

Prediktív és prognosztikus faktorok szolid tumorokban - a molekuláris képződés és a patológiai ismeretek szerepe a terápiás válasz mérésében és annak előrejelzése során

Doktori tézisek

Dr. Tőkés Tímea

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Dank Magdolna, Ph.D., habilitált egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Hadjiev Janaki Stanislavov, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Molvarec Attila, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Nyirády Péter, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Nikolényi Alíz, Ph.D., egyetemi tanársegéd
Dr. Czegle Ibolya, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest
2015

1. BEVEZETÉS

Napjainkban a primer szisztémás terápia (PST) kiemelkedő szerepet kap a szolid daganatok, különösen az emlődaganatok kezelésében. Az onkológiai ellátás során, így a PST alatt is nő igény a terápiás válasz monitorozásra, a kezelés hatékonyságának korai értékelésére. Jelenleg nem ismert olyan biomarker, mely önmagában magas szenzitivitással jelezné előre a kedvező tumorválaszt. Célunk, hogy meghatározzuk azt az emlődaganatos betegcsoportot, akik biztosan profitálnak a PST alkalmazásából, a beteg számára lehető legkisebb megterhelést jelentő vizsgálatok segítségével, a lehető legrövidebb idő alatt.

Prediktív markerek meghatározására az emlőpatológia és a képalkotás eszközeit használtuk fel. Az emlődaganatok korszerű patológiai diagnosztikája a tumorproliferáció meghatározására a Ki-67 index mellett (melynek megbízhatósága magas inter- és intraobszerver variabilitása miatt kérdéses) egyéb sejtciklus-markerek expressziójának mérésével is lehetőséget ad, így új biomarkerek keresésére alkalmas. Emellett egy újszerű módszer, a digitális patológia segítheti a patológusokat a mindennapi gyakorlatban, gyorsíthatja, egyszerűsítheti a diagnosztikát. A módszer validálása azonban, különösen a Ki-67 mellett alkalmazható egyéb sejtciklus markerek meghatározásában még nem megoldott.

A modern diagnosztikus képalkotás is lehetőséget nyújthat a PST hatékonyságát jelző biomarkerek keresésére. Az ^{18}F -fluoro-dezoxi-glükóz Pozitron Emissziós Tomográfia és Computer Tomográfia (FDG-PET/CT), mint hibrid képalkotó modalitás, a funkció és metabolizmus mellett az anatómiai lokalizációról is információt szolgáltat. A PET/CT a staging során igen jól teljesít, az emlődaganatok FDG-felvétele jó összefüggést mutat a klinikopatológiai tulajdonságokkal. Azonban nem tisztázott, hogy a daganatok kiindulási FDG-felvételenek pontos kvantifikálásának – melyre a dinamikus adatgyűjtés ad lehetőséget – van-e prediktív jelentősége a PST-re adott későbbi válasz szempontjából.

Kiemelendő, hogy emlődaganatokban a PET/CT-vel végzett terápiás válasz mérésére jelenleg nem áll rendelkezésre standard módon elfogadott válaszmérő kritériumrendszer. A jelenlegi ajánlások a szolid daganatok esetében a PERCIST (PET Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) rendszer alkalmazását szorgalmazzák, mely azonban nem veszi figyelembe az emlődaganatok specifikus tulajdonságait. Emellett a vizsgálat időzítése (korai válaszmérés vs. terápiát követő restaging) sem egyértelmű a PST során. Elmondható továbbá, hogy a PET/CT vizsgálat önmagában is informatív, de a patológiai lelet és a képalkotás eredménye együttesen várhatóan kifejezettebb prediktív értékkel rendelkezik a kapott tumorválasz tekintetében. Esettanulmányok formájában mutatjuk be a patológiai markerek és a képalkotás egymást kiegészítő, együttes értékét a stagingben és a terápiás válasz mérésében.

2. CÉLKITŰZÉS

Célunk volt olyan biomarkerek keresése, melyek alkalmasak a PST során a terápiás válasz predikciójára. A biomarkerek azonosítására a digitális patológia és az FDG-PET/CT képalkotás eszköztárát alkalmaztuk.

2.1. Tumorproliferáció, mint prediktív marker a PST során

- Összehasonlítottuk emlődaganatos betegeink immunhisztokémiai vizsgálatait esetén a digitális patológia és a rutin vizuális analízis módszereivel kapott eredményeket, hogy eldöntsük: a sejtciklus markereinek analízisére alkalmasak-e a digitális patológiai módszerek.

- A PST kezelés előtti core-biopsziák esetében a Ki-67 mellett értékeltük egyéb sejtciklus markerek [az MCM2 (a minichromosome maintenance protein komplex eleme), a Ciklin A illetve a phosphohistone-H3 (a továbbiakban PHH3)] expresszióját, hogy pontosítsuk a PST indikációját a kezelés várható hatékonyságának korai előrejelzésével

- Összefüggéseket kerestünk a vizsgált daganatok klinikopatológiai tulajdonságai és a core-biopsziás mintákban detektált, illetve a terápia ellenére fennmaradt reziduális daganatszövetben detektált sejtciklus marker expresszió között.

2.2. FDG-PET/CT hatékonysága a PST-re adott tumorválasz mérésében

- Összevetettük és értékeltük a PST-re adott tumorválasz (metabolikus és morfológiai) objektívizálására rendelkezésre álló értékelő rendszerek alkalmazhatóságát a PET/CT esetén

- Kialakítottunk két, a klinikai gyakorlatban könnyen és idő-takarékosan alkalmazható pontrendszert: egy egyszerűsített, PERCIST kritériumrendszert alapjaiban magába foglaló osztályozási rendszert, és egy kombinált, a PERCIST mellett a morfológiát módosított RECIST kritériumok szerint értékelő kritérium rendszert.

- Vizsgáltuk a PERCIST alapú és a kombinált értékelési pontrendszer alkalmazhatóságát a terápiás válasz predikciójában Her2 overexpressziót mutató betegek között standard és trastuzumabot is tartalmazó PST protokollok esetében is.

- Összehasonlítottuk a PERCIST alapú és a kombinált értékelési módszer hatékonyságát biológiai szubtípus szempontjából heterogén emlődaganatos betegcsoport esetében is.

2.3. Dinamikus FDG-PET/CT vizsgálatok és a korai tumorválasz értékelése

- Esettanulmány formájában mutatjuk be az ún. dinamikus PET/CT vizsgálatok alkalmazását a staging során az FDG-felvétel abszolút kvantifikálására. Vizsgáltuk a módszer gyakorlati kivitelezhetőségét és a kinetikai paramétereket, mint új prediktív biomarkereket.

- Esettanulmány formájában mutatjuk be a terápiaközi, ún. interim PET/CT alkalmazását a patológiai válasz előrejelzésében, és a terápiás döntést befolyásoló szerepét a PST során, amennyiben a daganatok klinikopatológiai tulajdonságai ellentmondásos képet mutatnak.

