

**Ph.D. Tézis**

**Az orcein festéssel kimutatott érinvázio és ennek jelentősége különböző daganatokban, különös tekintettel a vastagbélrákokra**

**Dr. Sejben István**

**Témavezető:**

**Prof. Dr. Cserni Gábor, Ph.D., D.Sc., Bács-Kiskun Megyei Kórház  
Patológiai Osztály, Kecskemét & Szegedi Tudományegyetem, Patológiai  
Intézet**

**Multidiszciplináris Orvostudományok**

**Doktori Iskola**

**Szegedi Tudományegyetem**

**2016**



**AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK**

- I. Sejben I., Bori R., Cserni G.  
Venous invasion demonstrated by orcein staining of colorectal carcinoma specimens is associated with the development of distant metastasis.  
*Journal of Clinical Pathology* 2010;**63**:575-578.  
**IF: 2.475**
  
- II. Cserni G., Sejben I., Bori R.  
Diagnosing vascular invasion in colorectal carcinomas: improving reproducibility and potential pitfalls.  
*Journal of Clinical Pathology* 2013;**66**:543-547.  
**IF: 2.551**
  
- III. Sejben I., Kocsis L., Török L., Cserni G.  
Elastic staining does not assist detection of venous invasion in cutaneous melanoma.  
*Pathology Research and Practice*, 2016;**212**:51-53.  
**IF: 1.397**

## **1. BEVEZETÉS**

Évente mintegy 1,2 millió új colorectalis carcinoma (CRC) kerül felismerésre, és körülbelül 600 000 beteg hal meg ebben a betegségben világszerte. A CRC a rákhalálozás második leggyakoribb oka mindkét nemben, hozzávetőleg 5000 halálesetet okozva évenként hazánkban. A vastag- és végbélrákok több mint 90%-át adenocarcinomák teszik ki.

A CRC-s betegek kezelésének javításához ezen tumorok prognosztikai tényezőit kellene pontosabban meghatározni. A College of American Pathologists 1999. évi Konszenzus Nyilatkozata a prognosztikus paramétereket öt kategóriába sorolta a prognosztikus értékükre vonatkozó bizonyítékok erőssége alapján. CRC-ben a nyirok- és vérérbetörés az I-es prognosztikus csoportba került a lokális tumorinvázió kiterjedtségével, a regionális nyirokcsomó áttétekkel, a reziduális daganattal, a preoperatív carcinoembryonalis antigén szinttel és a radiális szél érintettségével együtt. A nyirok- és vérérbetörés nem csak prognosztikus jelentőségű, hanem egyúttal a kezelést is befolyásolja. Dukes B colon carcinomás betegeknek gyakran javasolnak kemoterápiát egyes klinikopatológiai tényezők alapján, mint a bélelzáródás, kevesebb, mint 12 vizsgált regionális nyirokcsomó, magas gradus, nyirok- és vérérbetörés, perineurális invázió, lokalizált perforáció és pozitív, közeli vagy nem azonosítható resectiós szél.

Az elasztikus rostfestéseket hasznosnak tartják a vénainvázio(VI) kimutatására colorectalis, gyomor- és nyelőcsőrákok esetében. A rugalmas rostfestésekkel pontosabban azonosítható a VI, mint rutin haematoxylin eosin (H&E) festéssel, és a colorectalis carcinomás anyagokban elasztikus festéssel kimutatott VI nagyobb távoli áttét kockázattal jár együtt. A CRC-ben orceinnel detektált VI prognosztikus jelentőségének vizsgálata céljából két fázisból álló vizsgálatot végeztünk. Ennek mintájára kipróbáltuk az orceint VI feltüntetésére cutan melanomákban.

## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

2.1 VI gyakoriságának vizsgálata CRC-s preparátumokban H&E és orcein festéssel és az eredmények összevetése.

2.2 Felmérni CRC-ben a H&E és orcein festéssel azonosított VI és a távoli metastasisok közti összefüggést.

2.3 CRC-ben az orceinnel kimutatott VI és a távoli áttétek közti kapcsolat megerősítése hosszabb utánkövetési periódust követően.

2.4 Különbségeket keresni a VI pozitív CRC-s betegekben az távoli áttétes és a metastasis nélküli betegcsoportok között.

2.5 Meghatározni az orcein festés hasznosságát VI kimutatásában primer cutan melanomás anyagokon.

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **3.1 AZ ORCEINNEL KIMUTATOTT VI ÉS ANNAK TÁVOLI METASTASISSAL VALÓ ÖSSZEFÜGGÉSÉNEK VIZSGÁLATA CRC-BEN**

