

A méhnyakrák és premalignus elváltozásai diagnosztikájának újabb módszerei

Doktori tézisek



Dr. Galamb Ádám

Semmelweis Egyetem

Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika

Témavezető: Dr. Sobel Gábor, PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Szánthó András, PhD, egyetemi docens

Dr. Novák Zoltán PhD, osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina, PhD, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Nagy Gyula Richárd, PhD, egyetemi adjunktus

Dr. Vajda Katalin, PhD, főorvos

Budapest

2020

1. Bevezetés

A méhnyakrák a Globocan 2018-es adatai szerint mind előfordulásban, mind halálozásban a 4. helyen áll a nők daganatos megbetegedései között. Bár a halálozás a fejlett országokban az utóbbi években csökkent, az előfordulás emelkedik, főleg a kevésbé fejlett országokban. A méhnyak citológiai módszerrel történő szűrésének elterjedése, a humán papilloma vírus (HPV), mint kórokozó szerepének a felismerése, valamint a HPV-ellenes populációs szintű vakcináció bevezetése a világ számos országában jelentős eredményekhez vezetett a méhnyakrák és rákelőtti (premalignus) elváltozások korai felismerésében. Ezért is volt jelentős, hogy a Semmelweis Egyetem II.Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján megalakult az Első Magyarországi HPV Központ, melynek munkájában magam is kezdettől résztvehettem (Galamb és mtsai 2011).

A HPV Központban nyert eredmények és megfigyelések azonban újabb kérdéseket, problémákat vetettek fel, elsősorban a korai diagnosztika területén, melyek a nőgyógyászt gyakran hozták nehéz döntési helyzetbe. A citológiai vizsgálatról bebizonyosodott, hogy bár specificitása magas, szenzitivitása alacsony. A HPV nagy kockázati típusainak (hrHPV) molekuláris patológiai módszerekkel történő kimutatása ezzel szemben fordított képet mutatott, magas érzékenységgű és alacsony fajlagosságú tesztként épült be a méhnyakrák kórismezésében. Mindezek alapján számos „kiegészítő” tesz bevezetésével próbálkoztak világszerte, melyek a fenti hiányosságokon javíthatnak (Benczik, Galamb és mtsai 2013). Ezek között is kiemelendő a közelmúltban széles körben ismertté vált CINTec[®], valamint CINTec[®]PLUS teszt, mely segíthet a citológiai kenetekben annak meghatározására, hogy a cervikális laphámelváltozások milyen fokozatáról, súlyosságáról van szó. Mindez alapvető a nőgyógyász és természetesen a beteg számára is annak eldöntésében, hogy milyen terápiát határoz meg a továbbiakban, azaz műtéti beavatkozásra kerül-e sor. Több munkacsoport kiegészítő tesztek kidolgozását tűzte ki célul, hogy segítse a kétséges esetek eldöntését és a legmegfelelőbb terápia alkalmazását. Magunk is ezen célt szem előtt tartva kezdtük munkánkat.

Témavezetőm, Dr.Sobel Gábor és munkatársai korábbi munkássága alapján bizonyítást nyert, hogy a sejtkapcsoló struktúrákat képező egyes fehérjék, elsősorban a claudin-1 (CLDN1) jelentősen felszaporodik méhnyakrákban és annak premalignus elváltozásaiban. Ennek alapján felvetődött, hogy hisztológiai, de kiemelten citológiai mintákban vizsgáljuk a különböző CLDN fehérjék kimutathatóságát, illetve fokozott megjelenését, mely segítheti a korai diagnózist és ennek alapján a megfelelő kezelési mód kiválasztását.

Az új megközelítés további lehetőségeit vizsgálva egyes epigenetikai eltérések felé is fordultunk. Ismertté vált, hogy az u.n. *mikroRNS*-ek (miR), ezen kis méretű, endogén, nem kódoló ribonukleinsav (RNS) molekulák expressziója megváltozik számos daganat kialakulása és progressziója során, valamint a HPV fertőzés hatására is (Galamb et al. 2015). Több szerv daganata esetében már sikerrel alkalmazták a miR expresszió változás detektálását mind szövetekből, mind a vérből származó mintákban. A miR expressziós profilok eltéréseit a normális és daganatos méhnyakhámban több tanulmányban is vizsgálták, azonban ezen munkák jelentős része nem vezetett egyértelmű következtetéshez, valamint a premalignus elváltozásokban bekövetkező eltéréseket kis arányban tanulmányozták.