3. MÓDSZEREK

3.1. Tumorproliferáció, mint prediktív marker a PST során

3.1.1. Betegbeválasztás

Vizsgálatainkba a betegbeválasztás a Semmelweis Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinika Onkológiai Részlegén (2013 márciusa előtt: SE Radiológiai és Onkoterápiás Klinika Onkológiai Osztálya) PST-ben részesült emlődaganatos betegek adatainak retrospektív áttekintésével történt. A beválasztási kritériumok: (1) primer emlődaganat core-biopsziával alátámasztott diagnózisa; (2) első kezelésként PST-ra került sor, 2008.január.1 és 2013.december.31 között; (3) staging FDG-PET/CT vizsgálat igazolta a távoli áttétek hiányát (cM0 stádium); (4) csak azon betegek kerültek beválasztásra, akik a PST-t követő műtéti ellátásba is beleegyeztek, így a műtéti szövettani minta rendelkezésre állt.

3.1.2. Hisztopatológiai elemzés

A PST-t megelőző core-biopsziás mintavételek esetében hematoxin-eozin festett metszetek alapján a hisztológiai típust, nukleáris grade-et, tubulus formációt, mitózis indexet, gyulladásos és lymphoid sejtes infiltrációt, illetve az in situ komponens és a lymphovasculáris invázió mértékét rögzítettük. A műtéti szövettan elemzése során a disszertáció beadásakor érvényben lévő, 2009-es Kecskeméti Konszenzus dokumentum ajánlásai szerint azonosítottuk a patológiai válaszreakciót. A pCR definíciója ypT0/ypTis volt.

3.1.3. Immunhisztokémia

A sejtciklus működését, illetve annak szakaszait specifikusan jelző fehérjék (Ki-67, MCM2, Ciklin A, PHH3) expresszióját immunhisztokémiai (IHC) módszerekkel vizsgáltuk. Az IHC vizsgálatokhoz formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövettani blokkokból készített 3-4 µm vastag metszeteket használtunk. A metszetek a terápiát megelőző, core-biopsziás szövettani anyagok blokkjaiból, valamint a PST-t követő műtéti minták reprezentatív szövettani blokkjából készültek. Az IHC vizsgálatokat kézi módszerrel végeztük. Deparaffinálás után az endogén peroxidáz aktivitás blokkolása 0,5%-os hidrogén peroxidot tartalmazó metanol oldattal történt 20 percig. Az antigénfeltárást mikrohullámú sütőben végeztük (Whirlpool JET Chef JT366 6th Sense, Whirlpool Corp., Benton Charter Township, Michigan, USA), 45 percig, tris-EDTA pufferben (0.01 M Tris-0.1 M EDTA pH 9.0 puffere). A nem specifikus fehérjék blokkolására 5% BSA (bovin serum albumin) oldatot (5% BSA, 0.1% Na-azid, 0.01% Tween 20) használtunk. Az antigén detektáláshoz a primer antitesteket, a felsorolt hígításokban (5% BSA-ban) elnyújtott inkubálással, 1 éjszakára, szobahőmérsékleten, párasító állványon alkalmaztuk: monoklonális egér ciklin A (1:150; klón Ab-6, MS-1061-S0/US; Lab Vision Corporation NeoMarkers, Fremont, CA, USA), Ki-67

(RTU klón MIB-1; Dako North America, Carpinteria, CA, USA), és MCM2 (1:200; klón Ab-1, MS-1726-P0/US; Lab Vision Corporation, NeoMarkers, Fremont, CA, USA) valamint nyúl poliklonális PHH3 antitest (1:200; klón 369A-14; Cell Marque, Rocklin, CA, USA). A kötődés kimutatásához a tárgylemezeket Novocastra post-primer (linker) és Novolink polimer antitesttel (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle, UK) kezeltük, a gyártó instrukciói szerint. Az antigén-antitest reakciót diaminobenzidin/tormaperoxidáz (DAB) kromogén rendszerrel vizualizáltuk (Ultravision Detection System, Large Volume DAB Plus Substrate System; Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) fénymikroszkópos ellenőrzés mellett. Pozitív kontrollként tonsillát használtunk. A metszetek digitalizálása Panoramic Scan (3DHISTECH Kft., Budapest, Hungary) szkennelével történt.

3.1.3.1. Vizuális analízis

A vizuális analízis (VA) során a digitalizált metszeteken pozitív sejtek százalékos arányát adtuk meg. Az elemzést két vizsgáló, egymástól függetlenül végezte. Minden metszeten 400x nagyítás mellett legalább 500 daganatsejtben értékeltük a pozitívan festődött sejtmagok százalékos arányát. A VA alapján megadtuk a Ki-67, MCM2, Ciklin A és PHH3 markerek százalékos festődési indexét. Emellett a PHH3 esetében meghatároztuk a PHH3 index értékét. A PHH3 index a 10 nagy nagyítású látótérben (NNL) számolt PHH3 pozitív sejtek száma (db/10 NNL), a meghatározás során csak azokat a PHH3 pozitív magokat vettük számításba, melyek erős, denz festődést mutattak, utalva a profázist, metafázist, anafázist és telofázist jellemző kromatin rögökre, a granuláris karakterű magfestődést mutató sejteket a kiértékelés során nem vettük figyelembe (interfázis).

3.1.3.2. Computer-asszisztált analízis

A computer-asszisztált (CA) analízist a digitalizált metszeteken végeztük, függetlenül a többi marker esetében kapott eredményektől, a klinikopatológiai adatoktól, valamint a VA analízis eredményeitől. A pozitív sejtek arányát a Panoramic Viewer 1.15.3 szoftver HistoQuant 1.16.2 moduljával (3DHISTECH Kft., Budapest, Hungary), szemiautomatizált módon határoztuk meg. A vizsgálandó régiót (ROI) manuálisan, szabadkézi jelöléssel választottuk ki, olyan régiót keresve, mely tumorsejtekben gazdag, de strómális elemeket nem, vagy csak minimális mennyiségben tartalmaz. A kijelölt terület legalább 500 tumorsejtet tartalmazott (azaz legalább 10 NNL-et magában foglalt). Következő lépésként manuálisan azonosítottuk a pozitívan festődő és az IHC-negatív tumorsejtek egy-egy mintapéldányát, mely alapján a program a kijelölést automatikusan elvégezte. A pozitívan festődő és negatív sejteket tartalmazó területek arányát a szoftver automatikusan kiszámította, a pozitív terület százalékos aránya a CA festődési értéke.

A CA módszer validálását Wienert ajánlásai alapján végeztük: 1) kézzel jelöltünk minden immun pozitív és negatív tumorsejtet a vizsgált ROI területén, majd 2) összehasonlítottuk a jelölt sejteket a CA módszer által pozitívnak és negatívnak jelölt sejtekkel, így azonosítva a fals pozitívan (FP) vagy fals negatívan (FN) jelölődő sejteket.