A vizsgálat első fázisában a Patológiai Osztályon 2007-ben vizsgált CRC-s resecatumok adatait gyűjtöttük össze retrospektív módon az intézeti adatbázisból. Az invázió mélységét és a peritoneum vagy szomszédos szerv invázióját jelző pT osztályozás, a nyirokcsomó statust tükröző pN kategória mellett a kezdeti, a távoli áttét meglétére vagy hiányára utaló M kategória a multidiszciplináris megbeszélések adatai alapján lett megállapítva. Az intraoperatív biopsziával és hisztológiával (pM) vagy klinikailag észlelt metastasisokat vettük figyelembe a kezdeti M kategóriába soroláskor. A kezdeti staging során rutin mellkasröntgen felvétel és hasi ultrahang vizsgálat történt, de szükség esetén egyéb képalkotó vizsgálatokra került sor. Az utánkövetési időszakban az M kategória meghatározása kiegészült a boncolások során nyert adatokkal, és a betegek kórlapjait is áttekintettük. Az összes daganatos blokk orceinnel festett metszeteiben prospektív módon, rutinszerűen történt VI keresés. Először a H&E-vel festett, majd a szinkrón készített orcein metszetekben vizsgáltuk a VI-t. Az két módszerrel kapott eredményeket külön rögzítettük. A tumorokat a TNM szerinti V klasszifikáció szerint is besoroltuk: V1 a mikroszkóposan azonosított VI-t, a V0 ennek hiányát jelenti. 2009 áprilisáig voltak elérhetőek az utánkövetési adatok. A következő eseteket zártuk ki az elemzésből: a muscularis mucosae meg nem haladó, intramucosalis carcinomákat (pTis a TNM-ben), kiújult rákokat, a kórszövettani vizsgálat előtt neoadjuváns kezelésen átesett eseteket, más helyen levő szinkrón vagy metakrón primer malignus daganatos betegeket és az MX (ismeretlen metastaticus statusú) eseteket, akiknél vagy hiányoztak az utánkövetési adatok vagy a posztoperatív exitust nem követte

körboncolás. A VI vagy a nyirokcsomó érintettség és a távoli áttét közti összefüggést Fisher egzakt próbával (FEP) vizsgáltuk. A szignifikancia szintet  $p < 0,05$  szinten határoztuk meg.

Munkánk második fázisában ugyanezt a betegcsoportot vizsgáltuk újra 2014. februárig megnyújtva az utánkövetési időszakot. Az utánkövetési adatokkal nem rendelkező betegeket töröltük, és metastaticus statusuk az utolsó utánkövetési hónap szerint lett rögzítve. A VI pozitív nem áttétes (M0) és a VI pozitív távoli, nem peritonealis áttétes (M1) eseteknek a diagnózis megállapításakor és később az utánkövetés alatti paramétereit hasonlítottuk össze. Az összehasonlított alcsoportok orcein festett metszeteit újravizsgáltuk, hogy megállapítsuk a VI-k számát és lokalizációját (intramurális vagy extramurális). A VI denzitást úgy határoztuk meg, hogy az azonosított VI-k számát elosztottuk az orcein festett metszetek számával (tumoros blokkok száma). Kontingencia táblázatokat használtunk a nodalis vagy VI status és a távoli áttét közötti kapcsolat értékelésére; FET-t és független mintás (kétmintás) t-próbát alkalmaztunk a kategórikus és folytonos változók összehasonlítására. A szignifikancia szintként  $p < 0,05$  lett kitűzve, és mindegyik próba kétoldalú volt.

### 3.2 ORCEIN FESTÉS HASZNOSSÁGÁNAK VIZSGÁLATA VI KIMUTATÁSÁRA CUTAN MELANOMÁBAN

Egy másik vizsgálatot végeztünk abból a célból, hogy felmérjük az orcein festés hasznosságát cután melanomás esetekben VI detektálására. 2006. január és 2013. szeptember között resecált 40 primer, vertikális fázisban levő, cutan melanomás esetet kerestünk elő az intézeti adatbázisból. A legalább 3 mm tumor vastagságot elérő eseteket választottuk be. Mindegyik eset minimum Clark III szintű volt. Az eredetileg H&E-vel festett összes tumoros blokkot utólag orceinnel is megfestettük. Két patológus szimultán értékelte a metszeteket vascularis invázióra nézve multidiszkussziós mikroszkóppal. Először a H&E metszetek, majd az orceinesek kerültek vizsgálatra. A két festéssel talált eredményeket külön rögzítettük, és összevetettük az eredeti kórszövetteni leletekkel.

