



A Ki-67 Proliferációs Index Meghatározásának Különböző Vonatkozásai Emlőrákban

Ph.D. Tézis

Dr. Vörös András

Témavezető:

Prof. Dr. Cserni Gábor D.Sc.

Szegedi Tudományegyetem

Pathologiai Intézet

Szeged

2014



AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

- I. **Vörös A**, Csörgő E, Nyári T, Cserni G.
An intra- and interobserver reproducibility analysis of the Ki-67 proliferation marker assessment on core biopsies of breast cancer patients and its potential clinical implications.
Pathobiology 2013; 80:111-8.
IF: 1.948
- II. **Vörös A**, Csörgő E, Kővári B, Lázár P, Kelemen Gy, Cserni G.
The use of digital images improves reproducibility of the Ki-67 labeling index as a proliferation marker in breast cancer.
Pathology & Oncology Research 2013 Nov 8. [Epub ahead of print]
IF: 1.555
- III. Cserni G, **Vörös A**, Liepniece-Karele I et al.
Distribution pattern of the Ki67 labeling index in breast cancer and its implications for choosing cut-off values.
The Breast 2014; 23:259-63.
IF: 1.967
- IV. **Vörös A**, Csörgő E, Kővári B, Lázár P, Kelemen Gy, Nyári T, Cserni G.
Different methods of pretreatment Ki-67 labeling index evaluation in core biopsies of breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy and their relation to response to therapy.
Pathology & Oncology Research 2014 May 25. [Epub ahead of print]
IF: 1.555

1. BEVEZETÉS

A proliferációs aktivitás fontos tulajdonsága különböző malignus daganatoknak, így az emlőrákoknak is. Számszerű meghatározására többféle módszer ismert, melyek közül irodalmi ajánlások a Ki-67 immunhisztokémiai reakciót javasolják, mivel viszonylag egyszerűen kivitelezhető, és széles körben hozzáférhető. A Ki-67 fehérje a sejtciklus valamennyi fázisában kifejeződik a G0 kivételével, ami alkalmassá teszi immunhisztokémiai detektálására. A proliferáló daganatsejtek pozitív reakciót mutatnak Ki-67 ellenanyaggal. A patológiai lelet a pozitív magreakciót mutató daganatsejtek mennyiségét tartalmazza százalékos megoszlásban kifejezve (Ki-67 proliferációs index).

Irodalmi adatok alapján, emlőrákok esetében, a magas Ki-67 proliferációs index rosszabb prognózisra utal a recidíva, az áttétképződés, a progresszió sebességének tekintetében. Ezek alapján a Ki-67 proliferációs index az emlőrákos betegek adjuváns kezelésének meghatározó prognosztikai faktora lett, amelynek különböző ún. "cut-off" értékeit említi az irodalom a kemoterápiás kezelésének indikációjában. A Ki-67 proliferációs index a prognosztikai jelentősége mellett a neoadjuváns kemoterápiára adott patológiai válaszreakció prediktív tényezője is lehet irodalmi adatok alapján, melyek szerint magas proliferációs aktivitás esetén nagyobb valószínűséggel következett be komplett patológiai tumor regresszió. A legújabb onkológiai ajánlások (St. Gallen International Breast Cancer Conference, 2013) a Ki-67 proliferációs index meghatározását a rutin diagnosztikai eljárások közé sorolják emlőrákok esetén, bár prediktív értéke neoadjuváns kemoterápia esetén nem teljes körűen bizonyított.

A fentebb említett klinikai szempontok alapján a proliferációs index reprodukálhatósága kiemelt fontosságú. A viszonylag szubjektív rutin diagnosztikai meghatározás várhatóan jelentős interobszerver eltérésekhez vezet. Egyes patológusok egyszerűen megbecsülik a pozitív sejtek százalékos arányát, mások precízebb számolós technikát alkalmaznak. A Ki-67 fehérje a sejtciklus során különböző mértékben fejeződik ki, ami az immunhisztokémiai reakció intenzitását is befolyásolva növeli az értékelés szubjektivitását. További tényezők is befolyásolhatják az értékelést, úgy mint a szöveti fixáció, különböző laboratóriumi eljárások, a tumorszövet jelentős heterogenitása a proliferációs aktivitás szempontjából. Míg a széli részeken fokozottabb aktivitás a jellemző, ezen területeken belül is változatos eloszlás lehetséges. Lehetnek olyan területek a tumor

különböző részein, ahol az átlaghoz képest is kifejezett pozitivitás látszik. Ezeket a részeket nevezzük ú.n. “hot spot”-nak. Nincs egyetértés azzal kapcsolatban, hogy a Ki-67 index meghatározásánál mely területeket vegyük figyelembe. Az interobszerver eltéréseket további emberi és technikai tényezők is növelhetik.

Jelen pillanatban nincsenek olyan standardizált metodikák, melyek kiküszöbölnék a fentebb említett befolyásoló tényezőket a Ki-67 festődés értékelésekor, habár előrelépések történtek ez irányban az elmúlt időszakban.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. Vizsgáljuk a Ki-67 proliferációs értékek reprodukálhatóságát az értékelő személyek és a különböző ellenanyagok szempontjából emlőrákos betegek core-biopsziás mintáin.

2.2. Egy standardizált, részben digitális számlálási módszert elemzünk a Ki-67 proliferációs index reprodukálhatóságának javítása céljából.

2.3. Vizsgáljuk a különböző patológiai intézményekben különböző patológusok által napi gyakorlatban alkalmazott eljárással meghatározott Ki-67 proliferációs értékek eloszlását többféle szempont alapján.

2.4. Különböző meghatározási módszereket hasonlítunk össze a neoadjuváns kemoterápiára adott válaszreakciók szempontjából. Arra keressük a választ, hogy létezik-e olyan meghatározási módszer az általunk vizsgáltak között, melyet leginkább javasolhatnánk alkalmazni a napi gyakorlatban. Megvizsgáljuk továbbá azt, hogy mi lehetne az a potenciális “cut-off” érték, amely leginkább elkülöníti a magas és alacsony proliferációt mutató emlőtumorokat neoadjuváns kemoterápiát megelőzően.

3. BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 A KI-67 PROLIFERÁCIÓS INDEX REPRODUKÁLHATÓSÁGI ÉS KORRELÁCIÓS VIZSGÁLATA ELLENANYAGOK ÉS VIZSGÁLÓ SZEMÉLYEK SZEMPONTJÁBÓL

Harminc emlőtumoros ($T2 \geq 3$ cm vagy $T3-4$ és/vagy $N1-2$ és $M0$) beteg kezelés előtti core-biopsziás mintáit vizsgáltuk retrospektív módon. Ezen betegcsoport docetaxel-epirubicin +/- capecitabine neoadjuváns kemoterápiában részesült. A mintákat 2003 jan. és 2011 dec. közötti időszakban vették az SZTE Radiológiai Klinikán, ill. a Bács-Kiskun Megyei Kórház radiológiai osztályán. A szövetszövetminták formalinos fixációját követően paraffinos beágyazás történt. Hematoxilin-eozin (HE) rutinfestés, valamint rutin immunohisztokémiai reakció történt ösztrogénreceptor (ER), progesteronreceptor (PR), HER-2 és topoizomeráz II-alfa ellenanyagokkal. Jelen kutatási célból a mintákat három különböző KI-67 ellenanyaggal is reagáltattuk: SP6, B56, MIB-1.

Valamennyi mintát három patológus értékelt egymástól függetlenül 400X nagyításon. A Ki-67 pozitív sejtek arányát 5%-os pontossággal határoztuk meg, így az értékek csak 5-re, vagy 0-ra végződhetnek. Minden vizsgáló a saját, napi rutin diagnosztikában használt módszerét alkalmazta. A meghatározást két hónappal később megismételtük. Ezt követően elsőként Spearman, ill. Pearson korrelációs vizsgálatokat végeztünk összevetve a két különböző időpontban végzett elemzést vizsgálópárokkal és ellenanyagpárokkal egyaránt. Az egyes vizsgálatok, ill. ellenanyagok KI-67 proliferációs értéket befolyásoló hatásának vizsgálatára két-szemponos ANOVA (ANOVA: analysis of variance, variancia analízis) elemzést is végeztünk. A statisztikai vizsgálatokra az SPSS 15.0 statisztikai software-t használtuk.

A Ki-67 proliferációs értékeket elsőként felosztottuk négy negyedre (0-25%, 26-50%, 51-75% és 76-100%) kategorikus elemzés céljából. Mivel korábbi ajánlás alapján 15% volt a "cut-off" érték az alacsony és 30% a magas proliferációs kategóriára, ezek alapján egy hármas felosztást is alkalmaztunk (0-15%, 16-30%, 31-100%). Interobszerver, valamint intraobszerver egyezéseket vizsgáltunk kappa statisztikával. Az interobszerver reprodukálhatóságot súlyozott kappa értékekkel is jellemeztük. A kappa értékek alapján minimális (0-0,2), gyenge (0,21-0,4), közepes (0,41-0,6), elfogadható (0,61-0,8) és kiváló

(>0,8) egyezésnek megfelelő eredményeket kaphattunk.

3.2 STANDARDIZÁLT, RÉSZLEGESEN DIGITALIZÁLT SZÁMLÁLÁSI MÓDSZER VIZSGÁLATA

A 3.1-es pontban ismertetett core-biopsziás mintákat használtuk. Valamennyi metszetről digitális mikroszkópos felvétel készült 200X nagyításon. Minden esetben a leginkább proliferáló terület került rögzítésre. Több fotó közül minden esetenél a legjobb került felhasználásra. A digitális képeket Microsoft PowerPoint file-ba helyeztük. Ezt követően ugyanazon a digitális felvételen négy különböző vizsgáló először becsléssel határozta meg a Ki-67 proliferációs értékeket 5%-os pontossággal, majd egy másik alkalommal speciális számlálós technikát alkalmaztunk. Ehhez minden egyes képre egy digitális rács került, mely a felvételeket egymástól azonos távolságra lévő területekre osztotta. A vizsgálók itt csak azokat a daganatsejteket vették figyelembe, melyeket a vonalak metszettek vagy érintettek. A vonalak lehetővé tették, hogy egy sejtet csak egyszer számoljunk meg. Mind a negatív, mind pedig a pozitív sejtek számát megadtuk és a kettő segítségével határoztuk meg a Ki-67 proliferációs indexet. A nem daganatos sejteket nem vettük figyelembe. Későbbi elemzésekben az itt kapott értékek kerekített értékeit használtuk fel. A meghatározáshoz szükséges időt mindkét módszernél rögzítettük. Ezután a becsült és számolt értékeket hasonlítottuk össze a különböző vizsgálók esetén (intraobszerver egyezés). Különböző vizsgálók értékeit is összevetettük egymással (interobszerver egyezés). A reprodukálhatóság vizsgálatára ismét kappa statisztikát alkalmaztunk a korábbihoz hasonlóan két különböző kategorizálással (3-as, 4-es felosztás). Spearman és Pearson féle korrelációs vizsgálatokat is végeztünk intra- és interobszerver összehasonlításra egyaránt.

