

DOKTORI (PhD) - ÉRTEKEZÉS

EZH2 expresszió vizsgálata nőgyógyászati szövettani mintákon

Dr. Makk Evelin

Témavezető: Dr. Kovács Krisztina

Programvezető: Prof. Dr. Miseta Attila

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos



Pécsi Tudományegyetem

OGYDHT Pécs

2024

Tartalomjegyzék:

Tartalomjegyzék.....	1
Rövidítések jegyzéke.....	3
I. BEVEZETÉS.....	6
I.1. Általános bevezető.....	6
I.2. A méhnyak rosszindulatú mirigyhám daganatai.....	7
I.3. A méhnyak jóindulatú mirigyhám elváltozásai.....	16
I.4. Méhnyálkahártya daganatok és a carcinosarcoma.....	19
I.5. Enhancer of zeste 2.....	24
I.5.1. Az EZH2 expresszió és szerepe a daganatok kialakulásában.....	24
I.5.2. Az EZH2 expresszió szerepe a nőgyógyászati daganatokban.....	26
II. CÉLKITŰZÉSEK.....	28
III. ANYAG ÉS MÓDSZEREK.....	29
III.1. Betegek és vizsgálati minták.....	29
III.1.1. Az EZH2 expresszió vizsgálata endocervicalis léziókban.....	29
III.1.2. Az EZH2, p16 és p53 expresszió vizsgálata méhtest carcinosarcomákban.....	30
III.2. Módszerek.....	30
III.2.1. Szövetteni vizsgálatok.....	30
III.2.2. Immunhisztokémiai vizsgálatok.....	30
III.2.3. Az alkalmazott immunreakciók kiértékelése.....	31
III.2.4. Statisztikai elemzés.....	33
III.2.5. Fotódokumentáció.....	34
IV. EREDMÉNYEK.....	35
IV.1. Az EZH2 expresszió endocervicalis léziókban.....	35
IV.2. Az EZH2, p16 és p53 expresszió méhtest carcinosarcomákban.....	44
V. MEGBESZÉLÉS.....	54
V.1. Az EZH2 expresszió endocervicalis léziókban.....	54
V.2. Az EZH2, p16 és p53 expresszió méhtest carcinosarcomákban.....	57
VI. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS KONKLÚZIÓ.....	63
VII. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	65

VII.1. A disszertáció anyagát képező saját közlemények jegyzéke.....	65
VII.2. A dolgozathoz kapcsolódóan idézhető absztraktok és prezentációk.....	65
VII.3. A disszertációtól független saját közlemények jegyzéke.....	66
VII.4. A disszertációtól független saját közlemények, absztraktok és prezentációk.....	66
VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	67
IX. IRODALOMJEGYZÉK.....	68

Rövidítések jegyzéke

AIS	Adenocarcinoma <i>in situ</i>
CI	Confidence interval / konfidencia intervallum
CIN	Cervicalis intraepithelialis neoplasia
CRD	Cysteine-rich domain / ciszteinben gazdag domén
DAB	Diaminobenzidin
DFS	Disease-free survival / betegségmentes túlélés
EAH/EIN	Endometrium atípusos hyperplasia / Endometrium intraepithelialis neoplasia
ECA	Endocervicalis adenocarcinoma
EED	Embryonic ectoderm development / embrionális ektoderma kialakulás
EGFR	Epithelial growth factor receptor / epithelialis növekedési faktor receptor
EID	EED interaction domain / EED fehérje kötéséért felelős domén
Ek	Epithelialis komponens
EMC	Endometrium carcinoma
EMT	Epithelialis-mesenchymalis transitio / epithelialis-mesenchymalis átmenet
ER	Estrogen receptor / ösztrogén receptor
ESS	Endometrialis stromalis sarcoma
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
gAIS	Gastric-type adenocarcinoma <i>in situ</i> / gyomor típusú <i>in situ</i> adenocarcinoma
GAS	Gastric-type endocervical adenocarcinoma / gyomor típusú endocervicalis adenocarcinoma
Gr	Grade / grádus
H&E	Hematoxin-eozin
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2 / humán epidermalis növekedési faktor receptor 2-es típusa
HPVA	Humán papillomavírus-asszociált adenocarcinoma
HSIL	High grade squamous intraepithelial lesion / magas fokú squamosus intraepithelialis lézió
ICC	Intraclass Correlation Coefficient / osztályon belüli korrelációs együttható
IECC	International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification / Nemzetközi Endocervicalis Adenocarcinoma Kritérium és Osztályozási rendszer
IHC	Immunhisztokémia

ISGyP	International Society for Gynecological Pathologists / Nőgyógyászati Patológusok Nemzetközi Társasága
ISH	<i>In situ</i> hibridizáció
(i-)SMILE/ISMC	(Invasive) stratified mucin-producing carcinoma / (invazív) rétegzett mucin termelő adenocarcinoma
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog / Kirsten patkány sarcoma vírus onkogén homológia
LEGH	Lobularis endocervicalis glandularis hyperplasia
LMS	Leiomyosarcoma
LSIL	Low grade squamous intraepithelial lesion / alacsony fokú squamosus intraepithelialis lézió
MDA	Minimal deviation adenocarcinoma / minimális eltérésű adenocarcinoma
MFS	Myxoid fibrosarcoma
MGH	Microglandularis hyperplasia
Mk	Mesenchymalis komponens
MMMT	Malignant mixed Müllerian tumor / malignus kevert Müller-cső-eredetű tumor
MMRd	Mismatch repair defitientia
MSI	Microsatellita instabilitás
ncRBD	non-codingRNA-binding domain / nem-kódoló RNS-kötő domén
NOS	Not otherwise specified / másként nem meghatározható
NHPVA/HPVI	Non-HPV-associated/HPV independent adenocarcinoma / humán papillomavírustól független adenocarcinoma
NSMP	Nem specifikus molekuláris profil
OS	Overall survival / Teljes túlélés
p53abn	Abnormális p53 immunfestődés / TP53 mutáció
p53wt	Vad típusú p53 immunoreaktivitás / vad típusú TP53
PAX	„Paired box”
PCR	Polimerase chain reaction / polimeráz láncreakció
PFS	Progression-free survival / progressziómentes túlélés
POLEmut	Polimeráz Epsilon exonukleáz domén ultramutált
PR	Progesteron receptor / progeszteron receptor
PRC2	Polycomb repressive complex 2 / polycomb represszor komplex 2
PTEN	Phosphatase and tensin homolog / foszfatáz és tenzin homológ
Rb	Retinoblastoma

RMS	Rhabdomyosarcoma
SANT	SWI3, ADA2, N-CoR, TFIIB DNS-kötő domén
SCC	Squamous cell carcinoma / laphámsejtes carcinoma
SET	Su(var)3–9, Enhancer of zeste, Trithorax – (C-terminális domén metiltransferáz aktivitással)
STMN	Stathmin-1 microtubulus-destabilizáló foszfoprotein
SUZ12	Suppressor of zeste 12
TEM	Tuboendometrioid metaplasia
TCGA	The Cancer Genome Atlas / Rákgenom Atlasz
T-ALL	T-sejtes akut lymphoblastos leukémia
UCS	Uterine carcinosarcoma / méhtest carcinosarcoma
WHO	World Health Organization / Egészségügyi Világszervezet

I. BEVEZETÉS

I.1. Általános bevezető

A nőgyógyászat az egyik olyan sajátos szakterülete a patológiának, ahol az immunhisztokémiai vizsgálatoknak kiemelt szerepe van a különböző kórállapotok (reaktív elváltozások, jóindulatú vagy rosszindulatú daganatok és rákmegelőző állapotok) diagnosztikájában. A gyakorlati életben nem ritkán immunhisztokémiai panelek alkalmazásával sikerül csupán a különböző kórképeket egymástól elkülöníteni.

A méhnyakrák és a méhnyálkahártyarák a női nemi traktus leggyakoribb rosszindulatú daganatai közé tartoznak. Mindkét daganattípus egy heterogén betegségcsoport eltérő kóroktannal, molekuláris háttérrel, kezelésre adott válaszkészséggel és kórjósággal.

Hisztomorfológiai sokszínűségük miatt az egyes daganatokon belül - valamint a két daganat esetén is - átfedő morfológiával találkozhatunk, melyek a mindennapi patológiai gyakorlatban diagnosztikai kihívásokat jelentenek a pontos diagnózis felállításánál.

Az EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) gén számos humán daganat kialakulásáért és progressziójáért felelős. Fokozott expresszióját hematológiai daganatok (pl. lymphomák) mellett többféle rosszindulatú hámdaganatban (orrgarat, emlő, tüdő, gyomor, vastagbél, máj, hasnyálmirigy, máj, pajzsmirigy, prostata, húgyhólyag, petefészek, méhtest, méhnyak) is kimutatták. Bizonyították fokozott expressziójának összefüggését a daganatok agresszív klinikai viselkedésével is. Mindezek következtében az EZH2 onkológiai diagnosztikus és prognosztikus fontosságú marker egyaránt lehet.

Az EZH2 élettani szerepe a női reproduktív szervek vonatkozásában nem teljesen tisztázott. A nőgyógyászati tumorokat tekintve az EZH2 fokozott expresszióját írták le méhnyak laphámrákban, méhnyálkahártya és petefészek daganatokban. Ezzel szemben méhnyak mirigyhámrák, illetve az endometrium daganatai közül carcinosarcomára vonatkozóan irodalmi adatokat nem találtunk.

Jelen dolgozat célja az EZH2 immunhisztokémiai marker diagnosztikai alkalmazhatóságának és jelentőségének elemzése volt nőgyógyászati szövettani mintákon, beleértve a méhnyak adenocarcinomáit és a méhnyálkahártya carcinosarcomáit.

I.2. A méhnyak rosszindulatú mirigyhám daganatai

A méhnyakrák világszerte a nők negyedik leggyakoribb daganatos megbetegedése [1]. Az esetek 70%-a laphámsejtes carcinoma (squamous cell carcinoma, SCC), mely szinte mindig összefügg a humán papillomavírussal (HPV). A legtöbb fejlett országban a nemzeti szűrő és védőoltási programoknak köszönhetően előfordulása csökkent az elmúlt néhány évtizedben [2]. Az endocervicalis adenocarcinoma (ECA) előfordulása a laphámcarcinomához képest ritkább (20-25%) [3], klinikailag azonban rosszabb kórjósággal, szövettanilag nagyobb heterogenitással jellemezhető [4]. A cervicalis laphámrákos esetekkel szemben a mirigyhámrákos új megbetegedések gyakorisága a fejlett országokban - a szűrőprogramok ellenére - növekedést mutat, elsősorban a fiatal, 55 év alatti korosztályban [2]. A legtöbb invazív endocervicalis mirigyrák HPV-asszociált (HPVA ECA). A daganatból főként a HPV16, 18 és 45 altípusai mutathatók ki, bár egyes epidemiológiai megfigyelések alapján a HPV18-as fertőzés mellett a leggyakoribb [2][5]. A magas onkogén kockázatú HPV-fertőzéshez társuló laphámrákokkal szemben a mirigyhámrákok egy jelentős százalékának (10-15%) kialakulásában azonban a HPV, mint kóroki tényező nem játszik szerepet, így ezen daganatcsoport kiemelkedő klinikai jelentőséggel bír [6]. Ez utóbbiak rosszabb prognózisúak a HPVA adenocarcinomákhoz képest, nemcsak a méhnyak, de egyéb HPV-fertőzésre hajlamos szervterületek vonatkozásában is, mint a szeméremtest és a szájgarat [7][8][9]. A méhnyaki mirigyhámdaganatok kockázati tényezői a laphám-tumorkéhoz hasonlóak. Közéjük sorolhatók a több szexuális partner, orális fogamzásgátlók hosszantartó (10 év <) alkalmazása, hormonpótló terápia és az elhízás [10].

A méhnyak adenocarcinómája átlagosan 50 éves korban fordul elő, gyakran hüvelyi vérzéssel jelentkezik [2]. A legtöbb ECA az átmeneti zónában alakul ki, kisebb részük a nyakcsatorna proximálisabb részén és az alsó méhszegmens szomszédságában jelenik meg.

Makroszkóposan exophyticus (polipoid, papillaris, nodularis) vagy kifelélyesedő lézió. Ritka esetben ún. „hordócervixet” képez a méhnyak falának megvastagodásával. Korai stádiumban, mikor a daganat kizárólag a nyakcsatornára lokalizálódik, a klinikai szűrővizsgálatok során észrevétlen maradhat.

A méhnyaki mirigyhámrákok csoportja több különböző rosszindulatú daganatot foglal magába, melyek morfológiailag is igen sokszínűek, legtöbbjük különböző sejttípusok és -

mintázatok keverékét mutatja. Biológiai viselkedésük, gyakoriságuk is változatos. Osztályozásuk az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) rendszere szerinti leíró, elsősorban morfológiai tulajdonságaikon, különösen a cytoplasmaticus jellemzőkön alapuló, amelyeket hematoxilín-eozin (H&E) festéssel értékelnek. A WHO a korábbi, negyedik kiadásában (2014) több mint 10 ECA típust különböztetett meg, azok klinikai viselkedése, biológiai jellemzői és kezelési eredményei alapján (**1. táblázat**). A mucinosus kategória magában foglalta az intestinalis típusú, a pecsétgyűrűsejtes és a „nem meghatározott” (NOS) altípusokat, melyek mindegyike lehet HPV függő és független egyaránt. Ide tartoznak a minden esetben nem HPV asszociált gastricus típusú (GAS) ECA-k. Az endometrioid carcinomát kizárólag morfológiai megjelenése alapján diagnosztizálták, emiatt a valódi endometrioid adenocarcinomákat nehéz volt megkülönböztetni a HPV asszociált nem mucinosus adenocarcinomáktól, hisz a két daganattípus eltérő entitás. Előbbi a méhnyak vagy méhtest endometriosisából, utóbbi magas kockázatú HPV fertőzésből ered [2]. A fenti osztályozási rendszer a mindennapi gyakorlatban nehezen volt alkalmazható, kellő reprodukálhatóság, klinikai és/vagy patogenetikai jelentőségének hiánya miatt, mely korlátozta a betegek kezelését. Ennek a klinikai gyakorlati hiányosságnak a kiküszöbölésére a nőgyógyászati patológia nemzetközi szakértőiből álló bizottság több mint 400 ECA esetet vizsgált meg egy új besorolás, a Nemzetközi Endocervicalis Adenocarcinoma Kritérium és Osztályozási rendszer (International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification, IECC) kidolgozása érdekében, amely magában foglalja a tumormorfológia, a HPV tesztelés (HPVA/NHPVA), valamint immunhisztokémiai panelek (p16, p53, PR, vimentin) használatát a klinikum függvényében [6]. Később a WHO a női nemi szervek daganatait az új hisztomorfológiai- és különösen a molekuláris patológiai adatok miatt felülvizsgálta, így a jelenlegi, 2020-as WHO osztályozás már elsősorban új (molekuláris) patológiai adatok alapján épül fel [11][12]. A WHO nagymértékben elfogadta a 2018-as IECC-t [13][14]) (**1. táblázat**), amely a 2021-ben felülvizsgált cervicalis carcinoma interdiszciplináris S3-irányelvében is szerepel [15][16].

A WHO a női nemi szervek daganatainak 2020-as osztályozásában a méhnyak mirigyhámsejtes carcinomáit etiológiájuk és klinikai viselkedésük alapján humán papillomavírussal asszociált (**HPVA**) és HPV-független (non-HPV-associated/HPV independent adenocarcinoma, **NHPVA/HPVI**) csoportba sorolja.

1. táblázat: Az endocervicalis adenocarcinomák besorolása a WHO 2014 és az IECC 2018/WHO 2020 osztályozási rendszer szerint

1,*IECC 2018/WHO 2020		WHO 2014
Fő csoportok	Típusok	Típusok
1. ² HPVA ECA	Szokványos	1. Szokványos
	Szokványos - villoglandularis	2. Villoglandularis
	Mucinosus, ⁴ NOS	3. Mucinosus, NOS
	Mucinosus, intestinalis	4. Mucinosus, intestinalis
	Mucinosus, pecsétgyűrűsejtes	5. Mucinosus, pecsétgyűrűsejtes
	⁵ i-SMILE	
	*Adenosquamosus	
	*Mucoepidermoid	
	*Adenoid basalsejtes	
2. ³ NHPVA ECA, Gyomor típusú	6. Mucinosus, gastricus	
3. NHPVA ECA, Világossejtes	7. Világossejtes	
4. NHPVA ECA, Mesonephricus	8. Mesonephricus	
5. NHPVA ECA, Endometrioid	9. Endometrioid	
**6. NHPVA ECA, Serosus	10. Serosus	
7. Invazív adenocarcinoma, NOS	11. Invazív adenocarcinoma, NOS	
***Micropapillaris variáns		
¹ International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification/Nemzetközi Endocervicalis Adenocarcinoma Kritérium és Osztályozási rendszer; ² Humán papillomavírus-asszociált endocervicalis adenocarcinoma; ³ Non-HPV-associated/Humán papillomavírustól független endocervicalis adenocarcinoma; ⁴ Not otherwise specified/másként nem meghatározható; ⁵ (Invasive) stratified mucin-producing carcinoma/(invazív) rétegzett mucintermelő adenocarcinoma; * Új entitások a WHO 2020 szerint; ** IECC és WHO 2014 szerinti ECA típusok [12], a WHO 2020 már nem tartalmazza; *** Újabb vizsgálatok alapján [17] bármely ECA rendelkezhet micropapillaris variánssal.		

A **HPVA ECA**-kat a tumorsejtek cytoplasmájában azonosítható nyák mennyisége szerint tovább osztályozták:

A **szokványos típusú** invazív adenocarcinoma esetén az intracytoplasmaticus mucin aránya 0-50%. E típus messzemenően a leggyakoribb (75-80%) ECA, nagyon jellegzetes szöveti képpel [6][16]. Rákmegelőző állapota a szokványos típusú *in situ* adenocarcinoma (adenocarcinoma *in situ*, AIS). Korábban a sejtek cytoplasmájában azonosítható nyák mennyisége szerint két

szubtypusát különítették el, az endocervicalis (mucint tartalmazó) és az endometrioid (mucint nem tartalmazó) altípust.

Az intracytoplasmaticus mucin hiánya, a „pseudoendometrioid” morfológia differenciáldiagnosztikai problémát okoz. Ugyanis nehéz elkülöníteni a méhnyak és méhtest valódi endometrioid carcinomájától.

A szokványos típus a daganatsejtek szerkezeti mintázata alapján **villoglandularis** (exophytikus hosszú, keskeny papillák) mintázattal rendelkezhet. Továbbá, előfordulhat **micropapillaris** (kis, szorosan összefüggő sejtcsoportok) variánsa is, igaz, e mintázat bármely ECA-ban jelentkezhets. A micropapillaris komponens rossz prognózissal társul, ezért fontos a megkülönböztetése [17].

Endometrium vagy petefészek serosus carcinómára emlékeztető morfológia szintén előfordulhat, mely kihívást jelent a metastaticus carcinomáktól való elkülönítésben.

Ritkán benignus laphám elemek is megjelenhetnek a daganatban, ami ugyancsak megnehezíti megkülönböztetésüket pl. az adenosquamosus carcinomától vagy a méhtest laphám differenciálódású endometrioid adenocarcinomájától.

A **mucinosus típusú** ECA esetén $\geq 50\%$ a H&E festéssel értékelhető intracytoplasmaticus nyák aránya, cytomorfológiailag szokványos típusúak. Három variánsa, a mucinosus, a másként nem meghatározható (not otherwise specified, **NOS**), az **intestinalis** (kehelysejtes) és a **pecsétgyűrűsejtes ECA**. Ezen daganattípusok a szokványosokhoz képest valószínűleg rosszabb túléléssel társulnak, ezért fontos az elkülönítésük [18].

Az **invazív rétegzett mucintermelő carcinoma** (invasive stratified mucin-producing carcinoma, **i-SMILE/ISMC**) az endocervicalis adenocarcinomák agresszív típusát képviseli, az összes méhnyakrák kevesebb mint 1%-a [19][20]. Morfológiailag oszlopos sejtek invazív fészkei jellemzők rá széli palizációval, változó mennyiségű intracytoplasmaticus mucinnal. Rák megelőző állapotát, a rétegzett mucint termelő intraepithelialis léziót (SMILE), először 2000-ben Park és munkatársai írták le [21]. Szöveti képében átfedést mutat a magas fokú laphám intraepithelialis lézióval (high grade squamous intraepithelial lesion, HSIL) és az *in situ* adenocarcinomával. Gyakran társul HSIL-lel, AIS-sel és laphámsejtes carcinomával.

A WHO 2020 új entitásai az **adenosquamosus** és **mucoepidermoid carcinomák**. Ezen típusok laphámsejtes és mirigyes differenciációt egyaránt mutatnak, a méhnyak tumorok 5-6%-át alkotják [12]. Magas onkogén kockázatú HPV16 és 18 infekcióval társulnak. Korábban rosszabb prognózist feltételeztek, de a jelenlegi tanulmányok szerint a többi méhnyak mirigyhám daganathoz hasonló kimenetelűek [22].

Az **adenoid basalsejtes carcinoma** szintén új HPV ECA típus. Magas onkogén kockázatú HPV-vel összefüggő daganat, mely egyaránt tartalmazhat egy alacsony fokú adenoid basalis daganatot, amelyet epitheliomának nevezhetünk, és különböző típusú invazív carcinomákat. E kevert daganatot el kell különíteni az adenoid basalis hyperplasiától és a rezerv sejtes eredetű nem neoplasticus lézióktól, melyek HPV és p16 negatívak.

Az **NHPVA/HPVI adenocarcinomák** az összes ECA körülbelül 15%-át teszik ki a legtöbb nyugati országban. Előfordulásuk Kelet-Ázsiában magasabb lehet az ebben a régióban viszonylag gyakori gyomor típusú ECA miatt [18]. Ide tartoznak a gyomor típusú, világossejtes, mesonephricus és endometroid ECA-k. Rákmegelőző elváltozások a gyomor típusú daganatokhoz köthetők csupán, melyek a lobularis endocervicalis glandularis hyperplasia (LEGH) – különösen annak atípusos formája -, és a gyomor típusú *in situ* adenocarcinoma (gastric-type adenocarcinoma *in situ*, gAIS). A többi típusnak nincs azonosított prekursor léziója.

A **gyomor típusú ECA** (gastric-type endocervical adenocarcinoma, GAS) világszerte a leggyakoribb NHPVA variáns, kivéve Japánt, ahol a második leggyakoribb (>20%) endocervicalis mirigyrák [2][23]. E daganatok különböző morfológiájúak lehetnek, cytomorfológiailag és immunhisztokémiai szempontból is más, főként pancreatobiliaris eredetű (pancreaticus ductalis carcinoma, cholangiocarcinoma) neoplasiákat utánozhatnak. Extrémén jól differenciált variánsa a korábban adenoma malignumként ismert minimális eltérésű adenocarcinoma (minimal deviation adenocarcinoma, MDA), melyet először Gusserow írt le 1870-ben [24]. Nehéz elkülöníteni őket a benignus glandularis lézióktól (mely Naboth-cysta, endocervicalis glandularis hyperplasia), különösen a kis biopsiás mintákon. A gyomor típusú daganatformák kilakulásának hátterében álló molekuláris mechanizmusokat jelenleg is kutatják. Gyakoribb előfordulásukat Peutz-Jeghers szindrómás betegek körében (11-17%) is megfigyelték [25][26].

A **világossejtes típusú ECA** a méhnyak mirigyhámrákok mindössze ~4%-át teszi ki [18]. Korábbi megfigyelések szerint *in utero* dietilstilbestrol hatásnak kitett fiatal nőkben fordult elő. Manapság ezek az esetek ritkák [27]. Cytomorfológiailag (világos/eosinophil cytoplasmájú daganatsejtek) utánozhatnak gyomor típusú adenocarcinomákat, benignus mirigyhámleziók közül Arias-Stella reakciót vagy microglandularis hyperplasiát.

A **mesonephricus ECA** nagyon ritka (<1%) [6]. E daganattípus többféle növekedési mintázat variációit (solid, ductalis, papillaris, tubularis, glomeruloid, ivarléc-szerű, sarcomatoid) mutathatja. Szövettani jellegzetessége a mesonephricus maradványokra emlékeztető intraluminális eosinophil kolloidszerű anyag. Az endometrioid, serosus, világossejtes vagy a szokványos típusú HPVA daganatoktól való elkülönítését kiegészítő vizsgálatok (HPV teszt, immunhisztokémiai vizsgálat) segítik. Hisztológiai képe a florid mesonephricus hyperplasiát is utánozhatja. Differenciáldiagnózisát utóbbiaktól is molekuláris vizsgálatok segítik. Friss tanulmányok Kirsten patkány sarcoma vírus onkogén homológ (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, KRAS) mutációt bizonyítottak a legtöbb ilyen ECA-ban [28][29].

Az **endometrioid típusú ECA** a méhnyak egy nagyon ritka (<1%) elsődleges daganata, mely nagy valószínűséggel endometriosis háttérében alakul ki. Diagnózisának felállításakor körültekintően kell eljárni, könnyen félrediaosztizálható a primer, humán papillomavírushoz asszociált szokványos típusú ECA-val. A hisztopatológiai vizsgálat során a diagnózisához ún. „megerősítő jeleket” (pl. endometriosis jelenléte) szükséges észlelni. Emellett HPV tipizálás és immunhisztokémiai markerek nyújthatnak segítséget a megkülönböztetésükben. Bizonyos esetekben a méhnyakra terjedő méhtest és petefészek eredetű endometrioid adenocarcinoma lehetőségének klinikai kizárása is szükségessé válhat.

A **serosus ECA, mint NHPVA típus az IECC/WHO 2014 osztályozási rendszerben még megtalálható, a 2020-as WHO beosztás már nem tartalmazza.** Jelen állásfoglalás szerint ezen formák metastaticus serosus malignitások [6][11][14][18].

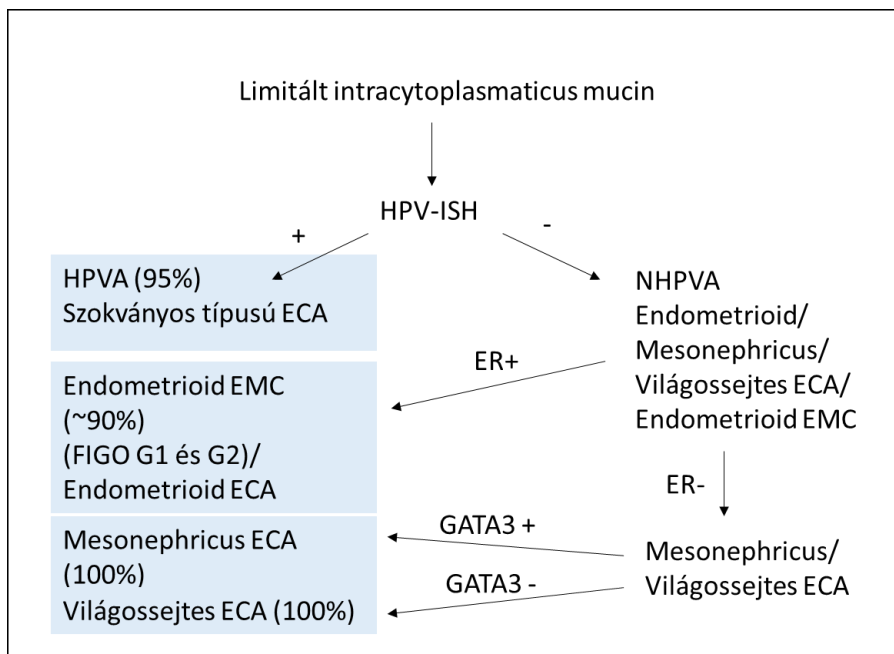
Az **invazív adenokarcinoma NOS** azon nagyon ritka rosszindulatú daganatokra alkalmazott kategória, melyek morfológiailag egyik csoportba sem sorolhatók. A kevés rendelkezésre álló adat szerint legtöbb esetben HPV asszociáltak és *blokk* típusú p16 pozitívitás jellemzi. Differenciáldiagnosztikájukat a HPVA és NHPVA ECA-kon kívül a laphámsejtes és

adenosquamosus carcinoma képezi még. Az utóbbi esetén a két malignus komponenst (laphám és mirigyhám) a H&E festett metszeteken fel kell ismerni.

Diagnosztikai algoritmusok:

Az Egyesült Államok és Kanadai Patológiai Akadémia (USCAP) 2020-as találkozóján az endocervicalis adenocarcinomák osztályozására vonatkozó ajánlások [18] szerint a diagnózishoz szükséges kiegészítő vizsgálatokat (pl. p16 immunhisztokémiai marker) nem szükséges rutinszerűen végrehajtani, mivel a morfológia szorosan összefügg a HPV státusszal. Nehezen eldönthető esetekben, a diagnosztikai algoritmus a cytoplasmában kimutatható nyák mennyiségén alapul, valamint kiegészítő vizsgálatok (pl. HPV-teszt, p16 és GATA3 immunhisztokémia) hasznosak lehetnek a különböző szövettani variánsok és utánpótlásuk differenciáldiagnosztikájában (**1-2. ábra**) [30]. Az RNS-alapú *in situ* hibridizáció (ISH) magas kockázatú HPV esetén nagyobb érzékenységet és fajlagosságot mutat, mint a HPV DNS polimeráz láncreakció (polimerase chain reaction, PCR) [31]. A HPVA ECA-k identifikálásában az RNS alapú ISH-nak a p16-hoz képest kiváló a szenzitivitása, specificitása, továbbá a pozitív és negatív prediktív értéke [6].

A HPVA és NHPVA ECA és az endometrioid endometrium carcinoma (EMC) immunfenotípusára vonatkozó folyóiratokban leírt adatok felhasználhatók diagnosztikai algoritmusok megalkotására [18][30][32][33] (**1-2. ábra**, Stolnicu és munkatársai 2019-es közleménye [30] nyomán).



1. ábra: Az endocervicalis adenocarcinómák immunhisztokémiai algoritmusának minimális mennyiségű intracytoplasmaticus nyák esetén (Stolnicu és mtsai. 2019-es közleménye [30] nyomán)

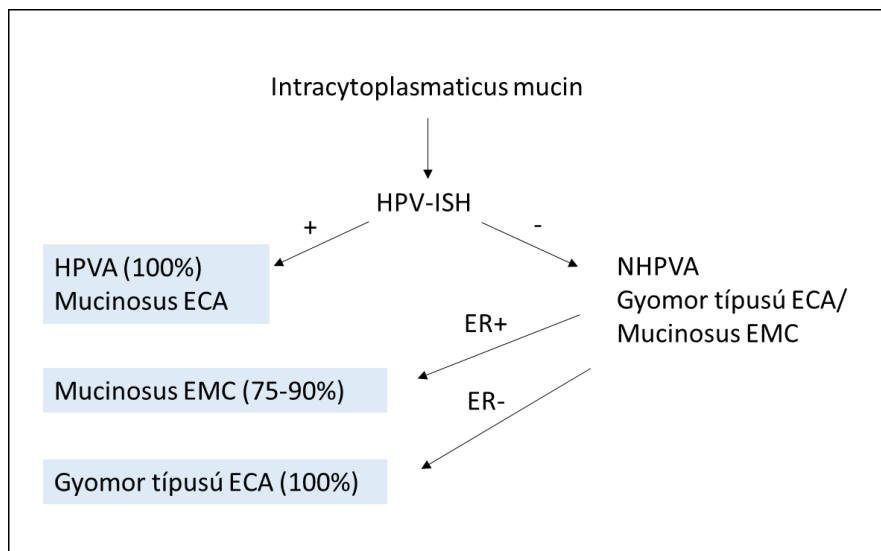
A humán papillomavírus *in situ* hibridizációja (HPV-ISH) és a hormonreceptor IHC vizsgálatok hasznosak a méhnyak és méhnyálkahártya mirigyrákok megkülönböztetésére.

Limitált cytoplasmában lévő nyák esetén (**1. ábra**) a magas kockázatú HPV-ISH 95%-os pontossággal választja el a HPVA szokványos típusú adenocarcinómát az endometrioid EMC-től és az NHPVA endometrioid, mesonephricus és a világossejtes típusú ECA-któl. Az ösztrogén receptor (estrogen receptor, ER) expressziója, mely nagyon ritkán látható mesonephricus és világossejtes carcinómákban, ~90%-os pontossággal elkülöníti a FIGO beosztás szerinti mirigyesen jól (*Grade 1*) és közepesen (*Grade 2*) differenciált EMC-t az NHPVA mesonephricus és világossejtes ECA-któl. Noha a GATA3 kötő fehérjéről kevés adat áll rendelkezésre, az eddigi tanulmányok szerint szinte 100%-ban megbízható marker a mesonephricus léziók differenciáldiagnosztikájában. Míg a mesonephricus ECA esetek kb. 96%-a mutat GATA3 pozitivitást [34], addig a világossejtes típusú daganatok általában GATA3 negatívak [18].

A HPV-ISH mellett az IHC vizsgálatok segítenek elkülöníteni a HPVA szokványos típusú ECA-t az EMC-től. Előbbinél a p16 marker szinte mindig diffúz pozitivitást mutat, utóbbinál

jelölődése foltos vagy negatív [18]. Az endometrioid EMC-vel szemben a szokványos ECA általában ER, progesteron receptor (PR) és vimentin negatív, carcinoembryonalis antigén (CEA) pozitív [18].

Leginkább problematikus terület az extrém ritka NHPVA endometrioid típusú ECA megkülönböztetése a méhnyálkahártya eredetű endometrioid adenocarcinomától, ugyanis mindkét daganat HPV negatív és immunprofiljuk is hasonló, mindkettőt ER, PR, vimentin, CK7 és „paired box” 8 (PAX8) pozitivitás jellemzi. A p16 marker segíthet, mely a méhtest eredetű endometrioid carcinoma esetén foltos pozitivitást mutat, a cervix eredetű pedig általában p16 negatív, de előfordulhat ún. *blokk* típusú festődés is. Ilyen esetekben nélkülözhetetlen a klinikai, radiológiai és makroszkópos jellemzők közti összefüggések értelmezése, mivel a kezelés nagymértékben függ a daganat származási helytől.



2. ábra: Az endocervicalis adenocarcinomák immunhisztokémiai algoritmusá egyértelmű intracytoplasmaticus nyák esetén (Stolnicu és mtsai. 2019-es közleménye [30] nyomán)

Az ECA-k sokszínűsége miatt a HPV-asszociált és a HPV-független formák közötti különbségtétel jelentős klinikai következményekkel jár. Tanulmányok igazolják, hogy a HPV-független méhnyak mirigyhám daganatokban szenvedő betegek esetén a teljes túlélés (overall survival, OS), a betegségmentes túlélés (disease-free survival, DFS) és a progressziómentes túlélés (progression-free survival, PFS) szignifikánsan kedvezőtlenebb, mint a HPV-vel

összefüggésbe hozható rákos megbetegedésben szenvedő társaiké [14][35]. Ezen kívül az NHPVA ECA-k eltérő és szokatlan növekedési mintázatokkal rendelkeznek és máshogy reagálnak az onkológiai kezelésre. Az a tény, hogy egyes méhnyak mirigyrákok HPV-függetlenek, fontosak a HPV-oltási stratégiák és szűrőprogramok szempontjából. Mivel a HPVA és NHPVA endocervicalis adenocarcinomák molekuláris mozgatórugói eltérőek, feltétlenül ismerni kell egyedi tulajdonságaikat. További klinikai kísérletek, genomikai vizsgálatok és célzott terápiák által remélhetőleg még inkább értelmezhetőbbé válnak ezen ritka daganatok és variánsaik.

I.3. A méhnyak jóindulatú mirigyhám elváltozásai

A méhnyak sejtjei rendkívül változatos olyan reaktív sejteltéréseket mutathatnak, melyek nem specifikusak, azonban rosszindulatú neoplastikus sejteltérézéseket imitálnak vagy együttes előfordulás esetén elfedik azokat. Immunhisztokémiai vizsgálatokkal is csak korlátozott mértékben különböztethetők meg egymástól különösen biopsiás mintákban. A méhnyak mirigyek WHO 2020 osztályozási rendszere szerinti jóindulatú elváltozásait és az általuk utánozott rosszindulatú kórképeket a **2. táblázat** tartalmazza [12]. A táblázatban szereplő entitások között található néhány olyan elváltozás, melyekkel leginkább a nőgyógyászati és/vagy férfi urogenitalis patológiában szakavatottak találkoznak ritkaságuknál fogva, például a méhnyak mülleri papillomája, a diffúz laminaris endocervicalis hyperplasia, a mesonephricus maradvány és hyperplasia, az endocervicosis és az ectopiás prostata szövet.

2. táblázat: A méhnyak mirigyek WHO 2020 osztályozási rendszere szerinti jóindulatú elváltozásai és az általuk utánczott malignus kórképek

Benignus glandularis léziók	Imitált malignus léziók
Endocervicalis polip	Adenosarcoma
Tuboendometrioid metaplasia	¹ AIS
	Endometrioid ² EMC
Naboth cysta	³ MDA / <i>Adenoma malignum</i>
Alagút csoport (<i>Tunnel cluster</i>)	MDA
	⁴ HPVA ECA - Szokványos típus
	Endocervicalis AIS
Microglandularis hyperplasia	Endometrioid / Mucinosus EMC
	Világossejtes ECA
	HPVA ECA - Szokványos típus
	Endocervicalis AIS
Arias-Stella reakció	Világossejtes ECA
	Méh serosus papillaris carcinoma
	HPVA ECA
Lobularis endocervicalis glandularis hyperplasia	MDA
	Gyomor típusú ECA
	⁵ gAIS
Mülleri papilloma	Botryoid rhabdomyosarcoma
	AIS
Endocervicosis	MDA
	Urothelialis adenocarcinoma
Diffúz laminaris endocervicalis hyperplasia	MDA
Mesonephricus maradvány és hyperplasia	Mesonephricus ECA
	Világossejtes ECA
	MDA
Ectopiás prostata szövet	AIS

¹Adenocarcinoma *in situ*; ²Endometrium carcinoma; ³Minimal deviation adenocarcinoma/minimális eltérésű adenocarcinoma; ⁴Humán papillomavírus-asszociált endocervicalis adenocarcinoma; ⁵Gastric-type adenocarcinoma *in situ*/gyomor típusú *in situ* adenocarcinoma.