## 4.EREDMÉNYEK

### 3.1 AZ ORCEINNEL KIMUTATOTT VI ÉS ANNAK TÁVOLI METASTASISSAL VALÓ ÖSSZEFÜGGÉSÉNEK VIZSGÁLATA CRC-BEN

Az Anyagok és módszerek részben említett esetek kizárása után 89 beteg (47 férfi és 42 nő) maradt a vizsgálatban. Ez 16 végbéltumoros és 73 colonicarcinomás beteget foglalt magában. Medián hat orceinnel festett metszetet vizsgáltunk. Nyolcvankilencből 16 esetben (18%) mutattunk ki VI-t a H&E metszetekben, míg az orceinnel festett metszetek értékelése során 89 esetből 63-ban (71%) találtunk VI-t. A VI gyakoribb volt nagyobb pT kategóriáknál és nodalis érintettség esetén; az összes pN2 esetben volt VI is. Távoli áttétet a kezdeti staging során 11 esetben igazoltak. A medián vizsgált nyirokcsomó szám 18 volt (4-55). Nyirokcsomóáttéte 46 (52%) betegnek volt, az M1 tumorokból 9 tartozott ide, míg 2 metastasisos eset a nyirokcsomó negatív csoportba tartozott. A nyirokcsomó status (pN0 kontra nyirokcsomó-áttétes) szinte összefüggést mutatott a kezdeti M1 statussal ( $p=0,05$ ). A H&E-vel detektált VI nem függött össze a kezdeti M1 statussal ( $p=1$ ), de az orceinnel azonosított VI és a szinkrón távoli metastasisok között szignifikáns kapcsolat állt fenn ( $p=0,029$ ). Tíz M0 esetet, ahol az utánkövetés kevesebb volt 6 hónapnál, kizártunk a további elemzésből. A fennmaradó 79 tumorból 14 (18%) mutatott VI-t H&E metszetekben, és ez a szám 56-ra (71%) emelkedett az orceines metszetek elemzését követően. Negyvenöt páciens kapott kemoterápiát (30-nál együttes véna- és nyirokcsomó-érintettség, 11-nél csak VI, és 3-nál csak nyirokcsomó-érintettség állt fenn, 1-nél pedig egyik sem), és 34 beteg nem kapott szisztémás kemoterápiát (6 venosus és nodalis érintettséggel, 8 egyedül VI-vel és 1 csak nodalis érintettséggel, 19 pedig VI és nodalis betegség nélkül). A 68 kezdetben M0-ás eset medián utánkövetési időtartama 17 hónapot tett ki (6-28). Ezen periódus alatt 9 colonicarcinomás betegnél jelent meg távoli áttét a műtét után 4-22 hónappal (medián 9 hónap). A 20 betegből, akiknél a vizsgálat zárásáig áttét alakult ki, 5 tartozott a nyirokcsomó negatív csoportba, és mind a 20 esetben orceinnel találtunk VI-t. A szinkrón és metakrón távoli áttétek összefüggést mutattak a nyirokcsomó érintettséggel és az orceinnel kimutatott VI-vel ( $p=0,02$ , illetve  $p=0,001$ ), míg a H&E-vel detektált VI nem mutatott összefüggést ( $p=0,31$ ). Az orceinnel azonosított VI 0,54-es pontossággal, 1,0-es szenzitivitással és 0,39-es specificitással jelezte előre a távoli áttét jelenlétét. A nodalis metastasis pontossága, szenzitivitása és specificitása a távoli metastasis előrejelzésére vonatkozólag 0,54, 0,75 és 0,56 lett.

A CRC vizsgálat második fázisában az ismételt elemzés medián utánkövetési időtartama 48 hónap volt. Az eredeti adatok és metszetek áttekintése után néhány beteg

metastaticus, VI és utánkövetési statusa változott. A további, VI és metastasis közti kapcsolatot elemző vizsgálatba 87 CRC-s páciens (45 férfi és 42 nő; medián életkor 71 év, 28-88 év; 16 rectalis és 71 colon carcinoma) került. Orcein festéssel 61 betegnél (70%; 95% konfidencia intervallum: 59-79%) azonosítottunk VI-t orcein, és 18 esetben (21%; konfidencia intervallum: 13-33%) H&E festéssel is mutatkozott VI. Kemoterápiát 46 beteg kapott (VI és nodalis érintettség együtt 29 esetben, csak VI 12 esetben, csak nodalis áttét 4 esetben és 1 esetben sem nodalis sem venosus érintettség), és 41 beteg nem kapott (19 VI és nodalis áttét nélküli, 10 csak V1, 2 csak nodalis metastatisos, 10 nodalis és venosus érintettséget mutató eset). Az utánkövetés alatt 31 páciens hunyt el, 18 a tumor következtében vagy tumorról, és 13 pedig más okok miatt. A vizsgált időszak elején 10 betegnél volt távoli nem-peritonealis áttét (M1). A műtétet követő 24 hónapos medián utánkövetési időszak elteltével további 16 betegben alakult ki távoli áttét. Két metakrón áttétes esetben (mindkettő nyirokcsomó pozitív és az egyik V1) csak a peritonealis metastasis alakult ki. Mivel ezek keletkezését VI vagy nodalis érintettség nemigen magyarázza, ezért ezeket a vizsgálatunkban, amiben csak a nem-peritonealis metastasisokat vettük számításba, nem tekintettük távoli haematogen áttétnek. Ha a nyirokcsomó statusát és az orceinnel kimutatott VI-t távoli áttét kimutatására irányuló tesztnak tekintenénk, akkor adataink alapján ezek pontossága, szenzitivitása és specificitása 58,8%, 70,8%, 55,6% illetőleg 52,9%, 91,7% és 38,1% lenne. Az összefüggés a távoli áttétek és a nyirokcsomó pozitivitás (FEP,  $p=0,03$ ) illetve a távoli metastasis és az orceinnel detektált VI (FEP,  $p=0,008$ ) között szignifikáns volt. A H&E-vel kimutatott VI nem mutatott szignifikáns kapcsolatot a metastasisokkal (FEP,  $p=0,24$ ). A 61 VI pozitív esetből 39-ben nem alakult ki távoli nem-peritonealis áttét (V1M0 csoport), és 22-nél viszont vagy szinkrón (10 eset) vagy metakrón (12 eset) távoli nem-peritonealis áttét fejlődött ki (V1M1 csoport). A vizsgált paraméterek közül a kor, a nemek aránya, a pT és pN kategória, a vizsgált és érintett nyirokcsomók száma, a H&E-vel detektált VI és az orcein festett metszetek száma nem mutatott szignifikáns különbséget a két csoportban. Az átlagos utánkövetési periódus a V1M0 csoportban nagyobb volt, míg a VI denzitás és extramuralis VI-t is mutató esetek aránya alacsonyabb volt, mint a V1M1 csoportban. A VI denzitás tekintetében határértékként 1-et véve alapul (az orceinnel festett metszetekben lemezenként legalább átlagosan 1 VI bizonyult szignifikánsnak), a távoli nem-peritonealis metastasisal való összefüggést szignifikánsnak találtuk (FEP,  $p=0,024$ ), és a

