

Szegedi Tudományegyetem  
Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ  
Patológiai Intézet  
Szeged  
2023



A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények listája

- I. Kővári B, Turkevi-Nagy S, Báthori Á, Fekete Z, Krenács L. Syntaxin 1: A Novel Robust Immunophenotypic Marker of Neuroendocrine Tumors. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 12;21(4):1213. doi: 10.3390/ijms21041213. PMID: 32059362; PMCID: PMC7072745. IF: 5,54
  
- II. Zombori T, Turkevi-Nagy S, Sejben A, Juhász-Nagy G, Cserni G, Furák J, Tizslavicz L, Krenács L, Kővári B. The panel of syntaxin 1 and insulinoma-associated protein 1 outperforms classic neuroendocrine markers in pulmonary neuroendocrine neoplasms. *APMIS.* 2021 Apr;129(4):186-194. doi: 10.1111/apm.13113. Epub 2021 Jan 28. PMID: 33417719. IF: 3,26
  
- III. Turkevi-Nagy S, Báthori Á, Böcz J, Krenács L, Cserni G, Kővári B. Syntaxin-1 and Insulinoma-Associated Protein 1 Expression in Breast Neoplasms with Neuroendocrine Features. *Pathol Oncol Res.* 2021 Oct 26;27:1610039. doi: 10.3389/pore.2021.1610039. PMID: 34764822; PMCID: PMC8575685. IF: 2,53

## 1. Bevezetés

### 1.1. A neuroendokrin neoplasmák (NEN-ek) diagnosztikája

A NEN-ek a rosszindulatú daganatos betegségek közel 1%-át teszik ki. Bármelyik szervben kialakulhatnak, azonban a leggyakrabban a gasztrointesztinális rendszer és az alsó légutak érintettek. A NEN-ek sajátos terápiája miatt a pontos patológiai diagnosis kulcsfontosságú. A low-grade neuroendokrin tumorok (NET-sek) rendszerint már a hisztomorfológiai kép alapján is kórismézhetőek. Ezzel szemben, különösen a high-grade NET-ek és nagysejtes neuroendokrin carcinomák (LCNEC-ek) esetén további vizsgálatok is szükségesek a NE differenciáció bizonyítására. Az erre a célra leggyakrabban alkalmazott diagnosztikai módszer az immunhisztokémia (IHC). A NE differenciáció igazolására számos marker használatos, pl. a CD56, a chromogranin A (CHGA) és a synaptophysin (SYP). A NE markerek széles palettája önmagában is azt sugallja, hogy nem ismerünk olyan molekulát, amely erre a célra önmagában alkalmazható lenne. Jelenleg a NE differenciáció kizárólag több marker egyidejű alkalmazásával bizonyítható egyértelműen.

### 1.2. Új NE markerek

Az új (specifikusabb és szenzitívebb) NE markerek azonosítása napjainkban is intenzív kutatások tárgyát képezi. Az insulinoma-associated protein 1 (INSM1) egy nemrég leírt, a sejtciklus szabályozásában szerepet játszó transzkripciós factor, amely a NE differenciációs szükséges gének átírásáért felelős, emiatt ígértetes, érzékeny és specifikus markernek tekinthető. Az INSM1 kifejeződését már számos szerv NE szöveteiben és NEN-ekben leírták, beleértve a tüdőt, a központi idegrendszert, a fej-nyak régiót, a pancreast, a prostatát és a bőrt is.

A syntaxinok a preszinaptikus plazmamembránban és a szinaptikus vezikulumok membránjában elhelyezkedő fehérjék. A syntaxin-1 (STX1), a soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein receptor (SNARE) complex egyik komponenseként meghatározó szerepet játszik a szinaptikus membránfúzióban és az exocytosisban. A molekula funkciója alapján feltételezhető, hogy a SYX1 kifejeződik neuronokban és NE sejtekben. Ez a teória in silico fehérje biomarker analízis segítségével is megerősítést nyert; emellett a STX1 jelenlétét korábban számos NE szervben, így a mellékvesevelőben és az endokrin pancreasban is igazolták. Mindazonáltal tudomásunk szerint még nem történt olyan átfogó vizsgálat, amely a STX1 mint általános NE marker felhasználhatóságát celozta a patológiai diagnosztikában.

### 1.3. Tüdő NEN-ek

A légzőrendszer a NEN-ek által második leggyakrabban érintett anatómiai terület. Megjelenésük és biológiai viselkedésük igen változatos, az indolens típusos carcinoidtól (TC) egészen a rendkívül agresszív kissejtes tüdőcarcinomáig (SCLC).