3.3 KÜLÖNBÖZŐ PATOLÓGIAI INTÉZMÉNYEK BEN KÜLÖNBÖZŐ PATOLÓGUSOK ÁLTAL NAPI GYAKORLATBAN ALKALMAZOTT ELJÁRÁSSAL MEGHATÁROZOTT KI-67 PROLIFERÁCIÓS ÉRTÉKEK ELOSZLÁSÁNAK VIZSGÁLATA

A résztvevők lehetőség szerint 100 egymást követő emlőtumoros eset Ki-67 értékeit

juttatták el számunkra. Az esetekhez egyéb információkat is csatoltak (ER, PR és HER2 státusz, betegek kora, szövettani típus, szövettani grade, a grade mitotikus pontszám komponense, specimen típusa). Egy kérdőíven rögzítettük a festésekre, kiértékelésekre vonatkozó adatokat is. Egy második alkalommal azt is rögzítettük, hogy az egyes patológusok alkalmazzák-e az *“International Ki-67 in Breast Cancer Working Group”* ajánlásaiban foglaltakat. Az adatok 2012. december és 2013. március közötti időszakból származnak.

3.4 KÜLÖNBÖZŐ MEGHATÁROZÁSI MÓDSZEREK ÖSSZEHASONLÍTÁSA A NEOADJUVÁNS KEMOTERÁPIÁRA ADOTT VÁLASZREAKCIÓK SZEMPONTJÁBÓL

A 3.1-es és 3.2-es pontokban részletezett, neoadjuváns kemoterápiában részesült betegek emlő core-biopsziás mintáit vizsgáltuk.

A terápiás válaszreakció szempontjából három kategóriát határoztunk meg: regresszió hiánya, részleges regresszió, komplett patológiai regresszió a *European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis*-ban foglaltak szerint. Mindhárom csoport 10 különböző esetet tartalmazott.

A korábbi három meghatározási módszert (számolás metszeten – 1-es módszer; számlálás digitális képen – 2-es módszer, becslés digitális képen – 3-as módszer) egy negyedik módszerrel egészítettük ki, ahol a metszeten becsültük meg a proliferációs indexet rövid átnézés után – 4-es módszer. A klinikai kimenettel való összevetés során valamennyi kategória 10 egymást követő értékeinek átlagait vettük alapul valamennyi vizsgáló, ellenanyag, illetve módszer esetén. Kruskal-Wallis tesztet és variancia analízist (egyszempontos és két-szempontos ANOVA) alkalmaztunk a Ki-67 értékek és a különböző klinikai kimenetek összevetésére. ROC görbe analízissel határoztuk meg a Ki-67 értékek eloszlását a komplett patológiai regressziót és a nem komplett regressziót (parciális regresszió, regresszió hiánya) mutató esetek között. Az ER státusz és a terápiás kimenetel közötti lehetséges összefüggést (figyelmen kívül hagyva a részleges regressziót mutató eseteket) Fisherféle egzakt teszttel vizsgáltuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1 A KI-67 PROLIFERÁCIÓS INDEX REPRODUKÁLHATÓSÁGI ÉS KORRELÁCIÓS VIZSGÁLATA ELLENANYAGOK ÉS VIZSGÁLÓ SZEMÉLYEK SZEMPONTJÁBÓL

Harminc emlőkarcinómát tartalmazó core-biopsziás mintát vizsgáltunk. A 3 független patológus összesen 270 kiértékelést végzett (CSG, VA, CSE), és ezt egy második alkalommal megismételtük (540 meghatározás).

Spearman korrelációs vizsgálatot alkalmaztunk a különböző vizsgáló személyek és ellenanyagok összehasonlítására (vizsgálópárok, illetve ellenanyagpárok szerint). Valamennyi vizsgálatot elvégeztük az első és a második alkalom esetén külön-külön (3 vizsgáló 3 ellenanyaggal, 9 értékelés), illetve összevonva is (3vizsgáló 3 ellenanyaggal, 2 alkalommal, összesen 18 értékelés). Az összevont (18 értékelés) interobszerver összehasonlítás (vizsgálópárok) alapján jó, illetve kiváló korrelációs eredményeket kaptunk (koefficiens értékek 0,74 és 0,91 között, $p < 0,0001$). Az ellenanyagokat illető korrelációs értékek (ellenanyagpárok) 0,8 és 0,92 között mozogtak ($p < 0,0001$), ami kiváló korrelációt sugallt az ellenanyagok tekintetében. Pearson korrelációt is végezve, a vizsgálókat összevetve 0,73 és 0,91 ($p < 0,0001$.) közötti értékeket kaptunk, az ellenanyagokat illetően pedig 0,79 és 0,93 ($p < 0,0001$) közötti értékeket, ami hasonlóképpen jó korrelációra utal. A 30 minta mind a 18 kiértékelésének többségét figyelembe véve (3 vizsgáló, 3 ellenanyag, két alkalommal), az esetekhez tartozó értékek eloszlása a következő volt: 1. negyed (0-25% Ki-67 index) – 5 eset; 2. negyed (26-50%) – 12 eset; 3. negyed (51-75%) – 6 eset; 4. negyed (76-100%) – 7 eset. Csupán 2 tumor esetén fordult elő, hogy valamennyi értékelés alapján ugyanabba a negyedbe került: egyik a legalacsonyabb, másik pedig a legmagasabb proliferációs csoportban. A háromkategóriás felosztás során többségi vélemény szerint 3 eset került a 0-15%-os Ki-67 proliferációs index csoportjába, 4 eset a 16-30%-os csoportba és 23 eset a 30% feletti csoportba. Tíz tumor esetén fordult elő 100%-os egyezés az értékeléseket illetően, ezek mindegyike a harmadik, magas proliferációs csoporthoz tartozott.

A négykategóriás felosztás során végzett kappa statisztikai vizsgálatok alapján közepes, illetve elfogadható reprodukálhatóságot mutató értékeket kaptunk a legalacsonyabb és a legmagasabb Ki-67 proliferációs indexet mutató csoportot illetően, azonban a középső két

csoport esetén minimális vagy gyenge reprodukálhatóság mutatkozott.