pontosság, a szenzitivitás és a specificitás értékei 70,5%, 40,9% és 87,2% voltak. Az orceinnel kimutatott extramuralis VI és a távoli nem-peritonealis metastasis szignifikáns kapcsolatot mutatott 60,0% pontossággal, 90,9% szenzitivitással és 42,1% specificitással. A VI lokalizációja és denzitása közötti összefüggést illetően az átlagos ( $\pm$ standard deviáció) VI denzitás nagyobb volt az extramurális VI (n=42) mint a csak intramurális VI (n=18) esetén ( $1,05\pm 0,98$  kontra  $0,31\pm 0,16$ ;  $p<0,0001$ ). A H&E metszeteken is több VI-t találtunk extramurális VI esetén (17 kontra 1,  $p=0,01$ ). Azonban legtöbb VI-t mutató esetben (n=37) mind intramurális mind extramurális VI jelen volt az orceinnel festett metszeteken, és két esetben pedig extramurális és nem meghatározható lokalizációjú VI, egy további esetben pedig intramurális és nem meghatározható lokalizációjú VI mutatkozott. A VI denzitás az intramurális VI-t mutató (n=56) és csak extramurális VI-t mutató (n=3) csoportban nem különbözött szignifikánsan.

### 3.2 AZ ORCEIN FESTÉS HASZNOSSÁGÁNAK VIZSGÁLATA BŐRMELANOMÁK VÉNAINVÁZIÓJÁNAK KIMUTATÁSÁRA

A vizsgált melanomák vastagsága 3,1 mm-től 18 mm-ig terjedt. Átlagosan esetenként 4 tumoros blokk került vizsgálatra. Negyvenből 10 esetben találtunk vascularis inváziót H&E festésű metszeteken, amelyeken a nyirok- és vérérbetörés általában nem különíthető el. Az orcein festés kiemeli a véna érintettséget. Egyértelmű VI-t orceinnel 5 esetben azonosítottunk. Egy kivételével az összes biztos VI felismerhető volt H&E metszeteken is. Hat esetben a H&E-vel detektált vascularis invázió nem látszott orceinnel. Csupán egy esetben mutattott ki az orcein több véna érintettségét, de ezeket részben a H&E festés is jelezte. Összegezve az orcein nem javította a VI kimutatás arányát. Továbbá az orceinnel történő VI azonosítást megnehezítette a dermis actinicus elastosisa vagy az adnexális struktúrák vascularis inváziót utánczó érintettsége.

## 5. MEGBESZÉLÉS

A CRC okozta halálozás potenciálisan kuratív resectio után leggyakrabban lokális vagy távoli kiújulással függ össze. A ráksejtek terjedése különböző utakon történik: direkt úton, transperitonealis módon, implantációval, nyirokutakon keresztül, haematogen úton vagy vénás extensio révén. A távoli helyekre való szétterjedés három fő útja a haematogen,



lymphohaematogen és peritonealis terjedés. A VI a tumor progresszió és terjedés morfológiailag detektálható, kritikus lépése, ami magyarázza, hogy a CRC prognosztikus faktoraik között szerepel a tumor invázió mélységével, a nyirokcsomó-érintettségével és a távoli áttétellel együtt. Az vérérbetörés jelenléte nyilvánvaló előfeltétele a haematogen metastasisok létrejöttének.

VI kimutatásához ideális esetben a következő struktúrákat kellene azonosítani: lumen daganatsejtekkel és vérrel vagy thrombussal, endothel bélés, körkörös simaizomsejtek és elasztikus rostok a vénafalban, szomszédos artéria. A luminális tumorsejtek és vér vagy thrombus felismerése ritkán igényel speciális festést. Ha a duzzadt endothelsejtek tumorsejtekre hasonlítanak, akkor cytokeratin és endothel markerek oldhatják meg a kérdést. Az érstruktúrákra specifikus endothelium immunhisztokémiai markerekkel feltüntethető. Factor VIII-related antigén, CD31 és CD34 használatos a vér- és nyirokerekek endotheljének kiemelésére. H&E festett metszeteken megbízható módon nem különíthetők el a lymphaticus és vérerek. Immunhisztokémiai lymphaticus endothel markerek használhatók a köztük való differenciálásra. Azonban hangsúlyozni kell, hogy az érintett erek endothelje gyakran felismerhetetlenségig károsodik. A VI kimutatás javítása céljából használhatók hisztokémiai és immunhisztokémiai festések az érfal simaizomsejtjeinek, illetve elasztikus rostfestés a vénafal elasztinjának kimutatására. Verhoff, Weigert, Miller és orcein festést alkalmaznak leginkább a rugalmas rostok feltüntetésére. Az elasztikus festések a kísérő artériát is kiemelik, melynek jelenléte segíti a véna azonosítását.