Mivel a betegségcsoport sajátos terápiát igényel, az SCLC kivételével minden olyan esetben IHC vizsgálat javasolt, amikor a NE differenciáció gyanúja felmerül. A differenciáldiagnózis azonban egyes esetekben, különösen a nagysejtes NEC-ek (LCNEC) esetén kihívást jelenthet. Ezen felül a necroticus vagy arteficiálisan károsodott minták vizsgálata során előfordulhat álpozitivitás, míg a rosszul differenciált tumorokban a CHGA immunreaktivitás gyakran gyenge, fokális, nehezen értékelhető. Hasonló korlátok a SYP esetén is jelen vannak. Az INSM1 a pulmonáris NEN-ek IHC diagnosztikájában már ígéretes, kiváló szenzitivitású molekulának bizonyult.

### 1.4. NE vonásokat mutató emlőtumороk

A NE vonásokkal jellemezhető emlődaganatok beosztása ellentmondásos és nem teljesen egyértelmű. Az emlőben igen ritka valódi NEN-ek mellett egyes tumortípusok, úgy mint a hypercellularis (type B) mucinosus carcinomák, a solid papillaris carcinomák, sőt az invazív carcinomák nem speciális típusa is mutathat NE jellegzetességeket akár a hisztomorfológia, akár az immunfenotípus alapján.

A NEN-ek beosztása számos módosításon ment keresztül, mire a klasszifikáció jelenlegi formája létrejött. Azonban a gyakorlati alkalmazhatósága, különös tekintettel a leggyakoribb entitásokra (pl: invazív carcinoma nem speciális típusa NE vonásokkal) továbbra is bizonytalan. Ez lehet az egyik oka annak, hogy a NE jelleget mutató emlődaganatok incidenciája széles tartományban (0.1-20%) mozog, illetve a NE differenciáció prognosztikai jelentősége emlőtumороkban továbbra sem ismert.

## 2. Célkitűzések

1. A STX1 mint NE marker diagnosztikai értékének vizsgálata egy változatos, nem-daganatos elváltozásokból, illetve jó- és rosszindulatú tumorokból álló mintákon.
2. A STX1 és az INSM1 IHC kifejeződésének felmérése tüdő NEN-eken, különös tekintettel a jelölődés kiterjedésére, intenzitására és mintázatára.
3. A STX1 és az INSM1 IHC kifejeződésének karakterizálása NE vonásokat mutató emlőtumороkban.

### 3. Anyag és módszer

#### 3.1. Általános megfontolások

Valamennyi NEN diagnózisa és grádusa az adott régióra vonatkozó, aktuális WHO “kék könyv” kötet alapján került megállapításra.

Az IHC reakciókat FFPE mintákon végeztük. A tissue microarray (TMA) blokkokat manuális TMA eszköz segítségével készítettünk. Minden tumoros elváltozásból két (centrális és perifériás zóna), egyenként 2,2 mm átmérőjű szövethenger származott.

A jelölődés intenzitásának jellemzése három fokozatú szemikvantitatív skálán történt az alábbi módon: gyenge (1+), mérsékelt (2+), erős (3+).

A kutatások a Helsinkii Deklarációban megfogalmazott humán orvosi kutatásokra vonatkozó etikai alapelvekkel összhangban és az SZTE Klinikai Vizsgálatokat Koordináló Iroda engedélyével történtek. (etikai engedély száma: #4430/2018).

#### 3.2. A STX1 mint általános NE marker

A STX1 nem daganatos elváltozásokban való tanulmányozásához normális pajzsmirigyből, mellékpajzsmirigyből, bőrből, pancreasból, mellékveséből, agyból és appendixből származó mintákat vizsgáltunk. A kutatásba hyperplasticus NE léziókat, köztük autoimmun metaplasticus atrophias gastritisben látható linearis és nodularis enterochromaffin-like (ECL) sejtes hyperplasiát és pancreas nesidioblastosist is bevontunk. Ahol lehetséges volt, a peritumorálisan elhelyezkedő fiziológiás NE sejtek STX1 expresszióját is megvizsgáltuk.

A STX1 specificitásának és szenzitivitásának meghatározása céljából a kutatásba összesen 398 nem NE és NE daganatos esetet vontunk be, ezeket részben teljes metszeteken, részben TMA formájában vizsgáltuk. Törekedtünk arra, hogy diagnosztikai kihívásokat jelentő elváltozásokat is bevonjunk.

Egy tumort akkor tekintettünk STX1-pozitívnak, ha a daganatsejtek több mint 50%-a membranosus vagy cytoplazmatikus pozitivitást mutatott. A TMA technikával vizsgált NEN-ek esetében az IHC vizsgálatot a klasszikus NE markerekkel (SYP, CHGA, CD56) is elvégeztük, a STX1-gyel és a többi markerrel pozitívan jelölődött esetek arányainak megoszlását összehasonlítottuk, erre a célra Fisher exakt tesztet alkalmaztunk.