Az egyesített kappa érték gyenge reprodukálhatóságot mutatott mind a vizsgáló személyek, mind pedig az ellenanyagok szempontjából. Ugyanezt elvégezve a két értékelést összevonva (18 kiértékelés esetenként), hasonló eredményt kaptunk (kappa értékek: 0,3 – 0,44). A súlyozott kappa értékek valamivel jobb interoszerver eredményeket mutattak (0,43-0,75), ami közepes, vagy elfogadható reprodukálhatóságnak felel meg. A háromkategóriás felosztás során (15%, ill. 30% “cut-off” értékek alapján) a magas proliferációs csoportban közepes/elfogadható, a közepes és az alacsony proliferációs csoportban csak gyenge reprodukálhatóságot tudunk megállapítani (kappa értékek: 0,37 – 0,52). A súlyozott kappa értékek itt 0,3 és 0,78 között mozogtak gyengétől elfogadhatóig terjedő reprodukálhatóságot tükrözve. A súlyozott kappa értékek enyhén jobb reprodukálhatóságot mutattak.

Az intraoszerver reprodukálhatóságot vizsgálva az alacsony és a magas proliferációs csoportba tartozó tumorok esetén jobb, a középső csoportokba tartozók (26-75% vagy 16-30%) esetén rosszabb reprodukálhatóságot láttunk mindkét kategorizálás során. Az egyes vizsgálók eltérő reprodukálhatóságot mutattak (kappa: 0,26 -0,42, illetve 0,36 – 0,61).

Ennek megfelelően a két-szemponos ANOVA vizsgálat azt mutatta, hogy 2-es számú vizsgáló szignifikánsan alacsonyabb értékeket határozott meg, mint a másik két értékelő. ($p=0,004$ az első értékelés esetén, $p=0,008$ a második értékelés esetén). Az ANOVA vizsgálat azt is kimutatta, hogy az SP6 ellenanyaghoz szintén szignifikánsan alacsonyabb átlagos Ki-67 értékek tartoztak (SP6:45.2 %, B56:52.3% és MIB-1:55.7%; $p=0,017$ az első, $p=0,01$ a második értékelés esetén).

Azt is megnéztük, hogy az egyes vizsgálók milyen módszerrel végezték az értékelést. Valamennyi vizsgáló a legintenzívebb területen számolta a pozitív sejtek arányát, továbbá a nagyon halványan festődő sejtmagokat figyelmen kívül hagyta. Minden vizsgáló megbecsült egy területet, ami hozzávetőleg 100 tumorsejtet tartalmazott, azonban ezt eltérő módon tették. Mindez alapján a módszerek bizonyos szempontok alapján összevethetőek egymással, de a számolást illetően eltértek egymástól. Valamennyi módszer 100 tumorsejtet tartalmazó terület pozitív sejteinek %-os értékét határozta meg valamelyik legaktívabban festődő régióban. Egyik esetben sem fordult elő 1000 sejt megszámlálása ellentétben a nemzetközi ajánlásokkal.

4.2 STANDARDIZÁLT, RÉSZLEGESEN DIGITALIZÁLT SZÁMLÁLÁSI MÓDSZER VIZSGÁLATA

A 3.1-es és a 4.1-es pontokban leírt core-biopsziás mintákat vizsgáltuk. Négy független, emlőpatológiában jártasságot szerzett patológus (CSG, VA, CSE, KB) összesen 720 értékelést végzett.

Pearson és Spearman korrelációs analízisekkel jó, ill. kiváló egyezéseket tapasztaltunk a becült és a számolt értékeket összehasonlítva valamennyi vizsgáló esetén (intraobszerver egyezés). A korrelációs együtthatók Pearson analízis esetén 0,899 és 0,920 között, Spearman analízis esetén 0,886 és 0,925 között alakultak.

Interobszerver vizsgálatot is végeztünk hasonlóképpen Pearson és Spearman szerint, ami alapján a becült és a számolt értékek esetén egyaránt kiváló korrelációt tapasztaltunk. Becült értékek esetén a Pearson együttható 0,909 és 0,964 között, a Spearman együttható 0,916 és 0,956 között alakult. Ugyanezek a számolt értékek esetén 0,954 és 0,979 között, illetve 0,951 és 0,977 között helyezkedtek el.

Hasonló korrelációs vizsgálatokat végeztünk a különböző ellenanyagok összehasonlítására. A becült és számolt értékek ellenanyagonkénti összehasonlítása során (ellenanyagonkénti intraobszerver vizsgálat) a négy vizsgáló esetén kapott értékeket minden ellenanyagnál átlagoltuk. Az SP6 ellenanyag esetén a Pearson és Spearman korrelációs értékek átlagai \pm SE a becslés esetén $0,855\pm 0,044$, illetve $0,857\pm 0,035$, a B56 esetén $0,922\pm 0,004$ and $0,926\pm 0,008$, a MIB-1 esetén $0,904\pm 0,012$ és $0,879\pm 0,026$ voltak. Az eredmények alapján úgy tűnik, hogy az SP6 ellenanyag valamivel gyengébb intraobszerver korrelációt eredményezett, mint a másik kettő.

Ellenanyag szerinti interobszerver vizsgálatok alapján (ellenanyagonkénti vizsgálópárok, 6 vizsgálópár), a számolt értékeket elemezve, SP6 esetén az átlag \pm SE korrelációs érték $0,871\pm 0,044$ és $0,881\pm 0,039$ volt Pearson, illetve Spearman szerint, míg B56 esetén $0,967\pm 0,005$ és $0,947\pm 0,005$, MIB-1 esetén $0,957\pm 0,006$ és $0,960\pm 0,006$ voltak ezek az együtthatók. A becült Ki-67 értékeket vizsgálva a Spearman és a Pearson együtthatók átlaga \pm SE SP6 esetén $0,942\pm 0,008$ és $0,943\pm 0,009$, B56 esetén $0,947\pm 0,008$ és $0,962\pm 0,006$, MIB-1 esetén $0,926\pm 0,012$ és $0,896\pm 0,013$ volt. Az eredmények azt mutatják, hogy az SP6 ellenanyag enyhén gyengébb korrelációval jár interobszerver vizsgálat során is, bár ez esetben csak a számolt értékek összehasonlításánál. A MIB-1 ellenanyag a becült értékek esetében itt

kissé gyengébbnek bizonyult. Kappa statisztikával a becült értékek esetén mind a négy-, mind pedig a háromkategóriás felosztás alapján csak elfogadható reprodukálhatóságra utaló eredményeket kaptunk (kappa: 0,68, ill. 0,65). A számlálás esetén a kappa értékek 0,67 illetve 0,73 voltak, szintén elfogadható reprodukálhatóságra utalva.