A közölt VI incidencia CRC-ben jelentős változatosságot mutat, 10 és 90% között ingadozik. Feltéve, hogy minden távoli haematogen áttétes betegnek volt VI-ja, 10,5% és 29,6% fals negatív arányt becsült Ouchi, illetve Sternberg. Sternbergék szerint ezek az eltérések a közölt tumorszériák különbözőségének, az anyagok feldolgozásának technikai különbségének és az interobserver variabilitásnak tudhatók be. Másként fogalmazva, a VI detekció arányát a tumor jellemzői (stage, differenciáció), a vizsgált tumor mennyisége (a blokkok és metszetek száma, nagysága), a festési módszer (H&E vagy elasztikus festés vagy immunfestés) és a leletező patológus jártassága befolyásolja. A fals negatív ráta csökkentésére a blokkok és metszetek számának növelését, rugalmas rostfestést, a tumor kerületéből tangencionális, valamint mesenterialis és mesenterialis ereket tartalmazó blokkot kimetszését

ajánlják. Eredményeik azt mutatják, hogy közvetlen összefüggés áll fenn a VI gyakoriság és a tumor stage, míg fordított arányosság van a VI incidencia és a tumor differenciáció között, és minél nagyobb számú blokkot vizsgáltak, annál nagyobb arányban fedeztek fel VI-t. Talbot és munkatársainak számítása szerint az extramuralis VI-k 3,9%-a nem kerül felismerésre 5 blokk esetén, míg ez az arány 41,3%, ha csak 2 blokk készült. A Royal College of Pathologists azt ajánlja, hogy minimum 4 blokk a legjobb ennek a kulcsfontosságú prognosztikus tényezőnek a kimutatására. A College of American Pathologists Konszenzus Nyilatkozata 5 vagy több blokk feldolgozását tartja optimálisnak.

Talbot a VI-t így definiálta: „endothellel bélelt területen levő tumor, amit simaizom szegélyez vagy vörösvértesteket tartalmaz”. Ezt a definíciót H&E-vel festett metszeteken való véna érintettség identifikálására használják, de nem segít minden egyes VI azonosításában. Más jeleket is alkalmaznak VI markerként H&E metszeteken, és ide tartozik a „kinyújtott nyelv” jel (a tumorszövet sima szélű kinyúlása a pericorectalis zsírszövetbe, általában artéria mellett) valamint az „árva artéria” jel (körülírt tumorgóc artéria szomszédságában, kíséző véna nélkül).

A rugalmas rostfestéseket azért használják a VI kimutatására, mivel az elváltozás jobb láthatóságát eredményezik. Átlagosan háromszoros növekedést tapasztaltak a VI kimutatási arányt illetően egyes tanulmányokban, ahol a H&E és az elasztikus festéseket hasonlították össze. Ebben az esetben elasztikus lamina által körülvett tumorsejteket tekintenek VI-nek. Egy új tanulmányban Kojimáék egységes kritériumokat állapítottak meg a VI elasztikus rostfestéssel festett metszeten való azonosítására: “Rugalmas rostfestéssel festődő membrana elastica interna jelenléte a kerület felét meghaladóan egy tumorsejt csoport körül”.

A CRC-k VI kimutatási arányában levő nagy szóródás a különböző beteganyagokban azt mutatja, hogy ennek a jelenségnek a felismerése nem mentes a vizsgálónkénti variabilitástól. Littleford és munkatársai csak gyenge-közepes egyetértést találtak az extramuralis VI diagnosztikában H&E metszetek vizsgálata során. Harris és kollégái a CD31 és D2-40 immunfestések hatását vizsgálták az interobszerver variabilitásra, valamint a VI és a lymphaticus invázió kimutatására stage II CRC-ben. Azt találták, hogy az interobszerver egyezés gyenge volt, függetlenül az immunhisztokémia alkalmazásától.

Az rugalmas rostfestéssel detektált 60-70% körüli VI arány magasabb, mint a távoli áttétes esetek aránya CRC-ben. Tehát a VI-nek van fals pozitivitása is a haematogen metastasis előrejelzésében. Néhány pseudo-VI-nak nevezett jelenség hajlamosít VI túldiagnosztizálásra speciális festések használata során: artéria invázió, tangencionálisan metszett subserosalis elasztikus lamina, a mucosa protrúziója a submucosába, periganglionaris, perineurális, perinodalis, és perifollicularis elasztikus rostok valamint a periglandularis és a perimuscularis elastosis.

A vénák lamina elastica internája jelentősen megvastagodhat, és ezért az artériától való megkülönböztetésre gondolni kell. A vascularis struktúra és tumorsejtek vagy tumorsejt csoportok jelenléte kerek képletben néha érfal inváziót jelent, nem valódi lumenbe törő nagyér inváziót. Ezek a jelek H&E metszetekben VI-ként félreértelmezhetők. A tumorsejtekkel körülvett membrana elastica interna azonosítása ahelyett, hogy a membrana elastica interna venné körül a tumorsejteket, lehet a kulcsa az érfalinvázió felismerésének. Az endothellel bélelt centrális érintetlen lumen alátámaszthatja a helyes interpretációt. A bélfal néhány rétegét elasztikus rostok határolhatják, bár ezek nincsenek mindenütt egyformán jelen, és a virtuálistól a prominensig változnak, és prominens jellegük olykor korábbi sérüléssel lehet kapcsolatos (pl. neoadjuváns kezelés). Időnként lehetnek körkörösek, és ilyenkor a véna membrana elastica internájára emlékeztetnek. Ezek közül az elasztikus rosthálózatok közül valószínűleg a peritonealis vagy subserosalis elasztikus lamina a legfontosabb. A colon egyes szegmensein nagyon prominens lehet, és nagyon hajlamos circularis formák képzésére egyes metszési síkokban. Elasztikus rostok a muscularis mucosae alatt is előfordulhatnak, ahol a mucosa diverticularis protrúziói pseudo-VI-t okozhatnak, ha ezeket neoplasticus mirigyek szűrik be. Az elasztikus rosthálózat jelenlétére specifikus anatómiai/szöveti rétegekben mindig gondolni kell, amikor rugalmas rostfestésnél vascularis inváziót keresünk, bár ezek csak akkor jelentenek diagnosztikus problémát, ha a tumor infiltrálja a körülöttük levő szöveteket, és megtévesztő metszési síkokat látunk.