A fentiek alapján határoztuk meg célkitűzéseinket, mely a méhnyakrák és rákelőtti (premalignus) elváltozások korai detektálására, a HPV fertőzéssel való összefüggésére irányult.

A vizsgálatokat kollaborációban végeztem munkatársaimmal (Dr.Benczik Márta és dr.Kocsis Adrienne, GenoID Molekuláris Diagnosztikai Laboratórium), akik a HPV meghatározásokat végezték és a Semmelweis Egyetem II.Sz. Patológiai Intézetével, ahol a citológiai, hisztológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok történtek.

2. Célkitűzések

2.1. Az első hazai HPV központban vizsgált hölgyek HPV fertőzöttsége, a HPV típusok eloszlásának meghatározása.

2.2. A „hagyományos” és folyadék alapú („liquid based cytology”, LBC) minták értékelési eredményeinek összehasonlítása.

2.3 A sejtkapcsoló fehérje claudin-1 (CLDN1) immuncitokémiai kimutatás diagnosztikus értékének vizsgálata párhuzamosan végzett folyadék alapú (LBC) és hagyományos citológiai módszerrel készített cervix keneteken és összehasonlítása a p16^{INK4a} detektálásával.

2.4. A CLDN1 fokozott expresszió diagnosztikus értékének növelése egyéb biomarkerek (Ki67 proliferációs marker) alkalmazásával cervix citológiai és hisztológiai (konizációs) mintákban, célul tűzve ki a módszer szenzitivitásának és specificitásának emelését.

2.5. A CLDN1/Ki67 kettős immunmódszer eredményeinek összehasonlítása a CINTec[®]PLUS teszt eredményeivel LBC módszerrel készített citológiai és konizáció útján nyert hisztológiai mintákon.

2.6. A miR-expresszió változásai premalignus cervix elváltozásokban, konizációs anyagban.

3. Betegek, anyag és módszer

A vizsgálatokat a TUKEB 148/2012 sz. etikai engedélye alapján, a KMR_12-1-2012-0032 sz. projekt, valamint OTKA PD105019 sz. pályázat (Dr.Sobel Gábor) támogatása segítségével végeztük.

Betegek: A citológiai és szöveti minták értékelését eltérő számú betegen vizsgáltuk az egyes tanulmányokban. Első lépésként a betegektől citológiai célra vett mintákat mind hagyományos, mind folyadék alapú citológiai (LBC) módszerrel feldolgoztunk, az utóbbi módszer értékének felmérésére, melyeken későbbiekben a további elemzéseket (immunkémiai reakciókat) végeztük. A hisztológiai mintákat konizáció útján nyertünk, melyre a klinikai indikáció alapján került sor.

HPV meghatározás: A HPV meghatározás az LBC-ra levett cervix mintákból történt CONFIDENCE HPVTM segítségével, a GenoID Molekuláris Diagnosztikai Laboratóriumban (Budapest), dr Benczik Márta és dr Kocsis Adrienn irányításával és a laboratórium értékelésével.

Citológiai és hisztológiai minták: Összesen 9847 mintán végeztük el a vizsgálatokat, mely nem azonos a betegszámmal, mivel több vizsgálatban párhuzamos immunreakciókat végeztünk. A pontos számok az egyes vizsgálatok során kerültek feltüntetésre. A mintákat a Semmelweis Egyetem II.Sz Patológiai Intézetébe szállítottuk további feldolgozásra, majd a GenoID Laboratóriumba HPV meghatározásra. A kenetek értékelése a Bethesda rendszer szerint történt citológus előszűrők és szakorvosok diagnózisa alapján. Az LBC cervicalis citológiai mintákat asszisztens készítette a ThinPrep[®] 2000 Processor, HologicTM Inc. eszköz segítségével, a cég leírása alapján. A konizátumok formalin fixálás, paraffinba ágyazás (FFPE) után kerültek patológiai értékelésre, illetve további vizsgálatokra. A hisztológiai mintákból lézer mikrodisszekcióval történt a megfelelő területek kinyerése mikroRNS vizsgálat céljára.