3.1.4. Sejtciklus markerek és a daganatok klinikopatológiai paramétereinek összefüggései

A 3.1.1. fejezetben bemutatott betegcsoportban a vizsgált markerek expresszióját a daganatok kezelésre adott válaszával, valamint a daganatok klinikopatológiai tulajdonságaival is összevetettük. Értékeljük továbbá a reziduális daganatok biológiai viselkedése és a sejtciklus markerek expressziója közti összefüggéseket.

3.1.5. Statisztikai analízis

Minden alkalmazott statisztikai próba kétoldalas volt, a tesztek eredményeit statisztikailag szignifikánsnak akkor tekintettük, amennyiben a $p < 0,05$. Az adatokat átlag \pm standard deviáció (*SD*) vagy medián (interkvartilis tartomány) formájában adtuk meg. A CA analízis pontosságának értékelésére meghatároztuk az F-score-t. A CA és a kézi jelölés valamint a CA és VA módszerrel kapott eredmények közti egyezést Spearman rang korrelációs analízissel és Bland-Altman analízissel értékeltük. A pCR és non-pCR betegcsoportokat összehasonlítottuk a vizsgált markerek expresszióját tekintve (Mann-Whitney teszt). Értékeljük a CA és VA módszerrel meghatározott immun-pozitivitás jelentőségét a pCR előrejelzésében, ún. „Receiver Operating Characteristic” (ROC) analízissel. Meghatároztuk az optimális vágópontot a pCR predikciójára, mely alapján dichotomizáltuk mind a CA mind a VA módszerrel kapott eredményeinket (magas és alacsony expressziós kategóriák mentén). A kategorizált eredmények és a pCR közti összefüggést, Chi-négyzet illetve sz.e. Fisher egzakt teszt alkalmazásával értékeltük. A kategorizált CA és VA eredmények esetében meghatároztuk, javult-e a két módszer közti diagnosztikus egyetértés (Kappa statisztika). A klinikopatológiai tulajdonságok és a sejtciklus markerek expressziójának összefüggéseit Mann-Whitney teszttel illetve Kruskal-Wallis próbával vizsgáltuk.

3.2. FDG-PET/CT hatékonysága a PST-re adott tumorválasz mérésében

3.2.1. Betegbeválasztás

3.1.1. vizsgálatához képest kiegészítő beválasztási kritérium volt a 15 mm feletti tumorméret, valamint a terápiás válasz mérésére megtörtént staging (PST előtt) és restaging (az utolsó ciklus kemoterápia után) FDG-PET/CT vizsgálat. 2008.01.01 és 2013.12.31. között 188 emlődaganatos beteg esetében volt az első választandó kezelés a PST. Ebből az interim analízis során 42 beteg adatait elemeztük, majd a vizsgálat végén 71 beteg esetében értékeltük

a PET/CT hatékonyságát a válaszmérésben. A Her2 overexpressziót mutató betegek esetében (n=43) alcsoport analízist végeztünk, melynek során a beválasztási kritériumok a következőkkel egészültek ki: (1) Her2 overexpressziót igazoló immunhisztokémia, (sz.e. FISH); valamint (2) a terápiás válasz mérésére staging és restaging FDG-PET/CT vizsgálat és/vagy emlőultrahang történt. A betegeket két csoportra osztottuk, külön kezelve a kombinált kemoterápiában részesülő betegeket (1. kezelési csoport) és a neoadjuvánsan célzott kezelést, azaz trastuzumabot is kapó betegeket (2. kezelési csoport).

3.2.2. Hisztopatológiai analízis

A core-biopsziákat a 3.1.2. fejezetben leírtak szerint értékeltük. A biológiai szubtípusok besorolása a core-biopsziák rutin IHC vizsgálatának eredményei alapján (hormonreceptor, Her2 státus és Ki-67 LI meghatározása) történt, a 13th St. Gallen Konszenzus szerint.

A műtéti szövettan elemzése során a 2009-es Kecskeméti Konszenzus dokumentum ajánlásai szerint azonosítottuk a pCR-t elért betegeket. A patológiai választ a Chevallier és a Sataloff beosztás szerint is értékeltük. A Ki-67 LI esetében értékeltük a proliferációs aktivitásban a terápiára bekövetkező változásokat a következő score szerint: (score 1) pCR vagy Ki-67 LI $\leq 5\%$; (score 2) 30%-nál nagyobb csökkenés a proliferációs aktivitásban és a post-terápiás Ki-67 LI $>5\%$, de $<20\%$; (score 3) a Ki-67 LI csökkenés $\leq 30\%$, vagy a post-terápiás Ki-67 LI $> 20\%$ vagy a Ki-67 LI stabil vagy $<5\%$ -ot nöött; (score 4) a postterápiás Ki-67 LI legalább 5%-al magasabb kiindulási Ki-67 LI-nél.

3.2.3. PET/CT képalkotás és válaszmérés

A PST-t megelőző staging és az azt követő restaging FDG-PET/CT vizsgálatok teljes test-kamerákkal készültek (Siemens Biograph TruePoint 6 HD PET/CT, Siemens Molecular Imaging Division, Knoxville, TN, USA és GE Discovery ST 8 PET/CT, GE Medical Systems, Waukesha, WI, USA). Állapotfelmérés után (anamnézis, vércukorszint ($<7,8$ mmol/l), testsúly, testmagasság) a testtömegtől függő mennyiségű FDG (átlagosan 185-370 MBq) intravénásan került beadásra. A vizsgálatok egy ~60 perces nyugalmi periódus után történtek. Minden beteg esetében a terápia előtti és utáni vizsgálatokat ugyanazzal a berendezéssel és beállításokkal végeztük. A PET/CT vizsgálatok kiértékelését minden esetben ugyanazon szoftverrel és munkaállomáson végeztük. A fokális FDG-felvétel növekedést akkor tekintettük pozitívnak, amennyiben az a háttéraktivitás szintjét meghaladta (melyet a mediasztinum területén, a leszálló aortában mértük, PERCIST szerint). A fuzionált PET/CT felvételeken ROI-k manuális kijelölésével mértük a SUVmax értékét a primer tumor, illetve az axilláris nyirokcsomó régió területén a terápia előtt (SUVmax1), és a preoperatív vizsgálatokon (SUVmax2) (százalékos különbségük a Δ SUV). Amennyiben a tumor komplett

remissziót mutatott a kezelés hatására, úgy a poszt-terápiás vizsgálatok esetén a ROI-t a kiindulási mérés esetén definiált eredeti pozícióba helyeztük fel. A vizsgálatból kizártuk azon betegeket (n=3), akik a PST kezelés alatt testtömegük, több mint 10%-át elvesztették.