A méhnyak polipok esetében - főként azok felszíni hámszövetében - nagy gyakorisággal észlelhetők erosio, gyulladás okozta sejtmag eltérések és metaplasticus elváltozások, ennél fogva adenocarcinómát imitálhatnak [36]. A reaktív endocervicalis mirigyhámsejtekben gyakori jelenség a sejtmagok megnagyobbodása és megsokszorozódása, valamint a petevezető mirigyhámsejtjeire emlékeztető metaplasticus elváltozás csillószerű megjelenésével (tubalis/tuboendometrioid metaplasia). A tubalis/tuboendometrioid metaplasziát az *in situ* adenocarcinómával és a méhtest endometrioid adenocarcinómával lehet összetéveszteni [37]. Leginkább resectumokban azonosíthatók alagút csoportok (*tunnel clusterek*), illetve az átmeneti zóna szintjében a stromába mélyen benyúló mirigyek formájában megjelenő Naboth cysták, melyek elsősorban jól differenciált gyomor típusú endocervicalis adenocarcinómát, másnéven a korábban *adenoma malignum*ként ismert minimális eltérésű adenocarcinómát utánozhatnak [37]. A microglandularis hyperplasia (MGH) egy jóindulatú endocervicalis mirigyproliferáció, mely általában premenopauzális nők mintáiban fordul elő, ezen kívül várandóssághoz vagy progeszteron kezeléshez köthető. Posztmenopauzális nők endometrioid EMC-je hasonló szöveti képpel járhat. Ritkán ECA felszíni vagy széli részének szöveti képe utánozhatja. Az MGH és EMC elkülönítésében a p63, valamint a foszfatáz és tenzin homológ (phosphatase and tensin homolog, PTEN) immunhisztokémiai markerek nyújtanak segítséget [38][39][18]. Ugyancsak várandósság, vagy progeszteronnal kezelték, továbbá terhességi trophoblastos betegségben szenvedők esetében differenciáldiagnosztikai szempontból jelentős benignus mirigyhámelváltozás az Arias-Stella reakció, melyet többek között a világossejtes ECA-tól kell megkülönböztetni [18][40]. A lobularis endocervicalis hyperplasia elsősorban a nyakcsatorna felső, felszínes részére lokalizált metaplasticus elváltozás, melynek sejtjei gyomor (pylorus) típusú differenciálódásúak, így elsődleges differenciáldiagnózisa a jól differenciált gyomor típusú ECA/MDA. A ritkaságnak számító entitások közül a méhnyak Mülleri papilloma főként prepubertáskorban előforduló jóindulatú tumor, mely botryoid rhabdomyosarcomát és méhnyak AIS-t utánozhat [41]. Az endocervicosis a Müller-cső eredetű elváltozások közül a legritkább. Elsőként húgyhólyagban írták le, a méhnyakban kevésbé fordul elő. Feltételezések szerint a kismedencei hashártyából vagy retroperitoneumból ered. Ezen pseudoneoplastikus mirigyes elváltozást jóindulatú mucinosus endocervicalis típusú hámmal bélelt, egyenetlen elrendezésű, gyakran cysticusan tágult mirigyek jellemzik, melyek a méhnyak falán keresztül a környező szövetre terjednek. Fontos elkülöníteni a malignus kórképektől, mint az MDA és az urothelialis adenocarcinoma [42]. A diffúz laminaris

endocervicalis hyperplasia ugyancsak MDA-t [43], a mesonephricus maradvány és hyperplasia mesonephricus és világosejtes ECA-t, továbbá MDA-t is utánozhatnak [18]. A méhnyaki ectopiás prostata szövetet elsőként 1997-ben írták le, melyet szitaszerű (cribriform) és kesztyűujjszerű (papillaris) mintázatú benignus dűlmirigy csoportok alkotnak. Immunhisztokémiai vizsgálat során prostata specifikus antigén és prostata specifikus savas foszfatáz, újabb megfigyelések alapján NKX3.1 pozitivitást mutatnak. A cervix *in situ* adenocarcinomájával téveszthető össze [44].

Egy tanulmány szerint a PAX2 immunreaktivitás hasznos marker lehet a mesonephricus hyperplasia és a lobularis endocervicalis mirigy hyperplasia MDA-tól való megkülönböztetésére, és a tubalis metaplasia endocervicalis AIS-tól való elkülönítésére.

Összességében a diffúz, erős nuclearis PAX2 expressziós mintázat a méhnyak mirigy proliferációkban jóindulatú diagnózist jelez [37].

I.4. Méhnyálkahártya daganatok és az carcinosarcoma

A méhnyálkahártyarák az invazív nőgyógyászati rosszindulatú daganatok leggyakoribb formája, az Egyesült Államokban az összes női rosszindulatú daganatos megbetegedés sorában a negyedik helyet foglalja el, a nők daganatos halálzásának hatodik leggyakoribb oka, világszerte növekvő incidenciával és halálzással [12][45][46][47]. A legtöbb forma sporadikus, becslések szerint 5%-a örökletes csupán, leggyakrabban Lynch-szindrómával társul [48]. A daganat vonatkozásában bizonyítékokon alapuló szűrési lehetőségek nem állnak rendelkezésre.

Etiológia és klinikai jellemzők alapján az EMC-eket 1983 óta a mai napig két különböző, I-es és II-es típusba sorolják. Ez az epidemiológiai megfigyeléseken alapuló felosztás, mint a méhtestrák Bokhman-féle klasszifikációja ismeretes [49]. A két patogenetikai csoporthoz a daganat egyes szövettani típusai a későbbiekben lettek hozzárendelve. Az I-es típusú endometriumrák a gyakoribb (70-80%), hátterében ellensúlyozatlan ösztrogén hatás áll. Szövettanilag ebbe a csoportba sorolandók a jól differenciált, alacsony fokú (*Grade* 1 és 2) endometrioid EMC-k. Rákmegelőző állapotaik az endometrialis hyperplasiák atípiá nélkül vagy

atípiával (endometrium atípusos hyperplasia, EAH; másnéven endometrium intraepithelialis neoplasia, EIN). A II-es típusú EMC klinikailag ritkább, ugyanakkor agresszívebb, "de novo" kialakuló forma. Ebbe a típusba tartoznak a magas grádusú daganatok, mint a *Grade 3* endometrioid EMC, a savós, világossejtes, differenciálatlan carcinoma és a carcinosarcoma [50][51].

A legtöbb méhnyálkahártyarák korai stádiumban kerül felismerésre, kórjóslatuk ezáltal kedvező. Az esetek egy részében azonban előfordul, hogy alacsony grádus és stádium ellenére a követés során lokoregionális daganatkiújulás (4-7%) vagy távoli áttétek (7-17%) kerülnek észrevételre. A megfigyelések azt mutatják, hogy az I-es típusú méhnyálkahártyarákban szenvedő nők ~20%-ánál tapasztalható visszaesés, míg a II-es típusú EMC esetén a betegek felénél figyelhető meg daganatkiújulás vagy progresszió. Az összes méhnyálkahártya daganatos eset hozzávetőlegesen 20%-a halálos kimenetelű. A legfontosabb kórjóslati faktorok a daganatstádium, a szövettani típus, a grádus, az invázió mélysége a méh simaizomzatában, további megfigyelések szerint a vér- és nyirokér érintettség és a daganat hormonreceptor státusza egyaránt meghatározó [52].

Még 2013-ban, a Rákgenom Atlasz (The Cancer Genome Atlas, TCGA) program keretében megtörtént az endometriumrákok genomikai jellemzése, lehetővé téve az objektívebb és reprodukálhatóbb klasszifikációjukat. Az eredmények alapján a méhnyálkahártyarákok négy molekuláris altípusba sorolhatók: (1) Polimeráz epsilon exonukleáz domén ultramutált (*POLEmut*) formák; (2) hipermutált rákok mismatch repair deficienciával (MMRd) és mikroszatellita instabilitással (MSI); (3) nem specifikus molekuláris profilú (NSMP) csoport, ide tartoznak az alacsony mutációs rátájú daganatok alacsony DNS-kópiaszám rendellenességgel, melyek vad típusú p53 immunoreaktivitást mutatnak (p53wt) (4) rendellenes (abnormális) p53 immunfestődésű/TP53 mutációs (p53abn), vagy másnéven serosus-szerű csoport, melybe az alacsony mutációs rátájú, magas gyakoriságú DNS-kópiaszám rendellenességgel jellemezhető endometriumrákok tartoznak. A *POLE* ultramutált fenotípus és a mikroszatellita instabilitás kedvezőbb prognózisú betegségekhez kapcsolódik, míg a kópiaszám rendellenességekhez tartozó daganatok rossz kimenetellel járnak. A p53abn a legkedvezőtlenebb túléléssel járó molekuláris altípus, bár az endometrium carcinomák mindössze 15%-át teszi ki, ez a molekuláris altípus felelős az EMC-kel kapcsolatos mortalitás 50-70%-áért [53]. Az endometrium carcinomák 2020-ban közzétett új WHO klasszifikációja (3.

táblázat) elismeri ezen molekuláris alosztályozást. Azonban az új kiadás továbbra is morfológia alapján, az immunhisztokémia segítségével rendszerezi a daganatokat, mivel egyes molekuláris technikák világszerte továbbra sem hozzáférhetők. A biopsiás mintán alapuló morfológiai diagnózis pedig kiváló korrelációt mutat a későbbi hysterectomiás mintán alapuló molekuláris osztályozással [54][55][56]. A **3. táblázat** a hisztotípusok és molekuláris altípusok összefüggését tartalmazza. Az EMC-k többsége mind a négy molekuláris szubtypusba sorolható. A + jelek száma korrelál az egyes daganatok %-os megoszlásával (+++: >50%; ++: 10-50%; +: <10%), megmutatják, mely molekuláris alcsoportba sorolható leginkább az adott hisztotípus [12][55].

3. táblázat: Az endometrialis carcinomák besorolása a WHO 2020 klasszifikáció szerint és molekuláris alosztályozásuk

EMC hisztotípusok	Molekuláris altípusok			
	¹ POLEmut	² MMRd	³ NSMP	⁴ p53abn
Endometrioid carcinoma ⁵ Gr1-2	+	++	+++	+
Gr3	++	++	++	++
Serosus carcinoma	-	+	+	+++
Világossejtes carcinoma	+	+	+++	++
Differenciálatlan és dedifferenciált carcinomák	+	++	++	++
	++	++	++	+
Kevert carcinomák	+	++	+	+++
Más endometrialis carcinomák/ Új entitások:				
Mesonephricus adenocarcinoma	?	?	?	?
Mesonephricus-szerű adenocarcinoma	-	-	+++	-
Laphámsejtes carcinoma	?	?	?	?
Gyomor típusú mucinosus carcinoma	?	?	?	?
Carcinosarcoma	+	++	+	+++

¹Polimeráz Epsilon exonukleáz domén ultramutált; ²Mismatch repair deficienciás; ³Nem specifikus molekuláris profilú; ⁴Abnormális p53 immunfestődésű/TP53 mutációs; ⁵Grade/grádus;
*Az EMC hisztotípusok %-os megoszlása a molekuláris altípusok között: +++ = >50%; ++ = 10-50%; + = <10%; ? = nincs irodalmi adat róla

Az endometrioid carcinoma messze a leggyakrabban előforduló rosszindulatú hám eredetű méhdaganat. Jellemzően atípusos hyperplasia háttérben alakul ki. Az alacsonyabb fokú (Grade 1-2) endometrioid EMC-k leggyakoribb molekuláris szubtypusa az NSMP, a magas fokú

(Grade 3) daganatok többsége az MMRd csoportba tartozik. A serosus carcinoma a második leggyakoribb méhnyálkahártyarák, az esetek ~10%-át teszi ki. Túlnyomórészt a p53abn/serosus altípusba tartozik. A világossejtes carcinoma ritka hisztotípus, a pontatlan diagnosztikai kritériumok miatt pontos gyakorisága nem ismert, az endometrium carcinomák <10%-át (valószínűleg ~2%) alkotja. Bármelyik molekuláris szubtípusba tartozhatnak, döntően a nem specifikus molekuláris profilú csoport tagjai. A differenciálatlan és dedifferenciált carcinomák klinikailag agresszív EMC hisztotípusok. Ezen hámdaganatok nem mutatnak specifikus származási differenciációt, leggyakoribb molekuláris altípusuk az MMRd, előbbiek 37%-a, utóbbiak 43%-a sorolható ide. A „kevert méhtest carcinoma” elnevezés akkor alkalmazandó, ha két különálló szövettani típus azonosítható, melyek közül legalább az egyik serosus vagy világossejtes. A WHO új kiadása szigorúan támogatja, hogy mindkét komponens egyértelműen endometrialis carcinoma különböző hisztotípusa legyen, melyeknek morfológiailag és immunhisztokémiaileg is különbözniük kell. A dedifferenciált EMC és a carcinosarcoma bár definíció szerint kevert daganatok, nem tartoznak bele ebbe a diagnózisba. A kevert EMC-k túlnyomó többsége a p53abn kategóriába tartozik. A WHO 2020-as osztályozásba négy új entitás került bevezetésre: a mesonephricus és mesonephricus-szerű adenocarcinoma, a laphámsejtes carcinoma és a mucinosus gastrointestinalis típusú carcinoma. Az endometriumot és a méhnyakat egyaránt érintő esetek differenciáldiagnosztikai kihívást jelentenek. Mivel ezen morfológiájú elsődleges daganatok leginkább a méhnyakra jellemzőek, fontos kizárni a cervicalis eredetet. A mesonephricus és mesonephricus-szerű adenocarcinoma bár sok morfológiai, immunhisztokémiai és molekuláris hasonlósággal bír, közülük csak a mesonephricus carcinoma mutat határozott bizonyítékot a mesonephricus maradványokra. Etiológiájuk továbbra is rejtélyes, de KRAS és ARID1A mutációkat mindkét daganatban leírtak. Az endometrium laphámsejtes carcinomája az előbbiekhöz hasonlóan rendkívül ritka daganat. Kockázati tényező a HPV fertőzés mellett krónikus gyulladáshoz vezető állapotok és korábbi besugárzás. A gastricus/gastrointestinalis típusú primer mucinosus endometrium carcinomát csak a közelmúltban írták le, mivel korábban azokra a méhnyakban kialakuló ilyen morfológiájú daganatokra helyezték a hangsúlyt, ahol gyakrabban fordul elő. Ez utóbbi négy, ritka hisztotípus molekuláris profiljáról kevés adat áll rendelkezésre. A mesonephricus-szerű EMC-eket tekintve minden rendelkezésre álló adat arra utal, hogy az NSMP molekuláris altípusba tartoznak [57].[12][56]

A meglehetősen agresszív és extrém ritka, a méhtest tumorok <5%-át alkotó méhtest **carcinosarcoma** (uterine carcinosarcoma, UCS), mely korábban a vegyes epithelialis és mesenchymalis tumorok (kevert Müller-cső-eredetű tumor/malignant mixed Müllerian tumor, MMMT) csoportjába tartozott. Jelenleg az endometrium carcinoma külön típusaként osztályozandó. Endometrialis carcinomává való átkategorizálása, szemben a kevert hám és kötőszöveti malignitással az egyik legfontosabb változás a korábbi kiadáshoz képest [56]. E kétfázisú daganat rosszindulatú epithelialis (carcinoma) és rosszindulatú homológ vagy heterológ mesenchymalis (sarcoma) komponensből áll [58]. A malignus hámkomponens általában magas fokú carcinoma, leggyakrabban serosus carcinoma, ezt követően lehetnek endometrioid, világossejtes, differenciálatlan és kevert hisztotípusok is. A mesenchymalis komponens leggyakrabban magas fokú vagy differenciáció nélküli sarcoma. A heterológ sarcomás alkotóelemek közül a rhabdomyosarcoma (RMS) fordul elő leggyakrabban. Azonban chondrosarcoma, osteosarcoma és liposarcoma is megfigyelhető [59][60]. Agresszív klinikai viselkedésük a magas gyakoriságú DNS-kópiaszám-rendellenesség túlsúlyával magyarázható [12][56]. Döntő többségük tehát ezen p53abn molekuláris altípusba sorolható, ritkábban az EMC másik három molekuláris altípusához is tartozhatnak [61][62]. A tanulmányok jórésze támogatja a metaplasticus monoklonális vagy konverziós elméletet, miszerint az UCS egyetlen neoplasticus sejttípus metaplasticus transzformációjából fejlődik ki [63]. Bizonyítékok támasztják alá, hogy az UCS-t egy epithelialis-mesenchymalis átmenet (EMT) okozza, amely lehetővé teszi, hogy a carcinomás sejt mesenchymalis/sarcomás sejt fenotípussá váljon, így képes elvándorolni a származási hámrétegből [64]. Az EMT-elméletet a magas epithelialis-mesenchymalis tranzíciós gén expressziós profilja támasztja alá, és valószínűleg a mikroRNS-promóterek epigenetikai változásainak, valamint a hiszton génmutációk és amplifikációk következménye [61]. Egyes tanulmányok szerint az UCS-k alacsony százaléka - a kollíziós elméletet támogatva - valódi kollíziós daganatnak tűnik, mivel molekulárisan biklonális, és nagy valószínűséggel két független sejtpopulációból fejlődik ki [65].

Az UCS szignifikánsan rosszabb prognózisú a többi magas fokú endometrialis adenocarcinomához képest, mint például a *Grade 3* endometrioid EMC, vagy a serosus és világossejtes carcinomák [66].

A p53 egy gyakran használt immunhisztokémiai marker az endometrium carcinomák diagnosztikájában, és a TCGA adatbázisa alapján az UCS-k több mint 90%-a TP53 mutációt

tartalmaz [55]. Hasonlóképpen, a p16/Retinoblastoma (Rb) útvonal szerepét az UCS patogenezisében is már bizonyították korábban [67].

I.5. Enhancer of zeste homolog 2

A humán Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) gén a 7-es kromoszóma hosszú karjának 35-ös régiójában (7q35) található és az EZH hiszton-lizin-N-metiltransferáz fehérjét kódolja [68][69]. 20 exont tartalmaz, melyek 613 aminosavból álló fehérjét kódolja [70]. Az EZH2 fehérjének öt funkcionális alegysége ismert: az EED fehérje kötéséért felelős domén (EED interaction domain, EID), mely az „embrionális ektoderma kialakulás” (embryonic ectoderm development, EED) fehérje megkötéséért felel; a nem-kódoló RNS-kötő domén (non-codingRNA-binding domain, ncRBD); a SWI3, ADA2, N-CoR, TFIIIB DNS-kötő domén (SANT-domén), mely a hisztonok megkötésében játszik szerepet; valamint a ciszteinben gazdag CXC domén (cysteine-rich domain, CRD) és a Su(var)3–9, Enhancer of zeste, Trithorax domén (SET-domén), melyek a metiltransferáz aktivitásért felelősek [70].

I.5.1. Az EZH2 expresszió és szerepe a daganatok kialakulásában

Az EZH2 gén a polycomb fehérjecsoport tagja. Utóbbiak fontos epigenetikai regulátorok, jelentős szerepet játszanak a sejt proliferációban, őssejt differenciációban, valamint a rosszindulatú daganatos átalakulás során történő aberráns génexpresszióban. A polycomb fehérjéket két komplex alkotja, a polycomb represszor komplex 1 és 2 (polycomb repressive complex, PRC1,PRC2). A PRC2 egy központi tagja az EZH2, ill. további három kulcsfontosságú komponense az EED, a suppressor of zeste 12 (SUZ12) és az Rb asszociált fehérje 46 [70].

Az EZH2 az egyik legtöbbet vizsgált hiszton-metiltransferáz, mely a H3 hisztonfehérje 27. aminosav-pozíciójában lévő lizin trimetilációját katalizálja, EMT-t indukálva [71][72]. Hatásmechanizmusát tekintve PRC2 függően katalizálja a hármas hiszton trimetilációját, így hozzájárul a transzkripció csendesítéséhez. Továbbá számos non-hiszton fehérje szubsztrátot tud aktiválni, ami a transzkripció aktivációját és csendesítését egyaránt eredményezi. Ezen

kívül transzkripció faktorok koaktivátora révén PRC2 függetlenül a transzkripció aktivációjában van szerepe [73]. Az EZH2 expresszió és aktivitás a daganatsejtekben genetikus, transzkripció, poszttranszkripció és poszttranszláció szinteken szabályozott, melyekből következik az EZH2 számos élettani funkcióban betöltött szerepe [72][77].

Az EZH2-nek elsődleges szabályozó funkciója van a normál és neoplastikus sejtek proliferáció és differenciációs folyamataiban, valamint a tumorigenezisben azáltal, hogy elnémítja számos tumorszuppresszor gén - beleértve a p21 [74], p16 [75] és p27 [76] – transzkripcióját [77]. Az EZH2 a Wnt jelátviteli út inhibitorainak gátlásával indirekt módon aktiválja a Wnt útvonalat, elősegítve ezáltal a tumorsejtek invázióját [78]. Az EZH2 túlzott expressziója gátolja a Rad51 DNS-javító enzim működését, mely megzavarja a helyreállító útvonalat és onkogének abnormális expresszióját okozza [79]. Bizonyítékok igazolják, hogy az EZH2 indukálja az EMT-t [71][72]. Fontos szerepet játszik az embrionális fejlődésben, az X-kromoszóma inaktivációban, az őssejtek sokoldalúságának fenntartásában és a daganatos áttétképződésben [70][80]. Onkogén szerepe mellett az EZH2 tumorszuppresszív hatását is azonosították, mint például T-sejtes akut lymphoblastos leukémiában (T-ALL) [81], hasnyálmirigy és világossejtes veserákban [82][83], és diffúz középilonali gliómában [84]. Ugyanis az EZH2 gátlása egyes daganattípusoknál támogatja a rák progresszióját. Sőt mi több, az EZH2-nek döntő szerepe van a T és NK sejtek mediálta immunvédekezésben is [73][85][86].

Tanulmányok igazolják, hogy az EZH2 számos humán daganat kialakulásában és előrehaladásában szerepet játszik. Ennek hátterében a gént érintő funkciónyerő és funkcióvesztő mutációk, az EZH2 fehérje túlzott expressziója, ill. a H3K27 demetiláz gént érintő mutációk állnak [73][87].

Az EZH2 fehérje fokozott expresszióját többféle rosszindulatú daganatban kimutatták, beleértve az orrgarat [88], emlő [89], a tüdő [90], a nyelőcső [91], a gyomor [92], a vastagbél [93], a hasnyálmirigy-epeúti traktus [94], a máj [95][96], a pajzsmirigy [97], a prostata [98], a vese [99] és a húgyhólyag [100] carcinomáit. Az EZH2-t alaposan tanulmányozták a leggyakoribb nőgyógyászati malignitásokban is, mint például a méhnyak [101], a méhtest [102][103] és a petefészekrák [104][105]. Továbbá az EZH2 túlzott expresszióját megfigyelték melanómában [106], többféle agydaganatban, többek közt gliómában [107] és glioblastómában [108], hematológiai daganatokban, mint pl. a diffúz nagy B-sejtes lymphoma [109], a myelodysplasiás szindróma, akut myeloid leukémiát [110], és a myeloma multiplex

[111], valamint lágyrész sarcomákban [112][113]. Bizonyították azt is, hogy az EZH2 *overexpressziója* összefüggésbe hozható a daganatok agresszív klinikai viselkedésével, és potenciális differenciáldiagnosztikai markernek javasolták. Fokozott expressziója összefügg a daganatsejtek proliferációjával, és távoli metastasisokhoz vezet. Ennélfogva az EZH2 a daganatterápia potenciális célpontja, ezért az EZH2-inhibitorokkal történő preklinikai és klinikai vizsgálatok intenzíven zajlanak [114][115][116][117][118][119][120][121][122].

I.5.2. Az EZH2 expresszió szerepe a nőgyógyászati daganatokban

Az EZH2 élettani szerepe a női reproduktív szervek vonatkozásában nem teljesen tisztázott. A méh normál fejlődése során a hámsejtek proliferációjában és differenciációjában, a mirigyek fejlődésében betöltött szerepét állatkísérletes modellekkel igazolják. Fang és mtsai. kutatási eredményei szerint az EZH2 fenntartja a méh epithelialis integritását részben azért, hogy gátolja a basalis-szerű sejtek differenciálódását és az endometrium hyperplasia kialakulását. Kimutatták, hogy az EZH2 deléciója fokozott gyulladást okoz, illetve növeli az epithelialis rétegződést, szerepet játszva a méhnyálkahártya kialakulásában [123][124][125].

A belső női nemi szervek normál szöveteiben expressziója változatos és különböző intenzitású. A hüvely és a méhnyak laphámjának alsó felében, főként a basalis harmad sejtjeinek magjában erős jelölődést mutat, a méhnyálkahártya összességében gyenge pozitivitással bír (a mirigyhámban a jelölődési mintázat változó, a stroma sejtjeiben nem vagy csekély mértékű az expresszió). Az endocervicalis mirigyhámban, a méhtest simaizomzatában, a normál petefészekben EZH2 jelölődés nincs vagy nem mutatkozik.

A női reproduktív szervek malignus daganatainak kialakulásában az EZH2 fehérje túlzott expressziója a fő mechanizmus, azonban pontos szerepe még nem tisztázott. Az EZH2 expressziója vulvárákban nem ismert, míg a cervix laphám- és az endometrium carcinomában, valamint az ovarium epithelialis eredetű és granulosa sejtes daganataiban fokozott expresszióját írták le [101][102][103][104][105].

Az endocervicalis mirigyák EZH2 expressziójára, annak differenciáldiagnosztikai alkalmazhatóságára vonatkozóan irodalmi adat nem áll rendelkezésre.

A méhnyálkahártya daganatok közül a - korábban említett - méhtest carcinosarcoma (UCS) EZH2 expressziójáról és klinikopatológiai összefüggéseiről ugyancsak korlátozott adatok állnak rendelkezésre. Az irodalomban EZH2 pozitivitás UCS-ben csupán egyetlen effúziós cytológiai mintában kimutatva van jelen [126].

II. CÉLKITÚZÉS

Munkánk során célkitűzésünk volt az EZH2 expressziójának immunhisztokémiai vizsgálata különböző nőgyógyászati szövettani mintákon. A nőgyógyászati daganatok sokszínűsége ellenére az EZH2 diagnosztikai alkalmazhatóságáról kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Méhnyak laphámrákban az EZH2 expressziója ismert volt, melynek tudatában intézetünkben az adott immunhisztokémiai vizsgálatokat e markerrel kiegészítettük. Ezzel szemben méhnyak mirigyhám daganatok EZH2 expressziójáról szóló adatot egyáltalán nem találtunk. Egy kettős cervix tumoros minta EZH2 markerrel történő vizsgálata során észleltük, hogy az *in situ* laphámcarcinoma mellett az invazív endocervicalis adenocarcinoma neoplasticus mirigyei egyaránt diffúz pozitív festődést mutattak. Feltételeztük, hogy a fokozott pozitivitás kimutatható lesz a többi esetben is, abban bízva, hogy az EZH2 a méhnyak adenocarcinoma diagnózisát megkönnyíti. További megfigyelésünk során az EZH2 hasonlóan erős festődést mutatott a kifejezetten ritka és agresszív méhtest carcinosarcoma (UCS) sejtjeiben is. Korábbi tanulmányt erre vonatkozóan sem találtunk. Bizonyítékok igazolják, hogy az EZH2 elősegíti az EMT-t, ezért feltételeztük, hogy az EZH2 fokozott expressziója is szerepet játszhat az UCS patogenezisében. A fentiek megválaszolására a következők vizsgálatát tűztük ki célul:

II.1. A dolgozat első részében az EZH2 nuclearis expressziójának kimutatása invazív és *in situ* endocervicalis adenocarcinomákban (ECA és AIS), összevetve a normál endocervicalis hámmal és a nem neoplasticus endocervicalis léziókkal. Az expressziós mintázatok összehasonlítása és elemzése, a differenciáldiagnosztikában, mint segítséget nyújtó marker fajlagosságának és érzékenységének kiértékelése.

II.2. A munka második részében az EZH2, valamint a p16 és p53 biomarkerek expressziójának vizsgálata méhtest carcinosarcomákban, valamint lehetséges szerepük elemzése az UCS komponenseinek és hisztotípusainak diagnózisában és hisztogenezisében.

III. ANYAG ÉS MÓDSZEREK

III.1. Betegek és vizsgálati minták

A PTE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáról évente kb. 2400 páciens mintája érkezik patológiai vizsgálatra. Fénymikroszkópos vizsgálathoz a formalinban fixált mintákból szabvány kórszövettani protokollok szerint 4µm vastag H&E festett metszetek készülnek. A szövettani diagnózisok alapját az érvényben lévő WHO klasszifikáció képezi [12].

Döntően a Pécsi Tudományegyetem Patológiai Intézetének és részben a Tolna Megyei Balassa János Kórház (Szekszárd) Patológiai Osztályának archívumából kiválasztott szövetszövetminták formalinban fixált, paraffinba ágyazott blokkjaiból készült metszetein végeztünk retrospektív vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatásetikai Bizottságának engedélyével (PTE/57682/2017, KK/644-1/2020). Az érintett személyek klinikopatológiai jellemzőit - úgymint az életkoruk, szövettani vizsgálataik száma, ideje és eredménye - statisztikai analízisre alkalmas formában, Excel táblázatban rögzítettük.

III.1.1. Az EZH2 expresszió vizsgálata endocervicalis léziókban

Vizsgálatunkba 2007-2017 között diagnosztizált eseteket vontuk be, melyek biopsia, kúpkimetszés (conisatio) és méheltávolítás (hysterectomia) során eltávolított szövetekből származtak.

Ötvennégy neoplasticus endocervicalis léziót vizsgáltunk, melyből 37 invazív endocervicalis adenocarcinoma (ECA) és 17 *in situ* adenocarcinoma (AIS) volt. Ezen esetek közül 12-ben egyidejűleg magas fokú squamosus intraepithelialis lézió (high grade squamous intraepithelial lesion, HSIL) is mutatkozott. Egyidejű alacsony fokú squamosus intraepithelialis lézió (low grade squamous intraepithelial lesion, LSIL) csupán egy mintában fordult elő.

Összesen 32 nem neoplasticus endocervicalis léziót (15 reaktív atípiá, 9 microglandularis hyperplasia, 3 tuboendometrioid metaplasia, 3 *tunnel cluster*, 2 endometriosis) elemeztünk.

A szomszédos normál endocervicalis mirigyhámot is áttekintettük, mely az 54 rosszindulatú esetből 34-ben, ill. valamennyi nem daganatos mintában jelen volt.

III.1.2. Az EZH2, p16 és p53 expresszió vizsgálata méhtest carcinosarcomákban

Az EZH2, p16 és p53 markerek jelölődésének tanulmányozásához a 2012-től 2019-ig diagnosztizált méh carcinosarcomák egymás utáni eseteit gyűjtöttük össze a Pécsi Tudományegyetem Patológiai Intézet archívumából.

Összesen 28 méhtest carcinosarcoma eset 22 hysterectomiából és 6 biopsiából származó mintáin végeztük az immunhisztokémiai vizsgálatokat.

III.2. Módszerek

III.2.1. Szövettani vizsgálatok

Formalinban fixált és paraffinba ágyazott szövetminták H&E festett metszetei minden esetben rendelkezésre álltak. Ezen tárgylemezeket újraértékeltek, hogy kiválaszthassuk a legmegfelelőbb – a carcinosarcomákat illetően mind az epithelialis, mind a mesenchymalis komponenst egyaránt tartalmazó reprezentatív - blokkokat az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz minden egyes betegre vonatkozóan. Az endocervicalis adenocarcinomákat a Nemzetközi Endocervicalis Adenocarcinoma Kritérium és Osztályozási rendszer (International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification, IECC) alapján kategorizáltuk [6]. A carcinosarcomák epithelialis és mesenchymalis komponenseit a jelenlegi WHO klasszifikáció szerint további hisztotípusokba soroltuk. Az IECC és a WHO szerinti szövettani mintázatokat ezeken az eredeti, rutin H&E festett tárgylemezeken detektáltuk.

III.2.2. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az immunhisztokémia előtt a formalinban fixált, paraffinba ágyazott blokkokból mikrotómmal 4 µm vastag metszeteket készítettünk szilánnal bevont tárgylemezre, majd 20 percig 60 °C-on ráolvasztottuk.

Az immunfestések Leica Bond Max automatizált immunhisztokémiai és *in situ* hibridizációs automatán (Leica Biosystems, Bannockburn, IL) készültek. A primer antitest detektálását a gyártó ajánlása szerint a Leica Bond Polymer Refine Detection Kit-tel (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, Egyesült Királyság) végeztük. Az egér monoklonális EZH2 antitestet (6A10 klón) a Leica Biosystems (Newcastle Upon Tyne, Egyesült Királyság) cégtől szereztük be, és 1:200-as hígításban alkalmaztuk, a nyúl monoklonális p53 antitestet (SP5 klón) pedig a Thermo Fisher Scientific cégtől (USA), utóbbit szintén 1:200-as hígításban használva.

Az immunfestési protokoll *in situ* paraffinmentesítést és EZH2 esetében pH9-es (20perc), p53 antitest esetében pH9-es (30 perc) epitóp feltárást (97 °C-on), peroxid blokkolást (5 perc), elsődleges antitest inkubációt (15 perc), posztprimer antitest inkubációt /nyúlban termelt egér-ellenes IgG-vel (8 perc), polimer nyúl-ellenes Poly-HRP-IgG-vel (8 perc)/, kromogénként diaminobenzidin (DAB) inkubációt (10 perc), majd hematoxilinnal való háttérfestést (5 perc) tartalmazott. Pozitív és negatív kontrollok minden reakcióban szerepeltek.

Az egér monoklonális Cintec p16 antitestet (E6H4 klón) a Ventana Medical Systems Inc. (Tucson, AZ, USA), RTU azaz gyárilag előhígított formában a Benchmark Ultra automatával detektáltuk. Az immunfestési protokoll teljes egészében automatizáltan deparaffinálást, 64 perces pH8-as epitóp feltárást (97 °C-on), 20 perces primer antitest inkubálást és gyári Ultraview DAB Kit felhasználását foglalta magában.

III.2.3. Az alkalmazott immunreakciók kiértékelése

A dolgozat alapját képező munka mindkét részében, valamennyi immunreakció kiértékelését elvégeztem, melyet végül témavezetőm, Dr. Kovács Krisztina ellenőrzött. Ezen értékeléseket a további alpontok mindegyikében az ő nevére hivatkozva teszem.

III.2.3.1. Az EZH2 expresszió vizsgálata endocervicalis léziókban

Az immunreakciók szemikvantitatív analízisét három, több mint 15 éves szakmai tapasztalattal rendelkező patológus szakorvos (Kálmán Endre, Kovács Krisztina, Oszter Angéla) végezte

egymástól függetlenül. Az eseteket akkor tekintettük pozitívnak, ha 40-szeres (40x) nagyítással egyértelmű pozitív jelölődés volt látható. A pozitív eseteket a magfestődéssel rendelkező sejtek százalékos aránya szerint tovább osztályoztuk: <10% fokálisan pozitív „+”, 10-50% részlegesen pozitív „++” és >50 % diffúz pozitív „+++” [99][127][128][129].

Az immunreaktivitás elemzése nemcsak a neoplasticus és nem neoplasticus elváltozásokat, hanem - ha a metszetben kimutatható volt - a szomszédos normál mirigyhámot is magába foglalta. Az egyidejű squamosus cervicalis intraepithelialis neoplasiákat nem vettük figyelembe a kiértékelés során.

III.2.3.2. Az EZH2, p16 és p53 expresszió vizsgálata méhtest carcinosarcomákban

Ebben a vizsgálatban az EZH2 és a p16 immunreaktivitás szemikvantitatív meghatározását két patológus szakorvos (Kovács Krisztina, Oszter Angéla) végezte külön a hám és külön a mesenchymalis komponensekre egyaránt. Az előző vizsgálathoz hasonlóan a 40x nagyítással nyilvánvaló pozitivitást tekintettük pozitív esetnek, melyeket a tumorsejtek nuclearis festődésének százalékos aránya (+: <10%, fokálisan pozitív; ++: 10-50% között, részlegesen pozitív; +++: >50%, diffúz pozitív) és intenzitása (0: nincs festődés, 1+: gyenge, 2+: közepes, 3+: erős) szerint tovább osztályoztunk [99][127][128][129]. A korábbi tanulmányokhoz hasonlóan a festődési indexet a festődés százalékos arányának és intenzitásának szorzataként számítottuk ki egy nullától kilencig terjedő skálán [130][131]. Ez alapján a daganatokat *fokozottan expresszálo* (festődési index > 4) vs. *alacsonyán expresszálo* (festődési index ≤ 4) kategóriába soroltuk. Más tanulmányokhoz hasonlóan mindkét marker esetében csak a magban mutatkozó barna színreakciót tekintettük pozitívnak [71][72]. A p16 cytoplasmaticus festődését figyelmen kívül hagytuk.

A p53 immunreaktivitást a Nőgyógyászati Patológusok Nemzetközi Társaságának (International Society for Gynecological Pathologists, ISGyP) ajánlásai [132] szerint határoztuk meg (kiértékelők: Kovács Krisztina, Éles Klára). A p53 festődési mintázatot vad típusúnak vagy aberránsnak (ez utóbbi tovább osztályozható, mint diffúz nuclearis, *null* vagy cytoplasmaticus expresszió) értékeltük. Ehhez első lépésként a nuclearis festődési mintázatot vizsgáltuk annak megállapítására, hogy a festődés eloszlása és intenzitása megfelel-e a p53 diffúz nuclearis

mintázat (80% feletti erős és diffúz magfestődés) vagy a p53 *null* mintázat (a nuclearis festődés teljes hiánya valamennyi sejtben) kritériumainak. Amennyiben egyik mintázat sem igazolódott, második lépésként a cytoplasmaticus festődést értékeltük, hogy elkülönítsük a p53 cytoplasmaticus mintázatot (közepestől az erősig terjedő cytoplasmaticus festődés) a p53 vad típusútól (elszórt sejtmagfestődés). Ennek megfelelően, az ISGyP ajánlás szerint a vad típusú (normál) mintázat akkor teljesül, ha elszórt nuclearis festődés van jelen hiányzó vagy gyenge cytoplasmaticus festődés mellett; az aberráns/diffúz nuclearis mintázat akkor teljesül, ha 80%-ban erős és diffúz magfestődés van jelen (cytoplasmaticus festődéssel vagy anélkül); az aberráns/*null* mintázat valamennyi sejtben a nuclearis festődés teljes hiánya esetén (cytoplasmaticus festődés nélkül) teljesül; az aberráns/cytoplasmaticus mintázat pedig akkor teljesül, ha mérsékelt vagy erős cytoplasmaticus festődés van jelen diffúz nuclearis expresszió hiányában [133].

III.2.4. Statisztikai elemzés

III.2.4.1. Az EZH2 expresszió vizsgálata endocervicalis léziókban

A kiértékelés végző szakorvosok közötti egyetértést az osztályon belüli korrelációs együttható (Intraclass Correlation Coefficient, ICC) [134] segítségével határoztuk meg mind a malignus, mind a benignus elváltozások elemzésében. Kétirányú, abszolút megegyezés típusú modellt alkalmaztunk. Mind az egyéni, mind az átlagos értékelési megbízhatóságot kiszámítottuk. Az elemzést MedCalc statisztikai szoftverrel futtattuk (version 13.0.0.0, MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium) [135].

A további, leíró és analitikus statisztikákhoz a léziókra és - ha jelen volt - a normál mirigyhámra vonatkozó egyedi értékeléseket bináris összesített értékeléssé (*overall score*) alakítottuk át. Ez alapján az immunexpressziót fokozottnak tekintettük, ha a három szakértő közül legalább kettő „++” vagy „+++” értéket adott. Az immunreaktivitást negatívnak/fokálisan pozitívnak definiáltuk, ha minimum két elemző „-” vagy „+”-nak minősítette az esetet. A szomszédos normál mirigyhámot akkor vettük be a statisztikai vizsgálatba, ha legalább két értékelő szerint jelen volt a metszetben.

A neoplasticus (ECA és AIS) és a nem neoplasticus léziók immunreaktivitásának összesített értékelését statisztikailag a Fisher-féle egzakt teszttel (MedCalc) hasonlítottuk össze. A 0,05 alatti „p” értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Az EZH2 *overexpresszió* diagnosztikai teljesítőképességét (szenzitivitás, specificitás, pozitív és negatív prediktív érték) szintén a MedCalc segítségével értékeltük a következők összehasonlítása során: a) neoplasticus vs. nem neoplasticus elváltozások, b) neoplasticus vs. normál mirigyhám és c) neoplasticus léziók vs. nem neoplasticus lézió és normál endocervix.

III.2.4.2. Az EZH2, p16 és p53 expresszió vizsgálata méhtest carcinosarcomákban

Ebben a vizsgálatban az EZH2 és a p16 esetében mindkét komponensben kiszámítottuk a két kiértékelő festődési index (alacsony vagy fokozott expresszió) pontszámainak átlagát. A festődés százalékos arányának és intenzitásának értékeit további elemzés céljából összesítettük. Az eltérő p53 mintázatokat újraértékeltek, a végeredményt konszenzus alapján határoztuk meg. Az EZH2 és a p16 festődési indexeket és a p53 festődési mintázatokat összehasonlítottuk az epithelialis vs. mesenchymalis komponensek, a serosus vs. endometrioid carcinoma komponensek, valamint a homológ vs. heterológ sarcoma komponensek között. A hisztotípus összehasonlításból a kevert és a differenciálatlan epithelialis típusokat alacsony esetszámuk miatt kizártuk. A minta elemszámától függően Khi négyzet próbát vagy Fisher egzakt teszteket használtunk a kategorikus értékek (festődési index és p53 festődési mintázat) összehasonlítására, míg Mann-Whitney tesztet az ordinális értékek (festődés százalékos aránya és intenzitása) összehasonlítására. Az epithelialis és a mesenchymalis komponensek közötti konkordanciát kappa (K) teszttel értékeltük. Az összes statisztikai tesztet ezúttal is Medcalc programmal végeztük [135]. Statisztikailag szignifikánsnak a 0,05-nél kisebb „p” értéket tekintettük [136].