### 3.3. A STX1 és az INSM1 IHC kifejeződése tüdő NEN-ekben

A kutatásba a Szegedi Tudományegyetem Patológiai Intézetben 2003 és 2019 között vizsgált tüdő resectatumokat vontunk be. SCLC-k (n = 30), LCNEC-ek (n = 17), TC-k (n = 33), és atípusos carcinoidok (AC-k) (n = 7) kerültek be a retrospektív vizsgálatba. Beválasztási kritérium volt a NE hisztomorfológia, illetve IHC pozitivitás legalább egy klasszikus NE markerrel (CHGA, SYP, CD56). A STX1 specificitásának meghatározásához 20 tüdő adenocarcinoma és 20 tüdő laphámcarcinoma került be a vizsgálatba.

A STX1, CHGA, SYP, CD56 és INSM1 metszeteken meghatároztuk a jelölődés kiterjedését, intenzitását, celluláris lokalizációját, valamint kiszámítottuk a markerek szenzitivitást. A STX1 és a CD56 esetén a membranosus vagy cytoplazmatikus, a CHGA és a SYP esetén a cytoplazmatikus, míg az INSM1 esetén a nuclearis kifejeződést értékeltük pozitívként, amennyiben a tumorsejtek >5%-a jelölődött. Ha a tumorsejtek >75%-ában észleltük a jelet, a pozitivitást diffúzknak tekintettük.

### 3.4. A STX1 és az INSM1 IHC kifejeződése emlőtumorokban

A Bács-Kiskun Megyei Oktatókórház és a Szegedi Tudományegyetem 2001 és 2009 közötti időszakban diagnosztizált esetei közül 113-at (79-et az előbbi, 34-et az utóbbi centrumból) vontunk be a vizsgálatokba. Hagyományos NE marker pozitivitás 55 beteg anyagából 59 tumorban (közülük 4 kétgócú) volt észlelhető, a többi 54 negatív volt ezekkel a markerekkel. Utóbbi csoport negatív kontrollként szolgált. Az előbbi csoportban az alábbi diagnózisok fordultak elő: hypercellularis (type B) mucinosus carcinoma, solid papillaris carcinoma, invazív emlőcarcinoma nem speciális típusa NE vonásokkal, illetve ductalis carcinoma in situ, NE altípus. A vizsgált tumorok közül egy sem teljesítette a NET vagy NEC diagnosztikai kritériumait.

A pozitivitási kritériumok az alábbiak voltak: CHGA és SYP esetén cytoplazmatikus jelölődés a tumorsejtek legalább 1%-ában, INSM1 esetén nuclearis pozitivitás a tumorsejtek legalább 1%-ában, STX1 és CD56 esetén cytoplazmatikus és/vagy membranosus pozitivitás a tumorsejtek legalább 1%-ában. Meghatároztuk a jelölődött tumorsejtek %-os arányát és a jelölődés intenzitását. Az INSM1 reakciókat egy további kritérium alapján két alternatív módon is kiértékeltek: 1) bármilyen intenzitású nuclearis jelölődés (nagy nagyítású látótér [HP] pozitivitás); 2) alacsony nagyításon is látható (LP) jelölődés.

Az új markerek sepcificitásának meghatározásához a STX1 és INSM1 IHC reakciókat olyan emlőcarcinomákból származó mintákon is elvégeztük, amelyek negatívak voltak CHGA-val, SYP-pel és CD56-tal.

## 4. Eredmények

### 4.1. A STX1 mint általános NE marker

Gyakorlatilag minden nem tumoros szövet, köztük a normális NE sejtek és a hyperplastikus NE elváltozások erős membranosus és gyenge-mérsékelt membranosus STX1-pozitivitást mutattak. A központi idegrendszer és a perifériás idegek neurális elemei szintén STX1 pozitívnak bizonyultak.

Egy kivétellel (99/100, 99%) az összes NEN STX1-pozitív volt, beleértve az áttéti NET-eket is. A gasztrointesztinális NET-ek speciális altípusai (EC sejtes, ECL sejtes, valamint rectalis L sejtes) szintén pozitívnak bizonyultak. A tumorsejtek legalább 50%-a közepesen vagy erősen jelölődött, és az esetek 92%-ában ez az arány meghaladta a 85%-ot. A jelölődés intenzitása nem korrelált a mitotikus aktivitással, a Ki-67 proliferációs indexszel vagy a tumor grásussal. Az egyetlen STX1-negatív eset egy grade 2-es, CHGA-pozitív, Vater papilla területi NET volt. Valamennyi NEC az anatómiai lokalizációtól függetlenül, beleértve a Merkel-sejtes carcinomákat és a medullaris pajzsmirigy carcinomákat, következetesen STX1-pozitívnak bizonyult, az esetek többségében diffúz-erős jelölődéssel.