Ezt követően az interim analízis részeként (n=42) elvégeztük a PERCIST, illetve korábban érvényes EORTC ajánlások alapján a tumorválasz értékelését. A natív CT felvételeken rögzítettük a morfológiai választ a RECIST 1.1 és a korábbiakban érvényes WHO kritériumok szerint is. Két további értékelési módszert alkalmaztunk:

- (1) *PET/CT Módszer 1*, avagy egyszerűsített PERCIST-alapú válaszmérés: a komplett remisszió PERCIST alapú definícióját használjuk a PET/CT értékelése során, vagyis akkor tekintjük a tumorválaszt teljesnek ($CR_{módszer1}$), ha a cél-lézió FDG-felvétele megszűnik (\leq a háttér vér-pool vagy májaktivitás szintjénél), és minden további, nem cél-lézió is a háttéraktivitásnál kisebb FDG-aviditást mutat; valamint nem jelent meg új, daganatra specifikus FDG-felvételt mutató lézió. A fenti definíció alapján komplett remissziót el nem ért betegeket a non- $CR_{módszer1}$ csoportba soroltuk.
- (2) *PET/CT Módszer 2*, azaz kombinált válaszmérés: a második módszer szerint definiált komplett remisszió ($CR_{módszer2}$) betegcsoportba csak azon betegek kerültek, akiknél mind a PERCIST szerint, mind a RECIST szerint komplett klinikai remissziót detektáltunk, mind a primer tumor mind az axilláris nyirokcsomó régió esetében. Ha bármely kritérium szerint reziduális daganatot találtunk, a tumorválasz nem lehetett komplett remisszióként értékelhető (non- $CR_{módszer2}$). (Amennyiben a RECIST alapján a daganat a kiinduláskor nem bizonyult mérhetőnek, a beteget kizártuk vizsgálat e részéből.)

A két módszert vizsgáltuk a Her2 overexpresszáló betegcsoportban (n=43), összevetve a konvencionális képalkotás hatékonyságával, majd vizsgálatunkat kiterjesztettük a teljes, PET/CT-vel utánkötött, PST kezelésben részesült betegcsoportra (n=71).

3.2.4. Ultrahang vizsgálatok

A Her2 overexpresszáló betegcsoportban értékeltük a konvencionális képalkotás pontosságát is a terápiás válasz mérésében. A vizsgálatba beválasztott betegek esetében a kezelést megelőző és azt követő emlő ultrahang vizsgálatok ugyanazzal a készülékkel történtek (Esaote MyLAB 25, Esaote North America, Indianapolis, IN, USA illetve Philips HD 15, Philips Healthcare, Andover, MA, USA). Minden beteg esetében ugyanaz a vizsgáló végezte a kezelés előtti és az azt követő ultrahangot. Egyéb esetben az eredményt a vizsgálatból kizártuk. A tumorválasz tekintetében komplett remissziót akkor definiáltunk, amennyiben az utolsó ciklus PST után a korábbi tumor helyén semmilyen reziduális, ultrahanggal detektálható elváltozást nem talált a vizsgáló.

3.2.5. Statisztikai analízis

Minden alkalmazott statisztikai próba kétoldalas volt, a tesztek eredményeit $p < 0,05$ -nél tekintettük szignifikánsnak. Az interim analízis során páros t-próbát/Wilcoxon sign-rank tesztet végeztünk a kezelés előtti és utáni paraméterek összehasonlítására. A pCR és non-pCR (pCR-t el nem ért) csoportot t-próba/Mann-Whitney teszt segítségével hasonlítottuk össze. ROC analízist végeztünk, hogy feltárjuk, a tumorválasz mely aspektusa írja le legjobban a pCR-t. Spearman rang-korrelációs analízist végeztünk a kritériumrendszerek közötti összefüggések feltárására. A két új kritériumrendszer (PET/CT módszer 1 és 2) alapján besorolt tumorválaszt összevetettük a patológiai válasszal, a Her2 alcsoport és a teljes, 71 fős betegcsoport esetén is. A diagnosztikus hatékonyság értékelésére meghatároztuk a módszerek szenzitivitását, specificitását, a pozitív és negatív prediktív értékét és a pontosságot. Összevetettük a patológiai és PET/CT-vel definiált tumorválaszt a különböző biológiai szubtypusok előfordulásával (Mann-Whitney, Kruskal Wallis és Chi-négyzet próba).

3.3. Dinamikus FDG-PET/CT vizsgálatok és a korai tumorválasz értékelése

3.3.1. Dinamikus FDG-PET/CT vizsgálatok emlődaganatos betegek esetében

A dinamikus PET/CT vizsgálatára a beválasztást prospektív jelleggel végeztük, de a korábban ismertetett beválasztási kritériumokat pontosítottuk: a daganat legalább 20 mm-es legyen. A kizárási kritériumok is kiegészültek: kooperációra képtelen/klausztofóbiás beteg; a beteg képtelen 60 percet a vizsgálóágyon mozdulatlanul fekvéni illetve nem lehetséges a radiofarmakon kellően gyors intravénás beadása vagy az ehhez szükséges vénabiztosítás.

A vizsgálatot Siemens Biograph TruePoint 6 HD (Siemens Molecular Imaging Division, Knoxville, TN, USA) készüléken végeztük. A beteg a rutin vizsgálatokra jellemző dózisban kapta meg az FDG-t (3,7 MBq/ttkg). A tracer intravénás beadása a vizsgálóasztalon történt meg (0. perc). A dinamikus leképezés 60 percig tartott a PET/CT vizsgálóasztalán mindvégig mozdulatlanul fekvő beteg esetében. A PET adatgyűjtés folyamatosan történt (ún. „list mode”), rögzített ágypozíció mellett.

3.3.2. Az FDG-PET/CT hatékonysága a PST során a korai tumorválasz mérésében

Az interim vizsgálatok a korai válasz mérésére alkalmazhatóak. Hatékonyságukat a terápiás válasz előrejelzésében esettanulmány formájában szemléltetjük. A PET/CT vizsgálatokat a 3.2.3. fejezetben leírt módszertan szerint végeztük, kiegészítve azzal, hogy az interim vizsgálat a megelőző kemoterápiás ciklus után minimum 2 héttel történhetett meg (de természetesen még a következő terápiás ciklus előtt). A tumorválaszt mind az interim, mind a restaging vizsgálatok esetén a PERCIST és RECIST kritériumok szerint is értékeltük.

3.4. Etikai engedélyek: SE TUKEB 76/2007., SE TUKEB 120/2013. SE TUKEB 119/2013.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Tumorproliferáció, mint prediktív marker a PST során

Összesen 57 emlődaganatos beteget választottunk be vizsgálatunkba, a grade 3 (36/57; 63,1%), invazív duktális emlődaganat (50/57; 87,7%) dominált a betegcsoportban. Minden beválasztott beteg PST kezelésén esett át, főként taxán-bázisú kezeléseket alkalmaztunk, anthraciklinekkel vagy platinával kombinációban. A PST kezelés után minden beteg beleegyezését adta a sebészeti ellátáshoz.

4.1.1. A computer-asszisztált (CA) analízis validálása

A vizsgált metszeteken átlagosan 1024,3 sejtet jelöltünk kézi módszerrel, majd a kézi jelölés és a CA módszer eredményét összevetettük (1. táblázat).

