

EZH2 expresszió vizsgálata nőgyógyászati szövettani mintákon

Doktori (PhD) – értekezés Tézisei

Dr. Makk Evelin

Témavezető: Dr. Kovács Krisztina

Programvezető: Prof. Dr. Miseta Attila

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos



Pécsi Tudományegyetem

OGYDHT Pécs

2024

Rövidítések jegyzéke

AIS	Adenocarcinoma <i>in situ</i>
CI	Confidence interval / konfidencia intervallum
CIN	Cervicalis intraepithelialis neoplasia
ECA	Endocervicalis adenocarcinoma
EMC	Endometrium carcinoma
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
EMT	Epithelialis-mesenchymalis transitio / epithelialis-mesenchymalis átmenet
H&E	Hematoxilin-eozin
HPVA	Humán papillomavírus-asszociált adenocarcinoma
HSIL	High grade squamous intraepithelial lesion / magas fokú squamosus intraepithelialis lézió
IECC	International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification / Nemzetközi Endocervicalis Adenocarcinoma Kritérium és Osztályozási rendszer
ISGyP	International Society for Gynecological Pathologists / Nőgyógyászati Patológusok Nemzetközi Társasága
(i-)SMILE/ISMC	(Invasive) stratified mucin-producing carcinoma / (invazív) rétegzett mucin termelő adenoarcinoma
LSIL	Low grade squamous intraepithelial lesion / alacsony fokú squamosus intraepithelialis lézió
NHPVA/HPVI	Non-HPV-associated/HPV independent adenocarcinoma / humán papillomavírustól független adenocarcinoma
NOS	Not otherwise specified / másként nem meghatározható
p53abn	Abnormális p53 immunfestődés / TP53 mutáció
Rb	Retinoblastoma
RMS	Rhabdomyosarcoma
TCGA	The Cancer Genome Atlas / Rákgenom Atlasz
UCS	Uterine carcinosarcoma / méhtest carcinosarcoma
WHO	World Health Organization / Egészségügyi Világszervezet

I. BEVEZETÉS

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 kórjósllattal.

Az endocervicalis adenocarcinoma (ECA) előfordulása a laphámcarcinomához képest ritkább (20-25%), klinikailag azonban rosszabb kórjósllattal, szövettanilag nagyobb heterogenitással jellemezhető. A legtöbb invazív endocervicalis mirigyarák HPV asszociált (HPVA ECA). A magas onkogén kockázatú HPV fertőzéshez társuló laphámrákokkal szemben a mirigyhámrákok egy jelentős százalékanak (10-15%) kialakulásában azonban a HPV, mint kóroki tényező nem játszik szerepet, így ezen daganatcsoport kiemelkedő klinikai jelentőséggel bír. Ez utóbbiak rosszabb prognózisúak a HPVA adenocarcinomákhoz képest.

Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, 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. A WHO nagymértékben elfogadta a 2018-as Nemzetközi Endocervicalis Adenocarcinoma Kritérium és Osztályozási rendszert (International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification, IECC). A HPVA ECA-kat a tumorsejtek cytoplasmájában azonosítható nyák mennyisége szerint tovább osztályozták. Megkülönböztetünk szokványos típusú - beleértve a villoglandularis és a micropapillaris variánst -, valamint mucinosus típusú - ezen belül a másként nem meghatározható (not otherwise specified, NOS), az intestinalis (kehelysejtes), a pecsétgyűrűsejtes és az invazív rétegzett mucintermelő carcinoma (invasive stratified mucin-producing carcinoma, i-SMILE/ISMC) variánst - ECA-t. A WHO 2020 új entitásai az adenosquamosus, a mucoepidermoid és az adenoid basalsejtes carcinoma. Az NHPVA csoportba tartoznak a gyomor típusú, világossejtes, mesonephricus és az endometroid ECA-k. Az invazív adenocarcinoma NOS azon nagyon ritka rosszindulatú daganatokra alkalmazott kategória, melyek morfológiailag egyik csoportba sem sorolhatók.

A méhnyálkahártyarák az invazív nőgyógyászati rosszindulatú daganatok leggyakoribb formája. 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. E kétfázisú daganat rosszindulatú epithelialis (carcinoma) és rosszindulatú homológ vagy heterológ mesenchymalis (sarcoma) komponensből áll. A malignus hámkomponens általában magas fokú carcinoma, leggyakrabban serosus carcinoma, ezt követően lehetnek endometrioid, világossejtes, differenciálatlan és kevert histotípusok 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. 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. A Rákgenom Atlasz (The Cancer Genome Atlas, TCGA) adatbázisa alapján az UCS-k több mint 90%-a TP53 mutációt tartalmaz, mellyel magyarázható agresszív klinikai viselkedésük.