Az intermuscularis elasztikus réteg általában nem prominens, de kifejezett lehet a myentericus plexus ganglionjai körül, amit nem ritkán érint az izomréteget beszűrő CRC.

Neoadjuváns radio- vagy kemoterápia alkalmazása rectum carcinomában elastosishoz, szokatlan helyeken való rugalmas rost felszaporodáshoz vezethet. Ilyen esetekben a

periglandularis rostok egyértelműen kerek képleteket hoznak létre, amelyek membrana elastica internára hasonlítanak. Ekkor az izomkötegeket is rugalmas rostok vehetik körül, és ez pseudo-VI számára kedvező háttérrel alkothat, ha a daganat infiltrálja ezeket a kötegeket.

Intraneuralis terjedés perineuralis elasztikus rostokkal, igen ritkán perinodalis elasztikus rostok (a nyirokcsomók tokja általában rugalmas rost mentes) és anorectalis carcinomákban a perifollicularis elasztikus lemez olyan morfológiai képet hoz létre, amikor tumorsejteket elasztikus rost tartalmú rétegek vesznek körül, vagyis pseudo-VI jön létre.

Következésképpen a VI-t CRC-ben többnyire aluldiagnosztizált jelenségként tartják számon. Legalább 4-5 blokk indítása, „árva artéria” és „kinyújtott nyelv” jel keresése, minden tumorblokk elasztikus festése praktikus és könnyen bevezethető intézkedés a fals negativitás csökkentésére. Azonban a rutin rugalmas rostfestés növeli a fals pozitivitás kockázatát. Tehát a VI-t utánzó jelenségeket ki kellene zárni, hogy optimális eredményeket kapjunk.

Bár a VI gyakoriság jelentősen növekedett orcein festés alkalmazásával, és ez prognosztikus jelentőséggel bír, világos, hogy nem mindegyik tumor ad távoli áttétet, amelynél VI-t azonosítottak. A VI szenzitivitása szinkron vagy későbbi metastasisra vonatkozólag az első vizsgálatunkban ideálisnak (100%) tűnt viszonylag rövid 17 hónapos medián utánkövetési idő mellett, a specificitás kevésbé volt kedvező (39%). A távoli metastasis kialakulása és az orceinnel kimutatott VI (nem igaz a H&E-vel igazoltra) közötti összefüggés szignifikáns volt. Hosszabb utánkövetési idő után ezt az összefüggést megerősítettük, és a H&E-vel detektált ekkor sem mutatott hasonló összefüggést. A szenzitivitás arra vonatkozólag, hogy azonosítsuk azokat a betegeket, akiknél a betegség lefolyása során bármikor áttét lép fel elég jó (92%) hosszabb követési idő után is, de a specificitás alacsony maradt. Klinikai nézőpontból nagyobb specificitással és pozitív prediktív értékkel rendelkező érték lenne ideális. Ebben a vonatkozásban a nyirokcsomó-érintettség jobbnak tűnik, bár az 56%-os specificitása még mindig nem ideális. A VI lehet a logikus forrása a távoli nem-peritonealis haematogen áttéteknek, míg a nyirokcsomó áttét csak egy előrehaladottabb stádiumot jelez, bár ez is okozhat haematogen áttétet, mivel végeredményként a nyirok is a vénás rendszerbe kerül. Ez a tanulmány megpróbálta azonosítani azokat a mennyiségi és minőségi jellemzőket, amelyek különbözőek azokban a VI-vel rendelkező betegekben, akiknél nem alakult ki áttét és, akiknél kialakult.

Az elemzett változók közül csak három mutatott szignifikáns különbséget a V1M1 és a V1M0 csoport között. A medián utánkövetési időtartam az első csoportban rövidebb volt, több ember halt meg ebben a csoportban, azzal összhangban, hogy a metastasisok rossz prognózist jelentenek. Ha fordítva lett volna, és a V1M0 csoport utánkövetése lett volna rövidebb, akkor ez adataink megbízhatóságát csökkentette volna. A másik csoport hosszabb utánkövetési periódusa azt is jelenti, hogy ezeknél a betegeknél kevésbé valószínű a távoli áttét-képződés. Egyesek szerint mind az intramurális, mind az extramurális VI azonos prognosztikus hatással bír, hiszen ugyanazokba az erekbe gyűlik a vér a bél különböző anatómiai rétegeiből, és mi is ezt a véleményt osztottuk. Ugyanakkor, eredményeink arra utalnak, hogy az extramurális VI nagyobb metastasis kockázatot jelent, mint az izolált intramurális VI. Prognosztikus faktorként az extramurális VI fölényét az intramurálissal szemben több irányelv is elismeri, és eredményeink összhangban állnak a korábbi és újabb közleményekkel, amelyek szerint mind az intramurális mind az extramurális VI prognosztikus jelentőségű, de az utóbbinak nagyobb a prognosztikus értéke.