III.2.5. Fotódokumentáció

A metszeteket 3D HISTECH Panoramic MIDI szkennelvel digitalizáltuk, majd Panoramic és CaseViewer szoftver segítségével fotódokumentációt készítettünk.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. Az EZH2 expresszió endocervicalis léziókban

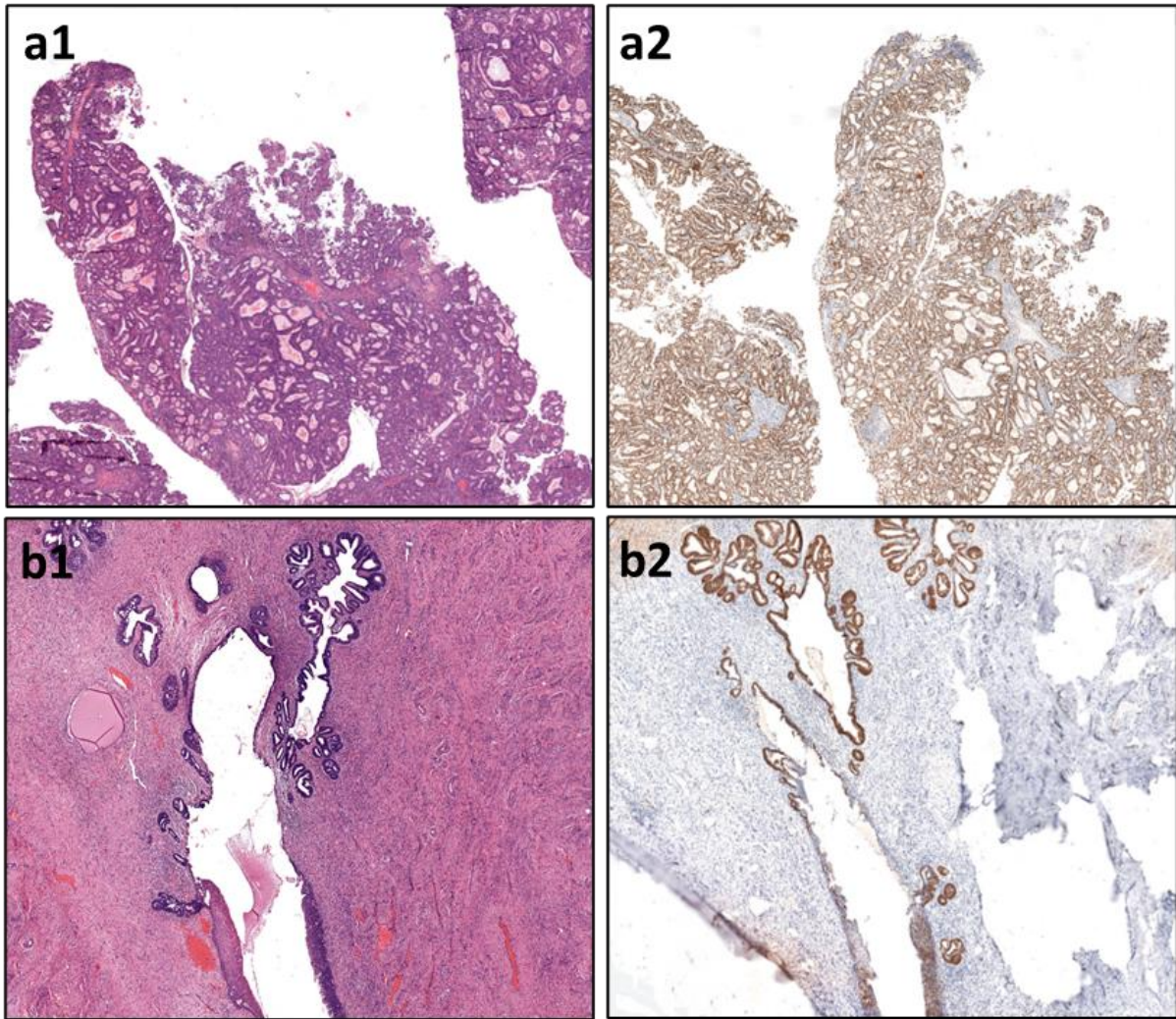
Az eredeti H&E metszetek újraértékelése során az összesen 54 endocervicalis – 37 invazív (ECA) és 17 *in situ* (AIS) – adenocarcinoma eset közül 12-ben egyidejű HSIL, egy mintában pedig LSIL volt jelen. A betegek átlagéletkora 44,5 év volt (29–84 év).

Az IECC alapján történő besorolás során az ECA-k döntő többsége (a kohorsz 92%-a) humán papillomavírussal összefüggő adenocarcinoma (HPVA) volt (**4. táblázat**). Ezen csoporton belül az altípusok között a szokványos típusú adenocarcinoma volt a leggyakoribb (a kohorsz 88%-a). Ezt követte a villoglandularis; mucinosus, másként nem meghatározott (not otherwise specified, NOS); a mucinosus, intestinalis, végül az invazív rétegzett mucintermelő carcinoma (invasive stratified mucin-producing carcinoma, iSMILE) (3%) típus.

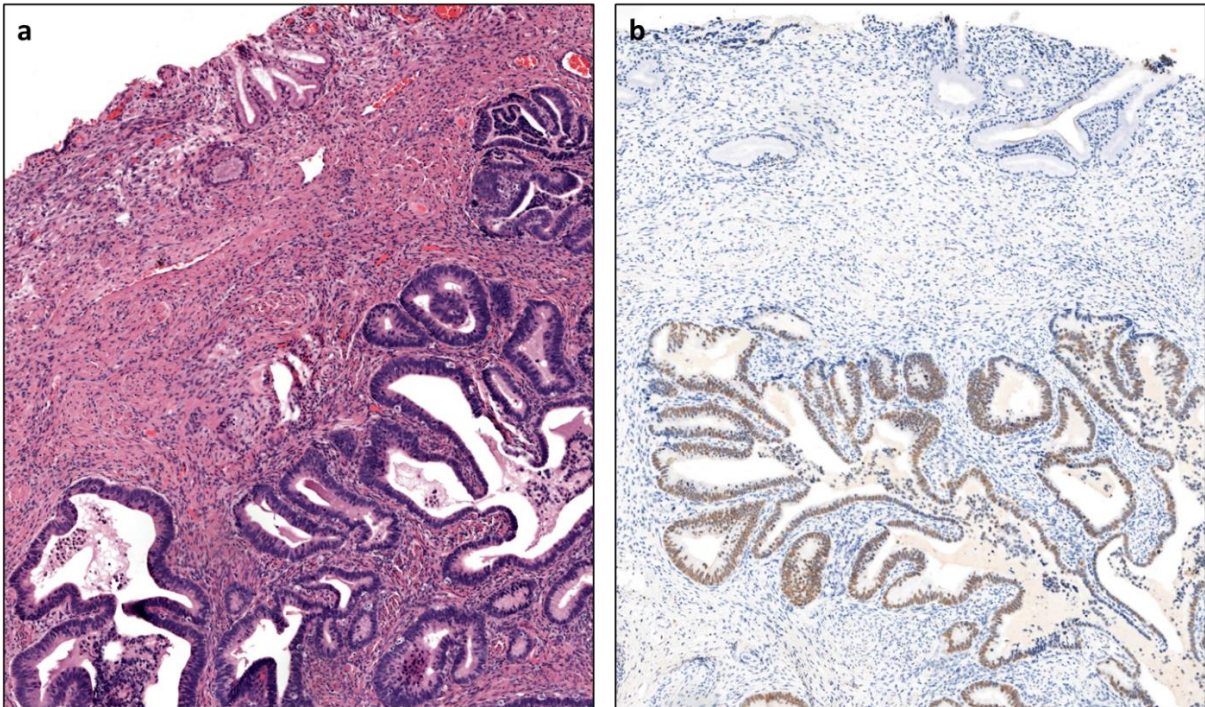
Mindössze 3 ECA (8%) volt a human papillomavírustól független adenocarcinomákhoz (NHPVA) sorolható, melyek közül két serosus (papillaris) és egy endometrioid altípust azonosítottunk.

A neoplasticus léziók EZH2 immunhisztokémiai elemzésének részletes eredményeit az **4. táblázat** (ECA esetek) és az **5. táblázat** (AIS esetek) foglalja össze.

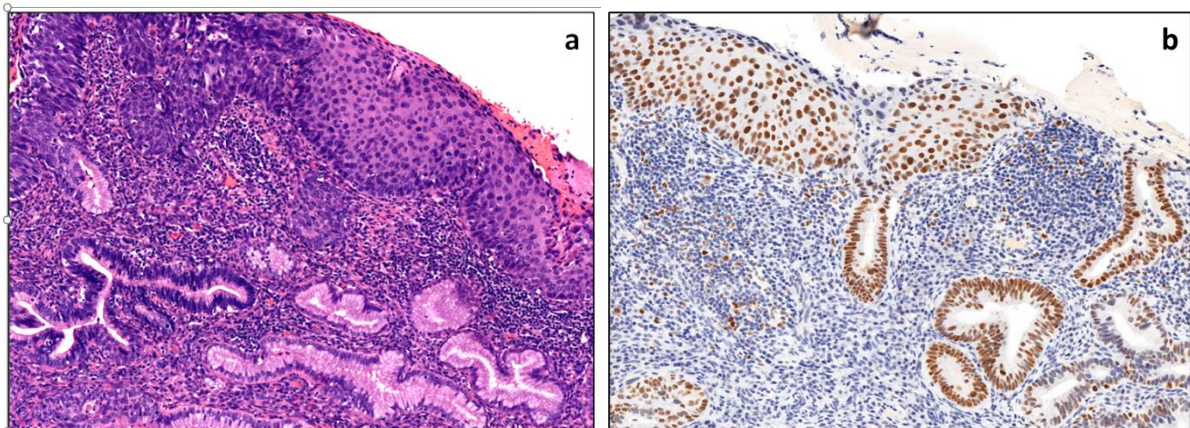
Az összes neoplasticus endocervicalis léziót (ECA és AIS) mindhárom kiértékelő szakorvos EZH2 pozitívnak találta. Ezen 54 esetből egy kivétellel valamennyi elváltozás (98,14%) fokozott EZH2 expressziót mutatott (fokozott *overall score*/összesített értékelés) (**3-5. ábra**).



3. ábra: Fokozott EZH2 expresszió neoplasticus endocervicalis léziókban (a1, b1: H&E; a2,b2: EZH2). **(a1,a2)** Invazív adenocarcinoma (ECA) méhkaparékban (lásd 1. tbl. 23. e. sz.; nagyítás: 20x). **(b1,b2)** *In situ* adenocarcinoma (AIS) conisatumban (lásd 2. tbl. 17. e.sz.; nagyítás: b1=20x és b2=30x).

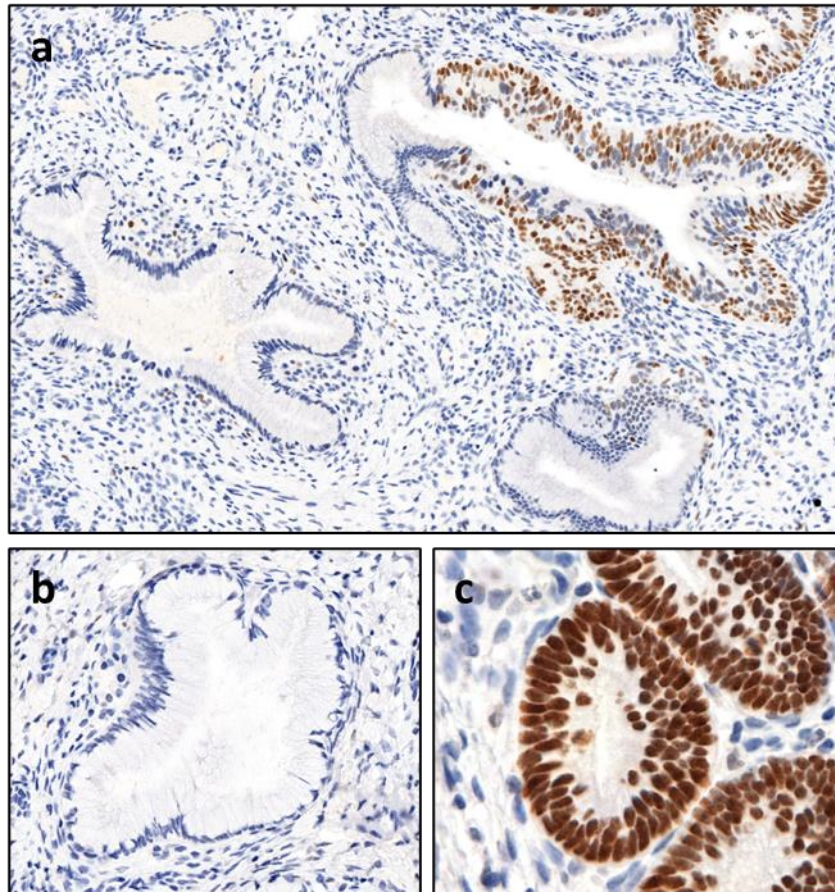


4. ábra: Endocervicalis adenocarcinoma (szokványos típus) H&E és EZH2 festéssel. **(a)** ECA H&E festett metszete, **(b)** ECA fokozott nuclearis EZH2 festődése (lásd 4. tbl. 17. e.sz.; nagyítás: 100x).



5. ábra: Cervix *in situ* adenocarcinoma (AIS) és egyidejű *in situ* laphámcarcinoma (CIN3) H&E és EZH2 festéssel. **(a)** AIS+HSIL/CIN3 H&E festett metszete, **(b)** AIS+HSIL/CIN3 fokozott nuclearis EZH2 festődése (lásd 2. tbl. 11. e.sz.; nagyítás: 200x).

Az 54 rosszindulatú mintából 34-ben (63%) szomszédos normál mirigyhámot észlelt legalább két kiértékelő. A három szakértő átlagosan a detektált normál mirigyhám esetek 88,3%-ában nem talált EZH2 immunfestődést, mindössze 11,7%-ban volt fokális pozitivitás megfigyelhető. (részletek a **4. és 5. táblázatban**). Az immunhisztokémiai elemzés mind a 34 esetben negatív/fokálisan pozitív *overall score*-t eredményezett.



6. ábra: EZH2 *in situ* endocervicalis adenocarcinómában és a szomszédos normál szövetben. Az immunhisztokémia azt mutatta, hogy a daganatos mirigyekben az esetek 98%-ában fokozott az EZH2 expresszió, míg a normál mirigyhámban egy esetben sem (0/66) láttunk EZH2 festődést. A különbség szignifikáns ($p < 0,05$). **(a)** EZH2 fokozott expressziója malignus endocervicalis mirigyekben és a normál endocervix negatív immunreaktivitása (nagyítás: 200x), **(b)** EZH2 negatív normál endocervicalis mirigy (nagyítás: 400x), **(c)** EZH2 diffúz pozitív malignus endocervicalis mirigy (nagyítás: 400x), **(a-c)**: lásd 2. tbl. 17. e.sz.).

4. táblázat: ECA esetek klinikai adatai és az EZH2 immunreaktivitás eredményei

Eset-szám	Élet-kor	Diagnózis	Típus (IECC ⁵)	EZH2 Immunreaktivitás ⁴							
				Normál endocervicalis hám				Neoplasticus endocervicalis léziók			
				Kiértékelő			Összesített értékelés ¹⁰	Kiértékelő			Összesített értékelés ¹⁰
				1	2	3		1	2	3	
1.	83	ECA	HPVA ⁶ /Mucinosus, intestinalis	ø ³	ø	ø	ø	+++	+++	+++	+
2.	84	ECA	HPVA/Szokványos	-	ø	-	-	+++	+++	+++	+
3.	74	ECA	HPVA/Szokványos	ø	ø	ø	ø	+++	+++	++	+
4.	53	ECA+CIN3 ²	HPVA/Szokványos	-	+	-	-	+++	+++	+++	+
5.	50	ECA	NHPVA ⁷ /Endometrioid	-	-	-	-	+	+	++	-
6.	48	ECA	HPVA/Szokványos	ø	ø	-	ø	+++	++	+++	+
7.	49	ECA+CIN3	HPVA/Szokványos	ø	ø	ø	ø	+++	+++	+++	+
8.	48	ECA	HPVA/Szokványos	ø	ø	-	ø	+++	++	++	+
9.	42	ECA+AIS	HPVA/Szokványos	+	-	-	-	+++	+++	+++	+
10.	45	ECA	HPVA/Szokványos	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
11.	37	ECA	HPVA/Szokványos	-	-	-	-	+++	+	+++	+
12.	41	ECA	HPVA/Villoglandularis	ø	ø	ø	ø	+++	+++	+++	+
13.	37	ECA	HPVA/Szokványos	ø	ø	ø	ø	+++	+++	+++	+
14.	36	ECA+CIN2	HPVA/Szokványos	ø	-	-	-	++	+++	++	+
15.	30	ECA	HPVA/Szokványos	-	-	-	-	+++	++	+++	+
16.	31	ECA	HPVA/Szokványos	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
17.	90	ECA	HPVA/Szokványos	ø	ø	ø	ø	+++	+++	+++	+
18.	43	ECA	HPVA/Szokványos	ø	ø	-	ø	+++	+++	+++	+
19.	43	ECA	HPVA/Szokványos	ø	ø	ø	ø	+++	+++	+++	+
20.	49	ECA	HPVA/Mucinosus NOS ⁸	ø	ø	-	ø	+++	+++	+++	+
21.	44	ECA	HPVA/Szokványos	ø	ø	ø	ø	+++	+++	+++	+
22.	47	ECA	HPVA/Szokványos	ø	ø	ø	ø	+++	+++	+++	+
23.	32	ECA	HPVA/Szokványos	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
24.	42	ECA	HPVA/Szokványos	ø	ø	ø	ø	+++	+++	+++	+
25.	37	ECA	HPVA/Szokványos	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
26.	54	ECA	HPVA/Szokványos	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
27.	52	ECA	HPVA/Szokványos	ø	ø	-	ø	+++	++	+++	+
28.	50	ECA	HPVA/Szokványos	ø	ø	-	ø	+++	+++	+++	+
29.	36	ECA	HPVA/Szokványos	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
30.	86	ECA	HPVA/Szokványos	ø	ø	ø	ø	++	++	++	+
31.	45	ECA	HPVA/Szokványos	ø	ø	-	ø	+++	+++	+++	+
32.	36	ECA+CIN3	HPVA/Usual	-	-	-	-	+++	++	+++	+
33.	41	ECA+AIS	HPVA/iSMILE ⁹	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
34.	48	ECA	NHPVA/Serosus	-	ø	ø	ø	+++	+++	+++	+
35.	77	ECA	NHPVA/Serosus	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
36.	47	ECA	HPVA/Szokványos	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
37.	37	ECA	HPVA/Szokványos	-	-	-	-	+++	+++	+++	+

¹Endocervicalis adenocarcinoma; ²Cervicalis intraepithelialis neoplasia; ³Nem detektálható normál mirigyhám a metszetben; ⁴Immunreaktivitás mértéke: +++ = >50%, ++ = 10-50%, + = <10%, - = negatív – nincs egyértelmű immunreaktivitás 40x-es nagyítással; ⁵International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification; ⁶Humán papillomavírus-asszociált adenocarcinoma; ⁷Human papillomavírustól független adenocarcinoma; ⁸Mucinosus, másként nem meghatározható; ⁹Invazív rétegzett mucintermelő carcinoma; ¹⁰Az immunreaktivitás összesített kiértékelése: „-” negatív/fokális pozitivitásra utal (min. két kiértékelő szerint „-” vagy „+”), míg a „+” fokozott expresszióra utal (min. két kiértékelő szerint „++” vagy „+++”).

5. táblázat: AIS esetek klinikai adatai és immunfestődésének eredményei

Eset-szám	Élet-kor	Diagnózis	EZH2 Immunreaktivitás ⁴							
			Normal endocervicalis hám				Neoplasticus endocervicalis hám			
			Kiértékelő			Összesített értékelés ⁵	Kiértékelő			Összesített értékelés ⁵
			1	2	3		1	2	3	
1.	33	AIS	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
2.	53	AIS+CIN1	+	+	-	-	+++	+++	+++	+
3.	42	ECA+AIS	+	-	-	-	+++	+++	+++	+
4.	41	AIS	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
5.	38	AIS	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
6.	35	AIS	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
7.	36	AIS	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
8.	31	AIS	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
9.	45	AIS+CIN3	∅ ³	∅	-	∅	++	++	++	+
10.	48	AIS+CIN3	-	+	-	-	+++	+++	+++	+
11.	46	AIS+CIN3	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
12.	41	AIS+CIN3	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
13.	45	AIS+CIN3	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
14.	40	AIS+CIN3	-	+	-	-	+++	+++	+++	+
15.	41	ECA+AIS	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
16.	38	AIS+CIN3	-	+	-	-	+++	+++	+++	+
17.	65	AIS+CIN3	-	-	-	-	+++	+++	+++	+

¹Adenocarcinoma *in situ*; ²Cervicalis intraepithelialis neoplasia; ³Nem detektálható normál mirigyhám a metszetben;

⁴Immunreaktivitás mértéke: +++ = >50%, ++ = 10-50%, + = <10%, - = negatív – nincs egyértelmű immunreaktivitás 40x-es nagyítással;

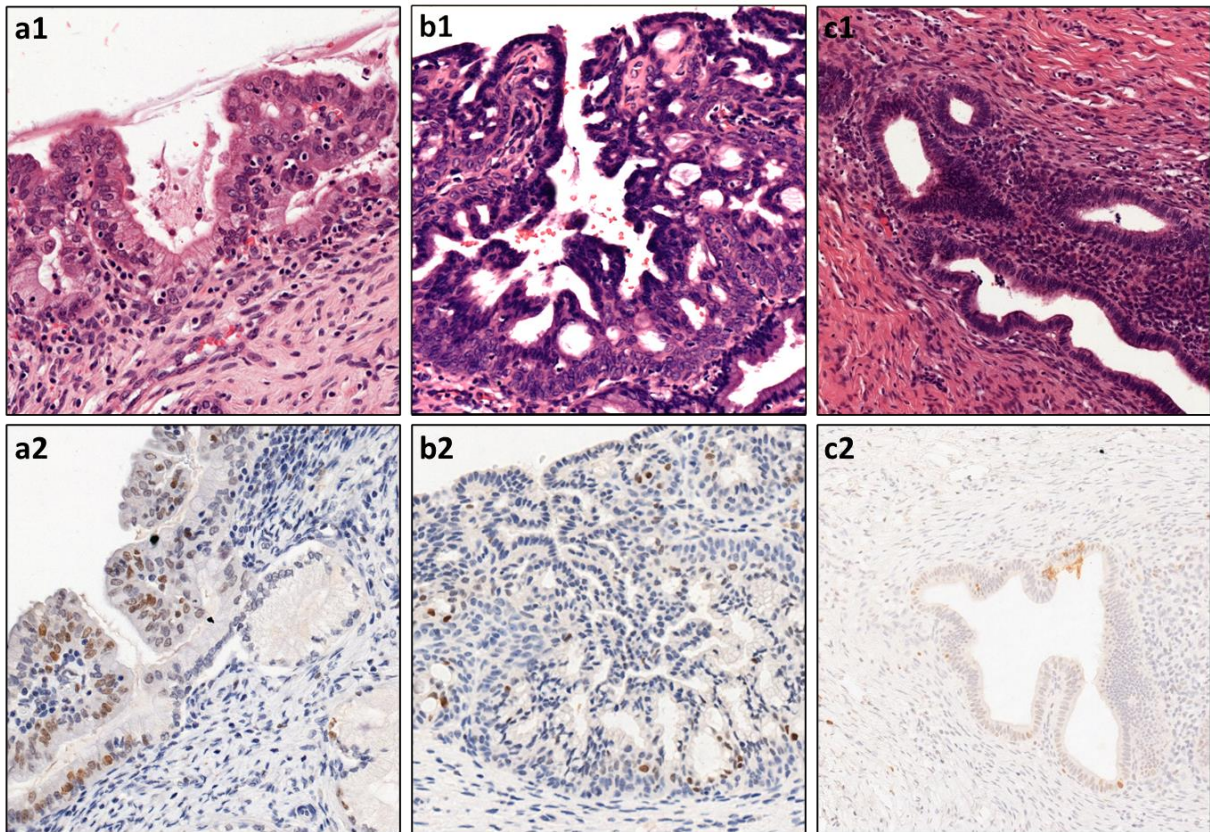
⁵Az immunreaktivitás összesített kiértékelése: „-” negatív/fokális pozitivitásra utal (min. két kiértékelő szerint „-” vagy „+”), míg a „+” fokozott expresszióra utal (min. két kiértékelő szerint „++” vagy „+++”).

Összesen 32 nem daganatos endocervicalis léziót (15 reaktív atípiá, 9 microglandularis hyperplasia, 3 tuboendometrioid metaplasia, 3 *tunnel cluster*, 2 endometriosis) elemeztünk.

Az EZH2 immunhisztokémiai vizsgálatának részletes eredményeit a nem daganatos endocervicalis elváltozásokra a **6. táblázat** foglalja össze.

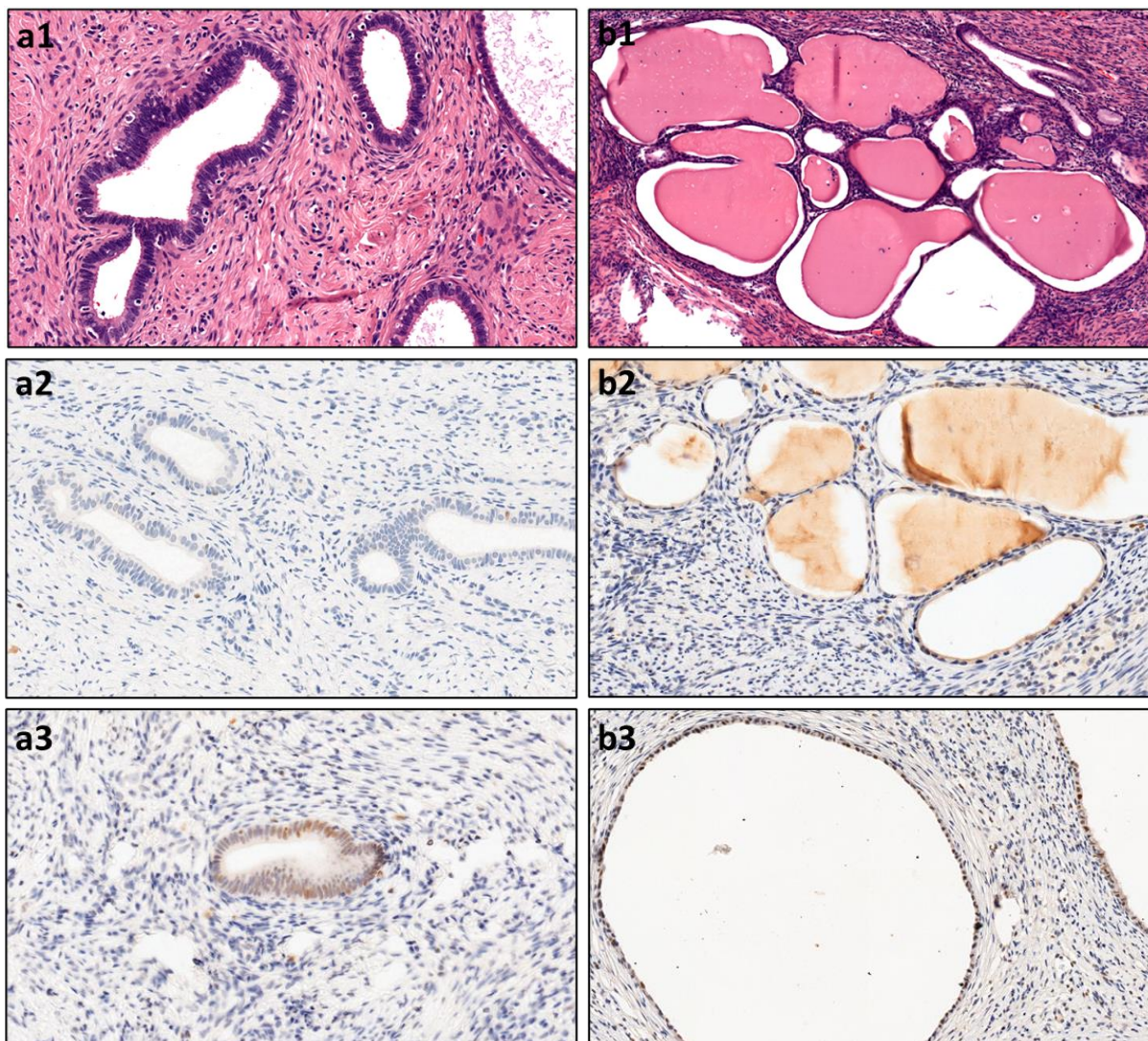
Átlagosan az immunértékelések 67,7%-a negatív, 24%-a fokálisan pozitív, és 8,3%-a részlegesen pozitívnak bizonyult. Az összesített kiértékelések során 28/32 esetben (87,5%) negatív/fokálisan pozitív, míg a maradék 4 esetben (12,5%) fokozott *overall score*-t kaptunk.

A szomszédos normál mirigyhám valamennyi nem neoplasticus mintában mindhárom kiértékelő által kimutatható volt. A normál endocervix e minták 95,84%-ban EZH2 negatívnak, 2,08%-ban fokálisan pozitívnak, a visszamaradó 2,08%-ban részlegesen pozitívnak bizonyult (részletek a **6. táblázatban**). Az összesített értékelés minden egyes mintában *negatív/fokálisan pozitív* eredményt adott. A **7-8. ábra** a nem neoplasticus léziók negatív vagy fokálisan pozitív (+) EZH2 immunreaktivitásának reprezentatív eseteit mutatja.



7. ábra: Reaktív atípiá, microglandularis hyperplasia és endometriosis

(a1, b1, c1) H&E festés, nagyítás: a1, b1=400x, c1=300x **(a2)** EZH2 fokális pozitivitás reaktív atípiában (lásd 6. tbl. 10. e.sz.; nagyítás: 400x), **(b2)** EZH2 negativitás microglandularis hyperplasiában, EZH2 fokális pozitivitás laphám metaplasiában (lásd 6. tbl. 24. e.sz.; nagyítás: 400x), **(c2)** EZH2 festődés hiánya endometriosisban (lásd 6. tbl. 25. e.sz.; nagyítás: 200x).



8. ábra: Tuboendometrioid metaplasia (TEM) és alagút csoport / *tunnel cluster*

(a1, b1) H&E festés, nagyítás: a1=400x, b1=300x **(a2)** EZH2 festődés hiánya TEM-ben (lásd 6. tbl. 27. e.sz.; nagyítás: 400x), **(a3)** EZH2 részleges pozitívitas (++) egy másik TEM mintában (lásd 6. tbl. 28. e.sz.; nagyítás: 400x), **(b2)** EZH2 negativitás alagút csoportban (lásd 6. tbl. 30. e.sz.; nagyítás: 300x), **(b3)** EZH2 részleges pozitív (++) festődése egy másik alagút csoportot tartalmazó mintában (lásd 6. tbl. 31. e.sz.; nagyítás: 300x).

6. táblázat: Nem neoplasticus endocervicalis léziók klinikai és EZH2 immunreakcióinak adatai

Eset-szám	Élet-kor	Diagnózis	EZH2 Immunreaktivitás ²							
			Normál endocervicalis hám				Nem neoplasticus endocervicalis léziók			
			Kiértékelő			Összesített értékelés ³	Kiértékelő			Összesített értékelés ³
			1	2	3		1	2	3	
1.	33	Reaktív atípiá	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	50		-	-	-	-	+	+	-	-
3.	39		-	-	-	-	-	-	-	-
4.	54		-	-	-	-	+	+	+	-
5.	40		-	-	-	-	+	+	-	-
6.	40		-	-	-	-	-	-	-	-
7.	42		-	-	-	-	-	-	-	-
8.	39		++	-	-	-	++	++	+	+
9.	49		++	-	-	-	++	++	+	+
10.	43		-	-	+	-	+	+	+	-
11.	32		-	-	-	-	-	-	-	-
12.	46		-	-	-	-	+	-	+	-
13.	61		-	-	-	-	-	-	-	-
14.	48		-	-	-	-	-	-	-	-
15.	48		-	-	-	-	-	-	-	-
16.	51	Microglandularis hyperplasia	-	-	+	-	-	-	-	-
17.	50		-	-	-	-	-	-	-	-
18.	37		-	-	-	-	-	-	-	-
19.	69		-	-	-	-	+	+	+	-
20.	37		-	-	-	-	-	-	-	-
21.	54		-	-	-	-	+	+	+	-
22.	37		-	-	-	-	-	-	-	-
23.	48		-	-	-	-	-	-	+	-
24.	51		-	-	-	-	-	-	-	-
25.	35	Endometriosis	-	-	-	-	-	-	-	-
26.	33		-	-	-	-	-	-	-	-
27.	36	TEM ¹	-	-	-	-	-	-	-	-
28.	41		-	-	-	-	++	++	+	+
29.	46		-	-	-	-	-	-	-	-
30.	61	Alagút csoport/ Tunnel cluster	-	-	-	-	-	-	-	-
31.	53		-	-	-	-	++	++	+	+
32.	67		-	-	-	-	-	-	-	-

¹Tuboendometrioid metaplasia; ²Immunreaktivitás mértéke: +++ = >50%, ++ = 10-50%, + = <10%, - = negatív – nincs egyértelmű immunreaktivitás 40x-es nagyítással; ³Az immunreaktivitás összesített kiértékelése: „-” negatív/fokális pozitivitásra utal (min. két kiértékelő szerint „-” vagy „+”), míg a „+” fokozott expresszióra utal (min. két kiértékelő szerint „++” vagy „+++”).

A Fisher-féle egzakt teszt statisztikailag szignifikáns (kétirányú $p < 0,0001$) különbséget mutatott a neoplasticus vs. nem neoplasticus léziók összesített értékelésének eredményei között (fokozott *overall score* eredményt kaptunk az 54 neoplasticus elváltozás közül 53-ban, szemben a 32 nem neoplasticus lézió közül csupán 4 esetben).

A fokozott EZH2 expresszió/EZH2 overexpresszió diagnosztikus teljesítőképességének eredményei a következők lettek:

- a) neoplasticus vs. nem neoplasticus léziók megkülönböztetésénél a szenzitivitás 98,15% (95% CI = 90,11% - 99,95%), a specificitás 87,5% (95% CI = 71,01% - 96,49%), a pozitív prediktív érték 92,98% (95% CI = 83% - 98,05%), és a negatív prediktív érték pedig 96,55% (95% CI = 82,24% - 99,91%).
- b) neoplasticus elváltozást vs. valamennyi normál cervicalis mirigyhámot tartalmazó minta (n=66) összehasonlításánál a szenzitivitás átlagértéke 98,15% (95% CI = 90,11% - 99,95%), a specificitás 100% (95% CI = 94,4% - 100%), a pozitív prediktív érték 100% (95% CI = 93,28% - 100%), a negatív prediktív érték pedig 98,46% (95% CI = 91,72% - 99,96%).
- c) neoplasticus vs. együttes nem neoplasticus léziót és normál endocervixet tartalmazó minta (n=98) összevetésénél a szenzitivitás 98,15% (95% CI = 90,11% - 99,95%), a specificitás 95,88% (95% CI = 89,78% - 98,87%), a pozitív prediktív érték 92,98% (95% CI = 83% - 98,05%), a negatív prediktív érték 98,46% (95% CI = 94,17% - 99,97%).

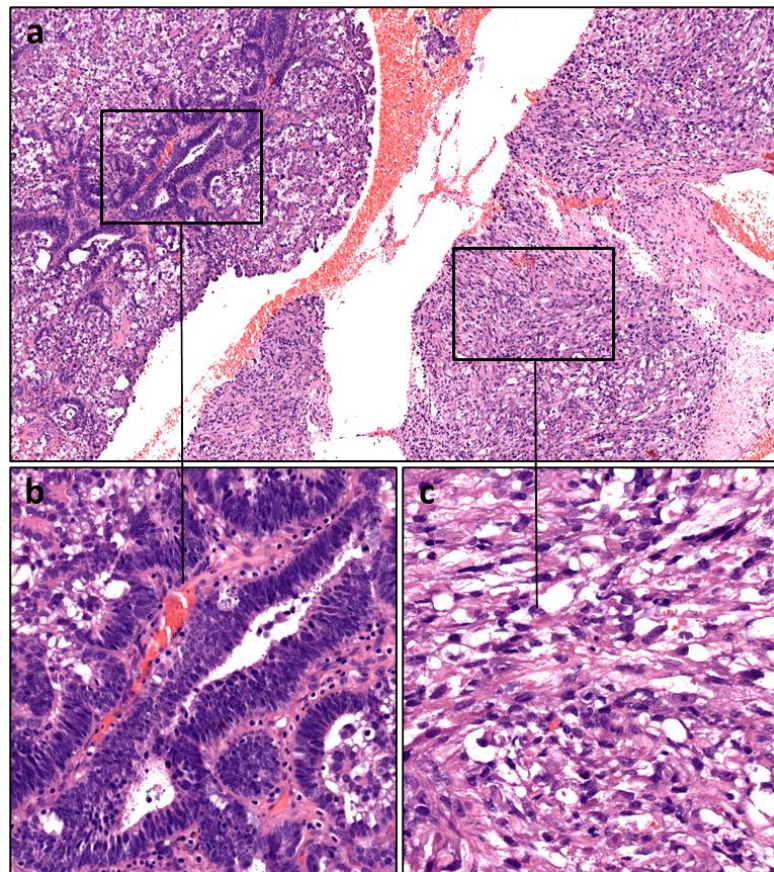
A neoplasticus endocervicalis elváltozások (ECA és AIS) immunreaktivitásának elemzésénél a kiértékelők közötti osztályon belüli korrelációs együttható (ICC) 0,53 az egyéni értékelésnél (95%-os konfidencia intervallum = 0,37 - 0,67), és 0,77 az átlagos értékelés tekintetében (95%-os konfidencia intervallum = 0,64 - 0,86).

A nem neoplasticus endocervicalis léziók immunhisztokémiai vizsgálatánál az elemzést végző szakorvosok közötti ICC 0,8 volt az egyéni értékelésnél (95%-os konfidencia intervallum = 0,68-0,89), és 0,92 az átlagos értékelésre vonatkozóan (95%-os konfidencia intervallum = 0,86-0,96).

IV.2. Az EZH2, p16 és p53 expresszió méhtest carcinosarcomákban

Ebben a vizsgálatban 28 méhtest carcinosarcomában szenvedő nő vett részt, átlagos életkoruk 70,5 év (53-85 év). A formalin-fixált és paraffinba ágyazott szövetminták 22 sebészi - hysterectomiás - rezekátumból és 6 biopsiás (kürett) mintából származtak. Szövettanilag az epithelialis komponens 14 (50%) esetben serosus, 9-ben (32,1%) endometrioid, 2-ben (7,1%)

differentiálatlan és 3 mintában kevert (serosus és endometrioid) carcinomából (10,7%) állt. A mesenchymalis komponens 7 esetben (25%) heterológ, 21 mintában (75%) pedig homológ elemeket tartalmazott. A heterológ sarcoma komponensek között 4 chondrosarcoma és 3 rhabdomyosarcoma (RMS) fordult elő. A leggyakoribb homológ komponens az endometrialis stromalis sarcoma (ESS) volt (n = 14), ezt követte 3 leiomyosarcoma (LMS), 3 nem differenciált sarcoma és 1 myxoid fibrosarcoma (MFS).