Immuncitokémia/immunhisztokémia: A CLDN1-ellenes antitesttel végzett immunreakcióhoz az antitestet 1:100x hígításban használtuk (részletes leírás a közleményekben) a Zymed (San Francisco, CA), valamint a Cell Marque (Roclin, CA) és a Dako (Glostrup, Denmark) cégektől beszerezve. A reakció kivitelezése a Ventana

ES automata immunfestő készülékkel (Ventana Medical System Inc., Tucson, AZ), a SE II.Sz. Patológiai Intézetében történt. A CINTec®PLUS reakciót a cég előírásai szerint végeztük (Hoffmann-La Roche, Basel), manuálisan, immunhisztológus asszisztens segítségével. A reakciók értékelése multidiszkussziós mikroszkóppal, citológus/patológus munkatársakkal együttműködve történt. Azon mintákat tekintettük pozitívnak, a cég leírása alapján, melyekben ugyanazon sejtből tudtuk kimutatni a citoplazmatikus és/vagy nukleáris barna színű p16^{INK4a} és a piros nukleáris Ki67 reakciót. Ugyanazon LBC mintákból készített párhuzamos lemezekon végeztük el a CLDN1/Ki67 reakciót, hasonló értékelési elv alapján.

mikroRNS meghatározás: A formalinban fixált paraffinba ágyazott (FFPE) mintákból végeztük a miR meghatározást TaqMan MicroRNA Assay (Life Tech Thermo Fischer Sci Inc) segítségével. A reverz transzkripció (RT) és kvantitatív PCR reakció megfelelő kittel, majd az amplifikáció Light Cycler 480 Instrument II (Roche Diagnostic) segítségével történt.

Statisztikai értékelés: A statisztikai elemzésben Szekerczés Tímea biomérnök PhD hallgató volt segítségemre, akivel több közleményben szereplünk társszerzőként. Az értékelésben két-irányú kontingencia analízist használtunk a Java Statistics (<http://statpages.org/ctab2x2.html>) alapján. A további elemzést a Yates-korrigált chi-square, Mantel-Haenszel chi-square, Fischer Exact Test szolgálta.

4. Eredmények

4.1. Az első magyar HPV Központ adatai alapján 1155 hölgy mintáját elemezve 2007-2011 között, a vizsgált népességben a leggyakoribbnak a **HPV16** bizonyult, **ezt követték a HPV51 és HPV31-es típusok** hazánkban.

4.2. A 687 folyadékalapú (LBC) és „hagyományos” párhuzamosan preparált citológiai mintát összehasonlítva, a Bethesda-rendszer szerinti értékelés eredményei között **nem volt lényeges különbség.**

4.3. Immuncitokémiai reakcióval 502 LBC mintán vizsgáltuk párhuzamosan a **CLDN1 fehérje és a p16^{INK4a} expresszióját.** A statisztikai elemzések szerint a CLDN1 immuncitokémia (IC-CLDN1), mely kimutatta a **fokozott CLDN1**

expressziót a premalignus (és malignus) sejteken, szenzitivitása kissé magasabb volt, mint a p16^{INK4a} immuncitokémia (IC-p16^{INK4a}) érzékenysége [77,3 % (68,7-84,6) vs. 69,3 % (60,9-76,3)]. Az IC-CLDN1 specificitása azonban alacsonyabb volt, mint az IC-16^{INK4a} értéke [60,9 % (53,5-67,2) vs. 80,5 % (73,2-86,5)]. Összevetve a három teszt (citológia, IC-CLDN1, IC-p16^{INK4a}) adatait, az IC-CLDN1 szenzitivitása volt a legmagasabb a három teszt között, minimálisan meghaladva a citológia érzékenységét, specificitása azonban elmaradt a citológia mögött. Az immuncitokémia eredményeit vizsgálva a CLDN1-reakció szenzitivitása meghaladta az p16^{INK4a}-reakció értékét (88,2 % vs 75,5 %), azonban specificitásában elmaradt mögötte (33,3 % vs 68,1 %).