Fontosnak tűnik a mennyiségi különbség az orceinnel VI pozitív és a betegség folyamán áttéssé vált betegek és VI pozitív áttétmentesek között. Ezt a mennyiségi különbséget tükrözi ebben a munkában a VI denzitás, amely átlagosan több, mint kétszer olyan gyakori volt az M1 csoportban, mint az M0-ban. Az 1 VI/metszet önkényes határértéket választva nagyobb specificitás adódott a metastaticus disszemináció vonatkozásában. Nagyobb VI denzitás (gradus) értékekkel járó nagyobb metastasis incidenciát talált két japán tanulmány is, melyek elastica-van Giesont használtak VI azonosításra.

Nyilvánvalónak tűnik, hogy egy prognosztikus faktor pl. a VI, bármennyire fontos is, nem tudja előrejelezni a CRC kimenetelét. A prognosztikus indikátorok kombinációja szükséges a prognózis pontosabb megállapításához és a kezelés meghatározásához. Például a Petersen prognosztikus indexet a stage II colon carcinomás betegekre dolgozták ki, és a VI, a peritonealis érintettség, a sebészi szél érintettség és a tumor perforáció alapján számítják ki. Egy pontot kap az intra- vagy extramurális VI, a peritonealis és a sebészi szél érintettség, míg a tumor perforáció 2 pontot kap. A teljes pontszámot a részpontok összege adja. Az alacsony (0-1) teljes pontszám 85,7%-os 5 éves túléléssel jár, és alacsony rizikócsoporthoz definiált. Azok, akik teljes pontszáma 2-5, a magas rizikójú csoportba tartoznak, ami 49,8%-os 5 éves

túléléssel társul. Ezt a prognosztikus pontrendszert Dukes B és C colon és rectum tumoroknál is validálták. Munkacsoportunk, más intézettel együttműködve, a Petersen index megbízhatóságát hasonlította össze két centrumban. Bár a VI detekciós ráta szignifikánsan nagyobb volt az egyik centrumban, és a tumor perforáció gyakoribb volt a másikban, az eredmények megerősítették a prognosztikus index hasznosságát. Ez amellet szól, hogy egyetlen kedvezőtlen paraméter (hacsak nem a nagyobb súllyal szereplő transtumoralis perforáció az) kisebb hatással van az általános prognózisra, és ezzel még a tumor egy jobb prognosztikus kategóriába kerül. Ez összhangban áll jelen eredményeinkkel, ami szintén rámutat arra, hogy van értelme a VI kvantifikálásának. A VI nagyobb mennyisége nagyobb távoli áttét gyakorisággal párosul. Bár ezek az eredmények elég logikusak, a CRC-s betegek viszonylag alacsony száma ebben a kohorszban olyan korlátozó tényező, ami eredményeink nagyobb betegszámú csoportban való megerősítését kívánja.

Végeredményben megerősíthető, hogy az rugalmas rostfestések növelik a VI kimutatási rátát CRC-ben, mind a VI gyakoriságot mind a VI mennyiségét illetően. Az orceinnel kimutatott VI és a távoli áttét közti összefüggés ellenére, az orcein (vagy bármely más elasztikus festés) haszna megkérdőjelezhető, mivel több CRC-s betegben mutat VI-t mint ahányban metastasis fejlődik ki a betegsége lefolyása során, és a terápia módosítását okozva ilyen alapon túlkezeléshez vezethet. Ésszerű kvantitatív (VI denzitás) és kvalitatív (csak intramurális kontra extramurális) különbségeket találva a VI pozitív áttétes és áttét nélküli CRC-s betegekben, a klinikailag jelentős VI remélhetőleg jobban definiálható lesz.

Malignus bőrmelanomákban a tumor vastagság a legfontosabb prognosztikus kórszövettani tényező. A melanomák vascularis inváziójának jelentőségét vizsgáló tanulmányok különböző következtetésekre jutottak. A vascularis invázió gyakran standard metszeteken is azonosítható, azonban az endothelt kimutató immunhisztokémia hasznos segítség lehet. Az immunhisztokémia használata javítja az érinvázió azonosítását melanomában. Legjobb tudomásunk szerint még nem történtek vizsgálatok elasztikus rostfestésekkel a vascularis invázió kimutatására ebben a tumortípusban, bár ezek a festési módszerek hasznosnak bizonyultak a vascularis invázió detektálására colorectalis, gyomor- és nyelőcsőrákban. Az elasztikus festések alkalmazása CRC-ben a vascularis invázió pontosabb azonosítását teszi lehetővé a rutin H&E festéshez viszonyítva, és az így kimutatott véna