9. ábra: Méhtest carcinosarcoma epithelialis (serosus carcinoma) és mesenchymalis (homológ/leiomyosarcoma) komponensei H&E festéssel **(a)** UCS kaparék mintája benne a két komponenssel megjelölve (1. e.sz., nagyítás: 100x), **(b)** Epithelialis komponens (nagyítás: 400x), **(c)** Mesenchymalis komponens (nagyítás:400x).

A 28 carcinosarcoma eset klinikai adatait, valamint EZH2, p16 és p53 immunhisztokémiai elemzésének részletes eredményeit a **7. táblázat** tartalmazza.

7. táblázat: A carcinosarcoma esetek klinikai adatai, az EZH2 és p16 immunreaktivitás, valamint a p53 IHC eredményei

Eset-szám	Életkor	Epithelialis komponens/ Carcinoma	Mesenchymalis komponens/ Sarcoma	Immunreaktivitás																p53 IHC ³					
				Nuclearis festődés %-os aránya ¹				Nuclearis festődés intenzitása ²				EZH2				Kiértékelő									
				EZH2		p16		EZH2		p16		EZH2		p16		EZH2		p16		EZH2		p16			
				1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2		
1.	70	Serosus	Homológ/LMS ⁶	Ek	Mk	Ek	Mk	Ek	Mk	Ek	Mk	Ek	Mk	Ek	Mk	Ek	Mk	Ek	Mk	Ek	Mk	Ek	Mk	Ek	Mk
2.	83	Endometrioid	Homológ/ESS ⁷	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3.	76	Kevert	Homológ/ESS	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4.	72	Nem diff.	Heterológ/Chondros.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5.	72	Endometrioid	Homológ/ESS	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6.	67	Endometrioid	Homológ/ESS	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
7.	63	Endometrioid	Homológ/ESS	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
8.	60	Endometrioid	Homológ/LMS	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
9.	53	Endometrioid	Homológ/ESS	+++	+++	+++	-	+	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+
10.	57	Serosus	Homológ/ESS	+++	+++	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+
11.	71	Serosus	Heterológ/RMS ⁸	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
12.	80	Nem diff.	Homológ/Nem diff.s.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
13.	79	Endometrioid	Heterológ/Chondros.	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
14.	59	Serosus	Homológ/ESS	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
15.	62	Serosus	Heterológ/Chondros.	++	+++	++	+++	+	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+
16.	83	Serosus	Homológ/LMS	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
17.	75	Kevert	Homológ/MFS ⁹	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
18.	67	Serosus	Homológ/ESS	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
19.	59	Kevert	Homológ/ESS	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
20.	84	Serosus	Homológ/ESS	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
21.	71	Serosus	Homológ/ESS	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
22.	85	Endometrioid	Homológ/ESS	+++	+	+++	+++	++	-	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
23.	60	Serosus	Homológ/Nem diff.s.	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
24.	71	Serosus	Homológ/ESS	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
25.	61	Endometrioid	Heterológ/Chondros.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
26.	78	Serosus	Homológ/Nem diff.s.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
27.	63	Serosus	Heterológ/RMS	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
28.	53	Serosus	Heterológ/RMS	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

¹Immunreaktivitás mértéke: +++ = >50%, ++ = 10-50%, + = <10%, - = negatív – nincs egyértelmű immunreaktivitás 40x-es nagyítással; ²Immunreaktivitás intenzitása: +++ = erős, ++ = közepes, + = gyenge, 0 = nincs festődés; ³p53 Immunhisztokémia; ⁴Epithelialis komponens; ⁵Mesenchymalis komponens; ⁶Leiomiosarcoma; ⁷Endometrialis stromalis sarcoma; ⁸Rhabdomyosarcoma; ⁹Myxoid fibrosarcoma; ¹⁰Aberráns/p53 diffúz nuclearis expressio: 80%-ban erős és diffúz magfestődés; ¹¹Aberráns/p53 null mintázat: nuclearis festődés teljes hiánya valamennyi sejten; ¹³Vad típusú (normál): elszórt sejtmagfestődés.

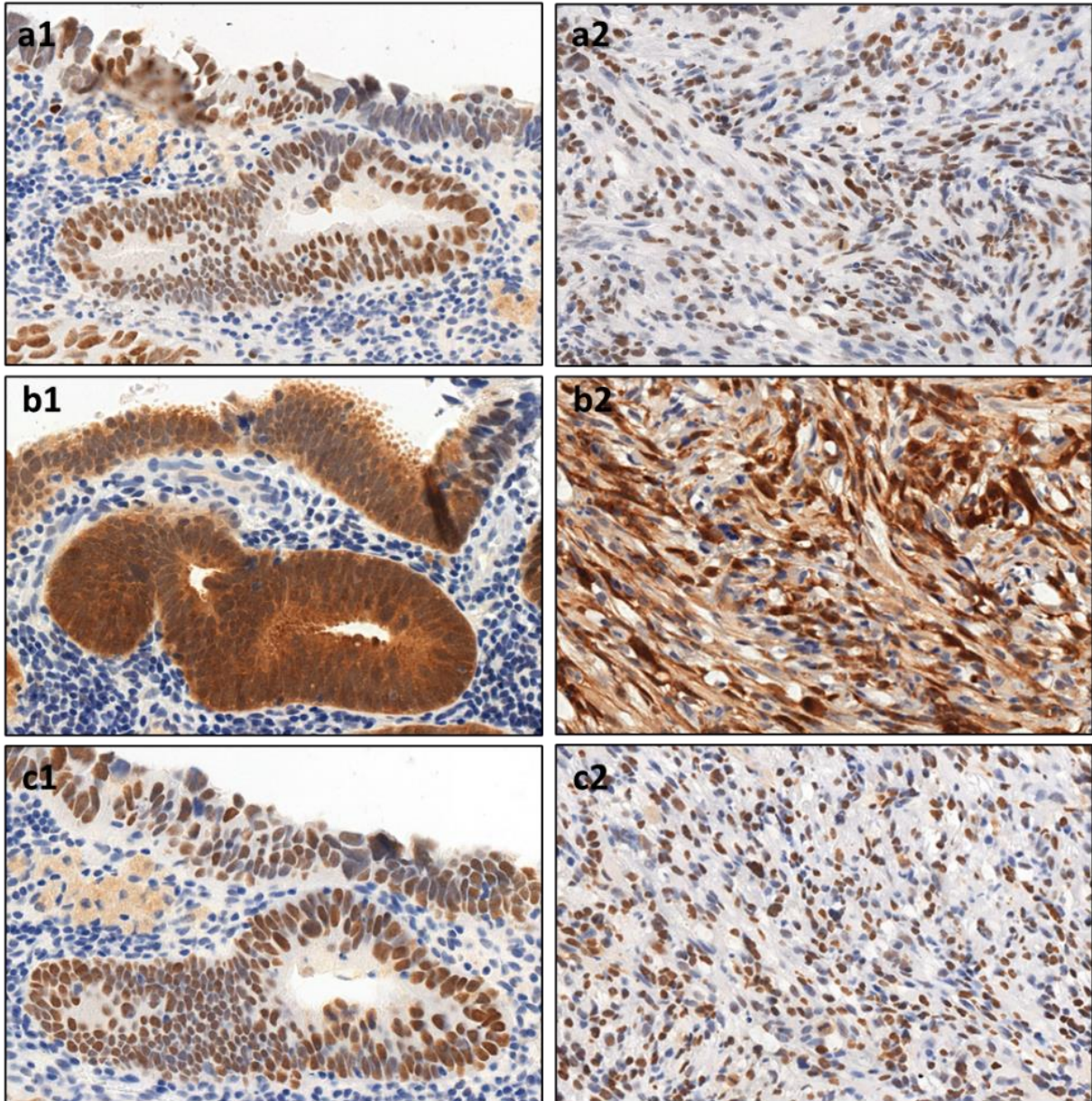
Az EZH2 és a p16 immunreaktivitás vizsgálatának összesített eredményeit a **8. táblázat** mutatja. Az immunhisztokémiai vizsgálat során az EZH2 fokozott expressziója kissé gyakoribb volt az epithelialis/carcinoma komponensekben (89,3%), mint a mesenchymalis/sarcoma (78,6%) alkotóelemekben. Hasonlóan fokozott p16 expresszió is valamivel gyakoribb volt a hámkomponensekben (78,6%), mint a mesenchymalisokban (62,5%). Fisher-féle egzakt teszt alapján az EZH2 és a p16 expressziója az epithelialis és a mesenchymalis komponensek között statisztikailag nem különbözött (EZH2 esetén $p=0,468$; p16 esetén $p=0,248$). Az EZH2 és a p16 nuclearis festődési százalékának és intenzitásának összegeként kapott pontértékei 0-6 között mozogtak. A Mann-Whitney tesztek alapján a két marker nuclearis festődésének százalékos aránya és intenzitása sem különbözött statisztikailag a hám és a kötőszöveti elemek között (festődés %-os aránya EZH2 esetén $p = 0,074$; p16 esetén $p = 0,076$; ill. a festődés intenzitása EZH2 esetén $p = 0,11$; és p16 esetén $p = 0,059$).

8. táblázat: Az EZH2 és a p16 immunreaktivitása UCS-k komponenseiben két patológus egymástól független kiértékelésének eredményei alapján (a festődési index mediánjai, a festődési százalék és intenzitás összegei)

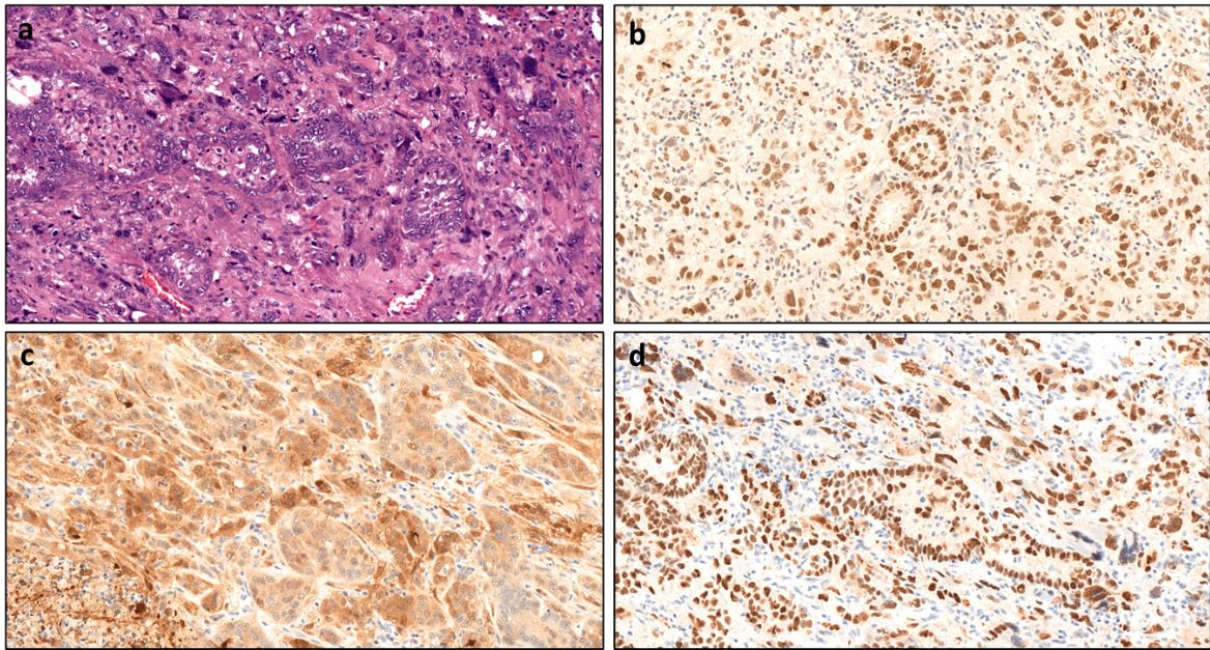
	EZH2		p16	
	Epithelialis komponens	Mesenchymalis komponens	Epithelialis komponens	Mesenchymalis komponens
Festődési index	n (%)			
Alacsony ¹	3 (10,7)	6 (21,4)	6 (21,4)	10,5 (37,5)
Magas²	25 (89,3)	22 (78,6)	22 (78,6)	17,5 (62,5)
	Átlag³ (SD)			
Festődési %	5,68 (0,72)	5,18 (1,15)	4,96 (1,68)	4,32 (1,87)
Nuclearis festődés intenzitása	5,64 (0,95)	5,18 (1,36)	5,21 (1,5)	4,46 (1,86)

¹Festődési index of ≤ 4 ; ²Festődési index of > 4 ; ³Értéktartomány= 0-6.

Az EZH2 és a p16 diffúz és fokozott expressziójának, valamint a p53 diffúz nuclearis mintázat reprezentatív eseteit a **10-11. ábra** mutatja be.



10. ábra: Mind az epithelialis (**a1,b1,c1**), mind a mesenchymalis (**a2,b2,c2**) komponens diffúz, erős pozitív festődést (3+) mutat (**a1,a2**) EZH2 és (**b1,b2**) p16 markerrel; >80% erős és diffúz magfestődés látszik (**c1,c2**) p53-mal mindkét komponensben (1. e.sz., nagyítás: 400x).



11. ábra: Méhtest carcinosarcoma (26. e.sz., nagyítás: 200x) **(a)** malignus epithelialis (serosus carcinoma) és malignus mesenchymalis (homológ/nem differenciált sarcoma) komponense H&E festéssel. **(b,c,d)** Diffúz, erős pozitív (3+) expresszió **(b) EZH2**-vel és **(c) p16**-tal; >80% erős és diffúz magfestődés **(d) p53**-mal mindkét komponensben.

Az EZH2 és a p16 különböző carcinoma komponensekben megfigyelt immunreaktivitás értékeit a **9. táblázat** tartalmazza. Mind a serosus, mind az endometrioid histotípusok mindkét markerrel szembeűnő festődést mutattak. Az EZH2 fokozott expressziója szinte valamennyi esetben kimutatható volt (89%-ban mind az endometrioid, mind a savós carcinomák esetén). Fokozott p16 expresszió szintén nagyon gyakran megfigyelhető volt (az endometrioid carcinomák 88%-ában, a serosus esetek 79%-ában). A serosus vs. endometrioid histotípusok összehasonlításánál az EZH2 és a p16 festődési pontszámok között nem találtunk statisztikai különbséget (serosus vs. endometrioid histotípusok esetén: Fisher-féle egzakt teszt alapján az EZH2 és p16 festődési indexre vonatkozó p értékek 0,74 és 0,96; Mann-Whitney teszt alapján az EZH2 és a p16 festődési százalékára vonatkozóan a p érték 0,35 és 0,15, míg a festődési intenzitást illetőleg 0,37 és 0,26).

9. táblázat: Az EZH2 és a p16 immunreaktivitása az UCS-k epithelialis komponenseinek hisztotípusaiban két patológus független kiértékelésének alapján (a festődési index mediánjai, a festődési százalék és intenzitás összegei)

	EZH2				p16			
	Endometrioid	Serosus	Kevert	Nem diff.	Endometrioid	Serosus	Kevert	Nem diff.
Festődési index	n (%)							
Alacsony ¹	1 (11)	1,5 (10,7)	0,5 (16,7)	0 (0)	2 (22)	3 (21)	1 (33,3)	0 (0)
Magas²	8 (89)	12,5 (89,3)	2,5 (83,3)	2 (100)	7 (88)	11 (79)	2 (66,7)	2 (100)
	Átlag³ (SD)							
Festődési %	5,77 (0,66)	5,57 (0,85)	5,66 (0,57)	6 (0)	4,88 (1,45)	4,93 (1,9)	4,66 (2,3)	6 (0)
Festődés intenzitása	5,44 (1,33)	5,71 (0,82)	5,66 (0,57)	6 (0)	5,11 (1,76)	5,28 (1,32)	4,66 (2,3)	6 (0)

¹Festődési index of ≤ 4 ; ²Festődési index of > 4 ; ³Értéktartomány= 0-6.

Az EZH2 és a p16 homológ és heterológ sarcoma komponensekben kiértékelt immunreaktivitás összesített eredményeit a **10. táblázat** tartalmazza.

Mindkét sarcomatípus hasonlóan gyakori fokozott EZH2 expressziót (a homológ komponensek 79%-a, a heterológ elemek 78,6%-a) és p16 expressziót (a homológ esetek 60%-a, a heterológok 72%-a) mutatott. Statisztikai különbség a két marker között nem bizonyult. (Homológ vs. heterológ típusok között: Fisher-féle egzakt teszt alapján az EZH2 és p16 festődési indexére vonatkozó p értékek 1, ill. 0,66; Mann-Whitney teszt alapján az EZH2 és p16 festődési százalékára vonatkozóan 0,37 és 0,4 voltak, a festődési intenzitásra pedig 0,1 és 0,48).

10. táblázat: Az EZH2 és a p16 immunreaktivitása az UCS-k mesenchymalis komponenseinek homológ és heterológ hisztotípusaiban két patológus független kiértékelésének alapján (a festődési index mediánjai, a festődési százalék és intenzitás összegei)

	EZH2		p16	
	Homológ	Heterológ	Homológ	Heterológ
Festődési index	n (%)			
Alacsony ¹	4,5 (21)	1,5 (21,4)	8,5 (40)	2 (28)
Magas²	16,5 (79)	5,5 (78,6)	12,5 (60)	5 (72)
	Átlag³ (SD)			
Festődés %	5,14 (1,23)	5,28 (0,95)	4,23 (1,92)	4,57 (1,81)
Nuclearis festődés intenzitása	5,38 (1,28)	4,57 (1,51)	4,42 (1,98)	4,57 (1,51)

¹Festődési index of ≤ 4 ; ²Festődési index of > 4 ; ³Értéktartomány= 0-6.

A p53 IHC eredményeit a **11. táblázat** szemlélteti. Aberráns p53 immunfestődés az epithelialis komponensek 85,7%-ában, a mesenchymalis elemek 82,1%-ában volt megfigyelhető, mely értékek statisztikailag azonosak voltak (Fischer teszt $p = 1$). Az epithelialis komponenseken belül az endometrioid carcinomák 66,6%-ában, a savós carcinomák 100%-ában aberráns p53 expressziót találtunk, ami statisztikailag szignifikáns (Fisher teszt $p = 0,0474$). A mesenchymalis komponenseket tekintve a homológ sarcoma esetek 76,2%-a, míg valamennyi heterológ sarcoma (100%) aberránsnak mutatkozott (nincs statisztikai különbség, Fisher teszt $p = 0,29$). Aberráns diffúz nuclearis p53 expressziót a homológ sarcoma hisztotípusok 81,2%-ában észleltünk, míg a heterológ esetek csak 28,6%-ában tapasztaltunk (a különbség statisztikailag szignifikáns, Fisher teszt $p = 0,032$). Aberráns p53 *null* mintázatot a heterológ sarcomák 71,4%-ában figyeltünk meg, míg a homológ sarcomáknak csak 18,8%-a mutatta ezt a festődési mintázatot (a különbség statisztikailag szignifikáns, Fisher teszt $p = 0,0257$). Egyéb szignifikáns különbséget nem találtunk az UCS komponenseinek és különböző hisztotípusainak p53 festődési mintázatai között.

Mérsékelt p53 cytoplasmaticus festődést csupán fokálisan, 3/28 esetben (lásd 8., 10. és 13. e.sz./**7. táblázat** és **12. ábra**) figyeltünk meg, de egyik daganat sem mutatott aberráns

cytoplasmaticus expressziós mintázatot. Ugyanis mindhárom esetben diffúz nuclearis p53 expressziós mintázat igazolódott, mely a cytoplasmaticus festődést felülírta, ezáltal mindhárom esetet diffúz nuclearis p53 IHC mintázatúnak tulajdonítottunk.

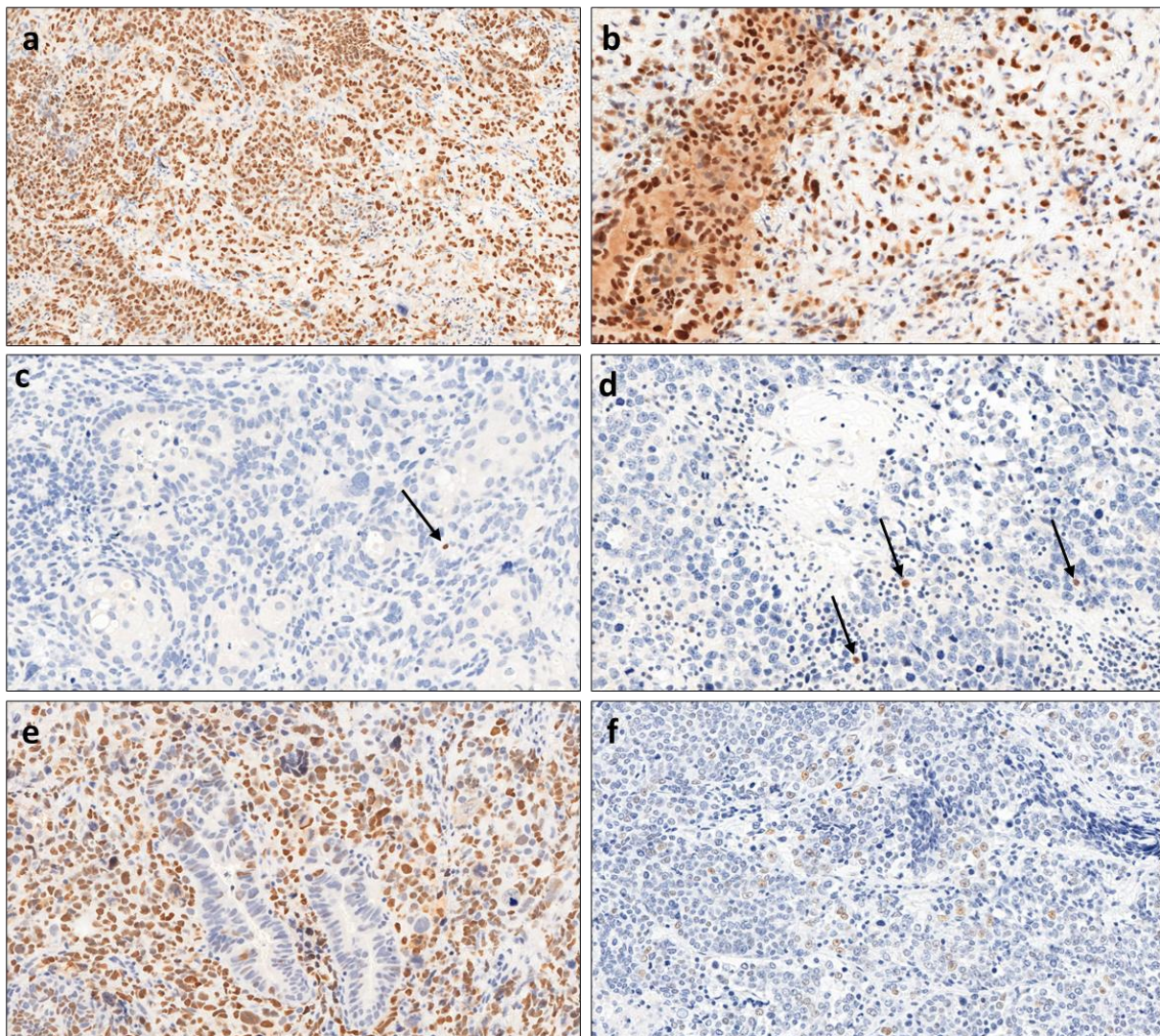
A **12. ábra** a különböző p53 expressziós mintázatokat mutatja.

11. táblázat: p53 festődési mintázatok UCS komponensekben és hisztotípusaikban

Expresszió		Epithelialis komponens				Mesenchymalis komponens			
		Endometrioid	Serosus	Kevert	Nem diff.	Összes	Homológ	Heterológ	Összes
Vad típus¹		3/9 (33,3%)	0/14 (0%)	0/3 (0%)	1/2 (50%)	4/28 (14,3%)	5/21 (23,8%)	0/7 (0%)	5/28 (17,9%)
Aberráns²		6/9 (66,6%)	14/14 (100%)	3/3 (100%)	1/2 (50%)	24/28 (85,7%)	16/21 (76,2%)	7/7 (100%)	23/28 (82,1%)
Mintázat	Diffúz nuclearis	5/6 (83,3%)	11/14 (78,6%)	2/3 (66,7%)	0/1 (0%)	18/24 (75%)	13/16 (81,2%)	2/7 (28,6%)	15/23 (65,2%)
	Null	1/6 (16,7%)	3/14 (21,4%)	1/3 (33,3%)	1/1 (100%)	6/24 (25%)	3/16 (18,8%)	5/7 (71,4%)	8/23 (34,8%)
	Cytopl.	0/6 (0%)	0*/14 (0%)	0/3 (0%)	0/1 (0%)	0*/24 (0%)	0/16 (0%)	0/7 (0%)	0/23 (0%)

¹Vad típus (normális): elszórt nuclearis festődés; ²Aberráns/Diffúz nuclearis mintázat: >80% erős és diffúz nuclearis festődés (cytoplasmaticus festődéssel vagy nélkül), **Aberráns/null pozitív mintázat:** nuclearis festődés teljes hiánya valamennyi sejtben, **Aberráns/cytoplasmaticus mintázat:** közepes-erős cytoplasmaticus festődés diffúz nuclearis expresszió hiányában; *Két endometrioid és egy serosus carcinomát tartalmazó esetben közepes cytoplasmaticus festődést észleltünk, de emellett 80% feletti erős és diffúz magfestődést is, mely utóbbi miatt mindhárom esetet diffúz nuclearis mintázatúnak tulajdonítottunk (lásd **12. ábra**).

Konkordancia vizsgálat során a p53 82,14%-ban volt összhangban az epithelialis és a mesenchymalis komponensek között (Cohen-féle K: 0,34 = „korrekt egyezés”).



12. ábra a-f: p53 expressziós mintázatok. **a-b:** Aberráns, p53 diffúz nuclearis mintázat gyenge **(a)** és közepes **(b)** cytoplasmaticus festődéssel UCS epithelialis és a mesenchymalis komponensében (a: 26. e.sz, nagyítás: 200x; b: 5. e.sz., nagyítás: 400x). **c-d:** Aberráns, p53 *null* mintázat, valamennyi sejtben a nuclearis festődés teljes hiányával mindkét UCS komponensben (c: 21. eset, nagyítás: 200x, d: 4. eset, nagyítás: 200x). A nyilak a belső pozitív kontrollokat (lymphocyták) jelzik. **e-f:** Vad típusú p53 IHC mintázat elszórt magfestődéssel mind az epithelialis **(e)**, mind a mesenchymalis **(f)** komponensben, **e:** aberráns, p53 diffúz nuclearis mintázat a mesenchymalis komponensben (e: 19. e.sz., nagyítás: 200x, f: 22. e.sz., nagyítás: 400x).

V. MEGBESZÉLÉS

V.1. Az EZH2 expresszió endocervicalis léziókban

Jelen dolgozat célja az EZH2 expressziós állapotának tanulmányozása volt munkánk első fázisában a neoplasticus endocervicalis léziókban, mint például az ECA és AIS, majd összehasonlítva a normál mirigyhámmal és a benignus, nem neoplasticus endocervicalis léziókkal.

Ebben a vizsgálatban valamennyi méhnyak mirigyhámdaganatos elváltozás EZH2 pozitívnak bizonyult eredményeink alapján. Ezenkívül az immunreaktivitást nagyon kiterjedtnek/diffúznak találtuk. Egy eset kivételével az összes (98,14%) daganatos elváltozás fokozott/robusztus EZH2 expressziót mutatott.

Ezzel szemben az EZH2 ezen intenzív jelölődése szignifikánsan ritkább (32 esetből 4, 12,5%) volt a nem daganatos mirigyes elváltozásokban (kétirányú teszt $p < 0,0001$). A normál szomszédos mirigyekben pedig egyik esetben sem (0/66) találtunk EZH2 pozitivitást. Olykor a téves pozitív festődést laphám metaplasia vagy rezervsejtes hyperplasia okozta (pl. lásd 7. ábra/b2 eset).

Mindemellett, a fokozott EZH2 expresszió kiváló diagnosztikai tesztképesseggel rendelkezik a neoplasticus elváltozások vs. nem neoplasticus léziók és a normál endocervix megkülönböztetésében. 98,15%-os szenzitivitás és 95,88%-os specificitás értékeket számoltunk a neoplasticus vs. együttes nem neoplasticus elváltozások és a normál endocervikális hámminták megkülönböztetésében ($n=98$), a pozitív prediktív érték 92,98%, a negatív prediktív érték pedig 98,46%. Az értékelők közti átlagos egyetértés kiválóan bizonyult [137].

Adataink arra utalnak, hogy az EZH2 nemcsak az emlő [77], tüdő [78], nyelőcső [79], gyomor [80], vastagbél [81], hasnyálmirigy-epeúti traktus [82], máj [83][84], pajzsmirigy [85], prostata [86], vese [87], húgyhólyag [88], a méhnyak laphám eredetű [90], méhtest [91][92] és a petefészekrák [93][94] rosszindulatú daganatainak pathogenezisében játszik szerepet, hanem endocervicalis neoplasiában [138] is.

Eredményeink alapján az EZH2 fehérje jelentős expressziója nemcsak az invazív endocervicalis mirigyhámrákok, hanem azok rákmegelőző elváltozásaiban is megfigyelhető, mely azt sugallja, hogy az EZH2 már a daganatképződés korai fázisában megjelenik. Ezek a megfigyelések összhangban vannak pl. húgyhólyagrákban [139], illetve emlőszövetben [140] tett megfigyelésekkel.

Mivel az EZH2 expressziója - függetlenül a humán papillomavírus jelenlététől - minden vizsgált esetben kimutatható volt, az eredményeink nem támogatják azon hipotézist, miszerint az EZH2 fokozott kifejeződése ECA esetén a HPV E7 onkoprotein által bekövetkező folyamat [141]. Feltételezzük, hogy az EZH2 lényeges és független tényező az endocervicalis carcinogenezisben és nagy valószínűséggel fokozott kifejeződése egyéb kontextusfüggő folyamatok eredménye hasonlóan a hasnyálmirigy ductalis adenocarcinomáihoz [142].

Eredményeinket azonban óvatosan kell értelmeznünk, mivel az endocervicalis adenocarcinomák különböző NHPVA formáit alacsony esetszámmal vizsgáltuk. A fehérje expresszió és a mirigyhám elváltozások háttérében álló okok összefüggésének felderítéséhez további vizsgálatok szükségeltetnek.

Yuting Gu és munkatársai az EZH2 expresszióját tanulmányozták endometrium carcinomákban. Megfigyelték, hogy az EZH2 jelölődésének aránya szignifikánsan magasabb a méhnyálkahártya daganatszövetben (68,27%), mint a szomszédos szövetekben (24,03%) [143]. Jia és mtsai. kimutatták, hogy az EZH2 fokozottan (közepestől erős immunreaktivitásig) expresszálódik komplex és atípusos hyperplasiában és méhnyálkahártyarákban, viszont egyszerű hyperplasiában és normál endometriumban nem, vagy csak gyengén [144]. Jin és mtsa. az EZH2 rendellenes fokozott expresszióját figyelték meg méhnyak laphámsejtes carcinomában a szomszédos normál szövetekhez képest ($P=0,0005$). Bár ezek a vizsgálatok az immunreaktivitás intenzitását vizsgálták, ellentétben az immunreakció mértékével, mint ahogy a jelen dolgozatban. Ennek ellenére eredményeink összehasonlíthatónak tűnnek, ugyanis az EZH2 expressziós különbségei a daganatos és nem daganatos és/vagy normál szövetek között legalább olyan jelentősek az endocervixben, mint az endometriumban vagy a cervicalis laphámban. Ez pedig felveti a lehetőséget, hogy az EZH2 festés differenciáldiagnosztikai eszközként alkalmazható endocervicalis elváltozások esetén.

Az irodalomban több biomarkerről találunk bizonyítékot a méhnyakrák és premalignus lézióinak, továbbá a nem neoplasticus elváltozások differenciáldiagnosztikai hasznosíthatóságáról, melyek döntő többsége a laphámelváltozásokra vonatkozik. Ezzel ellentétben a mirigyes elváltozásokról azonban korlátozott információ áll rendelkezésre.

Megfigyeléseink szerint az EZH2 AIS és ECA minták mindegyikében erősen expresszálódik. Howitt és mtsai. stathmin-1 microtubulus-destabilizáló foszoprotein (STMN) és p27kip1 sejtciklus szabályozó fehérje kimutatására irányuló vizsgálataik alkalmazása kapcsán hasonló eredményekről számolnak be. Az STMN gyakorlatilag minden cervicalis carcinomában (laphám és mirigyhám eredetűben egyaránt) és prekursor lézióiban is fokozottan expresszálódik. Emellett valamennyi ECA eset fokozott p27 expressziót mutatott [145].

Alacsony esetszám (mindössze 12 eset) mellett, vizsgálati eredményeinkkel megegyező expressziós mintázatot közölt Liao és nőgyógyászati onkológiai csoportja Carboanhidráz-IX (CA-IX) fehérje vonatkozásában. Adataik arra utalnak, hogy a CA-IX megfelelő helyettesítő biomarker lehet gyomor típusú endocervicalis neoplasiák esetén [146].

Sajnos a mai napig nem sikerült olyan biomarkert azonosítani, melynek alkalmazásával az endocervicalis (pre)malignus folyamatok teljesen megbízhatóan elkülöníthetők lennének. Jelenleg ezekhez különböző markerek kombinációit tartalmazó paneleket javasolnak: Sandra Lee és munkatársainak megfigyelései során a p16, p16/Ki67 kettős festés, ProExC, CEA, ESA, HIK1083, Claudin 18, és az ER jelvesztés a léziók körüli stromasejtekben hasznosnak bizonyultak magas ($\geq 0,75$) szenzitivitási és specificitási becslésekkel ≥ 1 malignus vs. benignus lézió összehasonlításában [147]. Ezekhez képest a mi adataink azt mutatják, hogy az EZH2 fokozott expressziója önmagában nagyobb diagnosztikai megbízhatósággal - 95% feletti szenzitivitással és specificitással - rendelkezik.

Következtetéképpen elmondható, hogy az EZH2 szerepet játszhat az endocervicalis daganatok patogenezisében, és az EZH2 fokozott expressziójának kimutatása hasznos differenciáldiagnosztikai eszköz lehet a diagnosztikailag kihívást jelentő kis biopsiás mintákban vagy a lapos kúposított minták bizonytalanul megítélhető, mechanikus/hő károsodást szenvedett sebészi széleiben megjelenő problémás endocervikális léziókban a szövettani mintákban és nem utolsósorban valószínűleg a cytológiában is.

V.2. Az EZH2, p16 és p53 expresszió méhtest carcinosarcomákban

A méhtest carcinosarcoma (UCS) az endometrium daganatok ritka és klinikailag agresszív típusa, melynek patogenezise még mindig vitatott.

Eredményeink azt mutatják, hogy az EZH2 és a p16 hasonlóan fokozottan expresszálódik, ill. a legtöbb UCS eset aberráns p53 expressziót mutat. Emellett az UCS hisztotípusok között mintázatbeli különbségeket találtunk.

A carcinosarcomák különböző immunhisztokémiai profiljait korábban már leírták.

Az EZH2 pozitivitást UCS-ben kutatásainkat megelőzően csupán egy tanulmány közölte egyetlen effúziós cytológiai mintából kimutatva [126]. Ebben a tanulmányban Piao Piao Ang. és mtsai. az EZH2 egyetlen immunmarkerként való alkalmazhatóságának vizsgálatát tűzték ki célul a metastaticus carcinoma diagnosztizálására effúziós mintákon. Összesen 108 pleurális, peritoneális és pericardiális folyadékgyülemet/mosófolyadékot vizsgáltak meg, amelyeket cytomorfológiailag egyértelműen reaktívnak (n = 41) illetve metastaticus carcinomának (n = 67) diagnosztizáltak. A metastaticus carcinoma esetek közül 54 adenocarcinoma, a többi laphámsejtes carcinoma (n = 1), carcinosarcoma (n = 1) és nem definiálható szövettani altípusú carcinoma (n = 11) volt. Az egyetlen carcinosarcoma cytológiai mintája EZH2 pozitív volt.

A p16 és p53, mint diagnosztikai és prognosztikai markerek szerepét UCS-ben korábbi tanulmányok már bizonyították. Engelsen és mtsai. magas kockázatú endometrium carcinomás betegektől nyert méhkaparék mintákon mutatták ki a p53 és p16 patológiás expressziójának és a betegség rossz prognózisának összefüggését [148]. Buza és Tavassoli a p16 marker fokozott expresszióját igazolták méhtest carcinosarcomák (MMMT) mindkét komponensében. Ugyanazon carcinosarcoma szövetminta két komponense között a p16 és a p53 immunreaktivitás egyezési aránya 83%, illetve 90% volt. Következésképpen nincs szignifikáns különbség a p16 festődésben a két komponens között. A p16 immunhisztokémiai reakció a p53-hoz képest azonban lényegesen intenzívebb és diffúzabb volt mind a carcinoma, mind a sarcoma komponensekben. Eredményeik azt mutatják, hogy a p16/Rb útvonal változásai fontos szerepet játszanak a méhtest MMMT-k patogenezisében [67]. Xiaowei és mtsai. megvizsgálták a p16, p53 és PAX8 immunhisztokémiai markerek együttes lehetséges

hasznosságát a carcinosarcomák diagnosztizálásában. A p16 és a p53 markerek mindkét komponensben majdnem azonos festődését észlelték. A p16 csaknem ugyanolyan fokozott expressziót mutatott az epithelialis (74%) és a mesenchymalis (71%) komponensekben. Továbbá a p53 expressziója is hasonló volt az epithelialis (48%) és a mesenchymalis (44%) komponensekben. A PAX8 fokozott expressziója viszont gyakoribb volt az epithelialis (73%), mint a mesenchymalis (13%) komponensekben [130].

Ezzel ellentétben a PAX8-hoz képest az EZH2 kutatásunk során nemcsak az epithelialis komponensben mutat valamivel magasabb expressziós arányt, hanem hasonlóan fokozottan jelölődik a mesenchymalis komponensben is.

Tanulmányok igazolják az EZH2 fokozott expresszióját a leggyakoribb nőgyógyászati rosszindulatú daganatokban, mint például a méhnyak [101][138], az endometrium [102][103] és a petefészekrák [104][105]. Az EZH2 expresszió prognosztikai jelentőségéről, a daganat agresszivitásával való összefüggéséről is beszámoltak ezekben a daganatokban szenvedő betegeknél [143][149][150][151]. Az EZH2-t a daganatterápia lehetséges célpontjának tartják, ezért az EZH2-gátlókkal kapcsolatos preklinikai és klinikai vizsgálatok jelenleg is intenzíven zajlanak [152][153][154][155][156]. UCS-ben az EZH2-ről, mint lehetséges terápiás célpontról irodalmi adat nem áll rendelkezésre.

Számos további immunhisztokémiai markert vizsgáltak potenciális markerként az UCS diagnosztikájában. Abargel és mtsa. a p27 magas arányú csökkent expresszióját figyelték meg mind a mesenchymalis (77,8%), mind az epithelialis (66,7%) komponensekben [157]. Menczer és mtsa. a C-Kit expresszióját vizsgálták méhtest carcinosarcomában, melynek kötőszöveti alkotóelemében nem láttak C-Kit festett sejteket, valamint az epithelialis komponensben is csupán alacsony pontozási indexe volt a C-Kit festődésének [158]. Későbbi tanulmányukban a COX-2 markerről közöltek, mely a carcinoma komponens 74%-ában volt pozitív, magas festődési érték 48,2% arányban volt megfigyelhető, ezzel ellentétben a sarcoma komponensben szignifikánsan alacsonyabb festődési paramétereket (11% pozitivitás, 3% magas festődési pontszám) mutatott [159]. Saglam és mtsai. AKT kináz, epithelialis növekedési faktor receptor (epithelial growth factor receptor, EGFR), C-ErbB-2 és C-Kit expresszióját tanulmányozták UCS-ben, melyek közül az AKT és EGFR antitest erősebb immunreaktivitást mutatott, továbbá a prognózis vizsgálatnál az epithelialis komponens esetében az AKT expressziója összefüggött a betegség kimenetelével [160]. A közelmúltban a

carcinosarcomákban a HER2, mint potenciális terápiás marker festődését is kimutatták, melynek fokozott expressziója/amplifikációja 6% és 25% közötti. Ezenfelül bizonyították a HER2 expresszió/amplifikáció intratumorális heterogenitását, ill. - a carcinoma komponenshez képest – a sarcoma komponensekben való alacsonyabb expresszióját is [157][158][159].