Az ellenanyagokat egyenként vizsgálva, becslésnél, négykategóriás felosztásnál a kappa értékek 0,65; 0,69 és 0,64 voltak a MIB-1, B56 és az SP6 esetén. Háromkategóriás felosztásnál a kappa értékek 0,59; 0,69 és 0,67 voltak. Számlálás esetén a négykategóriás felosztásnál a kappa értékek 0,66; 0,71 és 0,65, a háromkategóriás felosztásnál 0,90; 0,60 és 0,69 voltak. Ezen kappa értékek többsége elfogadható kategóriába tartozik. Két esetben közepes reprodukálhatóságot, egynél pedig jó reprodukálhatóságot kaptunk.

Az egyes esetek kiértékeléséhez szükséges időtartamot is rögzítettük. Becslés esetén ez az időtartam átlagosan 18 és 50 másodperc között mozgott, számolás esetén 90 és 180 másodperc között.

4.3 KÜLÖNBÖZŐ PATOLÓGIAI INTÉZMÉNYEKBE KÜLÖNBÖZŐ PATOLÓGUSOK ÁLTAL NAPI GYAKORLATBAN ALKALMAZOTT ELJÁRÁSSAL MEGHATÁROZOTT KI-67 PROLIFERÁCIÓS ÉRTÉKEK ELOSZLÁSÁNAK VIZSGÁLATA

Összesen 19, a “European Working Group for Breast Screening Pathology”-hoz kapcsolódó intézmény vett részt az elemzésben. Összesen 1782 esetet vizsgáltunk, melyekből később 73 kizárással került kategorikus Ki-67 proliferációs index besorolás miatt. A Ki-67 immunhisztokémiai reakció 15 intézményben automatizáltan történt az esetek többségében MIB-1 savóval (n=14). A hígítás 1:20 és 1:500 között mozgott. Tizenegy centrumban a patológusok számolással határozták meg a Ki-67 értéket (1009 tumor), 8 helyen (773 tumor) becslés történt. Néhány esetben alkalmaztak kerekített értékeket (873 tumor), 909 esetben nem történt kerekítés. Öt patológus 100 tumorsejten határozta meg a pozitivitást, három 200 sejten, egy 300 sejten, egy 500 sejten és egy 1000 sejten. Tizennyolc esetben történt “hot spot” meghatározás, ahol az értékelés történt. Az “International Ki-67 in Breast Cancer Working Group” ajánlásait 16 helyen ismerték, de csak kevés helyen alkalmazták. A vizsgált 1709 emlőrákos esethez tartozó medián Ki-67 proliferációs index 17% volt $23,4 \pm 21\%$

átlag \pm SD értékkel (0%-tól 100%-ig terjedő intervallumban). Négy, illetve három kategóriába felosztva az értékeket az átlag \pm SD Ki-67 proliferációs értékek (%) az egyes negyedek esetén 4,2 \pm 2,1; 12,4 \pm 2,4; 23,5 \pm 4,2; 53,6 \pm 18,5, a harmadok esetén 5,6 \pm 3,1; 17,4 \pm 4,3; 47,3 \pm 19,4 voltak. Két félre bontva az összes tumort, az átlag \pm SD értékek az alacsonyabb proliferációt mutató dagantok esetén 8,3 \pm 4,7%, a magasabb proliferációt mutatók esetén 38,6 \pm 20,1% volt. A Ki-67 proliferációs indexek magasabbak voltak azokban az esetekben, ahol a mitózisszámnak megfelelő grade pontszám is magasabb volt. A grade pontoknak megfelelő Ki-67 index eloszlása a következő volt a medián és az átlag \pm SD értékek szerint: 1 pont: 10 és 13 \pm 12; 2 pont: 23 és 27 \pm 18; 3 pont: 45 és 48 \pm 24. A KI-67 értékek jellemzően 0-ra, vagy 5-re végződtek. 1084 esetben (63%) végződtek 0-ra vagy 5-re és 653 esetben 0-ra (38%). 600 db. nem kerekített, számoláson alapuló értéket vizsgálva hasonló preferenciális eloszlást láttunk: 199 eset (33%, a véletlenszerű 20%-kal szemben), illetve 119 eset (20%, a véletlenszerű 10%-kal szemben).

Mivel a Ki-67 proliferációs index gyakran az ER pozitív, HER-2 negatív emlőtumrok esetén rendelkezik nagyobb terápiás konzekvenciával, ezeket az eseteket is külön megvizsgáltuk. A medián Ki-67 index 14% volt (átlag \pm SD: 17 \pm 15) a kérdéses 1248 esetben.

4.4 KÜLÖNBÖZŐ MEGHATÁROZÁSI MÓDSZEREK ÖSSZEHASONLÍTÁSA A NEOADJUVÁNS KEMOTERÁPIÁRA ADOTT VÁLASZREAKCIÓK SZEMPONTJÁBÓL

Összesen 1350 kiértékelést elemeztünk. Az összesített átlag Ki-67 proliferációs index (valamennyi módszert, vizsgálat, ellenanyagot belefoglalva) 54,22 (95% CI: 53,13-55,31) volt.