4.4. Kettős immunreakciót dolgozunk ki, melyben a CLDN1 immunreakciót Ki67 proliferációs marker kimutatása követett (**CLDN1/Ki67**). Ezen teszt teljesítőképességét a kereskedelemben elérhető **CINtec[®]PLUS kettős immunreakcióval hasonlítottuk össze**. Az LBC-vel készített kenetek (2907) Bethesda-szerinti osztályozása a következő volt: HSIL 121, LSIL 339, ASC-US 51, normál 2380 eset és 16 értékelhetetlen mintának bizonyult. A CINtec[®]PLUS reakciót 1596 mintán tudtuk elvégezni, melyből 1386 adott értékelhető eredményt, a CLDN1/Ki67 reakciót 1358 esetben, melyből 1159 volt elfogadható. 1097 LBC minta esetében volt lehetséges párhuzamosan a két reakció összehasonlítása. 840 negatív és 163 pozitív minta esetében mindkét teszt egyezett, mely statisztikai egyezést is mutatott ($\kappa=0,724$, 95% CI 0,672-től 0,776-ig). A további elemzéssel a CLDN1/Ki67 reakció szenzitivitása HSIL esetében 76,00%, specificitása 85,67% volt, pozitív prediktív értéke 20,21%, negatív prediktív értéke 98,68%. A CINtec[®]PLUS reakció szenzitivitása HSIL-ban 74,00%, specificitása 81,38%, pozitív prediktív értéke 15,95%, negatív prediktív értéke 98,50% volt. A két reakció eredményeit összevetve ROC (Receiver Operating Characteristic) analízissel, nem mutatkozott szignifikáns különbség közöttük ($p=0,177$).

4.5. 63 konizáció útján nyert **hisztológiai mintán** (carcinoma in situ: 7, HSIL: 30, LSIL: 3, nincs dysplasia: 23) elvégeztük a CLDN1/Ki67 immunhisztokémiai és párhuzamosan a CINtec[®]PLUS reakciót. **Mindkét kettős immunreakció egyértelmű pozitívítást** mutatott az összes vizsgált premalignus és malignus esetben (CIS, HSIL, LSIL), míg az ezt nem mutató minták negatívnak bizonyultak.

4.6. A **mikroRNS (miR)** expresszió változásainak vizsgálata a cervix premalignus és malignus elváltozásaiban ellentmondásos adatokat szolgáltatott az

irodalomban. 22 mintapárt (kóros és környező, morfológiailag normál cervicalis hám) vizsgáltunk, melyeket lézer mikrodisszekcióval nyertünk. Eredményeink alapján a **miR-20b jelentősen fokozott expressziót** mutatott CIN2-3 (HSIL)-ban a környező, azonos betegekből származó normál hámhoz viszonyítva ($p < 0,0001$).

5 Következtetések

5.1. Adataink alapján a **HPV16 a leggyakoribb** a hazai hölgyek között, melyet a **HPV51**, majd **HPV31** követ.

5.2. A **folyadékalapú (LBC) és „hagyományos” citológiai** diagnosztikai **eredmények megegyeztek**. Az egy-sejt rétegű, több lemez előállítását lehetővé tevő LBC az értékelés szempontjából előnyösebb a vizsgálók számára, és további immunhisztokémiai/biomarker vizsgálatok elvégzését teszi lehetővé.

5.3. A **CLDN1 immuncitokémiai reakció alkalmazható a kóros premalignus és malignus cervicalis hámsejtek/tumorsejtek kimutatására**. A statisztikai értékelések alapján azonban a magas szenzitivitású CLDN1 reakció specificitása nem éri el a citológiai vizsgálatok fajlagosságát. Ennek alapján további biomarkerekkel való kombináció szükséges.

5.4. A Ki67 proliferációs marker alkalmazása a CLDN1 reakciót követően (CLDN1/Ki67 kettős immuncitokémiai és/vagy immunhisztokémiai reakció) mind szenzitivitásban, mind specificitásban hasonló eredményt adott a CINTec®PLUS reakcióval. Ez azt igazolja, hogy a **CLDN1/Ki67 kettős immunreakció megfelelő a transzformált cervicalis sejtek detektálására, hasonló szenzitivitású és specificitású, mint az összehasonlításként alkalmazott CINTec®PLUS teszt**. Ennek alapján a jövőben új molekuláris teszt fejleszthető a méhnyakrák diagnosztikájában.