Az elmúlt években az EZH2 expressziójának fokozódását felfedezték bizonyos sarcomákban, beleértve a Ewing-sarcomát [113], az RMS-t [161], a synovialis sarcomát [162], az osteosarcomát [163] és a chondrosarcomát [164]. Zhang és mtsai. benignus és malignus izom eredetű tumorok (beleértve a méhtest LMS-t) EZH2 expresszióját hasonlították össze. Eredmények szerint az EZH2 91,30%-os érzékenységgel és 100%-os specificitással rendelkezik a jól differenciált LMS és a tőle olykor nehezen differenciálható cellularis leiomyoma megkülönböztetésében. Azt is megfigyelték, hogy az EZH2 RMS-ben ugyancsak erősen expresszálódik. Megállapították, hogy az EZH2 új differenciáldiagnosztikai markerként használható a jól differenciált LMS vs. cellularis leiomyoma, ill. az embryonalis RMS vs. rhabdomyoma megkülönböztetésére [165].

A méhnyálkahártya daganatokat általánosságban tekintve, a savós és endometrioid carcinomák közötti eltérő p53 és p16 festődési mintázat az irodalomban jól ismert [166][167][168]. A p53-at vizsgáló legtöbb tanulmányban elsődleges hangsúlyt helyeznek a p53 *overexpressziója* vs. serosus histotípus közötti összefüggés vizsgálatára [169]. A TP53 mutációk megfigyelhetők intraepitelialis carcinomákban, és úgy gondolják, hogy a méh savós carcinoma patogenezisének korai szakaszában fordulnak elő [170]. Emellett a p53 fokozott expresszióját figyelték meg az endometrioid carcinomák egy részében, főként a FIGO *Grade 3* daganatokban [171]. Egy 2018-as ajánlás szerint a kettős negatív immunprofil (p16 negatív és p53 vad típus) elsősorban az endometrioid, míg a kettős pozitivitás (diffúz, erős p16 pozitív és p53 aberráns/mutációs típus) nagyobb valószínűséggel a serosus carcinomákra jellemző [166]. Ez utóbbi összhangban van a jelen tanulmány eredményeivel, ugyanis szignifikánsan több ($p = 0,0474$) p53 aberráns típusú serosus, mint endometrioid histotípust találtunk UCS eseteink epithelialis komponenseiben. Az endometriumrák típusai és az UCS-hez kapcsolódó epithelialis komponenst alkotó histotípusok közötti eltérő p16 és p53 festődési mintázatok patomechanizmusbeli eltérések lehetőségét vetik fel. A nem UCS-hez kapcsolódó endometriumrákokban bizonyított az EZH2 fokozott expressziója [103][143], azonban ezek a vizsgálatok nem tartalmazták a carcinosarcoma specifikus kohorszait.

Az UCS patogenezeise máig vitatott. Egyetértünk az irodalommal abban, hogy kialakulásában az EMT valóban szerepet játszik. [59][63][172][64][173][174][175]. Az EZH2-PRC2 komplex számos célgént szabályoz. Az EZH2 közvetlenül tud kötődni fontos tumor onkogénekhez, és jelátviteli útvonalakat indíthat el EMT-t indukálva. Ding és mtsai. felismerték, hogy az GSK343 EZH2 inhibitor az EMT gátlásával korlátozza a méhnyak daganatsejtek progresszióját. Megfigyelték, hogy xenograft tumoros „meztelen” egereknél a GSK343 kezelés az EMT szuppressziójához vezet. Az észlelt EZH2-EMT-asszociált fenotípusok és mögöttes mechanizmusaik nagy hatással vannak a méhnyakrák kialakulására és súlyosságára, ami arra utal, hogy ennek az útvonalnak a specifikus inhibitorokon keresztül történő megcélzása általános epigenetikai átprogramozást eredményezne [152]. Adataink alátámasztják az EZH2 hasonló lehetséges szerepét az UCS patogenezisében, valamint emberben az EMT elméletet egyaránt igazolják.

A carcinoma és a sarcoma komponensek 85%-os egyezést mutattak a p53 fehérje fokozott expressziójával, és 96%-os egyezést a TP53 génmutációval, ami mindkét komponens monoklonális eredetére utal. A p16 fokozott expressziója az UCS-k körülbelül 60%-ában fordul elő TP53 mutációkkal egyidejűleg. A p16 expressziójának egyezése a carcinoma és sarcoma komponensek között körülbelül 85% volt a különböző tanulmányokban [67][176].

A nőgyógyászati patológiai diagnosztikában a p53 IHC-t széles körben használják a TP53 mutáció vizsgálatok helyettesítőjeként [177]. A p53 IHC megbízható diagnosztikai kiegészítő módszer az endometrium carcinomák hisztotipizálásához és molekuláris altípus meghatározásához [133][166][178]. A p53 IHC egy másik felhasználási területe a nőgyógyászati sarcomák provokálása molekuláris tesztelés céljából, azon a feltételezésen alapulva, hogy a TP53 mutációval rendelkező nőgyógyászati sarcomák nem tartalmaznak rákot kiváltó transzlokációkat [177]. Kunc és mtsai. magas gyakoriságú aberráns p53 IHC expressziót figyeltek meg méhen kívüli carcinosarcomában, ill. magas konkordanciát a carcinoma vs. sarcoma komponensek között [179]. De Jong és mtsai. méhtest carcinosarcomák epithelialis vs. mesenchymalis komponensei között figyeltek meg erős hasonlóságot a p53 overexpressziót tekintve (hátkomponensek 46%-ában vs. kötőszöveti alkotóelemek 53%-ában) [180]. Liu és mtsai. p53 overexpresszióról számoltak be UCS eseteik 63%-ában, ezenfelül a homológ vs. heterológ tumorok 47 és 77%-ában [181].

Az irodalommal összhangban, p53 IHC vizsgálataink során az aberráns típusú p53 expressziós mintázatot az UCS eseteink döntő többségében (az epithelialis komponensek 85,7%-ában, a mesenchymalis elemek 82,1%-ában) figyeltük meg, a két komponens közötti *fair/*”korrekt” konkordanciával (82,14%, Cohen-féle $K = 0,34$) [179][181][180][182].

Cherniack és mtsai. többféle szomatikus mutációt és kópiaszám-változást azonosítottak UCS-ben, melyek széleskörű terápiás lehetőséget kínálnak, beleértve a PARP, EZH2, sejtciklus és PI3K útvonal gátlók potenciális alkalmazását [61]. Jones és mtsai. kutatásuk során 22 UCS teljes exom analízisét végezték el, és igazolták a kromatin átalakító gének genetikai elváltozásait. Összesen 777 szomatikus mutációt azonosítottak 702 génben. Az EZH2 mutációit a mutáns toldalékok 12%-ánál figyelték meg [183].

A carcinosarcomákban leggyakrabban mutált gének a TP53, PTEN, PIK3CA, RB1, PPP2R1A, FBXW7, KRAS és az ARID1A [61]. A TCGA-ban a carcinosarcomák több mint 90%-a tartalmaz TP53 mutációt [61]. Egyes carcinosarcomák az endometrioid vonallal közös mutációs profillal rendelkeznek, pl. a PTEN mutáció, ami arra utal, hogy hasonlóan a serous carcinomához, a carcinogenezis alternatív útja egy alacsony fokú endometrioid carcinomán és annak rákmegelőző elváltozásainon keresztül történik [184]. Egy 57 UCS genomikai és proteomikai integrált elemzésével foglalkozó tanulmány változásokat tárt fel a kanonikus útvonalakban, különösen a PI3K útvonalban, ahol az esetek több mint 75%-ában mutattak ki FBXW7 mutációt, az RB1 elvesztését vagy a CCNE1 amplifikációját, ami a sejtciklus szabályozásának diszfunkciójára utal [61]. Tanulmányok igazolják, hogy a különböző p53 expressziós mintázatok háttérében eltérő TP53 mutációk állnak. Rendszerint a p53 diffúz pozitív esetek lehetséges *nem szinonim misszensz* mutációkat jeleznek. Ezzel szemben a *stopgain*, *indel* vagy *splicing* mutációk úgy tűnnek, hogy p53 *null* pozitív fenotípust eredményeznek [185][186][187].

A TP53 mutációk többnyire a legtöbb daganatban megfigyelhetők. Az FBXW7, p53 és PI3K útvonalak fontos szerepet játszanak az UCS kialakulásában, melyek közül az FBXW7 kulcsfontosságú tényező [188]. Az UCS patogenezisével foglalkozó tanulmányokban genetikai bizonyítékok vannak arra, hogy az UCS endometriális hámsejtekből származik, melyekből az EMT, főként az FBXW7 által vezérelve, egy rendkívül invazív fenotípust eredményez [189]. A konverziós elmélet az UCS monoklonális eredetét támogatja, mely szerint a carcinomás sejtek metaplasticus differenciáción keresztül sarcomás sejtekké képesek átalakulni. Az elméletet

alátámasztja, hogy a carcinomás és sarcomás sejtekben egyaránt kimutatható a citokeratinok és az epithelialis membrán antigének koexpressziója, továbbá együttes TP53 és KRAS mutációk, az X-kromoszóma inaktiváció azonos mintázatai, valamint hasonló heterozigóztás vesztes figyelhető meg a két komponensben [61].

Kutatásunk fő korlátja az EZH2, p53 és p16 részletes molekuláris patológiai vizsgálatának és összefüggéseik elemzésének hiánya, melyek a jövőbeli vizsgálatok középpontjai lehetnek. Ezenkívül a statisztikai megbízhatóságot az UCS ritkaságából adódó alacsony esetszám hátrányosan befolyásolhatja. Az EZH2 és p16 alacsony vagy fokozott expressziójának meghatározásához korábbi tanulmányok alapján megválasztott küszöbértékekkel dolgoztunk a jobb reprodukálhatóság és összehasonlíthatóság érdekében. A küszöbértékek megválasztása manipulálhatja az eseteloszlást, azonban jelenleg nincs elfogadott pontozási rendszer ezekre a markerekre [99][127][128][129]. Jelen tanulmány erősségei közé tartozik, hogy mindkét UCS komponenst, valamint azok hisztotípusait egyaránt elemeztük.

Összefoglalva úgy tűnik, hogy az EZH2, p16 és p53 markerek általános szerepet játszanak az UCS patogenezisében. Eredményeink alapján különböző p53 expressziós mintázat áll fenn az epithelialis komponens serosus és endometrioid hisztotípusai (aberráns vs. vad típus), valamint a mesenchymalis komponens homológ és heterológ típusai között (aberráns/diffúz nuclearis vs. aberráns/*null* mintázat). Ezen mintázatbeli különbségek eltérő genetikai jellemzőket és differenciációs utakat jelezhetnek, melyek további molekuláris patológiai vizsgálatokat igényelnek.

VI. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. Az első célkitűzésnek (EZH2 expresszió vizsgálata ECA és AIS mintákban) megfelelően:

- Adataink alátámasztják, hogy az EZH2 szerepet játszhat a méhnyak mirigyhám-daganatok patogenezisében [122].
- Eredményeink alapján az EZH2 fehérje jelentős expressziója nemcsak az invazív endocervicalis mirigyhám-rákok, hanem azok rákmegelőző elváltozásaiban is megfigyelhető, mely azt sugallja, hogy az EZH2 már a daganatképződés korai fázisában megjelenik.
- Mivel az EZH2 expressziója - függetlenül a humán papillomavírus jelenlététől - minden vizsgált esetben kimutatható volt, az eredményeink nem támogatják azon hipotézist, miszerint az EZH2 fokozott kifejeződése ECA esetén a HPV E7 onkoprotein által bekövetkező folyamat.
- Feltételezzük, hogy az EZH2 lényeges és független tényező az endocervicalis carcinogenezisben és nagy valószínűséggel fokozott kifejeződése egyéb kontextusfüggő folyamatok eredménye.
- Adataink azt mutatják, hogy az EZH2 fokozott expressziója nagy diagnosztikai megbízhatósággal - 95% feletti szenzitivitással és specificitással - rendelkezik. Ebből következik, hogy az EZH2 egy önmagában megbízható differenciáldiagnosztikai marker lehet endocervicalis léziók esetén.
- Ezenfelül az EZH2 fokozott expressziójának kimutatása hasznos differenciáldiagnosztikai eszköz lehet a diagnosztikailag kihívást jelentő kis biopsiás mintákban vagy a lapos kúposított minták bizonytalanul megítélhető, mechanikus/hő károsodást szenvedett sebési széleiben megjelenő problémás endocervicalis léziókban a szövettani mintákban és nem utolsósorban valószínűleg a lézió sejtjeinek felismerésében a cytológiai mintákban is.

2. A második célkitűzésnek (EZH2, p16 és p53 expresszió vizsgálata méhtest carcinosarcomákban) megfelelően:

- A méhtest carcinosarcoma esetek tanulmányozása során megfigyeltük, hogy az EZH2 nemcsak az epithelialis komponensben mutat magas expressziós arányt, hanem hasonlóan fokozottan jelölődik a mesenchymális komponensben is.
- Eredményeink alapján a p16 az EZH2 markerhez hasonlóan fokozottan expresszálódik, a legtöbb UCS eset pedig aberráns p53 expressziót mutat. Mindemellett az UCS hisztotípusok között mintázatbeli különbségeket találtunk.
- Adataink bizonyítják az EZH2 lehetséges szerepét az UCS patogenezisében, valamint emberben az EMT elméletet egyaránt támogatják.
- Az EZH2, p16 fokozott és a p53 aberráns expressziója az UCS-k hám és kötőszöveti eredetű komponenseiben továbbá alátámasztja a méhtest carcinosarcoma tumorigenezisének monoklonális elméletét.
- Eredményeink alapján különböző p53 expressziós mintázat áll fenn az epithelialis komponens serosus és endometrioid hisztotípusai között (aberráns vs. vad típus), valamint a mesenchymalis komponens homológ és heterológ típusai között (aberráns/diffúz nuclearis vs. aberráns/*null* mintázat). Ezen mintázatbeli különbségek eltérő genetikai jellemzőket és differenciációs utakat jelezhetnek, melyek további molekuláris patológiai vizsgálatokat igényelnek.

VII. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

VII.1. A disszertáció anyagát képező saját közlemények jegyzéke

Makk E, Bálint L, Czifra J, Tornóczky T, Oszter A, Tóth A, Kálmán E, Kovács K.

Robust expression of EZH2 in endocervical neoplastic lesions.

Virchows Archiv 475(1): 95–104. (2019)

Q1 IF = 4.535 Független idéző: 8 Összesen: 8

Makk E, Bohonyi N, Oszter A, Éles K, Tornóczky T, Tóth A, Kálmán E, Kovács K.

Comparative Analysis of EZH2, p16 and p53 expression in uterine carcinosarcomas.

Pathology and Oncology Research 29:1611547 (2023)

Q2 IF = 2.8 Független idéző: 0 Összesen: 0

VII.2. A dolgozathoz kapcsolódóan idézhető absztraktok és prezentációk

Makk E, Bálint L, Czifra J, Tornóczky T, Oszter A, Kálmán E, Kovács K.

Robust expression of EZH2 in endocervical neoplastic lesions.

Technology Transfer in Diagnostic Pathology 10th CE Regional Meeting

Gynecological Pathology. Visegrád, 2019. június 27-29.

VII.3. A disszertációtól független saját közlemények jegyzéke

Rideg O, Oszter A, **Makk E**, Kálmán E, Farkas K, Tornóczky T, Kovács K.

Wide Spectrum Analysis of Human Papillomavirus Genotypes in External Anogenital Warts.

Vaccines (Basel) 9(6):604. (2021)

Q1 IF = 4.82 Független idéző: 2 Összesen: 3

VII.4. A disszertációtól független saját közlemények, absztraktok és prezentációk

Makk E, Kovács K.

Eltérő immunfenotípusok primer, ill. recidív granulosa sejtes ovarium daganatokban.

Fiatal Patológusok Találkozója. Budapest, 2016. október 14-15.

Makk E, Bálint L, Kálmán E, Kovács K.

Hidegkés konizációk a várandósság idején: klinikopathológia és következmények.

XVI. Citológis Kongresszus. Siófok, 2017. március 30-április 1.

Makk E, Rostás T.

Radiopathological case reports.

Slovenian-Croatian-Hungarian-Slovakian Radiological Symposium.

Rogaska Slatina, Slovenia, 2018. március 15-17.

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetem kifejezni mindazoknak, akik segítettek a dolgozat elkészítésében.

Legelőször is köszönöm témavezetőmnek, Dr. Kovács Krisztinának mind szakmai, mind emberi támogató segítségét, aki értékes tanácsaival mindvégig segítette, támogatta munkám létrejöttét.

Külön köszönettel tartozom Dr. Kálmán Endrének, Dr. Oszter Angélának, Dr. Éles Klárának és témavezetőmnek, Dr. Kovács Krisztinának a mikroszkópos kiértékelési munkáért.

Hálásan köszönöm a munka létrejöttének lehetőségét és a munka szakmai felügyeletét Dr. Tornóczky Tamás Professzor Úrnak.

Hasonlóan köszönettel tartozom a PTE Patológiai Intézet számos asszisztensének, Szilágyi Imrénének, Juditnak külön szeretném kifejezni hálámat.

Végtelenül hálás vagyok családomnak, férjemnek, Dr. Tóth Arnoldnak nemcsak a statisztikai kiértékelésekben nyújtott segítségéért, hanem szüntelen támogatásáért és azért, hogy biztos hátteret teremtett kutatómunkámhoz.

IX. IRODALOMJEGYZÉK:

1. Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, et al (2020) Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob Heal* 8:e191
2. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS YR WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. In: WHO Classif. Tumours, 4th Ed. Vol. 6
3. Karamurzin YS, Kiyokawa T, Parkash V, et al (2015) Gastric-type endocervical adenocarcinoma an aggressive tumor with unusual metastatic patterns and poor prognosis. *Am J Surg Pathol* 39:1449–1457
4. Fujiwara K, Monk B, Devouassoux-Shisheboran M (2014) Adenocarcinoma of the Uterine Cervix: Why Is it Different? *Curr. Oncol. Rep.* 16
5. Loureiro J, Oliva E (2014) The spectrum of cervical glandular neoplasia and issues in differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 138:453–483
6. Stolnicu S, Barsan I, Hoang L, et al (2018) International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification (IECC): A new pathogenetic classification for invasive adenocarcinomas of the endocervix. *Am J Surg Pathol* 42:214
7. Rodríguez-Carunchio L, Soveral I, Steenbergen RDM, et al (2015) HPV-negative carcinoma of the uterine cervix: a distinct type of cervical cancer with poor prognosis. *BJOG* 122:119–127
8. McAlpine JN, Leung SCY, Cheng A, et al (2017) Human papillomavirus (HPV)-independent vulvar squamous cell carcinoma has a worse prognosis than HPV-associated disease: a retrospective cohort study. *Histopathology* 71:238–246
9. Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al (2010) Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 363:24–35
10. Castellsagué X, Diaz M, de Sanjosé S, et al (2006) Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst* 98:303–315

11. Höhn AK, Brambs CE, Hiller GGR, et al (2021) 2020 WHO Classification of Female Genital Tumors. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 81:1145
12. WHO Classification of Tumours Editorial Board (2020) WHO Classification of Female Genital Tumours, 5th Edition, Volume 4
13. Hodgson A, Park KJ, Djordjevic B, et al (2019) International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification: Validation and Interobserver Reproducibility. *Am J Surg Pathol* 43:75–83
14. Stolnicu S, Hoang L, Chiu D, et al (2019) CLINICAL OUTCOMES OF HPV-ASSOCIATED AND UNASSOCIATED ENDOCERVICAL ADENOCARCINOMAS CLASSIFIED BY THE INTERNATIONAL ENDOCERVICAL ADENOCARCINOMA CRITERIA AND CLASSIFICATION (IECC). *Am J Surg Pathol* 43:466
15. Horn LC, Beckmann MW, Follmann M, et al (2022) [Revised German guidelines on the diagnosis and treatment of carcinoma of the uterine cervix-what's new for pathologists in 2021?]. *Pathol (Heidelberg, Ger)* 43:
16. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientin mit Zervixkarzinom. AWMF-Registernummer: 032/033OL
17. Alvarado-Cabrero I, McCluggage WG, Estevez-Castro R, et al (2019) Micropapillary Cervical Adenocarcinoma: A Clinicopathologic Study of 44 Cases. *Am J Surg Pathol* 43:802
18. Stolnicu S, Park KJ, Kiyokawa T, et al (2021) Tumor Typing of Endocervical Adenocarcinoma: Contemporary Review and Recommendations From the International Society of Gynecological Pathologists. *Int J Gynecol Pathol* 40:S75
19. Stolnicu S, Boros M, Segura S, et al (2020) Invasive Stratified Mucinous Carcinoma (iSMC) of the Cervix Often Presents with High Risk Features Which are Determinants of Poor Outcome: An International Multicenter Study. *Am J Surg Pathol* 44:1374
20. Delrue C, Vanwalleghem L, de Paepe P, van Trappen P (2022) Stratified Mucin-producing Intraepithelial Lesions of the Cervix: Clinical Diversity of Cases and Literature Review. *Anticancer Res* 42:1175–1180

21. Park JJ, Sun D, Quade BJ, et al (2000) Stratified mucin-producing intraepithelial lesions of the cervix: adenosquamous or columnar cell neoplasia? *Am J Surg Pathol* 24:1414–1419
22. Stolnicu S, Hoang L, Hanko-Bauer O, et al (2019) Cervical Adenosquamous Carcinoma: Detailed Analysis of Morphology, Immunohistochemical Profile, and Outcome in 59 cases. *Mod Pathol* 32:269
23. Kojima A, Mikami Y, Sudo T, et al (2007) Gastric morphology and immunophenotype predict poor outcome in mucinous adenocarcinoma of the uterine cervix. *Am J Surg Pathol* 31:664–672
24. Gusserow A.L.S. (1870) Ueber Sarcoma des Uterus.No Title. *Arch Gynakol* 1:240–251.:
25. Vu Dinh G, Doan Thi Hong N, Vo Ngoc T, et al (2021) Peutz – Jeghers syndrome with gastric type mucinous endocervical adenocarcinoma in a young woman: A case report. *Ann Med Surg* 69:
26. Gilks CB, Young RH, Aguirre P, et al (1989) Adenoma malignum (minimal deviation adenocarcinoma) of the uterine cervix. A clinicopathological and immunohistochemical analysis of 26 cases. *Am J Surg Pathol* 13:717–729
27. J Boyd 1, H Takahashi, S E Waggoner, L A Jones, R A Hajek, J T Wharton, F S Liu, T Fujino, J C Barrett *JAM* (1996) No TitleMolecular genetic analysis of clear cell adenocarcinomas of the vagina and cervix associated and unassociated with diethylstilbestrol exposure in utero. *Cancer* 77(3):507-:
28. Mirkovic J, Sholl LM, Garcia E, et al (2015) Targeted genomic profiling reveals recurrent KRAS mutations and gain of chromosome 1q in mesonephric carcinomas of the female genital tract. *Mod Pathol* 28:1504–1514
29. Mirkovic J, Schoolmeester JK, Campbell F, et al (2017) Cervical mesonephric hyperplasia lacks KRAS/NRAS mutations. *Histopathology* 71:1003–1005
30. Stolnicu S, Barsan I, Hoang L, et al (2018) Diagnostic algorithmic proposal based on comprehensive immunohistochemical evaluation of 297 invasive endocervical adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 42:989

31. Schache AG, Liloglou T, Risk JM, et al (2013) Validation of a novel diagnostic standard in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 108:1332
32. Ronnett BM (2016) Endocervical adenocarcinoma: Selected diagnostic challenges. *Mod Pathol* 29:S12–S28
33. Staebler, Annette M.D.; Sherman, Mark E. M.D.; Zaino, Richard J. M.D.; Ronnett BMMD (2002) Hormone Receptor Immunohistochemistry and Human Papillomavirus In Situ Hybridization Are Useful for Distinguishing Endocervical and Endometrial Adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 26(8):p 99:
34. Roma AA, Goyal A, Yang B (2015) Differential Expression Patterns of GATA3 in Uterine Mesonephric and Nonmesonephric Lesions. *Int J Gynecol Pathol* 34:480–486
35. Ren H, Almadani N, Pors J, et al (2021) International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification (IECC): An Independent Cohort With Clinical and Molecular Findings. *Int J Gynecol Pathol* 40:533–540
36. Kerner H, Lichtig C (1993) Müllerian adenosarcoma presenting as cervical polyps: a report of seven cases and review of the literature. *Obstet Gynecol* 81:655–659
37. Rabban JT, McAlhany S, Lerwill MF, et al (2010) PAX2 distinguishes benign mesonephric and müllerian glandular lesions of the cervix from endocervical adenocarcinoma, including minimal deviation adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 34:137–146
38. Aoun BA, Skala SL (2022) Utility of p63 and PTEN staining in distinguishing cervical microglandular hyperplasia from endometrial endometrioid carcinoma with microglandular/mucinous features. *Histopathology* 80:1102
39. Lucas E, Carrick KS (2022) Low grade endometrial endometrioid adenocarcinoma: A review and update with emphasis on morphologic variants, mimics, immunohistochemical and molecular features. *Semin Diagn Pathol* 39:159–175
40. Luks S, Simon RA, Dwayne Lawrence W (2012) Arias-Stella reaction of the cervix: The enduring diagnostic challenge. *Am J Case Rep* 13:271
41. Hollowell ML, Goulart RA, Gang DL, et al (2007) Cytologic features of müllerian

- papilloma of the cervix: mimic of malignancy. *Diagn Cytopathol* 35:607–611
42. Lee SH, Park JW, Oh SR, Rha SH (2017) Diagnostic dilemma in cervical endocervicosis. *Obstet Gynecol Sci* 60:396
 43. Jones MA, Young RH, Scully RE (1991) Diffuse laminar endocervical glandular hyperplasia. A benign lesion often confused with adenoma malignum (minimal deviation adenocarcinoma). *Am J Surg Pathol* 15:1123–1129
 44. Larraza-Hernandez O, Molberg KH, Lindberg G, Albores-Saavedra J (1997) Ectopic prostatic tissue in the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 16:291–293
 45. Liu L, Habeshian TS, Zhang J, et al (2023) Differential trends in rising endometrial cancer incidence by age, race, and ethnicity. *JNCI Cancer Spectr* 7:
 46. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A (2022) Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* 72:7–33
 47. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71:209–249
 48. Underkofler KA, Ring KL (2023) Updates in gynecologic care for individuals with lynch syndrome. *Front Oncol* 13:
 49. Bokhman J V. (1983) Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 15:10–17
 50. Setiawan VW, Yang HP, Pike MC, et al (2013) Type I and II Endometrial Cancers: Have They Different Risk Factors? *J Clin Oncol* 31:2607
 51. Ebring C, Marlin R, Macni J, et al (2023) Type II endometrial cancer: Incidence, overall and disease-free survival in Martinique. *PLoS One* 18:e0278757
 52. Creutzberg CL, Van Putten WLJ, Koper PCM, et al (2000) Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-1 endometrial carcinoma: Multicentre randomised trial. *Lancet* 355:1404–1411
 53. Kommos S, McConechy MK, Kommos F, et al (2018) Final validation of the ProMisE

- molecular classifier for endometrial carcinoma in a large population-based case series. *Ann Oncol* 29:1180–1188
54. Getz G, Gabriel SB, Cibulskis K, et al (2013) Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nat* 2013 497:67–73
 55. Huvila J, Pors J, Thompson EF, Gilks CB (2021) Endometrial carcinoma: molecular subtypes, precursors and the role of pathology in early diagnosis. *J Pathol* 253:355–365
 56. Masood M, Singh N (2021) Endometrial carcinoma: changes to classification (WHO 2020). *Diagnostic Histopathol* 27:493–499
 57. Horn LC, Höhn AK, Krücken I, et al (2020) Mesonephric-like adenocarcinomas of the uterine corpus: report of a case series and review of the literature indicating poor prognosis for this subtype of endometrial adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 146:971–983
 58. Silverberg SG, Major FJ, Blessing JA, et al (1990) Carcinosarcoma (malignant mixed mesodermal tumor) of the uterus: A gynecologic oncology group pathologic study of 203 cases. *Int J Gynecol Pathol* 9:1–19
 59. Artioli G, Wabersich J, Ludwig K, et al (2015) Rare uterine cancer: Carcinosarcomas: Review from histology to treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 94:98–104
 60. Leskela S, Pérez-Mies B, Rosa-Rosa JM, et al (2019) cancers Molecular Basis of Tumor Heterogeneity in Endometrial Carcinosarcoma. *Cancers (Basel)* 11:964
 61. Cherniack AD, Shen H, Walter V, et al (2017) Integrated Molecular Characterization of Uterine Carcinosarcoma. *Cancer Cell* 31:411–423
 62. Gotoh O, Sugiyama Y, Takazawa Y, et al (2019) Clinically relevant molecular subtypes and genomic alteration-independent differentiation in gynecologic carcinosarcoma. *Nat Commun* 2019 10:1–14
 63. Kernochan LE, Garcia RL (2009) Carcinosarcomas (malignant mixed müllerian tumor) of the uterus: Advances in elucidation of biologic and clinical characteristics. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw* 7:550–557

64. Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119:1420–1428
65. George E, Lillemoe TJ, Twiggs LB, Perrone T (1995) Malignant mixed müllerian tumor versus high-grade endometrial carcinoma and aggressive variants of endometrial carcinoma: a comparative analysis of survival. *Int J Gynecol Pathol* 14:39–44
66. Zhang C, Hu W, Jia N, et al (2015) Uterine carcinosarcoma and high-risk endometrial carcinomas. *Int J Gynecol Cancer* 25:629–636
67. Buza N, Tavassoli FA (2009) Comparative analysis of P16 and P53 expression in uterine malignant mixed müllerian tumors. *Int J Gynecol Pathol* 28:514–521
68. Hillier LDW, Fulton RS, Fulton LA, et al (2003) The DNA sequence of human chromosome 7. *Nat* 2003 4246945 424:157–164
69. Cardoso C, Mignon C, Hetet G, et al (2000) The human EZH2 gene: genomic organisation and revised mapping in 7q35 within the critical region for malignant myeloid disorders. *Eur J Hum Genet* 8:174–180
70. Wan Z, Jiang H, Li L, et al (2020) Carcinogenic roles and therapeutic effects of EZH2 in gynecological cancers. *Bioorg Med Chem* 28:115379
71. Cao Q, Yu J, Dhanasekaran SM, et al (2008) Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene* 27:7274–7284
72. Ihira K, Dong P, Xiong Y, et al (2017) EZH2 inhibition suppresses endometrial cancer progression via miR-361/Twist axis. *Oncotarget* 8:13509–13520
73. Gan L, Yang Y, Li Q, et al (2018) Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential. *Biomark Res* 6:
74. Xie Z, Zhong C, Shen J, et al (2022) LINC00963: A potential cancer diagnostic and therapeutic target. *Biomed Pharmacother* 150:
75. Sasaki M, Nakanuma Y (2015) Cellular senescence in biliary pathology. Special emphasis on expression of a polycomb group protein EZH2 and a senescent marker p16INK4a in bile ductular tumors and lesions. *Histol Histopathol* 30:267–275

76. Said J (2005) Biomarker discovery in urogenital cancer. *Biomarkers* 10 Suppl 1:83–86
77. Hubaux R, Thu KL, Coe BP, et al (2013) EZH2 Promotes E2F-Driven SCLC Tumorigenesis through Modulation of Apoptosis and Cell-Cycle Regulation.
<https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318298762f>
78. Jung HY, Jun S, Lee M, et al (2013) PAF and EZH2 Induce Wnt/ β -Catenin Signaling Hyperactivation. *Mol Cell* 52:193
79. Chang CJ, Yang JY, Xia W, et al (2011) EZH2 promotes expansion of breast tumor initiating cells through activation of RAF1- β -catenin signaling. *Cancer Cell* 19:86
80. Kalantry S, Magnuson T The Polycomb Group Protein EED Is Dispensable for the Initiation of Random X-Chromosome Inactivation.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020066>
81. Ntziachristos P, Tsirigos A, Vlierberghe P Van, et al (2012) Genetic Inactivation of the PRC2 Complex in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Nat Med* 18:298
82. Mallen-St. Clair J, Soydaner-Azeloglu R, Lee KE, et al (2012) EZH2 couples pancreatic regeneration to neoplastic progression. *Genes Dev* 26:439
83. Vanharanta S, Shu W, Brenet F, et al (2013) Epigenetic expansion of VHL-HIF signal output drives multi-organ metastasis in renal cancer. *Nat Med* 19:50
84. Dhar S, Gadd S, Patel P, et al (2022) A tumor suppressor role for EZH2 in diffuse midline glioma pathogenesis. *Acta Neuropathol Commun* 10:47
85. Yang XP, Jiang K, Hirahara K, et al (2015) EZH2 is crucial for both differentiation of regulatory T cells and T effector cell expansion. *Sci Rep* 5:
86. Yin J, Leavenworth JW, Li Y, et al (2015) Ezh2 regulates differentiation and function of natural killer cells through histone methyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:15988–15993
87. Eich ML, Athar M, Ferguson JE, Varambally S (2020) EZH2-targeted therapies in cancer: hype or a reality. *Cancer Res* 80:5449
88. Alajez NM, Shi W, Hui ABY, et al (2010) Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2) is

- overexpressed in recurrent nasopharyngeal carcinoma and is regulated by miR-26a, miR-101, and miR-98. *Cell Death Dis* 1:e85
89. Guo S, Li X, Rohr J, et al (2016) EZH2 overexpression in different immunophenotypes of breast carcinoma and association with clinicopathologic features. *Diagn Pathol* 11:
 90. Findeis-Hosey JJ, Huang J, Li F, et al (2011) High-grade neuroendocrine carcinomas of the lung highly express enhancer of zeste homolog 2, but carcinoids do not. *Hum Pathol* 42:867–872
 91. Ha SY, Kim SH (2012) Co-expression of Bmi1 and EZH2 as an independent poor prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract* 208:462–469
 92. Choi JH, Song YS, Yoon JS, et al (2010) Enhancer of zeste homolog 2 expression is associated with tumor cell proliferation and metastasis in gastric cancer. *APMIS* 118:196–202
 93. Fluge O, Gravdal K, Carlsen E, et al (2009) Expression of EZH2 and Ki-67 in colorectal cancer and associations with treatment response and prognosis. *Br J Cancer* 101:1282
 94. Toll AD, Dasgupta A, Potoczek M, et al (2010) Implications of enhancer of zeste homologue 2 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hum Pathol* 41:1205–1209
 95. Zhai R, Tang F, Gong J, et al (2016) The relationship between the expression of USP22, BMII, and EZH2 in hepatocellular carcinoma and their impacts on prognosis. *Onco Targets Ther* 9:6987–6998
 96. Sasaki M, Ikeda H, Itatsu K, et al (2008) The overexpression of polycomb group proteins Bmi1 and EZH2 is associated with the progression and aggressive biological behavior of hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 88:873–882
 97. Borbone E, Troncone G, Ferraro A, et al (2011) Enhancer of Zeste Homolog 2 Overexpression Has a Role in the Development of Anaplastic Thyroid Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 96:1029–1038
 98. AE A, SA A, RA A (2017) Prognostic Value of Twist-1, E-cadherin and EZH2 in Prostate

Cancer: An Immunohistochemical Study. Turk Patoloji Derg.