A statisztikai eredmények alapján az átlagos Ki-67 proliferációs értékek szignifikáns eltéréseket mutatnak a különböző regressziós csoportokat összehasonlítva: a regressziót nem mutató csoportban az értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a komplett regressziót mutató csoport értékeinél ($p < 0,0001$). Az átlagos Ki-67 proliferációs értékek a következőképpen alakultak a komplett, a parciális regressziót mutató és a regressziót nem mutató csoportok esetén: 66,61 (95% CI: 64,71-68,50), 51,32 (95% CI: 49,43-53,21), illetve 44,72 (95% CI: 42,83-46,62).

A kéttényezős variancia analízis alapján az értékelési metódusok és a regressziós

kategóriák szignifikáns különbségeket mutattak a Ki-67 proliferációs index szempontjából. Az átlagos Ki-67 érték az 1-es módszer (számlálás metszeten) esetén volt a legalacsonyabb, és a 3-asban (digitális becslés) a legmagasabb. Az átlag Ki-67 értékek 46,63 (95% CI: 44,21-49,05); 54,62 (95% CI: 52,52-56,72); 61,59 (95% CI: 59,49-63,69) és 54,04 (95% CI: 51,94-56,17) voltak a négy metódus esetén.

A klinikai válaszreakciót figyelembe véve hasonló eredményeket kaptunk. Az 1-es metódushoz tartozó átlagos Ki-67 index 58,72 (95% CI: 54,53-62,92), 46,39 (95% CI: 42,19-50,59) és 34,78 (95% CI: 30,58-38,98) volt a komplett regressziót, a parciális regressziót mutató, illetve a regressziót nem mutató tumorok esetén. Az átlagos Ki-67 index megoszlása ugyanezen csoportokban a 3-as metódus esetén 77,18 (95% CI: 73,54-80,18), 56,59 (95% CI: 52,95-60,13), illetve 51,00 (95% CI: 47,37-54,64) volt.

A komplett regressziót mutató és a regressziót nem mutató esetekhez tartozó átlagos Ki-67 indexek összehasonlítására ROC görbe analízist végeztünk (a parciális regressziót mutató eseteket figyelmen kívül hagyva). A görbe alatti terület (AUC) értéke 0,969 volt. A komplett regressziót mutató esetekhez tartozó értékeket összehasonlítva a parciális regressziót mutató és a regressziót nem mutató esetekhez együttesen tartozó értékekkel az AUC értéke 0,93 volt.

A tájékozódásként ez alapján meghatározott optimális, komplett regresszióra nézve prediktív “cut-off” érték 56% körüli lenne (szenzitivitás: 0,89; specificitás: 0,81).

A Fisher féle egzakt próba alapján a komplett regressziót mutató esetek nagyobb gyakorisággal mutattak ER negatív fenotípust immunhisztokémiával ($p=0,024$).

5. MEGBESZÉLÉS

A Ki-67 proliferációs index az emlőrákok jelentős prognosztikai faktora, továbbá leginkább alkalmas a magas és alacsony proliferációs aktivitást mutató tumorok elkülönítésére, ezért megfelelő reprodukálhatósága kiemelt fontosságú. Eredményeink alapján interobszerver reprodukálhatósága gyenge a mindennapi rutin diagnosztikában, bár a korrelációs vizsgálatok jó vagy kiváló értékeket mutattak. Ezek az eredmények valamelyest kétségessé teszik a Ki-67 marker alkalmazásának jelenlegi módját. Vizsgálatunk azt is sugallja, hogy az emlőtumorok magas és alacsony proliferációs kategóriába való besorolása valamivel jobb, mint a közepes kategóriába való besorolás. Ez érvényes a négyes és a hármas kategorizálás esetén egyaránt. Ez azt is jelenti, hogy a klinikai szempontból fontosabb kategóriák elkülönítése jobban reprodukálható. Mindez hozzávetőleg elmondható az intraobszerver reprodukálhatóságról is. Itt az eredményeket az egyes vizsgálók meghatározási módszereinek különbsége is befolyásolta.

A vizsgált ellenanyagok közül az SP6 szignifikánsan alacsonyabb Ki-67 indexekkel járt együtt, azonban a reprodukálhatóságot nem befolyásolta. Összességében azonban mindhárom ellenanyag esetén enyhe vagy közepes reprodukálhatóságot tapasztaltunk.

Habár a 2009-es és 2011-es St. Gallen konszenzus konferenciákon, valamint az “International Ki-67 in Breast Cancer Working Group” részéről is konkrét ajánlások fogalmazódtak meg a Ki-67 proliferációs index meghatározását illetően (pl. 1000 tumorsejt megszámlálása), mindezek alkalmazhatósága kérdéses a mindennapi gyakorlatban. Amint azt mostani vizsgálatunkban is tapasztaltuk, különböző laboratóriumok között is előfordulnak metodikai eltérések. A patológusok általában a legkevésbé időigényes módszereket preferálják. A tézis 3-as pontjában leírtak alapján látható, hogy a különböző európai intézetekben leginkább 100 tumorsejt megszámlálását alkalmazzák szemben a fentebb említett ajánlásokkal, és többen csak megbecsülték a festődő sejtek arányát. Az időhiány fontos tényező, és befolyásolja az alkalmazott metodikát.

Az általunk bemutatott digitális módszer, mely során digitális rácsvonalak segítségével lehetővé válik, hogy minden vizsgáló ugyanazokat a sejteket vegye figyelembe ugyanazon területén a tumornak, jelentősen megnövelte a reprodukálhatóságot, de az így sem lett tökéletes. A módszer hátránya, hogy valamennyi idővesztést jelent a digitális képek elkészítése és a rácsvonalak ráhelyezése. Az értékelés 2-3 percet vett igénybe ennél a

módszernél szemben a becslés 1 perc alatti időigényével. Érdekes, hogy a becslés és számolás reprodukálhatósága között nem volt lényeges különbség. Eredményeink mind a becslés, mind pedig a számlálás esetén jó, illetve kiváló reprodukálhatósági értékeket mutattak. A becslés természetesen lényegesen kevesebb időt vett igénybe.