5.5. A **mikroRNS** expresszió változásainak vizsgálata a cervix premalignus és malignus elváltozásaiban ellentmondásos az irodalomban. Jelen eredményeink alapján a **miR-20b expresszió jelentősen emelkedett** a premalignus és malignus méhnyakelváltozásokban és a jövőben esetlegesen biomarkerként használható.

6. Saját közlemények jegyzéke

Közlemények

1. **Galamb A**, Pajor A, Langmár Z, Sobel G: Az első magyarországi humán papillomavírus központ tapasztalatai (2007-2011). Orv Hetil 152: 1804-1807, 2011
2. Benczik M, **Galamb Á**, Zinner B, Mikó M, Ács N, Jeney Cs, Sobel G: Új molekuláris biológiai jelzők a méhnyakrák szűrésében. Nőgyógy Onkol 18: 63-67, 2013
3. **Galamb Á**, Benczik M, Zinner B, Vigh E, Baghy K, Jeney Cs, Kiss A, Lendvai G, Sobel G: Dysregulation of microRNA expression in human cervical preneoplastic and neoplastic lesions. Pathol Oncol Res 21: 503-508, 2015 *(megosztott első szerző)* IF: 1,940
4. Benczik M, **Galamb Á**, Koiss R, Kovács A, Járay B, Székely T, Szekerczés T, Schaff Zs, Sobel G, Jeney Cs: Claudin-1 as a biomarker of cervical cytology and histology. Pathol Oncol Res 22: 179-188, 2016 *(megosztott első szerző)* IF: 1,736
5. Szekerczés T, **Galamb Á**, Kocsis A, Benczik M, Takács T, Martonos A, Járay B, Kiss A, Jeney Cs, Nyíri M, Schaff Zs, Sobel G: Dual-stained cervical cytology and histology with Claudin-1 and Ki67. Pathol Oncol Res 25: 477-486, 2019 *(megosztott első szerző)* IF: 2,433
6. **Galamb Á.**, Szekerczés T., Benczik M., Schlachter K., Kocsis A., Kiss A., Schaff Zs., Jeney Cs., Lendvai G., Sobel G.: MicroRNA expression in high-grade cervical intraepithelial neoplasia Pathol Oncol Res (közlésre előkészítve, benyújtás 2020 február-március) IF: 2,433

Előadások

1. **Galamb Á**, Sobel G, Ács N: Új molekuláris biológiai módszerek és biológiai jelzők a méhnyakrák szűrésében. Fiatal Nőorvosok Jubileumi Kongresszusa, Mátraháza, október 10-12, 2014.
2. Sobel G, Vígh E, Benczik M, **Galamb Á**, Koiss R, Szekerczés T, Járay B, Schaff Zs, Ács N, Jeney Cs: A CINtec®Plus (Roche) teszttel szerzett tapasztalatok a cervicalis kenetek értékelésében. Magyar Méhnyakkórtani és Kolposzkópos Társaság IV. Kongresszusa. I. Interdiszciplináris HPV-kongresszus, Budapest, március 20-21, 2015.
4. Szekerczés T, Vígh E, Dóra R, Kocsmár É, Benczik M, **Galamb Á**, Koiss R, Kiss A, Lotz G, Járay B, Schaff Zs, Jeney Cs, Sobel G: A CINtec®Plus (Roche) teszttel szerzett tapasztalatok a cervicalis kenetek értékelésében. 72. Pathológus Kongresszus, Hajdúszoboszló, szeptember 24-26, 2015
5. Szekerczés T, Vígh E, Dóra R, Kocsmár É, Benczik M, **Galamb Á**, Koiss R, Kiss A, Lotz G, Járay B, Schaff Zs, Jeney Cs, Sobel G: Claudin-1 fehérjén alapuló, kettős jelölésű teszt kialakítása cervicalis mintákon. 72. Pathológus Kongresszus, Hajdúszoboszló, szeptember 24-26, 2015