A STX1 pozitivitás mintázata változatos megjelenésű volt, ami a dominálónan cytoplazmatikus mintázattól a teljes, diffúz membranosus jelölődésig terjedt. A membrán pozitivitás általában teljes, körkörös volt a NET-ekben, azonban a NEC-ek egy részében aberráns inkomplett membranosus mintázat volt megfigyelhető. A klasszikus NE markerekkel összehasonlítva a STX1 pozitivitási aránya volt a legnagyobb mind a NET-ekben (99%), mind a NEC-ekben (100%), ezt követte a CHGA (98% és 91%), a SYP (96% és 89%) és a CD56 (70% és 93%). A négy markerrel jelölődött esetek arányainak megoszlása szignifikánsan különbözött mind a gasztrointesztinális NET-ek ( $p < 0.001$ ), a gasztrointesztinális NEC-ek ( $p = 0.01$ ), valamint a NEC-ek esetén általánosságban is ( $p = 0.007$ ).

Konvencionális carcinomában nem észleltünk STX1 kifejeződést, valamint az endokrin tumorok is következetesen negatívak voltak. Mind a 20 (100%) hypophysis adenoma és 14/16 phaeochromocytoma (88%) STX1-pozitívnak bizonyult.

Egy kivétellel az összes neuroectodermális/neuroepithelialis tumor minta erős, diffúz STX1-pozitivitást mutatott a neuroblastokban és a ganglionsejtekben. A kivételt képező eset egy medulloblastoma volt, amelyben a tumorsejtek kevesebb mint 10%-a jelölődött. A pozitív területein a neuropil komponens is közepes intenzitással jelölődött. A ganglioneuromák és a perifériás ideghüvely tumorok Schwann sejt komponense STX1-negatívnak bizonyult.

#### 4.2. A STX1 és az INSM1 IHC kifejeződése tüdő NEN-ekben

Valamennyi NEN STX1-pozitívnek bizonyult 3 SCLC kivételével. Diffúz pozitivitás volt észlelhető 80/87 esetben (92%), fokális jelölődés (5%-75% között) látszott 2 SCLC-ben, 1 LCNEC-ben és 1 TC-ben. A STX1 jelölődés median intenzitása erős (3+) volt az AC-kben és az SCLC-kben; mérsékelt (2+) a TC-kben és az LCNEC-ekben. A jellemző festődési mintázat membranosus predomináns és gyenge cytoplazmatikus volt a TC-kben, az AC-kben és az LCNEC-ekben. Cytoplazmatikus STX1-pozitivitást főleg az SCLC-kben és néhány LCNEC-ben észleltünk. Diffúz INSM1 pozitivitást találtunk 68/87 esetben (78%), fokális jelölődést (10%-75% között) 8 SCLC-ben, 6 LCNEC-ben és 5 TC-ben. Az INSM1 jelölődés median intenzitása mind a carcinoidokban, mind a high-grade NEN-ekben erősnek bizonyult; előbbi daganatok CHGA-val és SYP-pel szintén erősebben, utóbbiak mérsékeltén jelölődtek.

A STX1 szenzitivitása a high-grade NEN-ekre vonatkoztatva 93,6%-nak (95% CI: 82-99), carcinoidok esetén 100%-nak (95% CI, 91-100) bizonyult. Az egyes NE markerek összesített szenzitivitási értékei az alábbiak voltak: STX1: 96,6%, INSM1: 97,7%, CHGA: 85,2%, SYP: 85,2%, CD56: 92,9%.

A tüdő adenocarcinómák és laphámcarcinómák vizsgálata során nuclearis INSM1 pozitivitást észleltünk 2/20 (10%) adenocarcinómában és 5/18 (27,8%) laphámcarcinómában. A STX1 valamennyi vizsgált esetben negatívnak bizonyult.

#### 4.3. A STX1 és az INSM1 IHC kifejeződése emlőtumorokban

STX1 pozitivitást észleltünk 50/59 tumorban. A jelölődés 37/59 esetben (62,7%) diffúz volt. A pozitív tumorsejtek százalékos arányának mediánja cytoplazmatikus jelölődés esetén 85%, membranosus festődés esetén 55% volt. Az INSM1 HP-n 53/59 elváltozásban, LP-n 51/59-ben volt pozitív, egyaránt nuclearis mintázattal. A pozitivitási küszöbtől függetlenül a mintázat 28/59 (47,5%) esetben bizonyult diffúzsnak, a jelölődött sejtek százalékos arányának mediánja 50% volt.

A klasszikus NE markerek alkalmazása esetén a pozitív sejtek aránya és a jelölődött sejtek százalékos arányának median értéke az alábbiak szerint alakult: SYP: 58/59 és 80%, CHGA: 44/59 és 50%, CD56: 13/58 és 0%. Diffúz pozitivitás SYP-pel 41/59 (69,5%) esetben, CHGA-val 28/59 (47,5%) esetben, CD56-tal 3/58 (5,2%) esetben fordult elő.