Fontos hangsúlyozni, hogy vizsgálatainkat core-biopsziás mintákon végeztük. Ezek a minták sokszor nem tartalmazzak 1000 megszámlálható tumorsejtet és gyakran képezi nagyobb részüket nem daganatos szövetrészlet. A Ki-67 proliferációs indexet ezekben a kis mintákban kevésbé befolyásolják olyan tényezők, mint fixáció, tumor heterogenitás, eltérés a festési intenzitásokban, ami növelheti a reprodukálhatóságot, bár egy kis szövetminta nem biztos, hogy kellő mértékben reprezentatív.

A reprodukálhatósági vizsgálatok mellett informatívnak tartottuk a különböző intézetekben meghatározott Ki-67 értékek eloszlásának vizsgálatát is. Az adatok azt mutatták, hogy a Ki-67 indexek az alacsonyabb régióban csoportosulnak (17%-os medián érték az összes tumor esetén, 14% medián az ER pozitív, HER2 negatív tumorok esetén), ami tumorbiológiai okokra vezethető vissza. Emberi befolyásoló hatásnak tartható az, hogy az értékek gyakrabban végződtek 5-re, vagy 0-ra, mint azt a véletlenszerűség eredményezte volna. A korábban említett számos befolyásoló faktor közül, vélhetően az emberi tényezők azok, amelyek leginkább befolyásolhatják a Ki-67 proliferációs indexet. Mivel valamennyire eltérők az egyes értékelési módszerek, valamint az interobszerver reprodukálhatóság az optimálisnál gyengébbnek bizonyult, nem meglepő, hogy a javasolt "cut-off" értékek is változatosak. Mindegyik "cut-off" érték jellemzője, hogy elkülöníti a magas és alacsony proliferációjú tumorokat, azonban ezeknek az értékeknek a generalizálása esetenként téves besoroláshoz vezetne, amint ez irodalmi adatokban is látható. Publikált közlemény eredményei alapján a Ki-67 index reprodukálhatósága nem rosszabb, ha a meghatározás becsléssel történik és nem aprólékos számoláson alapul. Ezt is figyelembe véve a magas és alacsony proliferációjú tumorok szétválasztására használt 0-ra vagy 5-re végződő "cut-off" értékek (5, 10, 15, 20% stb.) jóval reálisabbnak tűnnek. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy néhány a "cut-off" értékre vonatkozó ajánlás nem tűnik reálisnak (pl. egy korábbi St. Gallen konszenzus konferencián elfogadott 14%-os érték, ami publikációnkkal egy időben, a 2013-as konszenzus során 20%-ra változott).

Amint korábban említettük, a Ki-67 index prognosztikai jelentőséggel rendelkezik és indikálhat neoadjuváns kemoterápiát is bizonyos esetekben. A cytotoxikus terápia proliferáló

daganatsejtekre fejt ki hatását, tehát magas proliferációs aktivitás esetén várhatóan nagyobb mértékű tumorregresszió következik be. Ezt több irodalmi adat is alátámasztja. Ezzel ellentétben olyan irodalmi adat is létezik, amely ezt kevésbé látja bizonyítottnak. A mi eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy magas proliferációs aktivitás szignifikánsan nagyobb arányban járt együtt komplett patológiai regresszióval függetlenül a vizsgáló személyétől, a módszertől, vagy az ellenanyag típusától. Az adatokat részletesen megvizsgálva, az egyes eseteket külön elemezve kitűnik azonban, hogy önmagában a Ki-67 index nem lehet prediktív tényező a komplett patológiai regressziót illetően. Teljes biztonsággal annyit tudunk megállapítani, hogy magas proliferációs aktivitáshoz nagyobb eséllyel társul komplett patológiai regresszió.

A különböző értékelési módszerek reprodukálhatóságát vizsgálva kimutattuk, hogy a digitális módszer jelentősen megnövelte a reprodukálhatóság mértékét. Azt is igazoltuk, hogy a digitális esetben alkalmazott becslés nem járt rosszabb reprodukálhatósággal a digitális számlálásos technikához képest. Ez az eredményünk azt sugallja, hogy a becslésen alapuló módszer is megfelelő diagnosztikus értékkel rendelkezik, és a napi rutinban könnyebben és gyorsabban megvalósítható.

Az egyes módszereket összehasonlítva, amellett, hogy mindegyik esetben elmondható volt, hogy nagyobb proliferációs aktivitáshoz gyakrabban társult komplett patológiai regresszió, azt is láttuk, hogy a különböző módszerek, vizsgáló személyek, ellenanyagok esetén más-más optimális “cut-off” érték rajzolódik ki. Ezeket összesítve az ROC görbe alapján az általunk vizsgált eseteket tekintve az optimális “cut-off” érték 55%, bár a különböző intézetek közötti Ki-67 index eloszlását vizsgálva az esetek kisebb része esik ebbe a kategóriába, mivel a medián Ki-67 index érték 17% volt. Ez alapján az általunk vizsgált kisebb betegcsoport a kiterjesztett betegcsoporton belül a magasabb kategóriába esik, ami alapján elképzelhető, hogy ebből a szempontból az általunk vizsgált csoport nem kellően reprezentatív. Az eltérést az is magyarázhatja, hogy az általunk meghatározott értékek a legmagasabb proliferációs tumor régiók vizsgálatán alapultak.

A statisztikai eredményeink alapján nem lehet egyértelműen meghatározni, hogy a vizsgált módszerek közül melyik a legalkalmasabb módszer, annak ellenére, hogy az egyik bizonyos szempontokból jobb eredményeket mutatott. Annyi bizonyos, hogy a digitális becslésen alapuló módszer elfogadható reprodukálhatóságot mutatott, gyors és egyszerűen kivitelezhető, valamint legjobban elkülöníti a regressziót mutató és regressziót nem mutató

tumorokat.