<https://doi.org/10.5146/TJPATH.2017.01392>

99. Wagener N, Macher-Goeppinger S, Pritsch M, et al (2010) Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression is an independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 10:524
100. Raman JD, Mongan NP, Tickoo SK, et al (2005) Increased expression of the polycomb group gene, EZH2, in transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 11:8570–8576
101. Jin M, Yang Z, Ye W, et al (2015) Prognostic significance of histone methyltransferase enhancer of zeste homolog 2 in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 10:857–862
102. Zhou J, Roh JW, Bandyopadhyay S, et al (2013) Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) and focal adhesion kinase (FAK) in high grade endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 128:344–348
103. Krill L, Deng W, Eskander R, et al (2020) Overexpression of enhance of Zeste homolog 2 (EZH2) in endometrial carcinoma: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 156:423
104. Xu Y, Li X, Wang H, et al (2016) Hypermethylation of CDH13, DKK3 and FOXL2 promoters and the expression of EZH2 in ovary granulosa cell tumors. *Mol Med Rep* 14:2739–2745
105. Li H, Cai Q, Godwin AK, Zhang R (2010) Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) promotes the proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer cells. *Mol Cancer Res* 8:1610
106. Cao J, Pontes KCS, Heijkants RC, et al (2018) Overexpression of EZH2 in conjunctival melanoma offers a new therapeutic target. *J Pathol* 245:433
107. Wu Z, Wang Q, Wang L, et al (2013) Combined aberrant expression of Bmi1 and EZH2 is predictive of poor prognosis in glioma patients. *J Neurol Sci* 335:191–196
108. Ahani N, Shirkoohi R, Rokouei M, et al (2014) Overexpression of enhancer of zeste human homolog 2 (EZH2) gene in human cytomegalovirus positive glioblastoma

- multiforme tissues. *Med Oncol* 31:1–5
109. Zhou Z, Gao J, Popovic R, et al (2015) Strong expression of EZH2 and accumulation of trimethylated H3K27 in diffuse large B-cell lymphoma independent of cell of origin and EZH2 codon 641 mutation. <https://doi.org/10.3109/1042819420151006220> 56:2895–2901
 110. Rinke J, Chase A, Cross NCP, et al (2020) EZH2 in Myeloid Malignancies. *Cells* 9:
 111. Goldsmith SR, Fiala MA, O’Neal J, et al (2019) EZH2 Overexpression in Multiple Myeloma: Prognostic Value, Correlation With Clinical Characteristics, and Possible Mechanisms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 19:744–750
 112. Yamaga K, Osaki M, Kidani K, et al (2008) High expression of enhancer of zeste homologue 2 indicates poor prognosis in patients with soft tissue sarcomas. *Mol Med Rep* 1:633–639
 113. Ramaglia M, D’Angelo V, Iannotta A, et al (2016) High EZH2 expression is correlated to metastatic disease in pediatric soft tissue sarcomas. *Cancer Cell Int* 16:59
 114. Duan R, Du W, Guo W (2020) EZH2: a novel target for cancer treatment. *J Hematol Oncol* 13:104
 115. Pourakbar S, Pluard TJ, Accurso AD, Farassati F (2017) Ezh2, a novel target in detection and therapy of breast cancer. *Onco Targets Ther* 10:2685–2687
 116. Fan DC, Zhao YR, Qi H, et al (2020) MiRNA-506 presents multiple tumor suppressor activities by targeting EZH2 in nasopharyngeal carcinoma. *Auris Nasus Larynx* 47:632–642
 117. Gong H, Li Y, Yuan Y, et al EZH2 inhibitors reverse resistance to gefitinib in primary EGFR wild-type lung cancer cells. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07667-7>
 118. Gui T, Liu M, Yao B, et al (2021) TCF3 is epigenetically silenced by EZH2 and DNMT3B and functions as a tumor suppressor in endometrial cancer. *Cell Death Differ* 28:3316
 119. Yamada L, Saito M, Thar Min AK, et al (2021) Selective sensitivity of EZH2 inhibitors based on synthetic lethality in ARID1A-deficient gastric cancer. *Gastric Cancer* 24:60–71

120. Sanches JGP, Song B, Zhang Q, et al (2021) The Role of KDM2B and EZH2 in Regulating the Stemness in Colorectal Cancer Through the PI3K/AKT Pathway. *Front Oncol* 11:637298
121. Xu L, Lin J, Deng W, et al (2020) EZH2 facilitates BMI1-dependent hepatocarcinogenesis through epigenetically silencing microRNA-200c. *Oncogenesis* 9:
122. Italiano A, Soria JC, Toulmonde M, et al (2018) Tazemetostat, an EZH2 inhibitor, in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and advanced solid tumours: a first-in-human, open-label, phase 1 study. *Lancet Oncol* 19:649–659
123. Fang X, Ni N, Lydon JP, et al (2019) Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit Is Required for Uterine Epithelial Integrity. *Am J Pathol* 189:1212
124. Fang X, Ni N, Wang X, et al (2022) EZH2 and Endometrial Cancer Development: Insights from a Mouse Model. *Cells* 11:
125. Mesa AM, Mao J, Nanjappa MK, et al (2020) Genomics of Metabolic and Tumor/Cancer Traits: Mice lacking uterine enhancer of zeste homolog 2 have transcriptomic changes associated with uterine epithelial proliferation. *Physiol Genomics* 52:81
126. Ang PP, Tan GC, Karim N, Wong YP (2020) Diagnostic Value of the EZH2 Immunomarker in Malignant Effusion Cytology. *Acta Cytol* 64:248–255
127. Bosari S, Lee AKC, Viale G, et al (1992) Abnormal p53 immunoreactivity and prognosis in node-negative breast carcinomas with long-term follow-up. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 421:291–295
128. Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, et al (2006) EZH2 Expression Is Associated With High Proliferation Rate and Aggressive Tumor Subgroups in Cutaneous Melanoma and Cancers of the Endometrium, Prostate, and Breast. *J Clin Oncol* 24:268–273
129. Sasaki M, Matsubara T, Kakuda Y, et al (2014) Immunostaining for polycomb group protein EZH2 and senescent marker p16INK4a may be useful to differentiate cholangiolocellular carcinoma from ductular reaction and bile duct adenoma. *Am J Surg Pathol* 38:364–369

130. Salvesen HB, Iversen OE, Akslen LA (1999) Prognostic significance of angiogenesis and ki-67, p53, and p21 expression: A population-based endometrial carcinoma study. *J Clin Oncol* 17:1382–1390
131. Chen X, Arend R, Hamele-Bena D, et al (2017) Uterine carcinosarcomas: Clinical, histopathologic and immunohistochemical characteristics. *Int J Gynecol Pathol* 36:412–419
132. Köbel M, Ronnett BM, Singh N, et al (2019) Interpretation of P53 Immunohistochemistry in Endometrial Carcinomas: Toward Increased Reproducibility. *Int J Gynecol Pathol* 38:S123
133. Rabban JT, Garg K, Ladwig NR, et al (2021) Cytoplasmic Pattern p53 Immunoexpression in Pelvic and Endometrial Carcinomas With TP53 Mutation Involving Nuclear Localization Domains: An Uncommon But Potential Diagnostic Pitfall With Clinical Implications. *Am J Surg Pathol* 45:1441–1451
134. Shrout PE, Fleiss JL (1979) Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychol Bull* 86:420–428
135. Schoonjans F, Zalata A, Depuydt CE, Comhaire FH (1995) MedCalc: a new computer program for medical statistics. *Comput Methods Programs Biomed* 48:257–262
136. Cohen J, Spohn H, Solomon L, Steinman A A COEFFICIENT OF AGREEMENT FOR NOMINAL SCALES 1
137. Koo TK, Li MY (2016) A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *J Chiropr Med* 15:155
138. Makk E, Bálint L, Cifra J, et al (2019) Robust expression of EZH2 in endocervical neoplastic lesions. *Virchows Arch* 475:95–104
139. Warrick JI, Raman JD, Kaag M, et al (2016) Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression in bladder cancer. *Urol Oncol* 34:258.e1-258.e6
140. Ding L, Erdmann C, Chinnaiyan AM, et al (2006) Identification of EZH2 as a Molecular Marker for a Precancerous State in Morphologically Normal Breast Tissues. *Cancer Res* 66:4095–4099

141. Holland D, Hoppe-Seyler K, Schuller B, et al (2008) Activation of the Enhancer of Zeste Homologue 2 Gene by the Human Papillomavirus E7 Oncoprotein. *Cancer Res* 68:9964–9972
142. Versemann L, Patil S, Steuber B, et al (2022) TP53-Status-Dependent Oncogenic EZH2 Activity in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)* 14:3451
143. Gu Y, Zhang J, Guan H (2017) Expression of EZH2 in endometrial carcinoma and its effects on proliferation and invasion of endometrial carcinoma cells. *Oncol Lett* 14:7191–7196
144. Jia N, Li Q, Tao X, et al (2014) Enhancer of zeste homolog 2 is involved in the proliferation of endometrial carcinoma. *Oncol Lett* 8:2049
145. Howitt BE, Nucci MR, Drapkin R, et al (2012) Stathmin-1 Expression as a Complement to p16 Helps Identify High-grade Cervical Intraepithelial Neoplasia With Increased Specificity
146. Liao SY, Rodgers WH, Kauderer J, et al (2013) Endocervical glandular neoplasia associated with lobular endocervical glandular hyperplasia is HPV-independent and correlates with carbonic anhydrase-IX expression: a Gynaecological Oncology Group Study. *Br J Cancer* 108:613
147. Lee S, Sahasrabudhe V V, Mendoza-Cervantes D, et al Tissue-based Immunohistochemical Biomarker Expression in Malignant Glandular Lesions of the Uterine Cervix: A Systematic Review.
<https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000345>
148. Engelsen IB, Stefansson I, Akslen LA, Salvesen HB (2006) Pathologic expression of p53 or p16 in preoperative curettage specimens identifies high-risk endometrial carcinomas. *Am J Obstet Gynecol* 195:979–986
149. Priya A, Chaurasia JK, K P, et al (2023) Evaluation of Immunohistochemical Expression of Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) and Its Association With Clinicopathological Variables in Carcinoma Cervix. *Cureus* 15:
150. Oki S, Sone K, Oda K, et al (2017) Oncogenic histone methyltransferase EZH2: A novel

prognostic marker with therapeutic potential in endometrial cancer

151. Rao Z-Y, Cai M-Y, Yang G-F, et al (2010) EZH2 supports ovarian carcinoma cell invasion and/or metastasis via regulation of TGF- β 1 and is a predictor of outcome in ovarian carcinoma patients. *Carcinogenesis* 31:1576–1583
152. Ding M, Zhang H, Li Z, et al (2015) The polycomb group protein enhancer of zeste 2 is a novel therapeutic target for cervical cancer. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 42:458–464
153. Bitler BG, Aird KM, Garipov A, et al (2015) Targeting EZH2 methyltransferase activity in ARID1A mutated cancer cells is synthetic lethal. *Nat Med* 21:231
154. Roh J-W, Eun Choi J, Dong Han H, et al (2019) Clinical and biological significance of EZH2 expression in endometrial cancer.
<https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1672455>
155. Ihira K, Dong P, Xiong Y, et al (2017) EZH2 inhibition suppresses endometrial cancer progression via miR-361/Twist axis. *Oncotarget* 8:13509–13520
156. Shi L, Zhang Q, Zhu S, et al (2023) Pharmacological inhibition of EZH2 using a covalent inhibitor suppresses human ovarian cancer cell migration and invasion. *Mol Cell Biochem.* <https://doi.org/10.1007/S11010-023-04767-3>
157. Abargel A, Avinoach I, Kravtsov V, et al (2004) Expression of p27 and p53: Comparative analysis of uterine carcinosarcoma and endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 14:354–359
158. Menczer J, Kravtsov V, Levy T, et al (2005) Expression of c-kit in uterine carcinosarcoma. *Gynecol Oncol* 96:210–215
159. Menczer J, Schreiber L, Sukmanov O, et al (2010) COX-2 expression in uterine carcinosarcoma. *Acta Obstet Gynecol Scand* 89:120–125
160. Saglam O, Husain S, Toruner G (2013) AKT, EGFR, C-ErbB-2, and C-kit expression in uterine carcinosarcoma. *Int J Gynecol Pathol* 32:493–500
161. Adesso L, Leoncini PP, Dall’agnese A, et al (2014) The Polycomb group (PcG) protein EZH2 supports the survival of PAX3-FOXO1 alveolar rhabdomyosarcoma by repressing FBXO32 (Atrogin1/MAFbx). 33:4173–4184

162. Shen JK, Cote GM, Gao Y, et al (2016) Targeting EZH2-mediated methylation of H3K27 inhibits proliferation and migration of Synovial Sarcoma in vitro OPEN. Nat Publ Gr. <https://doi.org/10.1038/srep25239>
163. Sun R, Shen J, Gao Y, et al Overexpression of EZH2 is associated with the poor prognosis in osteosarcoma and function analysis indicates a therapeutic potential. 7:
164. Girard N, Bazille C, Lhuissier E, et al (2014) 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an Inhibitor of the Histone Methyltransferase EZH2, Induces Apoptosis and Reduces Cell Migration in Chondrosarcoma Cells. PLoS One 9:
165. Zhang N, Zeng Z, Li S, et al (2018) High expression of EZH2 as a marker for the differential diagnosis of malignant and benign myogenic tumors OPEN. Sci REPORTs | 8:12331
166. Murali R, Davidson B, Fadare O, et al (2019) High-grade Endometrial Carcinomas: Morphologic and Immunohistochemical Features, Diagnostic Challenges and Recommendations. Int J Gynecol Pathol 38:S40
167. Yemelyanova A, Ji H, Shih IM, et al (2009) Utility of p16 expression for distinction of uterine serous carcinomas from endometrial endometrioid and endocervical adenocarcinomas: immunohistochemical analysis of 201 cases. Am J Surg Pathol 33:1504–1514
168. Gilks CB, Oliva E, Soslow RA (2013) Poor interobserver reproducibility in the diagnosis of high-grade endometrial carcinoma. Am J Surg Pathol 37:874–881
169. Garg K, Leitao MM, Wynveen CA, et al (2010) p53 overexpression in morphologically ambiguous endometrial carcinomas correlates with adverse clinical outcomes. Mod Pathol 23:80–92
170. Tashiro H, Isacson C, Levine R, et al (1997) p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. Am J Pathol 150:177
171. Soslow RA, Shen PUF, Chung MH, Isacson C (1998) Distinctive p53 and mdm2 immunohistochemical expression profiles suggest different pathogenetic pathways in poorly differentiated endometrial carcinoma. Int J Gynecol Pathol 17:129–134

172. Kernochan LE, Garcia RL (2009) Carcinosarcomas (malignant mixed müllerian tumor) of the uterus: Advances in elucidation of biologic and clinical characteristics. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw* 7:550–557
173. McCluggage WG (2002) Uterine carcinosarcomas (malignant mixed Mullerian tumors) are metaplastic carcinomas. *Int. J. Gynecol. Cancer* 12:687–690
174. Castilla MÁ, Moreno-Bueno G, Romero-Pérez L, et al (2011) Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinosarcoma. *J Pathol* 223:72–80
175. Chiyoda T, Tsuda H, Tanaka H, et al (2012) Expression profiles of carcinosarcoma of the uterine corpus—are these similar to carcinoma or sarcoma? *Genes, Chromosom Cancer* 51:229–239
176. Kanthan R, Senger JLB, Diudea D (2010) Malignant mixed Mullerian tumors of the uterus: histopathological evaluation of cell cycle and apoptotic regulatory proteins. *World J Surg Oncol* 8:60
177. Köbel M, Kang EY (2021) The many uses of p53 immunohistochemistry in gynecological pathology: Proceedings of the ISGyP companion society session at the 2020 USCAP annual meeting. *Int J Gynecol Pathol* 40:32–40
178. Rabban JT, Blake Gilks C, Malpica A, et al (2019) Issues in the Differential Diagnosis of Uterine Low-grade Endometrioid Carcinoma, Including Mixed Endometrial Carcinomas: Recommendations from the International Society of Gynecological Pathologists. *Int J Gynecol Pathol* 38 Suppl 1:S25–S39
179. Kunc M, Gabrych A, Rekawiecki B, et al (2020) Immunohistochemical evaluation of mismatch repair proteins and p53 expression in extrauterine carcinosarcoma/sarcomatoid carcinoma. *Wspolczesna Onkol* 24:1–4
180. De Jong RA, Nijman HW, Wijbrandi TF, et al (2011) Molecular markers and clinical behavior of uterine carcinosarcomas: focus on the epithelial tumor component. *Mod Pathol* 24:1368–1379
181. F S Liu 1, M F Kohler, J R Marks, R C Bast Jr, J Boyd AB (1994) Mutation and

Overexpression of the P53 Tumor Suppressor Gene Frequently Occurs in Uterine and Ovarian Sarcomas. *Obstet Gynecol* 83:118–24

182. Taylor NP, Zigelboim I, Huettner PC, et al (2006) DNA mismatch repair and TP53 defects are early events in uterine carcinosarcoma tumorigenesis. *Mod Pathol* 19:1333–1338
183. Jones S, Stransky N, McCord CL, et al (2014) Genomic analyses of gynaecologic carcinosarcomas reveal frequent mutations in chromatin remodelling genes. *Nat Commun* 5:
184. McConechy MK, Ding J, Cheang MCU, et al (2012) Use of mutation profiles to refine the classification of endometrial carcinomas. *J Pathol* 228:20
185. Köbel M, Piskorz AM, Lee S, et al (2016) Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of TP53 mutation in ovarian carcinoma. *J Pathol Clin Res* 2:247–258
186. da Costa LT, Dos Anjos LG, Kagohara LT, et al (2021) The mutational repertoire of uterine sarcomas and carcinosarcomas in a Brazilian cohort: A preliminary study. *Clinics* 76:1–15
187. Zhao S, Bellone S, Lopez S, et al (2016) Mutational landscape of uterine and ovarian carcinosarcomas implicates histone genes in epithelial-mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:12238–12243
188. Di Fiore R, Suleiman S, Drago-Ferrante R, et al (2023) The Role of FBXW7 in Gynecologic Malignancies. *Cells* 12:1415
189. Cuevas IC, Sahoo SS, Kumar A, et al (2019) Fbxw7 is a driver of uterine carcinosarcoma by promoting epithelial-mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:25880–25890



Robust expression of EZH2 in endocervical neoplastic lesions

Evelin Makk¹ · Levente Bálint¹ · János Cifra² · Tamás Tornóczy¹ · Angéla Oszter¹ · Arnold Tóth³ · Endre Kálmán¹ · Krisztina Kovács¹

Received: 24 October 2018 / Revised: 22 February 2019 / Accepted: 25 February 2019 / Published online: 22 March 2019
© The Author(s) 2019

Abstract

The aim of this study was to evaluate the nuclear expression of histone methyltransferase enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) in endocervical neoplastic lesions such as invasive endocervical adenocarcinoma (ECA) and cervical in situ adenocarcinoma (AIS) in comparison with normal endocervix and non-neoplastic counterparts. A total of 54 consecutive neoplastic cases (37 ECA, 17 AIS) and 32 non-neoplastic endocervical lesions (15 reactive atypia, 9 microglandular hyperplasia, 3 tuboendometrioid metaplasia, 3 tunnel cluster, 2 endometriosis) were included in the study with adjacent normal endocervix if present. EZH2 immunoreactivity was evaluated semiquantitatively by three independent experts in lesions and adjacent normal glandular epithelium as well. EZH2 expression was defined robust if at least two of the three experts rated partial or diffuse positivity. Robust EZH2 expression was statistically compared among the neoplastic, non-neoplastic, and normal glandular epithelium samples. Diagnostic test capability of robust EZH2 expression was calculated. Fifty-three out of the 54 neoplastic cases (98%) showed robust EZH2 expression. Robust EZH2 expression was significantly less often (4 out of 32 cases, 12.5%) found in the non-neoplastic endocervical lesions ($p < 0.0001$) and never (0 out of 66 samples) in the adjacent normal glandular epithelium. Robust EZH2 overexpression had a sensitivity and specificity of over 95% in detecting neoplastic lesions versus non-neoplastic lesions or normal glandular epithelium. EZH2 may play a role in the pathogenesis of endocervical neoplasia, and the detection of robust expression of EZH2 might be a useful differential diagnostic tool in problematic endocervical lesions in histology and cytology as well.

Keywords Cervical cancer · EZH2 · Endocervical adenocarcinoma · AIS

Introduction

Endocervical adenocarcinoma (ECA) is the second most common histological type of cervical cancer; it comprises approximately 20 to 25% of cervical malignancies [1] and has a poorer prognosis than squamous cell carcinoma [2]. Cervical adenocarcinomas and their precursor lesions are heterogeneous and have several different subtypes, most of them closely related to HR-HPVs [3].

It is well established that the pRB pathway is involved in the pathogenesis of cervical cancer due to the interaction with HR-HPV E7 oncoproteins leading to genomic instability [4]. It is also known that viral E6/E7 oncoproteins may interact with different types of epigenetic enzymes, such as p300, CBP, and pCAF, which can be involved in the oncogenesis [5].

Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), a member of the polycomb group of genes, is a methyltransferase that methylates histone H3 on gene promoters and plays a critical role in epigenetic gene silencing and chromatin remodeling. EZH2 inhibits cell differentiation and targets gene expression. In conjunction with the p53 protein, it induces tumor cell proliferation, metastasis, and immortalization [6].

Recent studies focused on the role of EZH2 in the pathogenesis of various adenocarcinomas as well as malignant tumors of the breast [7], lung [8], stomach [9], colon [10], pancreatobiliary tract [11], liver [12], thyroid gland [13], prostate [14], bladder [15], uterus [16], and ovary [17]. High expression of EZH2 was shown to be associated with tumor aggressiveness and was suggested as a potential differential

✉ Evelin Makk
makk.evelin@gmail.com

¹ Department of Pathology, University of Pécs Medical School, Szigeti út 12, Pécs 7624, Hungary

² Department of Pathology, County Hospital Tolna, János Balassa Hospital, Béni Balogh Ádám u. 5-7, Szekszárd 7100, Hungary

³ Department of Radiology, University of Pécs Medical School, Ifjúság út 13, Pécs 7624, Hungary

diagnostic marker [8, 10–17]. In the cervix, one study reported overexpression and the possible prognostic significance of EZH2 in squamous cell carcinoma [18].

Expression of EZH2 in endocervical neoplastic lesions is yet unknown. In this study, we examined EZH2 expression in ECA and AIS, compared with non-neoplastic cervical lesions and normal glandular epithelium.

Materials and methods

Patients and specimen collection

Consecutive patients from 2007 to 2017 with a diagnosis of endocervical neoplastic lesions (ECA and/or AIS with or without cervical intraepithelial neoplasia) and patients with benign findings as a control group were collected from the archives of the Department of Pathology, University of Pécs, Hungary, and Department of Pathology, County Hospital Tolna, János Balassa Hospital, Szekszárd, Hungary.

Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples from biopsy, cone, or hysterectomy specimens were available along with the HE slides in each case. Slides were re-evaluated to select the most feasible specimens for immunohistochemistry for each patient. We classified endocervical adenocarcinomas based on the International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification (IECC) [19].

This work has been approved by the local ethical committee (number of permission: PTE/57682/2017).

Immunohistochemistry

Prior to immunohistochemistry, formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens were cut into 4- μ m-thick sections and dried for 20 min at 60 °C.

Immunostaining was performed using Leica Bond Max autostainer (Leica Biosystems, Bannockburn, IL) and Leica Bond Polymer Refine Detection Kit (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK). The mouse monoclonal EZH2 antibody (clone 6A10) was obtained from Leica Biosystems (Newcastle Upon Tyne, UK) and used at a dilution of 1:200. The immunostaining protocol included deparaffinization and pH 9 epitope retrieval for 20 min, peroxidase blocking for 5 min, primary antibody incubation for 15 min, post-primary rabbit anti-mouse IgG for 8 min, polymer anti-rabbit Poly-*HRP*-IgG for 8 min, diaminobenzidine chromogen for 10 min, and hematoxylin counterstain for 5 min. Positive and negative controls were included in all reactions.

Evaluation of immunoreactivity

Immunoreactivity evaluation included not only the neoplastic lesions (ECA, AIS) or non-neoplastic lesions in control

patients but the adjacent normal glandular epithelium as well, if present. The presence of concurrent cervical intraepithelial neoplasia was noted; however, these lesions were not included in the immunoreactivity analysis. The histological patterns were detected in the original, routine HE stained slides.

Immunoreactivity was evaluated semiquantitatively by three independent board-certified pathologists with over 15 years of professional experience (expert 1: E.K., expert 2: K.K., expert 3: A.O.). Cases were regarded as positive if they were obviously positive by $\times 40$ magnification and further classified according to the percentage of cells with nuclear staining: < 10% as focally positive “+”, 10–50% as partly positive “++”, and > 50% as diffusely positive “+++” [20].

The inter-expert agreement was determined using Intraclass Correlation Coefficient (ICC) [21] for both the neoplastic and the non-neoplastic lesions ratings. Two-way model, absolute agreement type was applied; both single and average measurement reliability was calculated. The analysis was run in MedCalc statistical software (version 13.0.0.0, MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium) [22].

For statistical analyses, the individual ratings per lesions and normal glandular epithelium if present were transformed into a binary overall score. Immunoreactivity of a lesion or normal glandular epithelium was regarded “robust” if at least two of the three experts rated either “++” or “+++”. Immunoreactivity was regarded as “negative/focally positive” if at least two of the three experts rated either “–” or “+”. Adjacent normal glandular epithelium was included in analyses if it was detected by at least two experts.

Neoplastic (ECA and AIS) and non-neoplastic lesion immunoreactivity overall scores were statistically compared using Fisher’s exact test (MedCalc). *P* value was considered statistically significant if under 0.05.

Diagnostic test capability (sensitivity, specificity, and positive and negative predictive value) of EZH2 overexpression in distinguishing (a) neoplastic lesions from non-neoplastic, (b) neoplastic lesions from normal endocervical epithelium, and (c) neoplastic lesions from non-neoplastic lesions and normal endocervical epithelium combined was evaluated also using MedCalc.

Results

A total of 54 cases of endocervical neoplastic lesions (37 ECA, 17 AIS) were retrieved from the archive. In 12 out of these cases, concurrent HSILs were present. Concurrent LSIL was present in one case. The median patient age was 44.5 (range 29–84). The most common IECC diagnoses were human papillomavirus-associated adenocarcinoma (HPVA) type (92% of the cohort). Between subcategories, usual type adenocarcinoma was the most common HPVA type (88% of the cohort), followed by villoglandular, mucinous not

Table 1 Clinical and immunostaining data of ECA cases

Case No.	Age	Diagnosis	Type (IECC ⁴)	EZH2 immunoreactivity ³							
				Normal glandular epithelium				Neoplastic endocervical lesions			
				Expert			Overall score ⁹	Expert			Overall score ⁹
				1	2	3		1	2	3	
1.	83	ECA	HPVA ⁵ /mucinous, intestinal	∅ ²	∅	∅	∅	+++	+++	+++	+
2.	84	ECA	HPVA/usual	–	∅	–	–	+++	+++	+++	+
3.	74	ECA	HPVA/usual	∅	∅	∅	∅	+++	+++	++	+
4.	53	ECA + CIN3 ¹	HPVA/usual	–	+	–	–	+++	+++	+++	+
5.	50	ECA	NHPVA ⁶ /endometrioid	–	–	–	–	+	+	++	–
6.	48	ECA	HPVA/usual	∅	∅	–	∅	+++	++	+++	+
7.	49	ECA + CIN3	HPVA/usual	∅	∅	∅	∅	+++	+++	+++	+
8.	48	ECA	HPVA/usual	∅	∅	–	∅	+++	++	++	+
9.	42	ECA + AIS	HPVA/usual	+	–	–	–	+++	+++	+++	+
10.	45	ECA	HPVA/usual	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
11.	37	ECA	HPVA/usual	–	–	–	–	+++	+	+++	+
12.	41	ECA	HPVA/villoglandular	∅	∅	∅	∅	+++	+++	+++	+
13.	37	ECA	HPVA/usual	∅	∅	∅	∅	+++	+++	+++	+
14.	36	ECA + CIN2	HPVA/usual	∅	–	–	–	++	+++	++	+
15.	30	ECA	HPVA/usual	–	–	–	–	+++	++	+++	+
16.	31	ECA	HPVA/usual	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
17.	90	ECA	HPVA/usual	∅	∅	∅	∅	+++	+++	+++	+
18.	43	ECA	HPVA/usual	∅	∅	–	∅	+++	+++	+++	+
19.	43	ECA	HPVA/usual	∅	∅	∅	∅	+++	+++	+++	+
20.	49	ECA	HPVA/mucinous NOS ⁷	∅	∅	–	∅	+++	+++	+++	+
21.	44	ECA	HPVA/usual	∅	∅	∅	∅	+++	+++	+++	+
22.	47	ECA	HPVA/usual	∅	∅	∅	∅	+++	+++	+++	+
23.	32	ECA	HPVA/usual	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
24.	42	ECA	HPVA/usual	∅	∅	∅	∅	+++	+++	+++	+
25.	37	ECA	HPVA/usual	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
26.	54	ECA	HPVA/usual	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
27.	52	ECA	HPVA/usual	∅	∅	–	∅	+++	++	+++	+
28.	50	ECA	HPVA/usual	∅	∅	–	∅	+++	+++	+++	+
29.	36	ECA	HPVA/usual	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
30.	86	ECA	HPVA/usual	∅	∅	∅	∅	++	++	++	+
31.	45	ECA	HPVA/usual	∅	∅	–	∅	+++	+++	+++	+
32.	36	ECA + CIN3	HPVA/usual	–	–	–	–	+++	++	+++	+
33.	41	ECA + AIS	HPVA/iSMILE ⁸	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
34.	48	ECA	NHPVA/serous	–	∅	∅	∅	+++	+++	+++	+
35.	77	ECA	NHPVA/serous	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
36.	47	ECA	HPVA/usual	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
37.	37	ECA	HPVA/usual	–	–	–	–	+++	+++	+++	+

Endocervical adenocarcinoma

¹ Cervical intraepithelial neoplasia² No normal glandular epithelium present on slide³ Immunoreactivity extent: +++ => 50%, ++ = 10–50%, + =< 10%, – = negative—no obvious immunoreactivity at × 40 magnification⁴ International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification [19]⁵ Human papillomavirus-associated adenocarcinoma⁶ Nonhuman papillomavirus-associated adenocarcinoma⁷ Mucinous, not otherwise specified⁸ Invasive stratified mucin-producing carcinoma⁹ Overall score of immunoreactivity evaluation: “–” refers to negative/focally positive (at least two experts rated either “–” or “+”) while “+” refers to robust expression (at least two experts rated either “++” or “+++”)

otherwise specified (NOS), and mucinous including intestinal and invasive stratified mucin-producing carcinoma (iSMILE) categories (3%) (Table 1). There were only three patients with nonhuman papillomavirus-associated adenocarcinoma (NHPVA) (8%). Between subcategories, there were two cases

with serous type and one with the endometrioid type of NHPVA.

The detailed results of the EZH2 immunohistochemical analyses for ECA and AIS are summarized in Table 1 (for ECA) and in Table 2 (for AIS).

Table 2 Clinical and immunostaining data of AIS cases

Case No.	Age	Diagnosis	EZH2 immunoreactivity ³							
			Normal glandular epithelium				Neoplastic endocervical lesions			
			Expert			Overall score ⁴	Expert			Overall score ⁴
			1	2	3		1	2	3	
1.	33	AIS	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
2.	53	AIS + CIN1 ¹	+	+	–	–	+++	+++	+++	+
3.	42	ECA + AIS	+	–	–	–	+++	+++	+++	+
4.	41	AIS	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
5.	38	AIS	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
6.	35	AIS	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
7.	36	AIS	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
8.	31	AIS	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
9.	45	AIS + CIN3	∅ ²	∅	–	∅	++	++	++	+
10.	48	AIS + CIN3	–	+	–	–	+++	+++	+++	+
11.	46	AIS + CIN3	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
12.	41	AIS + CIN3	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
13.	45	AIS + CIN3	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
14.	40	AIS + CIN3	–	+	–	–	+++	+++	+++	+
15.	41	ECA + AIS	–	–	–	–	+++	+++	+++	+
16.	38	AIS + CIN3	–	+	–	–	+++	+++	+++	+
17.	65	AIS + CIN3	–	–	–	–	+++	+++	+++	+

Adenocarcinoma in situ

¹ Cervical intraepithelial neoplasia

² No normal glandular epithelium present on slide

³ Immunoreactivity extent: +++=> 50%, ++= 10–50%, +=< 10%, –= negative—no obvious immunoreactivity at × 40 magnification

⁴ Overall score of immunoreactivity evaluation: “–” refers to negative/focally positive (at least two experts rated either “–” or “+”) while “+” refers to robust expression (at least two experts rated either “++” or “+++”)

All neoplastic endocervical lesions (ECA and AIS) were found to be EZH2 positive by all three experts (for details see Tables 1 and 2). Except for one case out of the 54, all of these lesions (98.14%) received a “robust” overall score.

Adjacent normal glandular epithelium was detected in 34 (63%) out of the 54 malignant cases by at least two experts. On average, immunonegativity was found in 88.3%, while focal positivity in 11.7% of the detected normal glandular epithelium samples by the three experts (for details see Tables 1 and 2). Ratings resulted in an overall score of “negative/focally positive” in all of the 34 cases.

Figure 1 shows representative cases of diffuse (robust) EZH2 immunoreactivity of the neoplastic endocervical lesions (ECA and AIS) and negative immunoreactivity of the adjacent normal glandular epithelium.

A total of 32 non-neoplastic endocervical lesions (15 reactive atypia, 9 microglandular hyperplasia, 3 tuboendometrioid metaplasia, 3 tunnel cluster, 2 endometriosis) were analyzed.

The detailed results of the EZH2 immunohistochemical analyses for non-neoplastic endocervical lesions were summarized in Table 3.

On average, 67.7% of the ratings were negative, 24% of the ratings were focally positive, and 8.3% of the ratings were partly positive. The ratings resulted in an overall score of “negative/focally positive” in 28 out of the 32 cases (87.5%) and “robust” in the rest of the cases (4 cases, 12.5%).

Adjacent normal glandular epithelium was detected in all non-neoplastic endocervical lesion cases by all experts.

These adjacent normal glandular epithelium samples were on average rated immunonegative in 95.84%, focally positive in 2.08%, and partially positive in other 2.08% (for details see Table 3). These ratings resulted in an overall score of “negative/focally positive” for each sample. Figures 2 and 3 show representative cases of negative or focally positive (+) EZH2 immunoreactivity of the non-neoplastic lesions.

Fisher’s exact test yielded a statistically significant (two-tailed $p < 0.0001$) difference in the overall immunoreactivity scores between the neoplastic and non-neoplastic lesions

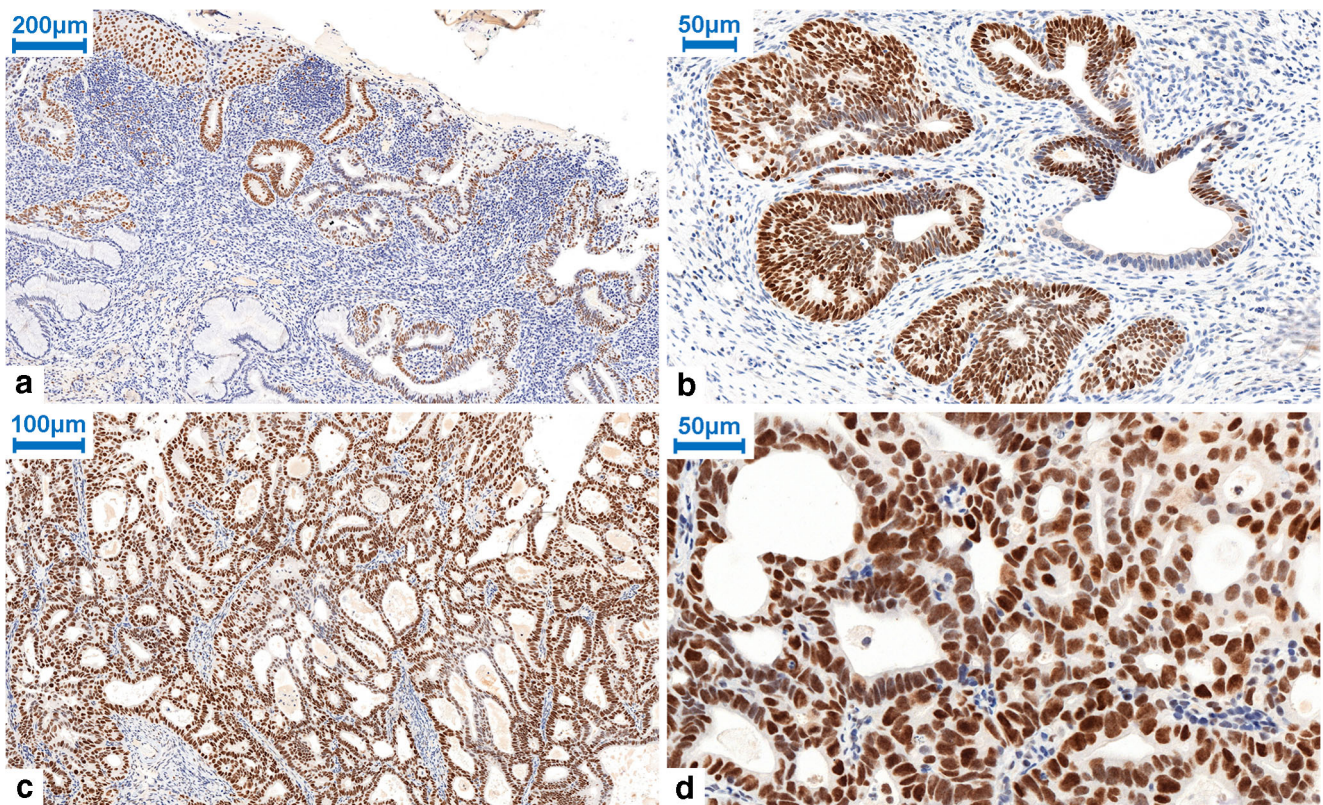


Fig. 1 EZH2 nuclear expression in CIN, AIS, and ECA. **a** Diffuse positive (robust) expression of EZH2 in CIN3 and AIS, negative staining of EZH2 in normal endocervical glandules (Table 2; Case No. 11; immunohistochemistry; $\times 100$ magnification). **b** Diffuse positive

(robust) expression of EZH2 in AIS (Table 2; Case No. 17; immunohistochemistry; $\times 300$ magnification). **c–d** Diffuse positive (robust) nuclear expression of EZH2 in ECA (Table 1; Case No. 22.; immunohistochemistry; $\times 200$ and $\times 400$ magnification)

(“robust” score was found in 53 out of the 54 neoplastic lesions vs. in 4 out of the 32 non-neoplastic lesions).

Robust EZH2 expression was found to have a sensitivity of 98.15% (95% CI = 90.11 to 99.95%) and a specificity of 87.5% (95% CI = 71.01 to 96.49%) in distinguishing neoplastic lesions from non-neoplastic lesions, with a positive predictive value of 92.98% (95% CI = 83 to 98.05%) and a negative predictive value of 96.55% (95% CI = 82.24 to 99.91%). A sensitivity of 98.15% (95% CI = 90.11 to 99.95%) and a specificity of 100% (95% CI = 94.4 to 100%) were found in distinguishing neoplastic lesions from all normal glandular epithelium samples ($n = 66$), with a positive predictive value of 100% (95% CI = 93.28 to 100%) and a negative predictive value of 98.46% (95% CI = 91.72 to 99.96%). A sensitivity of 98.15% (95% CI = 90.11 to 99.95%) and a specificity of 95.88% (95% CI = 89.78% to 98.87%) were found in distinguishing neoplastic from non-neoplastic lesions and normal endocervical epithelium samples combined ($n = 98$), with a positive predictive value of 92.98% (95% CI = 83 to 98.05%) and a negative predictive value of 98.46% (95% CI = 94.17 to 99.97%).

For the neoplastic endocervical lesion (ECA and AIS) immunoreactivity ratings, inter-expert ICCs were 0.53 for single

measures (95% confidence interval = 0.37–0.67) and 0.77 for average measures (95% confidence interval = 0.64–0.86).

For the non-neoplastic endocervical lesion immunoreactivity ratings, inter-expert ICCs were 0.8 for single measures (95% confidence interval = 0.68–0.89) and 0.92 for average measures (95% confidence interval = 0.86–0.96).

Discussion

The aim of this study was to investigate the EZH2 expression status of neoplastic endocervical lesions such as ECA and AIS compared with normal glandular epithelium and non-neoplastic endocervical lesions.

All endocervical neoplastic lesions in this study were found to be EZH2 positive by all experts. Moreover, immunoreactivity was found to be very extensive. Except for one case, all (98.14%) neoplastic lesions showed a robust EZH2 expression.

In contrast, robust EZH2 expression was significantly less often (4 out of 32 cases, 12.5%) found in the non-neoplastic glandular lesions (two-tailed $p < 0.0001$) and never (0 out of 66 samples) in the adjacent normal glandular epithelium.

Table 3 Clinical and immunostaining data of non-neoplastic cases

Case No.	Age	Diagnosis	EZH2 immunoreactivity ²								
			Normal glandular epithelium				Non-neoplastic endocervical lesions				
			Expert			Overall score ³	Expert			Overall score ³	
			1	2	3		1	2	3		
1.	33	Reactive atypia	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2.	50		–	–	–	–	–	+	+	–	–
3.	39		–	–	–	–	–	–	–	–	–
4.	54		–	–	–	–	–	+	+	+	–
5.	40		–	–	–	–	–	+	+	–	–
6.	40		–	–	–	–	–	–	–	–	–
7.	42		–	–	–	–	–	–	–	–	–
8.	39		++	–	–	–	–	++	++	+	+
9.	49		++	–	–	–	–	++	++	+	+
10.	43		–	–	+	–	–	+	+	+	–
11.	32		–	–	–	–	–	–	–	–	–
12.	46		–	–	–	–	–	+	–	+	–
13.	61		–	–	–	–	–	–	–	–	–
14.	48		–	–	–	–	–	–	–	–	–
15.	48		–	–	–	–	–	–	–	–	–
16.	51	Microglandular hyperplasia	–	–	+	–	–	–	–	–	–
17.	50		–	–	–	–	–	–	–	–	–
18.	37		–	–	–	–	–	–	–	–	–
19.	69		–	–	–	–	–	+	+	+	–
20.	37		–	–	–	–	–	–	–	–	–
21.	54		–	–	–	–	–	+	+	+	–
22.	37		–	–	–	–	–	–	–	–	–
23.	48		–	–	–	–	–	–	–	+	–
24.	51		–	–	–	–	–	–	–	–	–
25.	35	Endometriosis	–	–	–	–	–	–	–	–	–
26.	33		–	–	–	–	–	–	–	–	–
27.	36	TEM ¹	–	–	–	–	–	–	–	–	–
28.	41		–	–	–	–	–	++	++	+	+
29.	46		–	–	–	–	–	–	–	–	–
30.	61	Tunnel cluster	–	–	–	–	–	–	–	–	–
31.	53		–	–	–	–	–	++	++	+	+
32.	67		–	–	–	–	–	–	–	–	–

¹ Tuboendometrioid metaplasia

² Immunoreactivity extent: ++ = 10–50%, + = < 10%, – = negative—no obvious immunoreactivity at × 40 magnification

³ Overall score of immunoreactivity evaluation: “–” refers to negative/focally positive (at least two experts rated either “–” or “+”) while “+” refers to robust expression (at least two experts rated either “++” or “+++”)

Occasionally, false positivity was caused by squamous metaplasia or reserve cell hyperplasia (e.g., in Fig. 2 case b).