Az INSM1 összesített szenzitivitása HP küszöbszint mellett 89,8%-nak, LP mellett 86,4%-nak bizonyult; a STX1 esetén ez az érték 84,7%-nak adódott. A klasszikus NE markerek



összesített szenzitivitása: SYP: 98,3%, CHGA: 74,6%, CD56: 22,4%. A jelölődés median intenzitása s CD56 esetén mérsékelt (2+), az összes többi marker esetén erős (3+) volt.

A negatív kontroll csoport vizsgálata során 1/54 STX1 pozitív esetet találtunk, a marker specificitása ez alapján 98,1%-nak bizonyult. Az INSM1 esetén a HP küszöbérték alkalmazása során 23/54 eset volt pozitív (HP specificitás: 57,4%); ha az LP küszöbszintet használtuk, a pozitív esetek aránya 6/54-re csökkent, ezzel 88,9%-ra emelve a specificitást.

## 5. Megbeszélés

### 5.1. A STX1 mint általános NE marker

Kutatásunk során a STX1 diagnosztikai alkalmazhatóságának felmérése céljából átfogó IHC vizsgálatnak vetettünk alá egy nagyobb, jó- és rosszindulatú tumorokat tartalmazó mintát. Eredményeink alapján a STX1 kiváló NE markernek bizonyult, melynek szenzitivitása NET-ek esetén 99%-os, NEC-ek esetén 100%-os volt, felülmúlva ezzel a diagnosztikában alkalmazott klasszikus molekulákat, mint a SYP (96% és 89%), a CHGA (93% és 91%) és a CD56 (70% és 91%). A különbség a gasztrointesztinális NET-ek és NEC-ek esetén statisztikailag is szignifikánsnak bizonyult. Mivel mind a tüdő, mint a gasztrointesztinális, mind a pancreas NET-ek és NEC-ek hasonló gyakorisággal voltak pozitívak és a környező nem daganatos NE sejtek is valamennyi szervben pozitívak voltak, úgy tűnik, hogy a STX1 kifejeződése független az anatómiai lokalizációtól. A STX1 következetes pozitivitást mutatott a diagnosztikai buktatókat jelentő, CHGA-val gyakran negatív rectalis és appendix L-sejtes NET-ekben is. A phaeochromocytomák és a paragangliomák szintén közel egyöntetűen pozitívak voltak. Emellett a STX1 kifejeződése az összes vizsgált NEC-ben is megfigyelhető volt a morfológiai altípustól és a lokalizációtól függetlenül, beleértve a kis- és nagysejtes NEC-eket, a bőr Merkel-sejtes carcinomáját és a medullaris pajzsmirigy carcinomákat is. A SYP-el és a CHGA-val esetenként tapasztalható halvány, pontszerű pozitivitással szemben a STX1-el az esetek nagy részében erőteljes membranosus és cytoplazmatikus pozitívítás volt észlelhető, amely egyértelműbbé tette a minták értékelését. Számos, CHGA-t vagy SYP-et expresszáló endokrin daganat (pl. a mellékpajzsmirigy és mellékvesekéreg tumorai) egyöntetűen negatívak voltak STX1-gyel, amely kiváló specificitásra utal. Szintén utóbbi mellett szól az is, hogy az általunk vizsgált számos egyéb nem-NE tumor, beleértve számos carcinoma típust is, szintén STX1-negatívnak bizonyult. Bár a neuronális tumorok STX1-pozitivitást mutattak, ezen entitások jellegzetes megjelenését is figyelembe véve az elkülönítésük nem jelent diagnosztikai problémát.

## 5.2. A STX1 és az INSM1 IHC kifejeződése tüdő NEN-ekben

A vizsgált anyagban 84/87 (96,5%) tüdő NEN-ben észleltünk STX1-pozitivitást, amely az esetek >90%-ában diffúz megjelenésű volt. Az INSM1 83/85 (97,6%) NEN-ben bizonyult pozitívnak. A tumorok differenciációjának foka befolyással lehet egyes IHC markerek jelölődésének kiterjedésére, eloszlására és celluláris lokalizációjára. Utóbbi jelenség gyakori a NEC-ekben, mivel az érett secretoros granulomok gyakran csökkent mennyiségben vannak bennük jelen, amely csupán fokális CHGA-expresszióban nyilvánul meg. Ennek ellenére diffúz STX1-pozitivitást találtunk a SCLC-k és az LCNEC-ek >90%-ában. Mindazonáltal, a 3 STX1-negatív eset mindegyike SCLC volt, és a jelölődés kiterjedése kisebb volt a NEC-ekben. Megjegyezzük, hogy a 3 STX1-negatív SCLC közül 2 esetében a diagnózis kizárólag a NE hisztomorfológián alapult. Az utóbbi 2 daganat negatívnak bizonyult a klasszikus NE markerekkel, azonban a daganatsejtek <5%-ában STX1-pozitivitás itt is megfigyelhető volt. Megengedőbb pozitívítási küszöbérték (pl. 1% vagy akár mekkora jelölődés) alkalmazásával ezek az esetek szintén pozitívak lettek volna. A 2 INSM1 negatív eset érdekes módon AC volt, ezzel szemben a SCLC-k és a LCNEC-ek kivétel nélkül pozitívnak bizonyultak.