1. táblázat A CA analízis validálása. F-próba a pozitív (+) és negatív (-) sejtekre, és Spearman korreláció Bland-Altman analízissel a diagnosztikus egyetértés értékelésére

Marker [#]	F-próba			Diagnosztikus egyetértés			
	F-score* (%)	Fals pozitív† (%)	Fals negatív† (%)	Spearman r és p-érték	Átlagos eltérés (SD)	95% LoA / alsó	95% LoA / felső
Ki-67	+	96.68	5.42	0.976	-0.16 (5.534)	-11.01	10.69
	-	91.98	11.39	p<0.0001			
MCM2	+	96.06	6.54	0.991	-1.47 (2,318)	-6.013	3.073
	-	89.19	16.63	p<0.0001			
Ciklin A	+	95.68	6.48	0.987	0.258 (1,854)	-3.376	3.892
	-	97.00	4.55	p<0.0001			
PHH3	+	93.94	13.04	0.923	0.707 (1,651)	-2.528	3.942
	-	97.57	4.89	p<0.0001			

külön szemléltetjük az immun pozitív (+) és negatív (-) sejtek esetén a CA kézi validálásának eredményét
* az immun-pozitivitás F-próbájának átlaga; † az összes jelölt sejt arányában; LoA: level of agreement

A CA módszer pontosan azonosította az immun pozitív sejteket mind a négy marker esetén (F-score 90% felett). Az IHC negatív sejteket tekintve viszont a Ki-67 (11,39%) és az MCM2 (16,63%) esetén a fals pozitivitás aránya magas volt, a módszer a strómális elemeket és lymphocytákat pontatlanul IHC negatív tumorsejtként jelölte. A HistoQuant módszer tehát a kézi jelölésnél egyszerűbben alkalmazható, azzal egyenértékű eredményt szolgáltat, amennyiben a vizsgálandó régióban a strómális elemek aránya alacsony.

4.1.2. A computer-asszisztált és vizuális analízis különbségei

A Ki-67 esetében a CA eredményei átlagosan 3,94%-a voltak alacsonyabban a VA-el mértéknél. Az MCM2-t tekintve a CA eredmények átlagosan 4,32%-al voltak alacsonyabbak a VA-el mértéknél. Emellett az eltérés összefüggött az expresszió nagyságrendjével (p=0,0264):

amennyiben a mintában a pozitív sejtek száma magasabb (tehát magas MCM2 expresszió esetén) a CA és VA közti különbség magasabbnak bizonyult, a 4,32%-ot konzekvensen meghaladta. A Ciklin A és PHH3 esetében a CA és VA módszer közötti egyezés kiváló, 0,58% illetve 0,66%-al volt csupán alacsonyabb a CA, mint a VA eredménye. (2. táblázat)

2. táblázat. A CA és VA eredmények közti eltérés a Ki-67, MCM2, Ciklin A és PHH3 markerek esetén. A Spearman korreláció és Bland-Altman analízis eredményei.

	CA átlag (SD)	VA átlag (SD)	Spearman r és p-érték	Átlagos eltérés CA-VA (SD)	95% LoA / alsó	95% LoA / felső	Nagyságrenddel mutatott összefüggés
Ki-67	44.95 (24.9)	48.89 (25.7)	0.9726 p<0.0001	-3.939 (6.125)	-15.94	8.065	NS (p=0.323)
MCM2	48.39 (21.5)	52.72 (23.3)	0.9642 p<0.0001	-4.323 (5.915)	-15.92	7.271	p=0.0264
Ciklin A	24.39 (15.3)	24.98 (15.5)	0.9593 p<0.0001	-0,586 (3.71)	-7.857	6.685	NS (p=0.802)
PHH3	8.04 (5.4)	8.70 (5.5)	0.9017 p<0.0001	-0.666 (2.107)	-4.796	3.464	NS (p=0.641)

Rövidítések: SD: standard deviáció, 95% LoA: 95% level of agreement; NS: nem-szignifikáns.

4.1.3. A pCR és non-pCR betegcsoport elkülönítése, az optimális vágópontok

22 beteg ért el pCR-t (38,6%), és 35 esetben reziduális daganatot találtunk (non-pCR ráta: 61,4%). A VA módszert tekintve szignifikáns különbséget találtunk a pCR és non-pCR betegcsoport között a Ki-67 (p=0,000013), az MCM2 (p=0,000022), a Ciklin A (p=0,000042) és a PHH3 (p=0,006294) expressziójában is. A CA értékelés hasonló eredményt adott mind a négy marker esetében (Ki-67: p=0,000007; MCM2: p=0,000059; Ciklin A: p=0,000039 és PHH3: p=0,049564). A PHH3 index pontosabban különítette el a pCR vs. non-pCR csoportokat, (p=0,0038) mint a PHH3 százalékos expressziója (függetlenül a használt módszertől). A sejt-ciklus markerei szignifikáns prediktornak bizonyultak a pCR előrejelzésére (p<0,05), kivéve a PHH3 CA módszerrel mért értékét (p= 0,1004).

Következő lépésként ROC-analízist végeztünk, hogy meghatározzuk az optimális vágópontokat a pCR előrejelzésére, mind a VA mind a CA módszerrel végzett analízis eredményeinek esetében. A VA módszernél az optimális vágópont Ki-67 esetében 45%, MCM2-nél 47,5%, Ciklin A-nál 27,5%, míg PHH3-nál 7,5% volt. A CA értékelés esetében a következő vágópontokat találtuk: Ki-67: 47,5%, MCM2: 42,8%, Ciklin A: 28,8% és PHH3: 8,7%. Meghatároztuk a PHH3 index prediktív vágópontját is, mely >36 mitózis/10 NNL-nek adódott.

Minden marker esetében az optimális vágópontok alapján ‘magas’ és ‘alacsony’ expressziós kategóriákat definiáltunk. Ez alapján dichotomizáltuk mind CA és VA analízissel meghatározott eredményeket, és megismételtük a diagnosztikus egyetértés vizsgálatát Kappa-statisztika segítségével. Az MCM2 esetén az új, re-kategorizált VA és CA eredmények teljes

egyezeit mutattak ($\kappa=1,0$; $p<0,000$). A Ciklin A esetén kiváló egyezést találtunk a CA és VA eredmények között ($\kappa=0,925$; $p<0,000$). A Ki-67 és a PHH3 esetén gyengébb, de továbbra is jó egyezést detektáltunk (Ki-67: $\kappa=0,789$, $p<0,000$; PHH3: $\kappa=0,795$, $p<0,000$).

4.1.4. Sejtciklus markerek és a klinikopatológiai paraméterek összefüggései

A core-biopsziás szövettani mintákban az ER és PR negatív, alacsonyabb T stádiumú daganatok jelentősen magasabb proliferációs aktivitást mutattak, mint a hormon pozitív, nagyméretű tumorok. A magasabb grádusú, tripla negatív daganatokban mind a négy marker expressziója szignifikánsan magasabb volt. Kiegészítő ROC analízis szerint a Ki-67 és az MCM2 expressziója alapján különültek el a legjobban a rosszabb prognózisú, high grade ($AUC_{Ki67}=0,88$; $AUC_{MCM2}=0,86$), tripla negatív tumorok ($AUC_{Ki67}=0,81$; $AUC_{MCM2}=0,82$).