A terápiára adott válaszreakció nyilvánvalóan több tényezőn alapul, melyek közül a proliferáció mértéke csupán az egyik. A hormonreceptor státusz szintén ilyen tényező lehet irodalmi adatok alapján. Eredményeink szerint ER negatív tumorok gyakrabban mutattak komplett patológiai regressziót.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

6.1 Eredményeink alapján a Ki-67 proliferációs index reprodukálhatósága az optimálisnál gyengébb core-biopsziás minták esetén. A klinikailag jelentősebb magas proliferációs kategóriák (15% felett, vagy 25% felett, vagy 30% felett) esetén a reprodukálhatóság valamivel jobbnak bizonyult. Az ellenanyag típusa a reprodukálhatóságot számottevően nem befolyásolta.

6.2 A Ki-67 index jelenlegi inkonzisztens meghatározása a különböző intézetekben nem tesz lehetővé hiba nélküli terápiás döntéseket igen vagy nem alapon. Eredményeink alapján a különböző vizsgálók hasonló, de enyhén eltérő individuális értékelési módszere befolyásolja a reprodukálhatóságot, így mindenképp szükségesnek tartanánk egy egységesített, könnyen kivitelezhető módszer bevezetését.

6.3 Egy egyszerű digitális módszer: mikroszkópos felvételek készítése ráhelyezett digitális rácsvonalakkal lehetővé teszi, hogy különböző vizsgálók ugyanazt a területet megítélve ugyanazon daganatsejteket vegyék figyelembe a Ki-67 index meghatározásánál. Ez jelentősen növelheti a reprodukálhatóságot. Ennek megfelelően kimutattuk, hogy ezzel a módszerrel számolva a pozitív daganatsejtek mennyiségét sokkal jobb reprodukálhatóságot eredményez, mint amit metszeten való számlálás során tapasztaltunk.

6.4 A digitális képeken alkalmazott becslés nem csak gyorsabbnak bizonyult, hanem hasonlóképpen jó reprodukálhatóságot mutatott. A digitálisan számolt és becsült értékek jól korreláltak egymással. Ez alapján, bár nem objektív számokon alapul, a becslés elfogadható módszernek tekinthető a Ki-67 index meghatározására.

6.5 Nagyszámú meghatározott Ki-67 index numerikus eloszlását alapul véve néhány korábban javasolt "cut-off" érték nem tartható reálisnak, sokkal célszerűbbnek tartjuk 0-ra, vagy 5-re végződő értékek bevezetését.

6.6 Azok a tumorok, melyekhez magasabb Ki-67 proliferációs index tartozott, szignifikánsan nagyobb gyakorisággal mutattak komplett patológiai regressziót neoadjuváns kemoterápiát követően. Ez elmondható mindhárom ellenanyag, mind a négy vizsgáló, továbbá minden vizsgált értékelési módszer esetén. Ez alapján a legegyszerűbb, becslésen alapuló módszer is éppolyan jó alternatíva az időigényes számlálási módszerrel szemben. A magas

Ki-67 index és a komplett regresszió közötti összefüggés ellenére a Ki-67 index nem tekinthető önálló prediktív tényezőnek, mivel más faktorok (pl. ER státusz) szintén befolyásolják a terápiára adott válaszreakciót.

6.7 Komplex vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy a különböző értékelési módszerek más-más “cut-off” értéket igényelhetnek az alacsony és magas proliferációjú és a neoadjuváns kezelésre várhatóan jobban vagy kevésbé reagáló tumorok elkülönítésére. Eredményeink nem teszik lehetővé azt, hogy konkrét “cut-off” értékeket javasoljunk, mivel ilyen jellegű következtetéshez valószínűleg nagyobb esetszám lenne szükséges.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A tudományos munkát a **TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0** támogatta.

Köszönetemet fejezem ki elsősorban témavezetőmnek, **Prof. Dr. Cserni Gábornak**, a Bács-Kiskun Megyei Kórház Patológiai Osztály vezetőjének, a Szegedi Tudományegyetem Pathológiai Intézet társprofesszorának, aki szakmai és személyes támogatásával mindvégig segítette tudományos munkámat.

Köszönöm **Prof. Dr. Iványi Bélának** és **Prof. Dr. Mikó Tivadarnak** a Szegedi Tudományegyetem Pathológiai Intézetének jelenlegi és korábbi vezetőjének, hogy kiváló lehetőséget biztosítottak számomra a tudományos tevékenység végzéséhez, ebben mindvégig támogattak.

Köszönet illeti **Dr. Pálka Istvánt**, akinek szakmai irányítása alatt kezdetem el emlőpatológiával foglalkozni.

Köszönettel tartozom a szegedi emlő munkacsoport jelenlegi és korábbi tagjainak: **Prof. Dr. Kahán Zsuzsanna, Prof. Dr. Lázár György, Prof. Dr. Cserni Gábor, Dr. Paszt Attila, Dr. Simonka Zsolt, Dr. Ormándi Katalin, Dr. Hoffmann Csilla, Dr. Lázár Máté, Dr. Valicsek Erzsébet, Dr. Nikolényi Alíz, Dr. Kelemen Gyöngyi, Dr. Dobi Ágnes, Dr. Együd Zsófia, Dr. Rusz Orsolya, Dr. Hamar Sándor, Dr. Kaizer László, Dr. Ragó Péter, Dr. Csörgő Erika, Dr. Kővári Bence, Dr. Kuthi Levente, Dr. Tóth-Lipták Judit, Lázár Péter**, akik nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg.

Külön köszönet illeti **Dr. Nyári Tibort** a statisztikai vizsgálatokhoz nyújtott szakmai segítségéért.

Hálával tartozom a Pathológiai Intézet asszisztenseinek, elsősorban **Balogh Beátának**, továbbá **Dezső Mihály** fotósnak magas színvonalú munkájukért, mellyel részt vállaltak munkámban.

Nem utolsó sorban köszönöm családomnak és barátaimnak kitartó türelmét és maximális támogatását.