Robust EZH2 expression appeared to have an excellent diagnostic test capability in differentiating neoplastic lesions from non-neoplastic lesions and normal endocervix. A sensitivity of 98.15% and a specificity of 95.88% were found in distinguishing neoplastic from non-neoplastic lesions and

normal endocervical epithelium samples combined ($n = 98$), with a positive predictive value of 92.98% and a negative predictive value of 98.46%.

Inter-observer agreement for average measurements could be interpreted as excellent [23].

Our presented data suggest that EZH2 plays a role in the pathogenesis of not only malignancies of the breast [7], lung

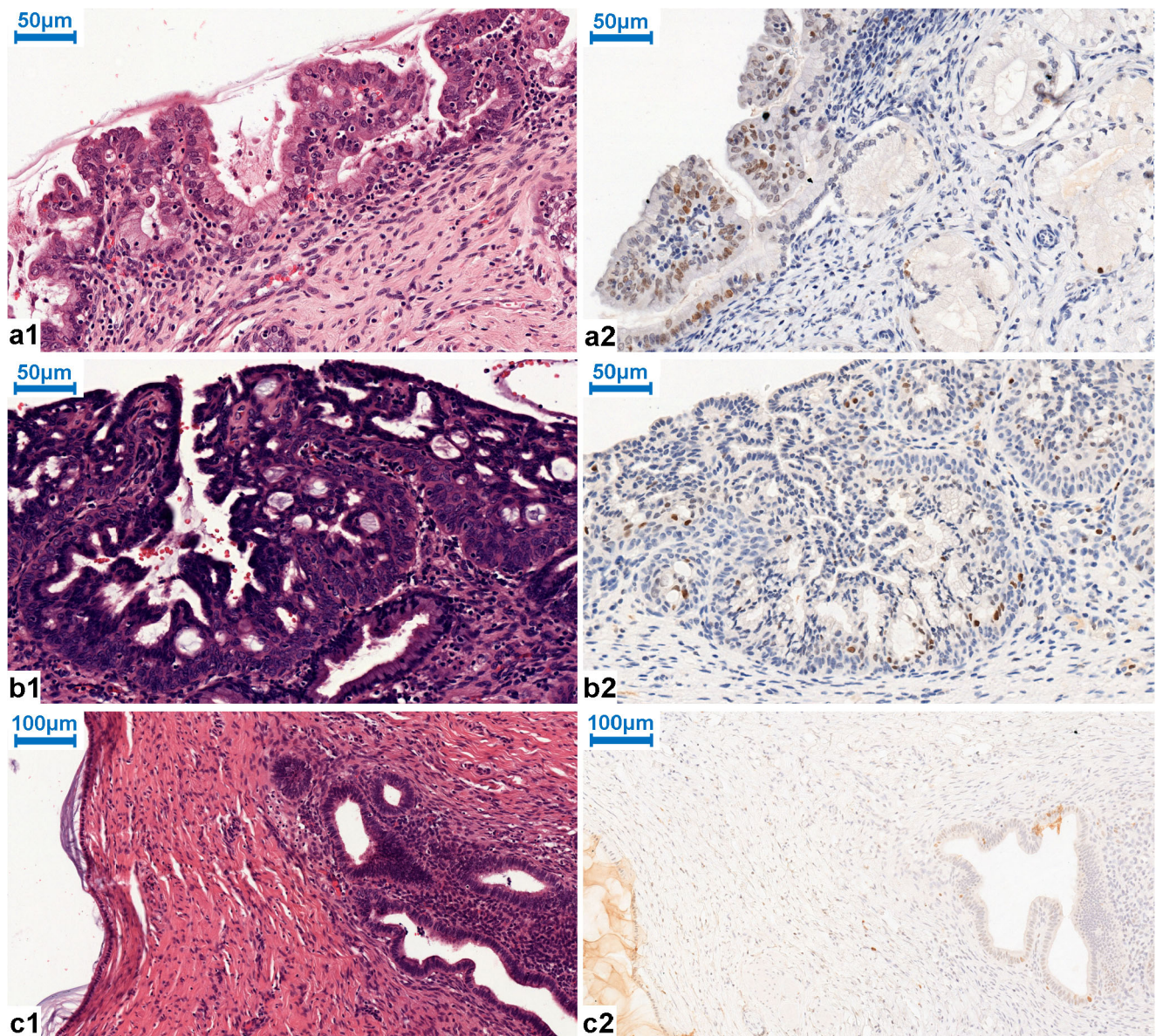


Fig. 2 Reactive atypia, microglandular hyperplasia, and endometriosis with HE. a1, b1 ($\times 400$ magnification), c1 ($\times 200$ magnification). a2 EZH2 focal positivity in reactive atypia (Table 3; Case No. 10; immunohistochemistry; $\times 400$ magnification). b2 No expression of

EZH2 in microglandular hyperplasia, EZH2 focal positivity in squamous metaplasia (Table 3; Case No. 24; immunohistochemistry; $\times 400$ magnification). c2 Negative staining of EZH2 in endometriosis (Table 3; Case No. 25; immunohistochemistry; $\times 200$ magnification)

[8], stomach [9], colon [10], pancreatobiliary tract [11], liver [12], thyroid gland [13], prostate [14], bladder [15], endometrium [16], and ovary [17] but also in endocervical neoplasia as well. Since EZH2 expression was found in all investigated cases including the non-human papillomavirus-related ones, authors speculate that EZH2 is a substantial and independent factor in endocervical carcinogenesis.

Yuting Gu et al. [24] studied the expression of EZH2 in endometrial carcinomas. The expression rate of EZH2 in endometrial carcinoma tissue (68.27%) was significantly higher than that in adjacent tissue (24.03%). Nan Jia et al. [25] demonstrated that EZH2 was overexpressed (medium to strong reactivity) in complex hyperplasia, atypical hyperplasia, and

endometrial cancer, but not in simple hyperplasia and normal endometrium (with negative to weak expression). In the study by Jin et al., aberrant overexpression of EZH2 was frequently observed in cervical squamous cell carcinoma as compared with adjacent normal tissues ($P = 0.0005$). Although these studies investigated immunoreactivity intensity, unlike immunoreactivity extent as in the present study, the results appear to be still comparable. EZH2 immunoreactivity differences between neoplastic and non-neoplastic and/or normal tissues appear to be at least as appreciable in the endocervix as in the endometrium or cervical squamous epithelium. This raises that EZH2 staining might be applied as a differential diagnostic tool in endocervical lesions. At present, panels including

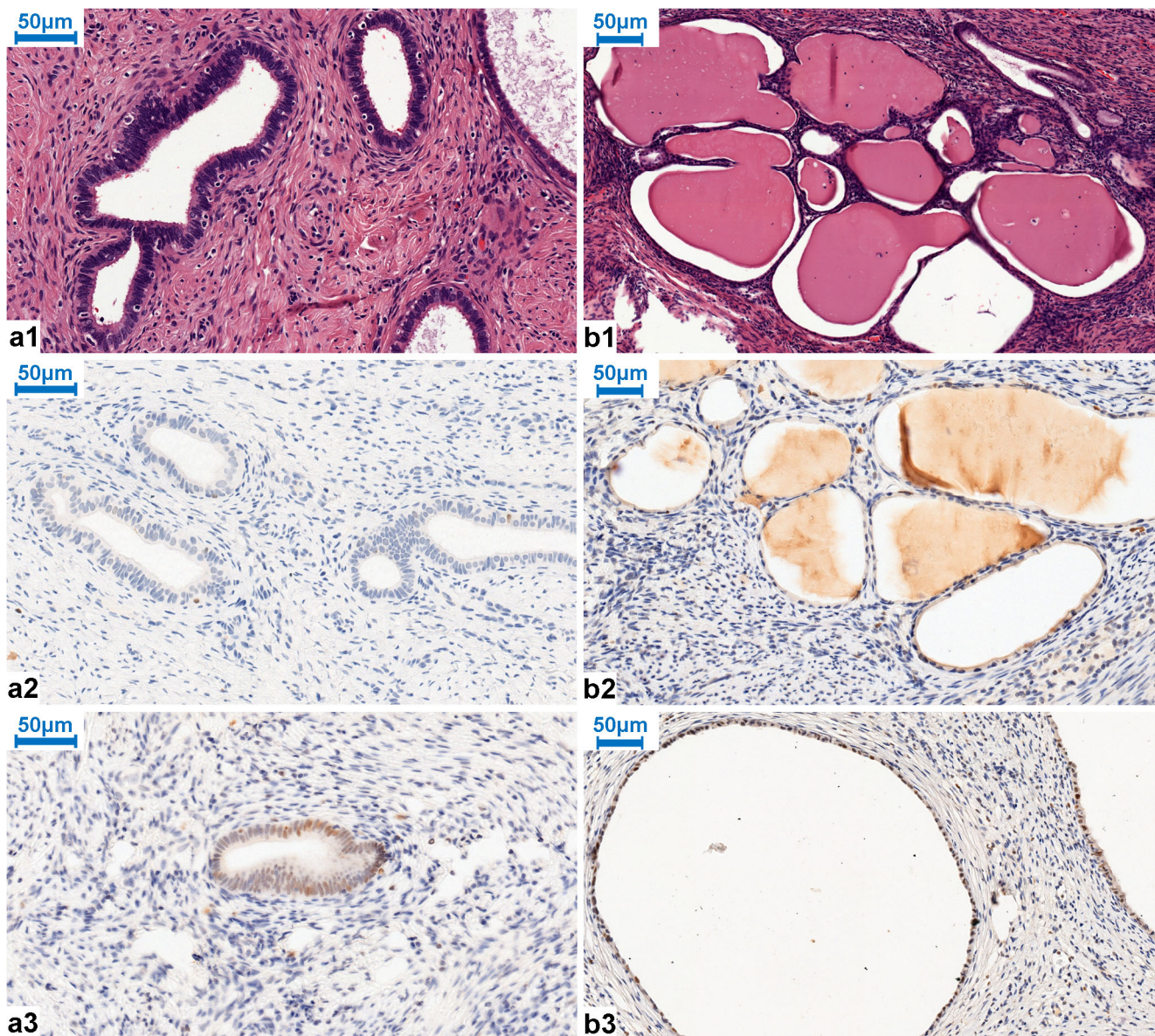


Fig. 3 Tuboendometrioid metaplasia (TEM) and tunnel cluster with HE. a1, b1 (a1, $\times 400$ magnification; b1 $\times 300$ magnification). a2 EZH2 negative staining in TEM (Table 3; Case No. 27; $\times 400$ magnification). a3 Partly positive (robust) expression (++) of EZH2 in another sample

with TEM (Table 3; Case No. 28; $\times 400$ magnification). b2 EZH2 negativity in tunnel cluster (Table 3; Case No. 30; $\times 300$ magnification). b3 Partly positive (robust) expression (++) of EZH2 in another case of tunnel cluster (Table 3; Case No. 31; $\times 300$ magnification)

combinations of various markers are suggested for endocervical differential diagnosis. Sandra Lee et al. [26] showed that p16, p16/Ki67 dual stain, ProExC, CEA, ESA, HIK1083, Claudin 18, and ER losses in perilesional stromal cells were useful with high (≥ 0.75) sensitivity and specificity estimates in ≥ 1 malignant versus benign comparisons. Our data indicate that robust expression of EZH2 alone has an even higher diagnostic reliability, with a sensitivity and specificity of over 95%.

As a conclusion, EZH2 may play a role in the pathogenesis of endocervical neoplasia, and the detection of robust expression of EZH2 might be a useful differential diagnostic tool in

problematic endocervical lesions in histology and probably in cytology as well.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge the Immunopathology Laboratory, Department of Pathology, University of Pécs and for their technical assistance. The present scientific certification is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.

Author contributions Evelin Makk played a major role in data collection and overview, interpreted the data, edited and revised the manuscript for intellectual content.

Levente Bálint played a major role in literary research, interpreted the data and revised the manuscript for intellectual content.

János Cifra played a major role in data collection, interpreted the data and revised the manuscript for intellectual content.

Tamás Tomóczky played a major role in the design and conception of the work, interpreted the data and revised the manuscript for intellectual content.

Angéla Oszter played a major role in data analysis, interpreted the data, and revised the manuscript for intellectual content.

Arnold Tóth played a major role in statistical data analysis, interpreted the data, edited and revised the manuscript for intellectual content.

Endre Kálmán played a major role in the conception of the work; analyzed the data, interpreted the data, edited and revised the manuscript for intellectual content.

Krisztina Kovács played a major role in the conception of the work, analyzed the data, interpreted the data, edited and revised the manuscript for intellectual content.

All authors approved the submitted manuscript and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Funding Information Open access funding provided by University of Pécs (PTE).

Compliance with ethical standards

The use of patient data for the present study has been approved by the local ethical committee (number of permission: PTE/57682/2017).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Karamurzin YS, Kiyokawa T, Parkash V, Jotwani AR, Patel P, Pike MC, Soslow RA, Park KJ (2015) Gastric-type endocervical adenocarcinoma: an aggressive tumor with unusual metastatic patterns and poor prognosis. *Am J Surg Pathol* 39(11):1449–1457. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000532>
- Yokoi E, Mabuchi S, Takahashi R, Matsumoto Y, Kuroda H, Kozasa K, Kimura T (2017) Impact of histological subtype on survival in patients with locally advanced cervical cancer that were treated with definitive radiotherapy: adenocarcinoma/adenosquamous carcinoma versus squamous cell carcinoma. *J Gynecol Oncol* 28(2):e19. <https://doi.org/10.3802/jgo.2017.28.e19>
- Ronnett BM (2016) Endocervical adenocarcinoma: selected diagnostic challenges. *Mod Pathol* 29(Suppl 1):S12–S28. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.131>
- Guo CP, Liu KW, Luo HB, Chen HB, Zheng Y, Sun SN, Zhang Q, Huang L (2011) Potent anti-tumor effect generated by a novel human papillomavirus (HPV) antagonist peptide reactivating the pRb/E2F pathway. *PLoS One* 6(3):e17734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017734>
- Huang SM, McCance DJ (2002) Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein/p300 and P/CAF. *J Virol* 76(17):8710–8721
- Zhang HM, Chen SQ, Yao SZ (2016) Expression and clinical implications of enhancer of Zeste homolog 2 and p53 protein in squamous cell carcinoma and precancerous lesions in the cervix. *Genet Mol Res* 15(2). <https://doi.org/10.4238/gmr.15027408>
- Pourakbar S, Pluard TJ, Accurso AD, Farassati F (2017) Ezh2, a novel target in detection and therapy of breast cancer. *Oncotargets Ther* 10:2685–2687. <https://doi.org/10.2147/OTT.S138777>
- Findeis-Hosey JJ, Huang J, Li F, Yang Q, McMahon LA, Xu H (2011) High-grade neuroendocrine carcinomas of the lung highly express enhancer of zeste homolog 2, but carcinoids do not. *Hum Pathol* 42(6):867–872. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.09.019>
- Choi JH, Song YS, Yoon JS, Song KW, Lee YY (2010) Enhancer of zeste homolog 2 expression is associated with tumor cell proliferation and metastasis in gastric cancer. *APMIS* 118(3):196–202. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02579.x>
- Fluge O, Gravdal K, Carlsen E, Vonen B, Kjelleveid K, Refsum S, Lilleng R, Eide TJ, Halvorsen TB, Tveit KM, Otte AP, Akslen LA, Dahl O, Norwegian Gastrointestinal Cancer G (2009) Expression of EZH2 and Ki-67 in colorectal cancer and associations with treatment response and prognosis. *Br J Cancer* 101(8):1282–1289. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605333>
- Toll AD, Dasgupta A, Potoczek M, Yeo CJ, Kleer CG, Brody JR, Witkiewicz AK (2010) Implications of enhancer of zeste homolog 2 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hum Pathol* 41(9):1205–1209. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.03.004>
- Zhai R, Tang F, Gong J, Zhang J, Lei B, Li B, Wei Y, Liang X, Tang B, He S (2016) The relationship between the expression of USP22, BMI1, and EZH2 in hepatocellular carcinoma and their impacts on prognosis. *Oncotargets Ther* 9:6987–6998. <https://doi.org/10.2147/OTT.S110985>
- Borbone E, Troncone G, Ferraro A, Jasencakova Z, Stojic L, Esposito F, Hornig N, Fusco A, Orlando V (2011) Enhancer of zeste homolog 2 overexpression has a role in the development of anaplastic thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 96(4):1029–1038. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1784>
- Abdelrahman AE, Arafa SA, Ahmed RA (2017) Prognostic value of Twist-1, E-cadherin and EZH2 in prostate cancer: an immunohistochemical study. *Turk Patoloji Derg.* <https://doi.org/10.5146/tjpath.2017.01392>
- Raman JD, Mongan NP, Tickoo SK, Boorjian SA, Scherr DS, Gudas LJ (2005) Increased expression of the polycomb group gene, EZH2, in transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 11(24 Pt 1):8570–8576. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1047>
- Zhou J, Roh JW, Bandyopadhyay S, Chen Z, Munkarah AR, Hussein Y, Alesh B, Jazaerly T, Hayek K, Semaan A, Sood AK, Ali-Fehmi R (2013) Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) and focal adhesion kinase (FAK) in high grade endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 128(2):344–348. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.07.128>
- Xu Y, Li X, Wang H, Xie P, Yan X, Bai Y, Zhang T (2016) Hypermethylation of CDH13, DKK3 and FOXL2 promoters and the expression of EZH2 in ovary granulosa cell tumors. *Mol Med Rep* 14(3):2739–2745. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5521>
- Jin M, Yang Z, Ye W, Yu X, Hua X (2015) Prognostic significance of histone methyltransferase enhancer of zeste homolog 2 in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 10(2):857–862. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3319>
- Stolnicu S, Barsan I, Hoang L, Patel P, Terinte C, Pesci A, Aviel-Ronen S, Kiyokawa T, Alvarado-Cabrero I, Pike MC, Oliva E, Park KJ, Soslow RA (2018) International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification (IECC): a new pathogenetic

- classification for invasive adenocarcinomas of the endocervix. *Am J Surg Pathol* 42(2):214–226. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000986>
20. Bosari S, Lee AK, Viale G, Heatley GJ, Coggi G (1992) Abnormal p53 immunoreactivity and prognosis in node-negative breast carcinomas with long-term follow-up. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 421(4):291–295
 21. Shrout PE, Fleiss JL (1979) Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychol Bull* 86(2):420–428
 22. Schoonjans F, Zalata A, Depuydt CE, Comhaire FH (1995) MedCalc: a new computer program for medical statistics. *Comput Methods Prog Biomed* 48(3):257–262
 23. Koo TK, Li MY (2016) A guideline of selecting and reporting intraclass correlation coefficients for reliability research. *J Chiropr Med* 15(2):155–163. <https://doi.org/10.1016/j.jcm.2016.02.012>
 24. Gu Y, Zhang J, Guan H (2017) Expression of EZH2 in endometrial carcinoma and its effects on proliferation and invasion of endometrial carcinoma cells. *Oncol Lett* 14(6):7191–7196. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7171>
 25. Jia N, Li Q, Tao X, Wang J, Hua K, Feng W (2014) Enhancer of zeste homolog 2 is involved in the proliferation of endometrial carcinoma. *Oncol Lett* 8(5):2049–2054. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2437>
 26. Lee S, Rose MS, Sahasrabudhe VV, Zhao R, Duggan MA (2017) Tissue-based immunohistochemical biomarker accuracy in the diagnosis of malignant glandular lesions of the uterine cervix: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Int J Gynecol Pathol* 36(4):310–322. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000345>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Andrea Ladányi,
National Institute of Oncology (NIO),
Hungary

*CORRESPONDENCE
Evelin Makk,
makk.evelin@gmail.com

RECEIVED 12 October 2023
ACCEPTED 28 November 2023
PUBLISHED 11 December 2023

CITATION
Makk E, Bohonyi N, Oszter A, Éles K,
Tornóczky T, Tóth A, Kálmán E and
Kovács K (2023), Comparative analysis
of EZH2, p16 and p53 expression in
uterine carcinosarcomas.
Pathol. Oncol. Res. 29:1611547.
doi: 10.3389/pore.2023.1611547

COPYRIGHT
© 2023 Makk, Bohonyi, Oszter, Éles,
Tornóczky, Tóth, Kálmán and Kovács.
This is an open-access article
distributed under the terms of the
Creative Commons Attribution License
(CC BY). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

Comparative analysis of EZH2, p16 and p53 expression in uterine carcinosarcomas

Evelin Makk^{1*}, Noémi Bohonyi², Angéla Oszter¹, Klára Éles¹,
Tamás Tornóczky¹, Arnold Tóth³, Endre Kálmán¹ and
Krisztina Kovács¹

¹Department of Pathology, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary, ²Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary, ³Department of Medical Imaging, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary

Introduction: The role of p16 and p53 immunohistochemistry in the diagnosis of rare and aggressive uterine carcinosarcoma (UCS) has been well established. However, enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), a histone methyltransferase and a member of the polycomb group family is a relatively new biomarker, with limited published data on its significance in this tumor type. The goal of this study was to examine EZH2 expression in UCS and its components, in correlation with morphological features, and p16 and p53 staining patterns.

Methods: Twenty-eight UCSs were included in the study. EZH2, p16 and p53 immunoreactivity were assessed independently by two pathologists in both tumor components (epithelial and mesenchymal). EZH2 and p16 immunostains were scored semiquantitatively: based on the percentage and intensity of tumor cell staining a binary staining index (“high- or low-expressing”) was calculated. The p53 staining pattern was evaluated as wild-type or aberrant (diffuse nuclear, null, or cytoplasmic expression). Statistical tests were used to evaluate the correlation between staining patterns for all three markers and the different tumor components and histotypes.

Results: High EZH2 and p16 expression and aberrant p53 patterns were present in 89.3% 78.6% and 85.7% of the epithelial component and in 78.6%, 62.5% and 82.1% of the mesenchymal component, respectively. Differences among these expression rates were not found to be significant ($p > 0.05$). Regarding the epithelial component, aberrant p53 pattern was found to be significantly ($p = 0.0474$) more frequent in the serous (100%) than in endometrioid (66.6%) histotypes. Within the mesenchymal component, p53 null expression pattern occurred significantly ($p = 0.0257$) more frequently in heterologous sarcoma components (71.4%) compared to the homologous histotype (18.8%).

Abbreviations: MMT: Malignant mixed Müllerian tumor; UCS: Uterine carcinosarcoma; EMT: Epithelial-mesenchymal transition; EZH2: Enhancer of zeste homologue 2; RMS: Rhabdomyosarcoma; IHC: Immunohistochemistry; ec: epithelial component; mc: mesenchymal component.

Conclusion: In conclusion, EZH2, p16 and p53 seem to play a universal role in the pathogenesis of UCS; however, a distinctive pattern of p53 expression appears to exist between the serous and endometrioid carcinoma components and also between the homologous and heterologous sarcoma components.

KEYWORDS

uterine cancer, carcinosarcoma, EZH2, p16, p53

Introduction

Uterine carcinosarcoma (UCS), or uterine malignant mixed Müllerian tumor (MMMT) is a very aggressive and rare neoplasm of the female genital tract, comprising less than 5% of endometrial malignancies [1].

This tumor has a biphasic morphology, containing both malignant epithelial (carcinomatous) and malignant mesenchymal (sarcomatous) components [2]. In most cases, it consists of a single carcinoma and a single homologous sarcoma histologic subtype. The former is usually serous carcinoma, followed by less common endometrioid, clear cell, undifferentiated, and mixed histotypes. The mesenchymal component is most often a homologous high grade sarcoma, and less often it consists of a heterologous rhabdomyosarcoma (RMS), chondrosarcoma, osteosarcoma, or liposarcoma [3, 4].

The majority of studies support the “metaplastic monoclonal or conversion theory,” whereby UCS develops from the metaplastic transformation of a single neoplastic cell type [5]. As part of the process, epithelial-mesenchymal transition (EMT) allows a polarized epithelial cell to transmogrify into a mesenchymal cell phenotype, giving the ability for it to migrate away from its original epithelial layer [6]. The EMT theory is supported by high epithelial to mesenchymal transition gene signature scores and is likely due to epigenetic alterations at microRNA promoters and histone gene mutations and amplifications [7]. However, a small percentage of UCS seem to represent real collision tumors, since they are molecularly biclonal and most likely develop from two independent cell populations [8].

Carcinosarcomas exhibit a significantly poorer prognosis compared to other high-grade endometrial carcinomas such as grade 3 endometrioid carcinoma, serous carcinoma and clear cell carcinoma [9].

Polycomb group proteins are a group of important epigenetic regulators. Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2), a histone lysin methyltransferase and a catalytic component of polycomb repressive complex 2 is involved in cell proliferation, cell differentiation and tumorigenesis by silencing the transcription of several tumor suppressor genes (including p21, p16 and p27) [10–13]. Accordingly, numerous studies have highlighted the role of EZH2 in cancer development and progression. Overexpression of EZH2 protein has been shown in various malignant tumors, including carcinomas of the breast

[14], lung [15], stomach [16], colon [17], pancreatobiliary tract [18], liver [19], thyroid gland [20], prostate [21], and bladder [22]. EZH2 has been also studied in most common gynecologic malignancies such as cervical [23, 24], endometrial [25, 26] and ovarian cancer [27, 28].

In recent years, EZH2 expression has also been discovered in certain sarcomas, including Ewing sarcoma [29], RMS [30, 31], synovial sarcoma [32], osteosarcoma [33], and chondrosarcoma [34].

Strong evidence demonstrated that EZH2 could promote EMT [35, 36], therefore, we postulated that aberrant EZH2 overexpression may also be involved in the pathogenesis of UCS.

Nevertheless, only limited data are available regarding EZH2 expression and its clinicopathological correlations in UCS. EZH2 positivity in UCS was previously only reported in one effusion cytology specimen [37].

p53 is a frequently used immunohistochemical marker in the diagnostic work-up of endometrial carcinomas, and based on The Cancer Genome Atlas database over 90% of UCS harbor TP53 mutation [38]. Similarly, the p16-RB pathway has also been previously implicated in the pathogenesis of UCS [39].

In this study, our goal was to investigate the potential role of EZH2 along with p16 and p53 biomarkers in the diagnosis and histogenesis of UCS components and their histotypes.

Materials and methods

Subjects

The study was approved by our institutional ethical committee (number of permission: KK/644-1/2020). Consecutive cases of UCS diagnosed from 2012 to 2019 were retrieved from the archives of the Department of Pathology, University of Pécs, Hungary.

Formalin-fixed and paraffin embedded tissue samples were collected from hysterectomy and biopsy (curettage) specimens. The original hematoxylin and eosin-stained slides from each case were reviewed, and representative blocks containing both malignant epithelial and mesenchymal components were selected for immunohistochemistry (IHC). The epithelial component was subclassified according to the current WHO classification [40] as serous, endometrioid, clear cell,

undifferentiated and mixed histotypes, while the mesenchymal component was classified as homologous or heterologous type.

Immunohistochemical analysis of EZH2, p16 and p53 expression

For IHC, 4 μ m thick sections were cut from the formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens. Immunostaining for EZH2 (mouse monoclonal, clone 6A10, prediluted, Newcastle Upon Tyne, United Kingdom), for p16 (mouse monoclonal, clone E6H4; Ventana Medical System Inc., Tucson, AZ), and for p53 (rabbit monoclonal, clone SP5, prediluted; Thermo Scientific, United States) were performed with proper positive and negative controls using Leica Bond Max autostainer (Leica Biosystems, Bannockburn, IL) and Leica Bond Polymer Refine Detection Kit (Upon Tyne, United Kingdom). Immunoreactivity was evaluated in both the epithelial and mesenchymal components independently by two board-certified pathologists with over 15 years of professional experience (K.K., A.O.).

EZH2 and p16 expression were scored semiquantitatively according to the percentage of tumor cell nuclear staining: 1+: <10% of tumor cell nuclei, 2+: between 10% and 50% of tumor cell nuclei, 3+: >50% of tumor cell nuclei [24, 41–44], and staining intensity (0: no staining, 1+: weak, 2+: moderate, 3+: strong). As in the previous studies, a staining index was calculated as the product of staining percentage and intensity on a scale of 0–9 [45, 46]. The tumors were categorized as high-expressing (staining index >4) or low-expressing (staining index \leq 4).

P53 immunoreactivity interpretation was conducted according to the recommendations by the International Society for Gynecological Pathologists [47]. The p53 staining pattern was evaluated as wild-type or aberrant (latter can be further classified as diffuse nuclear, null, or cytoplasmic expression) [48]. In more details, wild-type (normal) pattern is met when a scattered nuclear staining is present with no or weak cytoplasmic staining; Aberrant/diffuse nuclear pattern is met when 80% strong and diffuse nuclear staining is present (with or without any cytoplasmic staining), Aberrant/null pattern is met when a complete absence of nuclear staining in all cells is present without cytoplasmic staining; Aberrant/cytoplasmic pattern is met when a moderate to strong cytoplasmic staining is present in the absence of diffuse nuclear expression.

Statistical evaluation

For EZH2 and p16, the median staining index scores (low or high expression) of the two experts were calculated in both components. Regarding staining percentage and staining intensity, the ratings were summed up for further analysis.

Discordant p53 pattern ratings were reevaluated and the final result was decided in consensus. The EZH2 and p16 expression indices and p53 staining patterns were compared between the epithelial and mesenchymal components, as well as between the serous and endometrioid carcinoma components, and between the homologous and heterologous sarcoma components. Mixed and undifferentiated epithelial histotypes were excluded from histotype comparisons due to the low case numbers. Depending on the sample size, Chi square or Fisher exact tests were used to compare categorical values (staining index and p53 staining pattern) while Mann-Whitney test was used to compare ordinal values (staining percentage and staining intensity). Concordance between epithelial and mesenchymal components were evaluated with kappa test. All statistical tests were run in Medcalc [49]. A *p*-value of <0.05 was considered statistically significant [50].

Results

This study included 28 women with uterine carcinosarcoma, with a median age of 70.5 years (range 53–85 years). Formalin-fixed and paraffin embedded tissue samples were available from 22 hysterectomy and 6 biopsy (curettage) specimens. Histologically, the epithelial component comprised of 14 (50%) serous, 9 (32.1%) endometrioid, 2 (7.1%) undifferentiated, and 3 mixed (serous and endometrioid) carcinomas (10.7%). The mesenchymal component contained heterologous elements in 7 cases (25%), and homologous elements in 21 samples (75%). Among the heterologous sarcoma components, 4 chondrosarcoma and 3 RMS occurred. The most common homologous components were endometrial stromal sarcoma ($n = 14$), followed by 3 leiomyosarcomas, 3 undifferentiated sarcomas, and 1 myxoid fibrosarcoma.

The immunoreactivity measures of EZH2 and p16 in the epithelial and mesenchymal components are shown in Table 1. High EZH2 expression was slightly more common in the epithelial (89.3%) than in the mesenchymal (78.6%) component. Similarly, p16 expression was slightly higher in the epithelial (78.6%) compared to the mesenchymal (62.5%) components. Based on Fisher's exact test, p16 and EZH2 expressions between the epithelial and mesenchymal components were not statistically different (for EZH2 $p = 0.468$; for p16 $p = 0.248$). Based on Mann-Whitney tests, marker staining percentages and intensities were also not statistically different between the epithelial and mesenchymal components ($p = 0.074$ and $p = 0.076$ for staining percentage of EZH2 and p16, respectively; $p = 0.11$ and $p = 0.059$ for staining intensity of EZH2 and p16, respectively).

Figure 1 shows representative cases of diffuse and strong immunoreactivity with EZH2 and p16 markers and diffuse nuclear p53 pattern.

TABLE 1 Immunoreactivity of EZH2 and p16 in UCSs based on the two independent experts' ratings (medians for staining index, sums for staining percentage and nuclear intensity).

	EZH2		p16	
	Epithelial component	Mesenchymal component	Epithelial component	Mesenchymal component
Staining index			n (%)	
Low ^a	3 (10.7)	6 (21.4)	6 (21.4)	10.5 (37.5)
High ^b	25 (89.3)	22 (78.6)	22 (78.6)	17.5 (62.5)
			average ^c (SD)	
Staining percentage	5.68 (0.72)	5.18 (1.15)	4.96 (1.68)	4.32 (1.87)
Nuclear Intensity	5.64 (0.95)	5.18 (1.36)	5.21 (1.5)	4.46 (1.86)

^aStaining index of ≤ 4 .

^bStaining index of > 4 .

^cValue range = 0-6.

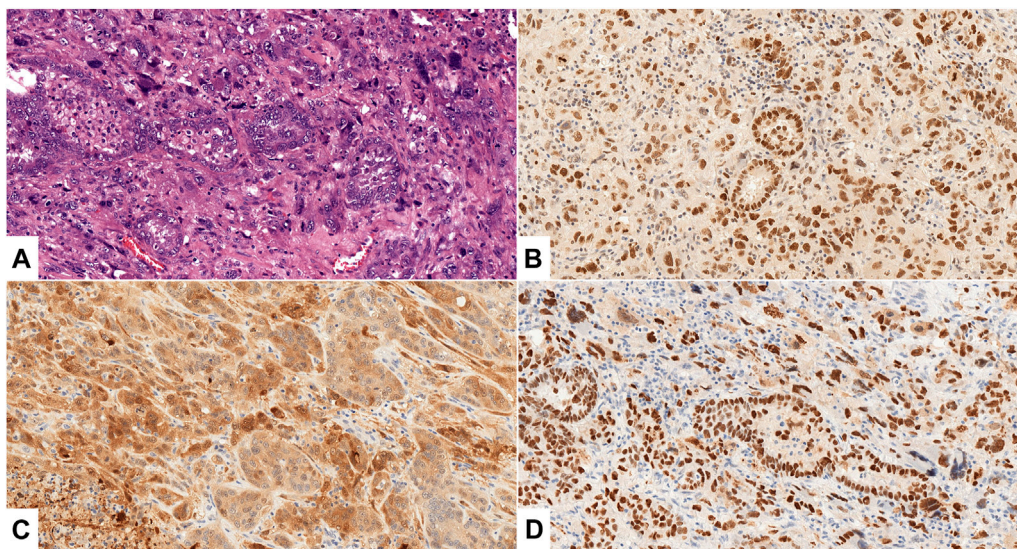


FIGURE 1

(A–D): Uterine carcinosarcoma, Case No. 26., $\times 200$ magnification. (A) HE staining shows malignant epithelial (serous carcinoma) and mesenchymal (homologous undifferentiated sarcoma) components. (B, C) Diffuse, strong positive (3+) expression of EZH2 (B), p16 (C) in both components; (D): $>80\%$ strong and diffuse p53 nuclear staining in both components.

The immunoreactivity measures of EZH2 and p16, in the different carcinoma components are shown in Table 2. Both serous and endometrioid histotypes showed prominent staining with all markers. High expression of EZH2 was almost always present (89% for both endometrioid and serous carcinomas). High p16 expression was also very common (88% of endometrioid, 79% of serous cases). There were no statistical differences in the EZH2 and p16 staining scores between the serous and endometrioid histotypes (Fisher exact test p values for staining index of EZH2 and p16 between the histotypes were 0.74 and 0.96 respectively. Mann-Whitney p values for staining percentages of EZH2 and p16 between the two carcinoma

histotypes were 0.35 and 0.15, respectively. Mann-Whitney p values for EZH2 and p16 staining intensity between the two carcinoma histotypes were 0.37 and 0.26, respectively.)

The immunoreactivity measures of EZH2 and p16 in homologous and heterologous sarcoma components are shown in Table 3. Both sarcoma types showed similarly common high EZH2 expression (79% of the homologous elements, and 78.6% of the heterologous elements) and p16 expression (60% of the homologous elements and 72% of the heterologous elements). These markers showed no statistical differences (Fisher exact test p values for staining index of EZH2 and p16 between the two types were 1 and 0.66,

TABLE 2 Immunoreactivity of EZH2 and p16 in UCS epithelial component serous and endometrioid histotypes based on the two independent experts' ratings (medians for staining index, sums for staining percentage and nuclear intensity).

	EZH2				p16			
	Endometrioid	Serous	Mixed	Undiff.	Endometrioid	Serous	Mixed	Undiff.
Staining index	n (%)							
Low ^a	1 (11)	1.5 (10.7)	0.5 (16.7)	0 (0)	2 (22)	3 (21)	1 (33.3)	0 (0)
High ^b	8 (89)	12.5 (89.3)	2.5 (83.3)	2 (100)	7 (88)	11 (79)	2 (66.7)	2 (100)
	average ^c (SD)							
Staining percentage	5.77 (0.66)	5.57 (0.85)	5.66 (0.57)	6 (0)	4.88 (1.45)	4.93 (1.9)	4.66 (2.3)	6 (0)
Nuclear Intensity	5.44 (1.33)	5.71 (0.82)	5.66 (0.57)	6 (0)	5.11 (1.76)	5.28 (1.32)	4.66 (2.3)	6 (0)

^aStaining index of ≤4.

^bStaining index of >4.

^cValue range = 0–6.

TABLE 3 Immunoreactivity of EZH2 and p16 in UCS mesenchymal component homologous and heterologous types based on the two independent experts' ratings (medians for staining index, sums for staining percentage and nuclear intensity).

	EZH2		p16	
	Homologous	Heterologous	Homologous	Heterologous
Staining index	n (%)			
Low ^a	4.5 (21)	1.5 (21.4)	8.5 (40)	2 (28)
High ^b	16.5 (79)	5.5 (78.6)	12.5 (60)	5 (72)
	average ^c (SD)			
Staining percentage	5.14 (1.23)	5.28 (0.95)	4.23 (1.92)	4.57 (1.81)
Nuclear Intensity	5.38 (1.28)	4.57 (1.51)	4.42 (1.98)	4.57 (1.51)

^aStaining index of ≤4.

^bStaining index of >4.

^cValue range = 0–6.

TABLE 4 p53 staining patterns in UCS components and component types.

Expression	Epithelial component					Mesenchymal component		
	Endometrioid	Serous	Mixed	Undifferentiated	All	Homologous	Heterologous	All
Wild-type ^a	3/9 (33.3%)	0/14 (0%)	0/3 (0%)	1/2 (50%)	4/28 (14.3%)	5/21 (23.8%)	0/7 (0%)	5/28 (17.9%)
Aberrant ^b	6/9 (66.6%)	14/14 (100%)	3/3 (100%)	1/2 (50%)	24/28 (85.7%)	16/21 (76.2%)	7/7 (100%)	23/28 (82.1%)
Pattern								
Diffuse nuclear	5/6 (83.3%)	11/14 (78.6%)	2/3 (66.7%)	0/1 (0%)	18/24 (75%)	13/16 (81.2%)	2/7 (28.6%)	15/23 (65.2%)
Null	1/6 (16.7%)	3/14 (21.4%)	1/3 (33.3%)	1/1 (100%)	6/24 (25%)	3/16 (18.8%)	5/7 (71.4%)	8/23 (34.8%)
Cytoplasmic	0/6 (0%)	0*/14 (0%)	0/3 (0%)	0/1 (0%)	0*/24 (0%)	0/16 (0%)	0/7 (0%)	0/23 (0%)

^aWild-type (normal) - scattered nuclear staining).

^bAberrant/Diffuse nuclear pattern: 80% strong and diffuse nuclear staining with or without cytoplasmic staining, Aberrant/null pattern: complete absence of nuclear staining in all cells, Aberrant/cytoplasmic pattern: moderate to strong cytoplasmic staining in the absence of diffuse nuclear expression. *One serous case and two endometrioid cases presented weak to moderate cytoplasmic staining but also at least 80% strong and diffuse nuclear staining, therefore were attributed diffuse nuclear pattern (see Figure 2).