A jelölődés mintázatának tekintetében erős membranosus STX1-pozitivitás volt jellemző a TC-kre, az AC-kre és a legtöbb LCNEC-re. Cytoplazmatikus jelölődést elsősorban a SCLC-kben és néhány LCNEC-ben figyeltünk meg. A fenti expressziós mintázat kialakulását magyarázó molekuláris eltérések NEC-ekben egyelőre nem tisztázottak. Mindazonáltal a high-grade tumorok genomjában felhalmozódott mutációk esetleg érinthetik a STX1 proteint kódoló gént is, ezáltal aberráns konformációjú vagy trunkált fehérje létrejöttéhez vezethetnek, amely nem képes felvenni a fiziológiás, membránhoz kötött pozícióját. A NE markerek összehasonlító vizsgálata során a jelölődés kiterjedése vonatkozásában a STX1 esetén figyeltük meg a legkisebb különbséget a carcionoidok és a NEC-ek között. A jelintenzitás tekintetében a legkisebb variabilitást az INSM1 mutatta.

Eredményeink alapján a STX1 szenzitivitása TC-k, AC-k és LCNEC-ek esetén 100%-os, az SCLC-k esetén pedig 90,0%-os volt. Mind a saját munkánk, mind az irodalmi adatok alapján megállapítható, hogy az összesített szenzitivitás tekintetében mind a STX1 (96,6%), mind az INSM1 (saját adat: 97,6%, irodalmi adat: 85,6%) felülmúlta a CHGA-t (saját: 89,3%, irodalmi adat: 75,1%), a SYP-et (saját adat: 89,3%, irodalmi adat: 86,6%) és a CD56-ot (saját adat: 95,2%, irodalmi adat: 92,7%) is.

A specificitás vizsgálata során más szerzők munkáival összehangban fokális INSM1-pozitivitást észleltünk az adenocarcinomák 10%-ában és a laphámcarcinomák 35%-ában. A

STX1 ellenes reakció egyöntetű negativitást mutatott mind a 20-20 fenti vizsgált daganatban. A TMA technika mellett további 8 adenocarcinomát és 5 laphámcarcinomát korábban teljes metszeten is megvizsgáltunk, ezek mindegyike szintén negatívnak bizonyultak. A STX1 specificitását összességében kiválóan találtuk (99,4%; 95% CI, 96-99), kis mértékben még az INSM1-ét (96,3%; 95% CI, 92-98) is meghaladta.

Összefoglalva mind a STX1, mind az INSM1 igen ígéretes, jó szenzitivitással és specificitással jellemezhető molekula, amelyek alkalmazása javasolható a mindennapi diagnosztikában. Az egyik nagy előnyük, hogy jó eséllyel immunreaktivitást mutatnak a klasszikus NE IHC markerekkel negatív SCLC-kben is. Mindazonáltal az eddigi tapasztalataink alapján a STX1 pozitívítás ezekben az esetekben csupán fokális. Az SCLC-k ezen alcsoportja, amely az SCLC-k közel 10%-át is kiteheti, potenciális diagnosztikus tévedés lehetőségét hordozza magában, emiatt a jövőben az ilyen fenotípusú tumorok nagyobb mintán végzett, további vizsgálata szükséges.

Véleményünk szerint mind a nuclearis INSM1 pozitívítás, mind a gyakran erős, membranosus STX1-mintázat egyértelműbben értékelhető, mint a cytoplazmában kifejeződő SYP és a CHGA. Az utóbbi markerekkel látható pozitívítás nehezebben különíthető el az aspecifikus háttérfestődéstől, különösen a gyenge, fokális immunoreaktivitást mutató esetekben. Részben a kis biopsziás anyagokban korlátozott mennyiségben rendelkezésre álló szövetminta, részben finanszírozási okok miatt a NE IHC reakciók panelje érdemben nem szélesíthető. Az eddigi adatok alapján egy STX1-et és INSM1-et kombináló IHC panel diagnosztikai teljesítőképessége felülmúlhatja a jelenlegi ajánlásokban javasolt CHGA, SYP és CD56 alkotta panelét. Mivel a STX1 és INSM1 reakciók jele különböző cellularis lokalizációban jelenik meg, azok kettős jelöléssel történő alkalmazása is kivitelezhető lehet, ezzel értékes biopsziás anyag takarítható meg esetleges további vizsgálatok céljára.