érintettség nagyobb távoli áttét rizikóval függ össze. Hasonlóképpen, megpróbáltuk láthatóvá tenni a VI-t cutan melanomás készítményeken is orcein festéssel. Öt esetben találtunk egyértelmű VI-t ezzel a módszerrel, míg 10 esetben találtunk vascularis inváziót H&E-vel. Vagyis az orcein nem javította az érinvázió azonosítását. Eredményeink oka az lehet, hogy a melanomák gyakrabban szűrik be a nyirokereket, mint a vérereket, és az érintett vérerek gyakrabban capillaris típusúak. Az orcein a viszonylag nagy vénák falában levő elasztikus rostokat festi, és a kis vér- és nyirokerek nem festődnek vele. Másik ok a bőr szövettani szerkezetében rejlik, ugyanis a dermis sok rugalmas rostot tartalmaz, ami néha zavaró háttérként, bár néhány melanoma mentes ettől az elastoticus törmeléktől, és a solaris elastosist mutató réteget lefelé nyomja a vertikális növekedés során. Az elasztikus rostok gyakran körkörös rendeződnek, például a periadnexalis, és a perineuralis kötőszövetben, és fals pozitív eredményhez vezethetnek, megnehezítve a VI és a pseudo-VI elkülönítését.

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink szerint orcein festéssel gyakrabban találunk VI-t CRC-ben mint H&E festéssel. Az orceinnel kimutatott VI összefügg a szinkrón és metakrón távoli áttétekkel, hasonlóan a nyirokcsomó metastasisokhoz. A VI és a nodalis status összehasonlítása azt mutatja, hogy bár mindkettő prediktív távoli áttétre nézve, az előbbi jobb szenzitivitását ellensúlyozza az utóbbi jobb specificitása.

CRC-s anyagokban az orceinnel detektált VI lokalizációja (intramurális vagy extramurális) és a denzitása/gradusa határozza meg annak prognosztikus jelentőségét. Bár mind az intramurális mind az extramurális VI mutat kapcsolatot a távoli metastasisal, az utóbbi prognosztikus értéke nagyobb. Egy VI/metszet VI denzítés nagyobb specificitást jelentett a haematogen disszemináció vonatkozásában.

Vizsgálataink és az irodalom áttekintése alapján javasolható, hogy orcein vagy más rugalmas rostfestést kell rutinszerűen használni a VI felmérésére CRC-ben, legalább a nyirokcsomó negatív és H&E-vel VI negatív esetekben.

Az optimális VI kimutatás tehát 4-5 tumorblokk indítását, VI morfológiai jeleinek (“kinyújtott nyelv” és “árva artéria” jelek) keresését a H&E metszeteken, elasztikus festés

rutin alkalmazását és a VI-t utánzó jelenségek (pseudo-VI) és a valódi VI elkülönítését foglalja magában.

Az rugalmas rostfestés bőrmelanomák VI-jének azonosítására való alkalmasságának vizsgálata után arra a következtetésre jutottunk, hogy az orcein festés nem hasznos ezen tumorokban az érinvázio kimutatásának javítására.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom

- témavezetőmnek, **Prof. Dr. Cserni Gábornak** a Szegedi Tudományegyetem Patológiai Intézete Professzorának, a Bács-Kiskun Megyei Kórház Patológiai Osztály vezetőjének, a munkámra fordított sok időért, támogatásért, és munkám szakmai irányításért;
- **Dr. Bori Ritának** munkájáért;
- **Dr. Svébis Mihálynak**, a Bács-Kiskun Megyei Kórház főigazgatójának támogatásáért;
- feleségemnek **Dr. Patyi Mártának** és lányomnak **Sejben Anitának**, hogy bátorítottak és segítettek;
- **Dr. Hamar Sándornak**, korábbi kollégámnak, hogy megtanított a szakma alapjaira;
- és a **Bács-Kiskun Megyei Kórház Patológiai Osztály asszisztenseinek** magas színvonalú munkájukért.

Ezt a dolgot a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal GINOP-2.3.2-15-2016-00020 számú pályázata támogatta.





Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ

Pathológiai Intézet

Igazgató: Dr. Iványi Béla tanszékvezető egyetemi tanár

6720 Szeged, Állomás u. 2. (6701 Szeged, Pf. 427.)

Tel: 62-545 878, 62-545 148

Fax: 62-545 868

Email: office.patho@med.u-szeged.hu

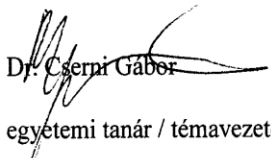
## TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Alulírott **Prof. Dr. Cserni Gábor** témavezető és első szerző igazolom, hogy **Dr. Sejben István** (második szerző) az alább megnevezett közlemény alapjául szolgáló munkában, az adatgyűjtésében, a kézirat végeleges tartalmának kialakításában aktívan részt vett, ezáltal felhasználhatja a **Vascular invasion detected by orcein staining and its significance in different tumors, especially colorectal cancer** (Orcein festéssel kimutatott érinvázio és ennek jelentősége különböző daganatokban, különös tekintettel a vastagbélrákokra) című doktori értekezésének részeként.

Igazolom, hogy a közlemény más doktori értekezés, egyéb tudományos dolgozat alapját nem képezi.

### Közlemény:

Cserni G, **Sejben I**, Bori R. Diagnosing vascular invasion in colorectal carcinomas: improving reproducibility and potential pitfalls. *J Clin Pathol* 2013;66:543-547. **IF(2013): 2,551**

  
Dr. Cserni Gábor

egyetemi tanár / témavezető

Szeged, 2014. 04. 09.