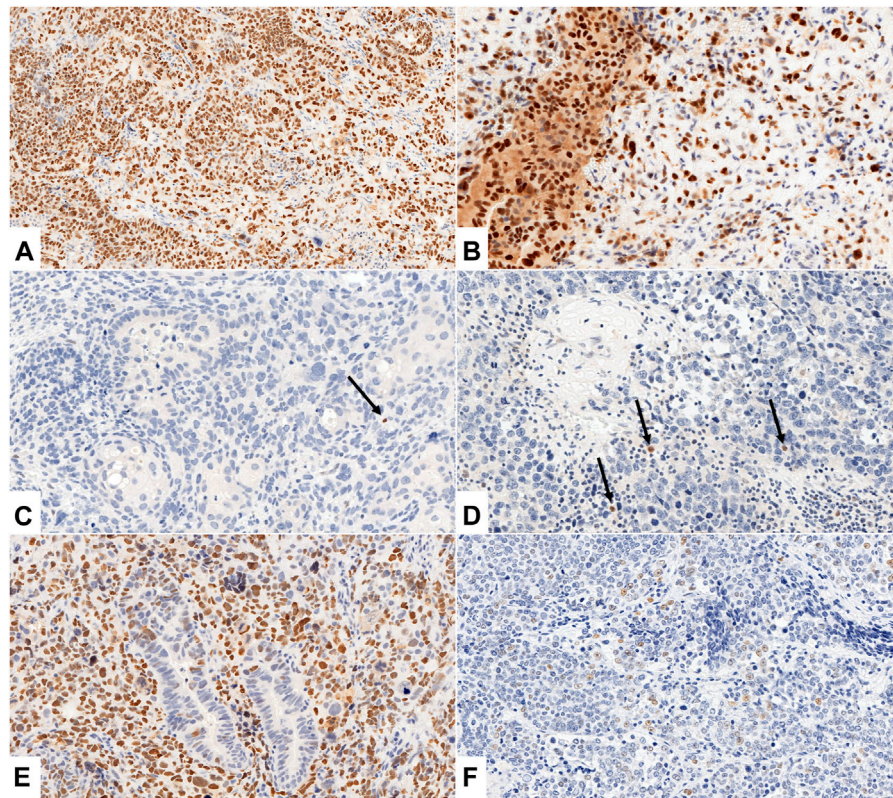


FIGURE 2

(A–F) Different patterns of p53 expression. (A, B) Aberrant, p53 diffuse nuclear pattern with weak (A) and weak to moderate (B) cytoplasmic staining in epithelial and mesenchymal components of UCS ((A): Case No. 26., ×200 magnification, (B): Case No. 5., ×400 magnification). (C, D) Aberrant, p53 null pattern with complete absence of nuclear staining in all cells of both components ((C): Case No. 11., ×200 magnification, (D): Case No. 21., ×200 magnification). Arrows indicate internal positive controls (lymphocytes). (E, F) Wild type p53 IHC pattern with scattered nuclear staining in epithelial (E) and mesenchymal (F) component, (E): aberrant, p53 diffuse nuclear pattern in mesenchymal component ((E): Case No. 19., ×200 magnification, (F): Case No. 22., ×400 magnification).

respectively. Mann-Whitney p values for staining percentage of EZH2 and p16 between the two types were 0.37 and 0.4, respectively. Mann-Whitney p values for staining intensity of EZH2 and p16 between the two types were 0.1 and 0.48, respectively.)

P53 staining patterns are shown in Table 4. Aberrant p53 immunostaining was seen in 85.7% of the epithelial and 82.1% of the mesenchymal components. These values were statistically equal (Fischer test $p = 1$). P53 cytoplasmic staining was observed only focally in 3/28 cases, but none of the tumors showed aberrant cytoplasmic expression pattern. Within the epithelial components, aberrant p53 expression was found in 66.6% of the endometrioid and 100% of the serous carcinomas, which was statistically significant (Fisher test $p = 0.0474$). Regarding the mesenchymal components, homologous sarcomas showed aberrant p53 patterns in 76.2% of cases, while all heterologous sarcomas (100%) were p53 aberrant (no statistical difference, Fisher test $p = 0.29$). Aberrant null p53 pattern was observed in 71.4% of the heterologous sarcomas, whereas only 18.8% of the homologous

sarcomas displayed this staining pattern (statistically significant difference, Fisher test $p = 0.0257$). Aberrant diffuse nuclear p53 expression was seen in 81.2% of the homologous sarcoma histotypes. No other significant differences were identified in p53 patterns among the UCS components and their different histotypes.

Figure 2 illustrates different patterns of p53 expression.

P53 was concordant between epithelial and mesenchymal components in 82.14% (Cohen's k : 0.34, fair agreement).

Discussion

Our results showed that EZH2 and p16 are similarly highly expressed, while p53 immunostaining is aberrant in the majority of uterine carcinosarcomas. Pattern differences were found between histotypes.

Previous studies have described various immunohistochemical profiles of carcinosarcomas.

EZH2 positivity in UCS was previously reported in a single effusion cytology specimen in one study [37], which investigated the utility of EZH2 as a single immunomarker in the diagnosis of metastatic carcinoma in effusion samples. A total of 108 pleural, peritoneal, and pericardial effusions/washings diagnosed as unequivocally reactive ($n = 41$) and metastatic carcinoma ($n = 67$) by cytomorphology over 18 months were reviewed. Among the metastatic carcinomas, 54 cases were adenocarcinoma and the remaining cases were squamous cell carcinoma ($n = 1$), carcinosarcoma ($n = 1$), and carcinoma of undefined histological subtypes ($n = 11$). Only one carcinosarcoma cytology specimen was included in this study that was a positive case.

The role of p16 and p53 immunohistochemistry as diagnostic and prognostic markers in UCS has been evaluated by a handful of prior studies. Engelsen et al. demonstrated that pathologic expression of p53 and p16 in endometrial curetings identifies high-risk endometrial carcinoma patients with poor prognosis [51]. Buza and Tavassoli reported p16 overexpression in the carcinomatous and sarcomatous components of uterine MMMTs, and observed that p16 immunohistochemical reaction was significantly more intense and diffuse than p53 immunostaining in both components. The concordance rates for p16 and p53 immunoreactivity for the two components within the same tumor were 83% and 90% of cases, respectively [39]. Xiaowei et al. examined the possible utility of p16, p53, and PAX8 IHC in the diagnosis of carcinosarcomas, and revealed almost equal staining in both components for p16 and p53. P16 staining showed almost equally high expression in the epithelial (74%) and mesenchymal components (71%), and p53 expression also was similar in the epithelial (48%) and mesenchymal (44%) components. High-expression of PAX8 was more common in the epithelial (73%) than in the mesenchymal (13%) components [46].

Compared to PAX8, EZH2 in our study shows not only a slightly higher expression rate in the epithelial component but is similarly highly expressed in the mesenchymal component as well.

Increased expression of EZH2 has been described in most common gynecologic malignancies such as cervical [23, 24], endometrial [25, 26] and ovarian cancer [27, 28]. Prognostic significance of EZH2 expression status has been also reported in patients with these tumours, because high expression of EZH2 was associated with tumor aggressiveness [52–54]. Therefore, EZH2 has been raised as a potential target for tumor therapy, and both preclinical and clinical studies on EZH2 inhibitors are intensively pursued [36, 55–58]. Regarding EZH2 as potential therapeutic target in UCS, no data exists in the literature.

Several further immunohistochemical markers have been studied as potential markers/adjuncts in the diagnosis of UCS as well, including p27, c-KIT, COX-2, EGFR, C-ErbB-2, the oncogene AKT [39, 59–63]. Recently, HER2 expression was

also demonstrated in carcinosarcoma, as a potential therapeutic marker. Rates of HER2 overexpression or amplification were reported to be ranging from 6% to 25%. Intratumoural heterogeneity of HER2 expression/amplification and lower HER2 expression in the sarcoma component compared to the carcinoma component was also shown [62, 64, 65].

Regarding endometrial cancers in general, it is well-documented that the staining patterns of p53 and p16 are different between endometrial serous and endometrioid carcinomas [66–68]. The primary emphasis in most studies examining p53 in endometrial carcinomas is placed on the correlation between p53 overexpression and serous histology [69]. Mutations in TP53 are observable in intraepithelial carcinomas and are believed to occur at an early stage in the development of uterine serous carcinoma [70]. In a subset of endometrioid carcinomas, p53 overexpression has been documented, predominantly in tumors categorized as FIGO grade 3 endometrioid carcinomas [71]. In line with a 2018 recommendation, tumors exhibiting a double negative profile (p16-negative/p53-wild-type) are indicative of being primarily endometrioid, whereas tumors demonstrating a double positive profile (p53 aberrant/mutation-type and diffuse strong p16 positive) are more likely associated with serous histology [66]. This is consistent with the findings of the present study as we found significant more ($p = 0.0474$) p53 aberrant type serous than endometrioid subtype of the epithelial UCS components. The different p16 and p53 staining patterns between endometrial cancer types and UCS related epithelial component histotypes raise the possibility of their different pathomechanisms. In non-UCS related endometrial cancers, overexpression of EZH2 is well established [26, 72]. Gu et al [72] collected a total of 104 samples from patients with the diagnosis of endometrial cancer and analyzed the expression of EZH2 by immunohistochemical staining. The results showed that the positive expression rate of EZH2 was 68.27%, which was significantly higher than that in the adjacent tissue ($p < 0.05$). Krill et al [26] analysed 87 tissue specimens from sixty patients with both early and advanced stage endometrioid endometrial adenocarcinoma and 27 matched-normal tissue specimens. Their results showed that EZH2 mRNA ($p < .0001$) and protein expression ($p < .0001$) in tumor specimens were significantly higher than in the matched-normal tissue. In primary tumors, EZH2 protein expression was associated with lympho-vascular space invasion ($p = .044$), and EZH2 mRNA expression was associated with age ($p = .037$). However, these studies did not include specific cohorts of carcinosarcoma.

The pathogenesis of UCS is still debated. Authors largely agree that EMT seems to play role in its development [3, 5, 6, 73–75]. The EZH2-PRC2 complex regulates several target genes. EZH2 can directly bind to important tumor oncogenes and initiate signaling pathways for EMT events. Furthermore,

EZH2 can induce EMT. Ding et al. demonstrated that the EZH2 inhibitor GSK343 suppresses the progression of cervical cancer cells by inhibiting EMT. Their data also established that treatment with GSK343 leads to a suppression of EMT in xenograft tumours in nude mice. The observed EZH2–EMT-associated phenotypes and their underlying mechanisms have important implications for cervical cancer development and severity, which suggests that targeting this pathway through specific inhibitors would result in general epigenetic reprogramming [55]. Our data support the possible role of EZH2 in the pathogenesis of UCS along with the EMT theory.

The carcinomatous and sarcomatous components showed 85% concordance of p53 protein overexpression and 96% concordance of TP53 gene mutation, which points to a monoclonal origin of both components. P16 overexpression occurs in about 60% of UCS simultaneously with TP53 mutations. The concordance of p16 expression between the carcinomatous and sarcomatous components was approximately 85% in different series [39, 76].

P53 IHC is widely used as a surrogate for TP53 mutation testing in diagnostic gynecologic pathology [77]. P53 IHC is a reliable diagnostic adjunct for histotyping and molecular subtyping of endometrial carcinomas [48, 66, 78]. Another use of p53 IHC is triaging gynecological sarcomas for molecular testing based on the assumption that TP53-mutated gynecological sarcomas do not harbor cancer driving translocations [77]. Kunc et al. have observed high frequency of aberrant p53 IHC expression in extrauterine carcinosarcoma and high concordance between the carcinomatous and sarcomatous components [79]. Liu et al. reported p53 overexpression in 63% of UCS, with 47% and 77% overexpression in the homologous and heterologous tumors, respectively [80]. It has been recently noted that 46% of the epithelial and 53% of the mesenchymal components showed overexpression of p53, displaying a strong similarity of these tumor components [81]. In general, p53 diffuse positive cases indicate possible nonsynonymous missense mutations. In contrast, stopgain, indel or splicing mutations seem to result p53 null positive phenotype [82–84].

We observed a high frequency of aberrant p53 IHC expression in UCS with a fair concordance (82.14%, Cohen's $k = 0.34$) between the epithelial and mesenchymal components that is in line with previous reports [79–81, 85].

Cherniack et al. identified multiple somatic mutations and copy number alterations in UCSs that offer expanded therapeutic options including potential use of PARP, EZH2, cell cycle and PI3K pathway inhibitor [7]. Jones et al. in their study performed a complete exome analysis of 22 UCS and verified genetic alterations in chromatin remodelling genes. Overall, they identified 777 somatic mutations in 702 genes. Mutations in EZH2 were observed in 12% of the mutant tags [86].

The most frequently mutated genes in carcinosarcomas are TP53, PTEN, PIK3CA, RB1, PPP2R1A, FBXW7, KRAS and

ARID1A [7]. In TCGA, over 90% of carcinosarcomas harbor a TP53 mutation [7]. Some carcinosarcomas share mutational profiles with the endometrioid lineage, e.g., PTEN mutation, indicating that, like serous carcinoma, an alternative route of carcinogenesis is via a low-grade endometrioid carcinoma and its precursors [87]. A comprehensive analysis of the genomic and proteomic profiles of 57 UCSs has unveiled disruptions in canonical pathways, notably the PI3K pathway. More than 75% of cases demonstrated mutations in FBXW7, loss of RB1, or amplification of CCNE1, suggesting dysregulation in cell cycle control [7].

Mutations in TP53 are frequently observed across various tumors, underscoring the pivotal involvement of the FBXW7, p53, and PI3K pathways in UCS. Among these pathways, FBXW7 stands out as a crucial driver in the development of this particular cancer [88]. Conclusive genetic evidence obtained through lineage tracing studies indicates that UCS originates from endometrial epithelial cells undergoing an epithelial-mesenchymal transition. This transition gives rise to a highly invasive phenotype, with FBXW7 identified as the specific driver in this process [89]. In accordance with the conversion theory, UCS are believed to originate in a monoclonal fashion, with carcinomatous subclones having the potential for metaplastic differentiation and subsequent transformation into sarcomatous cells [7]. Support for this theory stems from the concurrent expression of cytokeratins and epithelial membrane antigens in both carcinomatous and sarcomatous cells. Additionally, there is consistency in TP53 and KRAS mutations, identical patterns of X chromosome inactivation, and comparable loss of heterozygosity observed between the carcinomatous and sarcomatous components [7].

The main limitation of our study is that detailed molecular pathological exploration of EZH2, p53 and p16 and their interactions were not performed, which may be the focus of future research. In addition, statistical power may be impacted by the low case number, however, this is largely explained by the rarity of UCS. The applied cutoff values for defining EZH2 and p16 as low or high expressing are somewhat arbitrary and may affect case distributions. However, to date no standardized scoring has been adopted for these markers. So, instead of adjusting cutoff values for our study, we aimed to adhere to previous publications to achieve better reproducibility and comparability [24, 41–44]. Strengths of the study include that both components of UCS as well as their subtypes were analyzed.

In conclusion, EZH2, p16 and p53 seem to play a universal role in the pathogenesis of UCSs. However, a distinctive pattern of p53 expression appears to exist between the serous and endometrioid types of the epithelial component (aberrant vs. wild type) and also between the homologous and heterologous types of the mesenchymal component (diffuse nuclear aberrant vs. null aberrant). These pattern disparities may indicate unique genetical features and differentiation pathways warranting further molecular pathological studies.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusion of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The studies involving humans were approved by institutional ethical committee, University of Pécs (number of permission: KK/644-1/2020). The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The ethics committee/institutional review board waived the requirement of written informed consent for participation from the participants or the participants' legal guardians/next of kin because the study was a retrospective analysis on non-identifiable data.

Author contributions

EM played a major role in literary research, data collection and overview, interpreted the data, edited and revised the manuscript for intellectual content. NB played a major role in literary research, interpreted the data and revised the manuscript for intellectual content. AO played a major role in data analysis, interpreted the data, and revised the manuscript for intellectual content. KÉ played a major role in data analysis, interpreted the

data, and revised the manuscript for intellectual content. TT played a major role in the design and conception of the work, interpreted the data and revised the manuscript for intellectual content. AT played a major role in statistical data analysis, interpreted the data, edited and revised the manuscript for intellectual content. EK played a major role in conception of the work; analyzed the data, interpreted the data, edited and revised the manuscript for intellectual content. KK played a major role in conception of the work, analyzed the data, interpreted the data, edited and revised the manuscript for intellectual content. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the Immunopathology Laboratory, Department of Pathology, University of Pécs and for their technical assistance. The present scientific certification is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.

References

- Loda M, Mucci LA, Mittelstadt ML, Hemelrijck MV, Cotter MB. *Pathology and epidemiology of cancer*. Cham: Springer International Publishing (2016). doi:10.1007/978-3-319-35153-7
- Silverberg SG, Major FJ, Blessing JA, Fetter B, Askin FB, Liao SY, et al. Carcinosarcoma (malignant mixed mesodermal tumor) of the uterus: a gynecologic oncology group pathologic study of 203 cases. *Int J Gynecol Pathol* (1990) 9(1):1–19. doi:10.1097/00004347-199001000-00001
- Artioli G, Wabersich J, Ludwig K, Gardiman MP, Borgato L, Garbin F. Rare uterine cancer: carcinosarcomas: review from histology to treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* (2015) 94(1):98–104. doi:10.1016/j.critrevonc.2014.10.013
- Leskela S, Pérez-Mies B, Rosa-Rosa JM, Cristobal E, Biscuola M, Palacios-Berraquero ML, et al. Molecular basis of tumor heterogeneity in endometrial carcinosarcoma. *Cancers (Basel)* (2019) 11:964. doi:10.3390/cancers11070964
- Kernochan LE, Garcia RL. Carcinosarcomas (malignant mixed müllerian tumor) of the uterus: advances in elucidation of biologic and clinical characteristics. *J Natl Compr Cancer Netw* (2009) 7(5):550–6. doi:10.6004/jnccn.2009.0037
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* (2009) 119(6):1420–8. doi:10.1172/JCI39104
- Cherniack AD, Shen H, Walter V, Stewart C, Murray BA, Bowlby R, et al. Integrated molecular characterization of uterine carcinosarcoma. *Cancer Cell* (2017) 31(3):411–23. doi:10.1016/j.ccell.2017.02.010
- George E, Lillemoe TJ, Twigg LB, Perrone T. Malignant mixed müllerian tumor versus high-grade endometrial carcinoma and aggressive variants of endometrial carcinoma: a comparative analysis of survival. *Int J Gynecol Pathol* (1995) 14(1):39–44. doi:10.1097/00004347-199501000-00007
- Zhang C, Hu W, Jia N, Li Q, Hua K, Tao X, et al. Uterine carcinosarcoma and high-risk endometrial carcinomas: a clinicopathological comparison. *Int J Gynecol Cancer* (2015) 25(4):629–36. doi:10.1097/IGC.0000000000000350
- Hock H. A complex Polycomb issue: the two faces of EZH2 in cancer. *Genes Dev* (2012) 26(8):751–5. doi:10.1101/gad.191163.112
- Xie Z, Zhong C, Shen J, Jia Y, Duan S. LINC00963: a potential cancer diagnostic and therapeutic target. *Biomed Pharmacother* (2022) 150:113019. doi:10.1016/J.BIOPHA.2022.113019
- Sasaki M, Nakanuma Y. Cellular senescence in biliary pathology. Special emphasis on expression of a polycomb group protein EZH2 and a senescent marker p16INK4a in bile ductular tumors and lesions. *Histol Histopathol* (2015) 30(3):267–75. doi:10.14670/HH-30.267
- Said J. Biomarker discovery in urogenital cancer. *Biomarkers* (2005) 10(1):83–6. doi:10.1080/13547500500215050
- Pourakbar S, Pluard TJ, Aaccurso AD, Farassati F. Ezh2, a novel target in detection and therapy of breast cancer. *Onco Targets Ther* (2017) 10:2685–7. doi:10.2147/OTT.S138777
- Findeis-Hosey JJ, Huang J, Li F, Yang Q, McMahon LA, Xu H. High-grade neuroendocrine carcinomas of the lung highly express enhancer of zeste homolog 2, but carcinoids do not. *Hum Pathol* (2011) 42(6):867–72. doi:10.1016/j.humpath.2010.09.019
- Choi JH, Song YS, Yoon JS, Song KW, Lee YY. Enhancer of zeste homolog 2 expression is associated with tumor cell proliferation and metastasis in gastric cancer. *APMIS* (2010) 118(3):196–202. doi:10.1111/j.1600-0463.2009.02579.x
- Fluge O, Gravdal K, Carlsen E, Vonen B, Kjellevedt K, Refsum S, et al. Expression of EZH2 and Ki-67 in colorectal cancer and associations with treatment response and prognosis. *Br J Cancer* (2009) 101(8):1282–9. doi:10.1038/sj.bjc.6605333
- Toll AD, Dasgupta A, Potoczek M, Yeo CJ, Kleer CG, Brody JR, et al. Implications of enhancer of zeste homologue 2 expression in pancreatic ductal

- adenocarcinoma. *Hum Pathol* (2010) 41(9):1205–9. doi:10.1016/j.humpath.2010.03.004
19. Zhai R, Tang F, Gong J, Zhang J, Lei B, Li B, et al. The relationship between the expression of USP22, BMI1, and EZH2 in hepatocellular carcinoma and their impacts on prognosis. *Oncotargets Ther* (2016) 9:6987–98. doi:10.2147/OTT.S110985
20. Borbone E, Troncone G, Ferraro A, Jasencakova Z, Stojic L, Esposito F, et al. Enhancer of zeste homolog 2 overexpression has a role in the development of anaplastic thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* (2011) 96(4):1029–38. doi:10.1210/jc.2010-1784
21. Aziza EA, Shimaa AA, Ragab AA. Prognostic value of twist-1, E-cadherin and EZH2 in prostate cancer: an immunohistochemical study. *Turk Patoloji Derg* (2017) 1:198–210. doi:10.5146/tjpath.2016.01392
22. Raman JD, Mongan NP, Tickoo SK, Boorjian SA, Scherr DS, Gudas LJ. Increased expression of the polycomb group gene, EZH2, in transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* (2005) 11(24):8570–6. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1047
23. Jin M, Yang Z, Ye W, Yu X, Hua X. Prognostic significance of histone methyltransferase enhancer of zeste homolog 2 in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* (2015) 10(2):857–62. doi:10.3892/ol.2015.3319
24. Makk E, Bálint L, Cifra J, Tornóczky T, Oszter A, Tóth A, et al. Robust expression of EZH2 in endocervical neoplastic lesions. *Virchows Arch* (2019) 475(1):95–104. doi:10.1007/s00428-019-02550-8
25. Zhou J, Roh JW, Bandyopadhyay S, Chen Z, Munkarah AR, Hussein Y, et al. Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) and focal adhesion kinase (FAK) in high grade endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* (2013) 128(2):344–8. doi:10.1016/j.ygyno.2012.07.128
26. Krill L, Deng W, Eskander R, Mutch D, Zweizig S, Hoang B, et al. Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) in endometrial carcinoma: an NRG oncology/gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol* (2020) 156(2):423–9. doi:10.1016/j.ygyno.2019.12.003
27. Xu Y, Li X, Wang H, Xie P, Yan X, Bai Y, et al. Hypermethylation of CDH13, DKK3 and FOXL2 promoters and the expression of EZH2 in ovary granulosa cell tumors. *Mol Med Rep* (2016) 14(3):2739–45. doi:10.3892/mmr.2016.5521
28. Li H, Cai Q, Godwin AK, Zhang R. Enhancer of zeste homolog 2 promotes the proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer cells. *Mol Cancer Res* (2010) 8(12):1610–8. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0398
29. Ramaglia M, D'Angelo V, Iannotta A, Di Pinto D, Pota E, Affinita MC, et al. High EZH2 expression is correlated to metastatic disease in pediatric soft tissue sarcomas. *Cancer Cell Int* (2016) 16(1):59. doi:10.1186/S12935-016-0338-X
30. Adesso L, Leoncini PP, Dall'agnese A, Walters ZS, Verginelli F, Boldrini R, et al. The Polycomb group (PcG) protein EZH2 supports the survival of PAX3-FOXO1 alveolar rhabdomyosarcoma by repressing FBXO32 (Atrogin1/MAFbx). *Oncogene* (2014) 33:4173–84. doi:10.1038/ncr.2013.471
31. Zhang N, Zeng Z, Li S, Wang F, Huang P. High expression of EZH2 as a marker for the differential diagnosis of malignant and benign myogenic tumors. *Sci Rep* (2018) 8:12331. doi:10.1038/s41598-018-30648-7
32. Shen JK, Cote GM, Gao Y, Choy E, Mankin HJ, Hornicek FJ, et al. Targeting EZH2-mediated methylation of H3K27 inhibits proliferation and migration of Synovial Sarcoma *in vitro*. *Sci Rep* (2016) 6:25239. doi:10.1038/srep25239
33. Sun R, Shen J, Gao Y, Zhou Y, Yu Z, Hornicek F, et al. Overexpression of EZH2 is associated with the poor prognosis in osteosarcoma and function analysis indicates a therapeutic potential. *Oncotarget* (2016) 7(25):38333–46. doi:10.18632/oncotarget.9518
34. Girard N, Bazille C, Lhuissier E, Benateau H, Llombart-Bosch A, Boumediene K, et al. 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, induces apoptosis and reduces cell migration in chondrosarcoma cells. *PLoS One* (2014) 9(5):e98176. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0098176
35. Cao Q, Yu J, Dhanasekaran SM, Kim JH, Mani RS, Tomlins SA, et al. Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene* (2008) 27(58):7274–84. doi:10.1038/ncr.2008.333
36. Ihira K, Dong P, Xiong Y, Watari H, Konno Y, Hanley SJB, et al. EZH2 inhibition suppresses endometrial cancer progression via miR-361/Twist axis. *Oncotarget* (2017) 8(8):13509–20. doi:10.18632/oncotarget.14586
37. Ang PP, Tan GC, Karim N, Wong YP. Diagnostic value of the EZH2 immunomarker in malignant effusion cytology. *Acta Cytol* (2020) 64(3):248–55. doi:10.1159/000501406
38. Huvila J, Pors J, Thompson EF, Gilks CB. Endometrial carcinoma: molecular subtypes, precursors and the role of pathology in early diagnosis. *J Pathol* (2021) 253(4):355–65. doi:10.1002/PATH.5608
39. Buza N, Tavassoli FA. Comparative analysis of P16 and P53 expression in uterine malignant mixed müllerian tumors. *Int J Gynecol Pathol* (2009) 28(6):514–21. doi:10.1097/PGP.0b013e3181a934e9
40. WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Female genital tumours*. 5th ed. International Agency for Research on Cancer (2020). Volume 4. Available at: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Female-Genital-Tumours-2020>.
41. Bosari S, Lee AKC, Viale G, Heatley GJ, Coggi G. Abnormal p53 immunoreactivity and prognosis in node-negative breast carcinomas with long-term follow-up. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* (1992) 421(4):291–5. doi:10.1007/BF01660975
42. Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA, et al. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol* (2006) 24:268–73. doi:10.1200/JCO.2005.01.5180
43. Wagener N, Macher-Goeppinger S, Pritsch M, Hüsing J, Hoppe-Seyler K, Schirmacher P, et al. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression is an independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *BMC Cancer* (2010) 10(1):524. doi:10.1186/1471-2407-10-524
44. Sasaki M, Matsubara T, Kakuda Y, Sato Y, Nakanuma Y. Immunostaining for polycomb group protein EZH2 and senescent marker p16INK4a may be useful to differentiate cholangiolocellular carcinoma from ductular reaction and bile duct adenoma. *Am J Surg Pathol* (2014) 38(3):364–9. doi:10.1097/PAS.0000000000000125
45. Salvesen HB, Iversen OE, Akslen LA. Prognostic significance of angiogenesis and ki-67, p53, and p21 expression: a population-based endometrial carcinoma study. *J Clin Oncol* (1999) 17(5):1382–90. doi:10.1200/JCO.1999.17.5.1382
46. Chen X, Arend R, Hamele-Bena D, Tergas AI, Hawver M, Tong GX, et al. Uterine carcinosarcomas: clinical, histopathologic and immunohistochemical characteristics. *Int J Gynecol Pathol* (2017) 36(5):412–9. doi:10.1097/PGP.0000000000000346
47. Köbel M, Ronnett BM, Singh N, Soslow RA, Gilks CB, McCluggage WG. Interpretation of P53 immunohistochemistry in endometrial carcinomas: toward increased reproducibility. *Int J Gynecol Pathol* (2019) 38(1):S123–S131. doi:10.1097/PGP.0000000000000488
48. Rabban JT, Garg K, Ladwig NR, Zaludek CJ, Devine WP. Cytoplasmic pattern p53 immunoreactivity in pelvic and endometrial carcinomas with TP53 mutation involving nuclear localization domains: an uncommon but potential diagnostic pitfall with clinical implications. *Am J Surg Pathol* (2021) 45(11):1441–51. doi:10.1097/PAS.0000000000001713
49. Schoonjans F, Zalata A, Depuydt CE, Comhaire FH. MedCalc: a new computer program for medical statistics. *Comput Methods Programs Biomed* (1995) 48(3):257–62. doi:10.1016/0169-2607(95)01703-8
50. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* (1960) 20(1):37–46. doi:10.1177/001316446002000104
51. Engelsens IB, Stefansson I, Akslen LA, Salvesen HB. Pathologic expression of p53 or p16 in preoperative curettage specimens indicates high-risk endometrial carcinomas. *Am J Obstet Gynecol* (2006) 195(4):979–86. doi:10.1016/j.ajog.2006.02.045
52. Priya A, Chaurasia JK, P K, Panwar H, Yadav SK, Kapoor N. Evaluation of immunohistochemical expression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) and its association with clinicopathological variables in carcinoma cervix. *Cureus* (2023) 15(3):e36946. doi:10.7759/CUREUS.36946
53. Oki S, Sone K, Oda K, Hamamoto R, Ikemura M, Maeda D, et al. Oncogenic histone methyltransferase EZH2: a novel prognostic marker with therapeutic potential in endometrial cancer. *Oncotarget* (2017) 8:40402–11. doi:10.18632/oncotarget.16316
54. Rao ZY, Cai MY, Yang GF, He LR, Mai SJ, Hua WF, et al. EZH2 supports ovarian carcinoma cell invasion and/or metastasis via regulation of TGF-beta1 and is a predictor of outcome in ovarian carcinoma patients. *Carcinogenesis* (2010) 31(9):1576–83. doi:10.1093/carcin/bqg150
55. Ding M, Zhang H, Li Z, Wang C, Chen J, Shi L, et al. The polycomb group protein enhancer of zeste 2 is a novel therapeutic target for cervical cancer. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2015) 42(5):458–64. doi:10.1111/1440-1681.12382
56. Bitler BG, Aird KM, Garipov A, Li H, Amatangelo M, Kossenkov AV, et al. Synthetic lethality by targeting EZH2 methyltransferase activity in ARID1A-mutated cancers. *Nat Med* (2015) 21(3):231–8. doi:10.1038/NM.3799
57. Roh JW, Eun Choi J, Dong Han H, Hu W, Matsuo K, Nishimura M, et al. Clinical and biological significance of EZH2 expression in endometrial cancer. *Cancer Biol Ther* (2019) 21:147–56. doi:10.1080/15384047.2019.1672455
58. Shi L, Zhang Q, Zhu S, Tang Q, Chen X, Lan R, et al. Pharmacological inhibition of EZH2 using a covalent inhibitor suppresses human ovarian cancer cell migration and invasion. *Mol Cell Biochem* (2023). doi:10.1007/S11010-023-04767-3

59. Abargel A, Avinoach I, Kravtsov V, Boaz M, Glezerman M, Menczer J. Expression of p27 and p53: comparative analysis of uterine carcinosarcoma and endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* (2004) 14(2):354–9. doi:10.1111/j.1048-891x.2004.014221.x
60. Menczer J, Kravtsov V, Levy T, Berger E, Glezerman M, Avinoach I. Expression of c-kit in uterine carcinosarcoma. *Gynecol Oncol* (2005) 96(1):210–5. doi:10.1016/j.ygyno.2004.09.045
61. Menczer J, Schreiber L, Sukmanov O, Kravtsov V, Berger E, Golan A, et al. COX-2 expression in uterine carcinosarcoma. *Acta Obstet Gynecol Scand* (2010) 89(1):120–5. doi:10.103109/00016340903342006
62. Livasy CA, Reading FC, Moore DT, Boggess JF, Lininger RA. EGFR expression and HER2/neu overexpression/amplification in endometrial carcinosarcoma. *Gynecol Oncol* (2006) 100(1):101–6. doi:10.1016/j.ygyno.2005.07.124
63. Saglam O, Husain S, Toruner G. AKT, EGFR, C-ErbB-2, and C-kit expression in uterine carcinosarcoma. *Int J Gynecol Pathol* (2013) 32(5):493–500. doi:10.1097/PGP.0b013e31827fedef
64. Rottmann D, Snir OL, Wu X, Wong S, Hui P, Santin AD, et al. HER2 testing of gynecologic carcinosarcomas: tumor stratification for potential targeted therapy. *Mod Pathol* (2020) 33(1):118–27. doi:10.1038/S41379-019-0358-x
65. Jenkins TM, Cantrell LA, Stoler MH, Mills AM. HER2 overexpression and amplification in uterine carcinosarcomas with serous morphology. *Am J Surg Pathol* (2022) 46(4):435–42. doi:10.1097/PAS.0000000000001870
66. Murali R, Davidson B, Fadare O, Carlson JA, Crum CP, Gilks CB, et al. High-grade endometrial carcinomas: morphologic and immunohistochemical features, diagnostic challenges and recommendations. *Int J Gynecol Pathol* (2019) 38(1):S40–S63. doi:10.1097/PGP.0000000000000491
67. Yemelyanova A, Ji H, Shih IM, Wang TL, Wu LSF, Ronnett BM. Utility of p16 expression for distinction of uterine serous carcinomas from endometrial endometrioid and endocervical adenocarcinomas: immunohistochemical analysis of 201 cases. *Am J Surg Pathol* (2009) 33(10):1504–14. doi:10.1097/PAS.0B013E3181AC35F5
68. Gilks CB, Oliva E, Soslow RA. Poor interobserver reproducibility in the diagnosis of high-grade endometrial carcinoma. *Am J Surg Pathol* (2013) 37(6):874–81. doi:10.1097/PAS.0B013E31827F576A
69. Garg K, Leitao MM, Wynveen CA, Sica GL, Shia J, Shi W, et al. p53 overexpression in morphologically ambiguous endometrial carcinomas correlates with adverse clinical outcomes. *Mod Pathol* (2010) 23(1):80–92. doi:10.1038/MODPATHOL.2009.153
70. Tashiro H, Isacson C, Levine R, Kurman RJ, Cho KR, Hedrick L. p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am J Pathol* (1997) 150(1):177–85. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1858541/> (Accessed July 27, 2023).
71. Soslow RA, Shen PUF, Chung MH, Isacson C. Distinctive p53 and mdm2 immunohistochemical expression profiles suggest different pathogenetic pathways in poorly differentiated endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* (1998) 17(2):129–34. doi:10.1097/00004347-199804000-00006
72. Gu Y, Zhang J, Guan H. Expression of EZH2 in endometrial carcinoma and its effects on proliferation and invasion of endometrial carcinoma cells. *Oncol Lett* (2017) 14(6):7191–6. doi:10.3892/ol.2017.7171
73. Castilla MÁ, Moreno-Bueno G, Romero-Pérez L, Van De Vijver K, Biscuola M, López-García MÁ, et al. Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinosarcoma. *J Pathol* (2011) 223(1):72–80. doi:10.1002/PATH.2802
74. Chiyoda T, Tsuda H, Tanaka H, Kataoka F, Nomura H, Nishimura S, et al. Expression profiles of carcinosarcoma of the uterine corpus—are these similar to carcinoma or sarcoma? *Genes, Chromosom Cancer* (2012) 51(3):229–39. doi:10.1002/GCC.20947
75. McCluggage WG. Uterine carcinosarcomas (malignant mixed Mullerian tumors) are metaplastic carcinomas. *Int J Gynecol Cancer* (2002) 12(6):687–90. doi:10.1046/j.1525-1438.2002.01151.x
76. Kanthan R, Senger JLB, Diudea D. Malignant mixed Mullerian tumors of the uterus: histopathological evaluation of cell cycle and apoptotic regulatory proteins. *World J Surg Oncol* (2010) 8:60. doi:10.1186/1477-7819-8-60
77. Köbel M, Kang EY. The many uses of p53 immunohistochemistry in gynecological pathology: proceedings of the ISGyP companion society session at the 2020 USCAP annual meeting. *Int J Gynecol Pathol* (2021) 40(1):32–40. doi:10.1097/PGP.0000000000000725
78. Rabban JT, Blake Gilks C, Malpica A, Matias-Guiu X, Mittal K, Mutter GL, et al. Issues in the differential diagnosis of uterine low-grade endometrioid carcinoma, including mixed endometrioid carcinomas: recommendations from the international society of gynecological pathologists. *Int J Gynecol Pathol* (2019) 38(1):S25–S39. doi:10.1097/PGP.0000000000000512
79. Kunc M, Gabrych A, Rekawiecki B, Gorczyński A, Haybaeck J, Biernat W, et al. Immunohistochemical evaluation of mismatch repair proteins and p53 expression in extrauterine carcinosarcoma/sarcomatoid carcinoma. *Wspolczesna Onkol* (2020) 24(1):1–4. doi:10.5114/WO.2020.94718
80. Liu FS, Kohler MF, Marks JR, Bast RC, Jr, Boyd J, Berchuck A. Mutation and overexpression of the P53 tumor suppressor gene frequently occurs in uterine and ovarian sarcomas. *Obstet Gynecol* (1994) 83(1):118–24.
81. De Jong RA, Nijman HW, Wijnbrandi TF, Reyners AK, Boezen HM, Hollema H. Molecular markers and clinical behavior of uterine carcinosarcomas: focus on the epithelial tumor component. *Mod Pathol* (2011) 24(10):1368–79. doi:10.1038/MODPATHOL.2011.88
82. Köbel M, Piskorz AM, Lee S, Lui S, LePage C, Marass F, et al. Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of TP53 mutation in ovarian carcinoma. *J Pathol Clin Res* (2016) 2(4):247–58. doi:10.1002/CJP2.53
83. da Costa LT, Dos Anjos LG, Kagohara LT, Torrezan GT, De Paula CAA, Baracat EC, et al. The mutational repertoire of uterine sarcomas and carcinosarcomas in a Brazilian cohort: a preliminary study. *Clinics* (2021) 76:e2324–15. doi:10.6061/CLINICS/2021/E2324
84. Zhao S, Bellone S, Lopez S, Thakral D, Schwab C, English DP, et al. Mutational landscape of uterine and ovarian carcinosarcomas implicates histone genes in epithelial-mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2016) 113(43):12238–43. doi:10.1073/pnas.1614120113
85. Taylor NP, Zigelboim I, Huettner PC, Powell MA, Gibb RK, Rader JS, et al. DNA mismatch repair and TP53 defects are early events in uterine carcinosarcoma tumorigenesis. *Mod Pathol* (2006) 19:1333–8. doi:10.1038/modpathol.3800654
86. Jones S, Stransky N, McCord CL, Cerami E, Lagowski J, Kelly D, et al. Genomic analyses of gynaecologic carcinosarcomas reveal frequent mutations in chromatin remodelling genes. *Nat Commun* (2014) 5:5006. doi:10.1038/NCOMMS6006
87. McConechy MK, Ding J, Cheang MCU, Wiegand K, Senz J, Tone A, et al. Use of mutation profiles to refine the classification of endometrial carcinomas. *J Pathol* (2012) 228(1):20–30. doi:10.1002/PATH.4056
88. Di Fiore R, Suleiman S, Drago-Ferrante R, Subbannayya Y, Vasileva-Slaveva M, Yordanov A, et al. The role of FBXW7 in gynecologic malignancies. *Cells* (2023) 12(10):1415. doi:10.3390/cells12101415
89. Cuevas IC, Sahoo SS, Kumar A, Zhang H, Westcott J, Aguilar M, et al. Fbxw7 is a driver of uterine carcinosarcoma by promoting epithelial-mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2019) 116(51):25880–90. doi:10.1073/pnas.1911310116