A vizsgálat korlátai között a viszonylag alacsony esetszám mellett a TMA módszer alkalmazását kell megemlítenünk. Emellett a retrospektív adatgyűjtés valószínűleg némi torzító hatással lehetett a beválogatott esetekre. Mivel ezeket a tumorokat szinte kivétel nélkül a klasszikus NE markerek jelenléte alapján diagnosztizálták, ez a CHGA-, SYP- és CD56-pozitív esetek túlréprezentáltságához, ezáltal a hozzájuk tartozó szenzitivitási szintek túlbecsléséhez vezethetett.

### 5.3. A STX1 és az INSM1 IHC kifejeződése emlőtumorokban

Kutatásunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a STX1 és az INSM1 alkalmazhatóságát NE vonásokat mutató emlőelváltozások diagnosztikájában, illetve teljesítményüket összehasonlítsuk a tradicionális NE markerekével (SYP, CHGA és CD56). A korábban már vizsgált STX1, 84,7%-os szenzitivitásával más szervekhez hasonlóan a NE jellegeket hordozó emlődaganatokban is megbízható markernek bizonyult. Továbbá az esetek 62,7%-ában diffúz, meggyőző pozitivitást mutatott. A cytoplazmatikus jelölődés mellett a vizsgált elváltozások nagy részében erős, könnyen értékelhető membranosus pozitívitás is megfigyelhető volt. Tapasztalataink alapján ez utóbbi mintázat, valamint az INSM1-gyel látható nuclearis jelölődés egyszerűbben felismerhető, mint a többi marker cytoplazmatikusan megjelenő festődése. Az eltérő szubcellularis kompartmentekben észlelhető STX-1 és INSM1 jel további előnye, hogy a korlátozott mennyiségben rendelkezésre álló biopsziás mintákon akár kettős IHC jelölés is végezhető. A magas szenzitivitás mellett a STX1-et kiváló specificitás (98,1%) is jellemezte, mivel egy kivételével a kontroll csoport összes mintájában negatív reakciót adott.

Az INSM1 szenzitivitása az LP vagy HP küszöbértéktől függetlenül egyaránt kiválóan bizonyult (89,8% és 86,4%); de hozzá kell tennünk, hogy a vizsgált elváltozások több mint felében csupán fokális pozitívitás volt látható. A kontroll csoportban elért eredmények ezzel szemben már nem voltak ilyen meggyőzőek. Ha a megengedőbb LP definíciót alkalmaztuk, a specificitás csupán 57,4%-os volt; azonban a HP definíció szerint értékelve 88,9%-ra emelkedett. Mivel az általunk vizsgált anyagban így 17, NE vonásokkal nem jellemezhető tumorban fejeződött ki, kétségek merülnek fel az INSM1 specificitását illetően. Ennek ellenére a kiváló szenzitivitása miatt az INSM1 specifikusabb markerekkel kombinációban történő alkalmazása igen hasznos lehet.

A legmagasabb szenzitivitási értéket a SYP (98,3%) mint klasszikus NE marker érte el, azonban a jelölődött sejtek százalékos arányának mediánja a STX1 esetén kissé magasabbnak bizonyult (STX1: 85% vs SYP: 80%). A további két klasszikus NE molekula, a CHGA és a CD56 szenzitivitása azonban meglepően alacsonynak bizonyult (CHGA: 74,6% és CD56: 22,4%). Utóbbi markerrel szerzett tapasztalatainkat egy másik, közelmúltbeli publikáció eredményei is megerősítik, emiatt megfontolandó lenne a CD56 helyének felülvizsgálata a rutinszerűen alkalmazott NE marker eszköztárban, legalábbis az emlőtumorok esetében.

A vizsgálat nyilvánvaló limitáló tényezője a retrospektív adatgyűjtés és a bevont esetek relatív kis száma, ami befolyásolhatta az eredményeket. Emellett magyarázatra szorul az a jelenség is, hogy a vizsgált tumorok egy része miért mutatott INSM1-pozitívítást (a HP kritérium mellett) a többi NE marker expressziója nélkül. Ez utóbbi anomália, amelyet már más

szervek is megfigyeltek, további kétségeket ébreszt az INSM1 specificitását illetően. Az izolált INSM1-pozitivitást a neurosecretoros apparatus egyéb kimutatható komponenseinek hiányában megmagyarázhatja a NE differenciáció magi szignáljának továbbítási zavara a transzkripciós faktortól, amelynek molekuláris háttere jelenleg még nem tisztázott. Ezen elmélet szerint az INSM1 expresszió a NE differenciáció szükséges, de önmagában nem elégséges feltételének tekinthető.