A műtéti szövettan alapján non-pCR kategóriába sorolt daganatok között dominált az IDC (87,1%). A reziduális daganatok közül 17 grade 2, 14 pedig grade 3 differenciáltságú volt. 27 daganat ER-pozitív, 24 PR-pozitív és 13 Her-2 pozitív volt. Nem volt kimutatható szignifikáns különbség a patológiai válaszreakció mértéke és a vizsgált markerek között. A reziduális daganatok esetében a Ki-67 mutatott egyedül korrelációt a grade-el ($p=0,0322$), míg a dominálónan luminális karakterű daganatok mindössze az MCM2 ($p=0,0326$) és Ciklin A ($p=0,0339$) expressziója alapján voltak elkülöníthetőek luminális A és B csoportokra.

4.2 FDG-PET/CT hatékonysága a PST-re adott tumorválasz mérésében

4.2.1. Válaszmérő score rendszerek alkalmazhatósága a PST során

Összesen 42 beteg esetében vizsgáltuk a különböző score-rendszerek hatékonyságát a PST-ra adott tumorválasz mérésében. A 42 beteg (41 nő és egy férfi) átlagéletkora $48,3 \pm 10,7$ év volt. A PST részeként főként taxán-bázisú protokollokat alkalmaztunk ($n=39$), anthraciklin kombinációkban ($n=20$).

A PST kezelés hatására a SUVmax és a tumorméret szignifikánsan csökkent mind a primer tumor ($p<0,001$; $p<0,001$), mind az axilláris régió esetében ($p<0,001$, $p=0,027$). A primer tumorok Ki-67 értéke szintén szignifikáns csökkenést mutatott ($p<0,001$). A műtéti szövettan 18 beteg esetén mutatott pCR-t (42,9%), ebből 3 esetben találtunk DCIS-t. Összesen a betegek 83,3%-a mutatott teljes vagy részleges patológiai remissziót, mindössze 7 beteg esetén nem találtunk regresszióra utaló jelet (Chevallier IV/Sataloff T-D). A pCR tekintetében értékeltük a SUVmax, a tumorméret és a Ki-67 prediktív értékét. Szignifikáns eltérést találtunk a pCR-t elért és azt el nem ért (non-pCR) betegcsoportok között a kezdeti Ki-67 és SUVmax tekintetében ($p<0,001$). A kiindulási tumorméret nem mutatott összefüggést a pCR elérésével ($p=0,237$). A terápiát követően a pCR-t elért betegeknél kisebb SUVmax-ot ($p=0,001$) és tumorméretet ($p=0,045$) találtunk a non-pCR betegek esetén mértekkel szemben.

ROC analízist végeztünk, hogy értékeljük a Ki-67, SUVmax és tumorméret változásának összefüggését a pCR-el. A Ki-67 mutatta a legnagyobb pontosságot a pCR elkülönítésében a non-pCR betegcsoporttól (AUC=0,84), melyet a SUVmax (AUC=0,82), majd a tumorméret követett (AUC=0,74).

A tumorválasz értékelése során a klinikai választ besoroltuk a WHO, RECIST, EORTC és PERCIST rendszerek szerint, valamint a patológiai választ besoroltuk a Chevallier és Sataloff kritériumok és a Ki-67 score alapján. Értékeljük a klinikai válasz értékelésére alkalmazott és a patológiai válasz mérésére használt score-rendszerek összefüggéseit. A Chevallier és Sataloff rendszer alapján besorolt tumorválasz a legjobb összefüggést a RECIST és WHO rendszerekkel mutatta. Szignifikáns összefüggést találtunk a Ki-67 LI score és a PERCIST és EORTC rendszerek között, de a Ki-67 score a RECIST és WHO rendszerek közötti korreláció enyhén, de erősebbnek bizonyult. A Ki-67 score értéke a patológiai remisszió mértékével a klinikai válasznál gyengébb összefüggést mutatott. Kettős válaszkategóriák alkalmazása (komplett remisszió vs. egyéb tumorválasz) javított a PERCIST rendszer és a pCR ($r=0,556$) valamint a tumor proliferációs aktivitása közti ($r=0,576$) korreláción. A morfológiai választ tekintve a RECIST rendszer mind a pCR elérésével ($r=0,521$), mind a Ki-67 score szerinti tumorválasszal ($r=0,402$) közepesen erős korrelációt mutatott, emellett a metabolikus válasszal is összefüggött ($r=0,478$). Az új kategóriák alkalmazása a PERCIST hatékonysága mellett a morfológiai kritérium rendszerek, különösen a RECIST fontosságát is kiemelte.

4.2.2. Válaszmérés Her2 overexpressziót mutató emlődaganatokban

2008 és 2013 között 188 PST kezeléssel átesett beteg közül 46 Her2 overexpresszáló daganatot azonosítottunk, 43-at választottunk be jelen analízisünkbe (3 beteg a PST kezelés befejezését visszautasította). A 43 beteg közül (átlagéletkor $51,47 \pm 11,07$ év) 15 esetben Her2-pozitív szubtypust, 28 esetben Luminális B/Her2-pozitív daganatot detektáltunk. 26 beteg esetében főként taxán-bázisú kemoterápiás PST kezelést alkalmaztunk (1. kezelési csoport); 17 beteg esetén a célzott trastuzumab kezelést már a PST részeként alkalmazni tudtuk (2. csoport). Mindkét kezelési csoportban kedvező tumorválaszt találtunk a PST-ra. Az 1. csoportból 10 beteg (38,5%) a 2. csoportból 8 fő (47%) érte el a pCR-t. Mindkét kezelési csoportban a Her2-pozitív szubtypusba tartozó daganatok esetén a pCR szignifikánsan gyakoribb volt, mint a Luminális B/Her2-pozitív tumorokban (az 1. kezelési csoportban $p=0,043$, a 2. csoportban $p=0,029$).

Teszteltük a PET/CT és az emlő-UH pontosságát a pCR és non-pCR esetek elkülönítésében (3. táblázat).

Az UH specificitása igen alacsonynak bizonyult (25% az 1. kezelési csoportban és 12,5% a 2. kezelési csoportban). A PET/CT-vel mért tumorválasz tekintetében az 1. módszer esetén magasabb volt a fals negatív esetek száma az emlő UH-al összehasonlítva, azonban a fals pozitív esetek igen alacsony volt. A reziduális betegséget a PET igen érzékenyen detektálta. A tumorválaszt a PET/CT 2. módszer szerinti értékelve (PERCIST és RECIST kritériumok együttes definíciója a komplett remisszióra) mind a szenzitivitás (77,8% az 1. és 87,5% a 2. kezelési csoportban) mind a specificitás (100% és 62,5%) magasnak bizonyult.