Hisztomorfológiai sokszínűségük miatt az egyes nőgyógyászati tumorokon belül - valamint a fent említett daganatok esetén is - átfedő morfológiával találkozhatunk, melyek a mindennapi patológiai gyakorlatban diagnosztikai kihívásokat jelentenek a pontos diagnózis felállításának során.

Az EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) gén az egyik legtöbbször vizsgált hiszton-metiltranszferáz, a polycomb fehérjecsoport tagja, mely 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 mirigyhámrákra, illetve az endometrium daganatai közül carcinosarcomára vonatkozóan irodalmi adatokat nem találtunk.

II. CÉLKITŰZÉS

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 histotípusainak diagnózisában és histogenezisében.

III. ANYAG ÉS MÓDSZEREK

III.1. Betegek és vizsgálati minták

Döntően a Pécsi Tudományegyetem Patológiai Intézetének és részben a Tolna Megyei Balassa János Kórház (Szekszárd) Patológiai Osztályának archívumából kiválasztott szövetminták 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 hematoxin-eozin (H&E) festett metszetei minden esetben rendelkezésre álltak. Ezen tárgylemezeket újraértékeltek, hogy kiválaszthassuk a legmegfelelőbb – a carcinosarcomákat illetően mind az epithelialis, mind a mesenchymalis komponensek 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. 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 tárgylemezekon 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 „+++”.

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. A korábbi tanulmányokhoz hasonlóan a festődési indexet a festődés százalékos arányának és intenzitásának szorzataként számítottuk ki egy nullától kilencig terjedő skálán. Ez alapján a daganatokat *fokozottan expresszáló* (festődési index > 4) vs. *alacsonyán expresszáló* (festődési index ≤ 4) kategóriába soroltuk. Más tanulmányokhoz hasonlóan mindkét marker esetében csak a magban mutatkozó barna színreakciót tekintettük pozitívnak. A p16 cytoplasmaticus festődését figyelmen kívül hagytuk.

A p53 immunreaktivitást a Nőgyógyászati Patológusok Nemzetközi Társaságának (International Society for Gynecological Pathologists, ISGyP) ajánlásai 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).

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) 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).

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. Statisztikailag szignifikánsnak a 0,05-nél kisebb „p” értéket tekintettük.

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. 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.

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).

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 pozitívitas megfigyelhető. Az immunhisztokémiai elemzés mind a 34 esetben negatív/fokálisan pozitív *overall score*-t eredményezett.

Összesen 32 nem daganatos endocervicalis léziót (15 reaktív atípiá, 9 microglandularis hyperplasia, 3 tuboendometrioid metaplasia, 3 *tunnel cluster*, 2 endometriosis) elemeztünk. 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). Az összesített értékelés minden egyes mintában *negatív/fokálisan pozitív* eredményt adott.

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 sebési - 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%) differenciálatlan 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 RMS fordult elő. A leggyakoribb homológ komponens az endometrialis stromalis sarcoma volt (n = 14), ezt követte 3 leiomyosarcoma, 3 nem differenciált sarcoma és 1 myxoid fibrosarcoma.

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 százalékanak 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 $p = 0,059$).

Mind a serosus, mind az endometrioid histotípusok mindkét markerrel szembetűnő 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).

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 indexre 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).

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 histotípusok 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 histotípusainak p53 festődési mintázatai között.

Mérsékelt p53 cytoplasmaticus festődést csupán fokálisan, 3/28 esetben 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.

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

VI. KÖVETKEZTETÉSEK / ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

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

- 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 mirigyos elváltozásokban (kétirányú teszt $p < 0,0001$). A normál szomszédos mirigyekben pedig egyik esetben sem (0/66) találtunk EZH2 pozitívítást. Olykor a téves pozitív festődést laphám metaplasia vagy rezervsejtes hyperplasia okozta.
- Mindemellett, a fokozott EZH2 expresszió kiváló diagnosztikai tesztképességgel 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 kiválónak bizonyult.
- Adataink alátámasztják, hogy az EZH2 szerepet játszhat a méhnyak mirigyhámdaganatok patogenezisében.
- 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.
- 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 sebészi széleiben megjelenő problémás endocervicalis léziókban a szövettani mintákban és nem utolsósorban valószínűleg a lézió sejteinek 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 histotípusok 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 histotípusai 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. Citológus 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 Pathológiai 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 háttérrel teremtett kutatómunkámhoz.