További limitáció, hogy a NE differenciáció az emlőtumorer jelentős részében csupán fokális. Az intratumoralis heterogenitás mellett ezek az elváltozások azonos diagnosztikai kategórián belül is igen változatos megjelenésűek. Ezen körülményeket figyelembe véve előfordulhat, hogy a TMA módszer alkalmazása a többszörös mintavétel ellenére egyes esetek álnegatív értékeléséhez vezetett. Mindazonáltal ugyanezek a korlátozó tényezők az emlő core biopsziák mindennapos leletezése során is fennállnak, és az IHC vizsgálatok ilyen körülmények mellett is mindennaposak; emiatt a TMA módszer alkalmazásával kapott adatokból valószínűleg következtetni lehet arra, hogy a vizsgált markerek hogyan teljesítenének a biopsziás mintákon. Összességében úgy gondoljuk, hogy a relatíve kis számú eset ellenére munkánk alkalmas volt arra, hogy a STX1-ről és az INSM1-ről megállapíthassuk, hogy mindkét molekula megbízhatóan használható az emlőelváltozások NE markereként még akkor is, ha a rendkívül ritka primer emlő NET-ek és NEC-ek tanulmányozására nem volt lehetőségünk.

## 6. Következtetések

Munkánk során bemutattuk, hogy a STX1 több szempontból is felülmúlja az általános NE IHC markereket. Mivel specificitása közel tökéletes, emellett szenzitivitása a normális NE sejtekben és a NEN-ekben (beleértve a NEC-eket is) egyaránt kiemelkedő, a STX1 tűnik a legelőnyösebben alkalmazható IHC markernek. Emiatt javasoljuk a kórszövettani diagnosztika NE IHC paneljének kiegészítését a STX1-gyel. Mivel az anatómiai lokalizációtól vagy az altípusoktól függetlenül következetesen expresszálódik az összes NEN-ben, ezen tumorok diagnosztikájában kevésbé jártas, nem szubspecializált patológusok kezében is megbízható eszköznek tartható, mivel a többi markerhez képest kevésbé jellemző rá az egyes specifikus lokalizációjú elváltozásokra jellegzetes diagnosztikus buktatók (pl. rectális NET csökkent CHGA expressziós mintázata).

Miután bizonyítottuk a STX1 alkalmazhatóságát általános NE markerként, további célzott vizsgálataink a tüdőben és az emlőben előforduló elváltozásokra irányultak. A STX1

mindkét területen meggyőző, könnyen értékelhető és megbízható NE differenciációt bizonyító markernek bizonyult, amelynek mind a szenzitivitása, mind a specificitása kiváló.

Összefoglalva, az INSM1-hez hasonlóan erősen ajánljuk a STX1 felvételét a NE differenciáció meghatározására használt rutin diagnosztikai IHC panelbe. További kutatásokat követően a STX1 és az INSM1 esetlegesen felválthatja a jelenleg elfogadott, CHGA-ból, SYP-ból és CD56-ból álló eszköztárat.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, **Dr. Kővári Bencének** a Szegedi Tudományegyetem Patológiai Intézetéből a munkám során nyújtott segítségéért és útmutatásáért.

Köszönettel tartozom **Prof. Iványi Bélának** és **Prof. Tiszlavicz Lászlónak**, a Szegedi Tudományegyetem Patológiai Intézete professzorainak, akik lehetővé tették, hogy Intézetükben tudományos munkát folytathassak.

Hálámat fejezem ki **Prof. Cserni Gábornak** a Bács-Kiskun Megyei Oktatókórház patológiai osztályáról hasznos észrevételeiért és tanácsaiért. Szintén köszönöm **Dr. Oláh-Németh Orsolyának** a Szegedi Tudományegyetem Patológiai Intézetéből, hogy több alkalommal segített visszanyerni a munkavégzéshez szükséges lendületet.

Külön köszönet illeti **Prof. Krenács Lászlót**, a szegedi Daganatpatológiai és Molekuláris Diagnosztikai Laboratórium vezetőjét, a syntaxin-1 mint új neuroendokrin marker gondolatának értelmi szerzőjét.

Hálás vagyok **Dr. Fekete Zoltánnak**, **Dr. Bordács Barbarának** és **Dr. Böcz Jánosnak**, korábbi TDK-hallgatóknak az adatok összegyűjtéséért.

Szintén hálával tartozom a Patológiai Intézet valamennyi munkatársának, elsősorban **Zombori Tamásnak**, **Daru Krisztiánnak**, **Balogh Beátának** és **Kun Tibornak**.

Külön köszönetet mondok **Dezső Mihálynak** az ábrák elkészítésében nyújtott segítségéért.

Nem utolsó sorban köszönet illeti a családomat és a barátaimat, különösen **Ficzere Ágnest** biztatásukért és támogatásukért

A munka az SZTE ÁOK Kari Kutatási Alap – Hetényi Géza pályázat támogatásával készült (grant szám: 5S582).