3. táblázat. Az emlő UH és az FDG-PET/CT diagnosztikus értéke az 1. és 2. betegcsoportban

	Ultrahang		PET/CT 1. módszer		PET/CT 2. módszer	
	1. csoport (n=20)	2. csoport (n=16)	1. csoport (n=14)	2. csoport (n=16)	1. csoport (n=14)	2. csoport (n=16)
Szenzitivitás (%) (95% CI)	83.3 (51.6-97.4)	100 (47.9-100)	22.2 (3.5-59.9)	37.5 (9-75.3)	77.8 (40.1-96.5)	87.5 (47.4-97.9)
Specificitás (%) (95% CI)	25.0 (3.4-64.9)	12.5 (2.1-52.6)	100 (47.9-100)	87,5 (47.4-97.9)	100 (47.9-100)	62.5 (24.7-91)
PPV (%) (95% CI)	62.5 (35.5-84.7)	41.7 (15.3-72.2)	100 (19.3-100)	75 (20.3-95.9)	100 (58.9-100)	70.0 (34.8-92.9)
NPV (%) (95% CI)	50.0 (8.3-91.7)	100 (16.5-100)	41.7 (15.3-72.2)	58.3 (27.7-84.7)	71.4 (29.3-95.5)	83.3 (36.1-97.2)
Fals pozitívitas	6	7	0	1	0	3
Fals negatívitas	2	0	7	5	2	1

PPV: pozitív prediktív érték, NPV: negatív prediktív érték; CI: konfidencia intervallum

4.3.3. Biológiai szubttípusok hatása a tumorválasz értékelésére

2008 és 2013 között 188 PST kezelésem átesett beteg közül 87 esetben történt FDG-PET/CT a kezelés hatásosságának monitorozására, közülük 71 beteget tudtunk beválasztani a vizsgálatba. A grade 3 (44/71, 61,9%) invazív duktális emlődaganat (64/71, 90,1%) dominált a betegcsoportban. A biológiai szubttípus szerint 8 Luminális A, 17 Luminális B/ proliferatív, 19 Luminális B/Her2-pozitív, 10 Her2-pozitív és 17 tripla negatív daganatot vizsgáltunk.

A patológiai válasz szempontjából 2 csoportra osztottuk a betegeket: patológiai komplett remissziót elért (pCR, n=22, 32,4%) és el nem ért (non-pCR, n=48, 67,6%) betegcsoportra. A pCR és non-pCR betegcsoportok szignifikánsan eltértek a szubttípusok előfordulásában (Chi-négyzet=24,09, df=4, p=0,00008). A 17 Luminális B/proliferatív betegből 2 esetben fordult elő pCR (11,8%), a 19 Luminális B/Her2-pozitív betegből 3 (15,7%), a 10 Her2-pozitív tumorból 7 (70%) míg a 17 tripla negatív daganatból 11 (64,7%) mutatott pCR-t. A Luminális A szubttípus esetén (8 fő) egyik tumor sem mutatott komplett remissziót a kezelés hatására.

Értékeljük a két új módszerrel végzett FDG-PET/CT válaszmérés hatékonyságát is a pCR és non-pCR betegcsoportok elkülönítésében (4. táblázat).

4. táblázat. A diagnosztikus vizsgálatok értékelése. Az FDG-PET/CT vizsgálatok 1. és 2. módszer szerinti értékelésének szenzitivitása, specificitása, pozitív prediktív (PPV), negatív prediktív értéke (NPV) valamint pontossága

	FDG-PET/CT	
	PET/CT Módszer 1	PET/CT Módszer 2
Szenzitivitás (95% CI)	43.75% (29.5-58.8)	75% (60.4-86.4)
Specificitás (95% CI)	91.3% (71.9-98.7)	78.26% (56.3-92.5)
Pozitív prediktív érték (95% CI)	91.3% (71.9-98.7)	87.8% (73.8-95.9)
Negatív prediktív érték (95% CI)	43.75% (29.5-58.8)	60% (40.6-77.3)
Fals pozitívítás	2	5
Fals negatívítás	27	12
Pontosság	59%	76%

Rövidítések: 95% CI: 95 % konfidencia intervallum

Hasonlóan a Her2-overexpresszáló betegcsoportban leírtakhoz, 2. módszer esetén a fals negatív esetek száma alacsonyabb volt, mint az 1. módszer esetében, a magas szenzitivitás (75%) és specificitás mellett (78,26%). Összességében a 2. módszer pontossága magasabbnak bizonyult az 1. módszerénél (76% vs. 59%).

Ezután megvizsgáltuk a biológiai szubttípusok hatását a tumorválasz értékelésére. Mind SUVmax változása ($p=0,0044$) mind a morfológiai remisszió ($p=0,0331$) szignifikáns eltérést mutatott a szubttípusok között. A Her2-pozitív daganatok esetében volt a legnagyobb az FDG-felvétel csökkenése a kezelés hatására, míg a SUVmax változása a Luminális A szubttípus esetén volt a legkisebb. Nem találtunk különbséget a szubttípusok eloszlásában sem a CR_{módszer1} és non-CR_{módszer1} betegcsoportok között (Chi-négyzet=1,9737, $df=4$, $p=0,7405$) sem a 2. módszer szerint elkülönített két betegcsoport között (CR_{módszer2} és non-CR_{módszer2}) (Chi-négyzet=9,3477, $df=4$, $p=0,0529$), azonban a CR_{módszer2} betegcsoportban szintén domináltak a Her2-overexpresszáló ($n=14$) és tripla negatív daganatok ($n=10$) (szemben a luminális A és B proliferatív csoportokkal, ahol összesen 6 beteg mutatott klinikai CR-t).

4.3. Dinamikus FDG-PET/CT vizsgálatok és a korai tumorválasz értékelése

4.3.1 Dinamikus FDG-PET/CT vizsgálat emlődaganatos betegek esetében

38 éves nőbetegünk egy 3 cm nagyságú, mobilis, bőrt és axillát nem involváló daganatot észlelt önvizsgálat során a bal emlő külső-felső kvadránsában. A 26x14x22 mm-es daganat ultrahang vezérelt core-biopsziája grade 3 IDC-t igazolt, mely Luminális B/Her2-pozitív szubttípusú volt. A daganat igen magas proliferációs aktivitást mutatott: a Ki-67 index

meghatározása mellett (70%), vizsgáltuk az MCM 2 (70%), a Ciklin A (30%) és a PHH3 expresszióját (10%, 29 mitózis/10 NNL) is.

A tervezett PST kezelés megkezdése előtt staging FDG-PET/CT vizsgálat történt, melyet dinamikus adatgyűjtéssel egészítettünk ki a primer tumorra vonatkozóan. A dinamikus vizsgálatokat a PMOD szoftver (v3.310, Zürich, Svájc) segítségével értékeltük. A bemenő idő-aktivitás görbék (TAC) generálásához az aktivitáskoncentrációk változását a primer tumor és a bal kamra (vér-pool) területén kijelölt 1,5 cm átmérőjű gömb VOI-ban vizsgáltuk. Hogy kiküszöböljük a mozgási műtermékeket a VOI-k helyzetét minden időszeleten (frame) manuálisan (VOI₁) illetve szemiautomatikus módon (VOI₂) korrigáltuk, mely az utóbbi módszer a pontosabbnak bizonyult a daganat kijelölésében.

Az idő-aktivitás görbék (TAC-ok) felhasználásával a PMOD szoftver ún. FDG-eloszlásra vonatkozó kétkompartmentes modelljét kiválasztva meghatároztuk a kívánt kinetikai paramétereket (K₁, k₂, k₃, K_i). Mivel nem ismerjük az emlőszövetben az FDG és glükóz metabolikus rátája közti kapcsolat egzakt lumped constans-át, úgy az $MRFDG = C_{glc} \times K_i$ egyenletet alkalmaztuk az FDG-metabolikus rátáját leírására az emlő szövetben (μmol/perc/100 g szövet). Esetünkben a K₁/K_i hányados értéke (K₁/K_i=0,1) közelebb állt a nullához, mint az egyhez, az MRFDG értéke pedig 12 μmol/min/100 g szövetnek adódott. Mankoff és munkacsoportja eredményei alapján mindkét érték a pCR-re prediktív tartományba esett.

A betegnél 6 ciklus trastuzumab + taxán alapú PST után végzett műtét szövettana pCR-t igazolt (EWBPSG szerint TR1b), az SLNB negatív volt (0/3).

4.3.2 Az FDG-PET/CT hatékonysága a PST során a korai tumorválasz mérésében

52 éves nőbetegünk önvizsgálat során fedezte fel jobb emlőjében a körülírt, gyorsan növvő, tapintható elváltozást. Fizikális vizsgálattal 4 cm átmérőjű, gyulladással járó bőrtüneteket mutató terimét észleltünk a jobb emlő külső-felső kvadránsában. Az emlő ultrahang nyirokcsomó áttét gyanúját vetette fel. A core-biopszia grade 3, tripla negatív IDC-t igazolt. Azonban, szemben az agresszív klinikai viselkedéssel, közepes mitotikus aktivitást (9 mitózis/10NNL) írtak le, mindössze 10%-os Ki-67 index mellett.

A staging PET/CT vizsgálat metabolikusan igen aktív daganat mellett (SUV_{max} 15,7) – a klinikai tünetekkel összhangban – az emlő bőrében közepes metabolikus aktivitást, valamint egy szintén FDG-avid szoliter nyirokcsomó áttétet (SUV_{max} 17,7) detektált (cT2N1M0).

Az onkoteam a rapid tumornövekedés, kifejezett metabolikus aktivitás és a mastitis-szerű viselkedés miatt PST kezelést indikált. A betegnél az első ciklus docetaxel-carboplatin PST hatására a mastitis jellegű tünetek és az erythema csökkentek, azonban a tumor nem mutatott

méretbeli regressziót. A klinikus az ellentmondó fizikális lelet és az alacsony core-biopsziás Ki-67 index miatt interim PET/CT vizsgálatot rendelt a tumorválasz értékelésére.

Az interim vizsgálat egyértelmű metabolikus remissziót mutatott mind a tumor ($\Delta\text{SUV}=66,3\%$), mind az axilla területén ($\Delta\text{SUV}=77,4\%$), szemben a morfológiai válasszal, mely csupán az axillát tekintve mutatott egyértelmű regressziót (méret csökkenés: 41%), a primer tumort tekintve RECIST szerint stabil betegséget láttunk (méret csökkenés: 25%). A 6. ciklus végén, a műtét előtt restaging PET/CT történt, mely a primer tumor esetén PERCIST szerint komplett remisszió mellett morfológiai szempontból stabil betegséget írt le. Az axilla esetén reziduális FDG-felvétel mellett a nyirokcsomók mérete nem érte el a patológiás mérethatárt.

A tumor sebészeti eltávolítása után a primer tumor pCR-t találtunk (EWBPSG szerint TR1), fibrotikus-nekrotikus maradványokkal a primer tumor területén. Az ABD specimenen (2/10; EWBPSG szerint NR3) végzett ismételt IHC vizsgálatok alapján a reziduális daganat grade 3, tripla negatív IDC volt, igen magas, 80%-os Ki-67 index-szel.

Az interim PET/CT eredménye (SUVmax csökkenés 60% felett) prediktívnek bizonyult a tumorválaszra. Kiemelendő, hogy a staging vizsgálatok alapján a tumor kezdeti igen magas FDG-felvétele a core-biopsziával detektált proliferációs aktivitásnak ellentmondott. A core-biopsziás mintát retrospektív módon újraértékeljük a 3.1. fejezetben bemutatott módszerekkel. Az ismételt értékeléssel 20%-os Ki-67 mellett 75%-os MCM2, 20% Ciklin A és 72 mitózis / 10 NNL PHH3 indexet találtunk. A kezdeti alacsony Ki-67 index háttérében mérési hibát valószínűsítettünk. A Ki-67 meghatározásnak ismertek a buktatói, relatív magas intra- és interobszerver variabilitása. Emellett a core-biopszia nem tekinthető teljes mértékben reprezentatívnak a daganat biológiai viselkedését tekintve, mivel intra-tumorális eltérések is jelen lehetnek a daganat proliferációját tekintve. További magyarázat lehet magán a core-biopsziás mintán belüli heterogenitás jelenléte: az újabb lemetszés során egy tumorsejtekben gazdagabb, a tumor valódi viselkedését helyesebben reprezentáló területen végeztük kiegészítő méréseinket.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. Tumorproliferáció, mint prediktív marker a PST során

Eredményeink alapján elmondható, hogy a digitális patológiai módszerek emlődaganatok esetén jól alkalmazhatóak a proliferációs markerek expressziójának értékelésére. Előnyük az immunhisztokémia értékelésében az objektivitás növelése, az alacsonyabb intra- és interobszerver variabilitás, nagy kapacitás. A vizsgált sejtciklus markerek esetén (Ki-67, MCM2, Ciklin A és PHH3) a HistoQuant szoftverrel végzett CA értékelés megbízható módszernek bizonyult. A diagnosztikus egyetértés a CA és VA módszer között magasabb volt Ciklin A és PHH3 esetén, tehát azon markereknél, ahol az átlagos expresszió alacsonyabb. Emellett szól, hogy az MCM2 esetén az egyezés magasabbnak bizonyult alacsony expresszió esetén, de magasabb festődési indexek mellett az átlagos különbség nőtt a két módszer között.

A CA módszer pontossága nagyban függ a kijelölt ROI stromális sejt tartalmától – így a vizsgált terület definiálásához a patológus szakember munkája nélkülözhetetlen.

Mind a négy vizsgált sejtciklus marker a pCR pontos prediktorának bizonyult, és a ROC analízis alapján végzett optimális vágópontok mentén végzett kategorizálás (magas ill. alacsony festődési index) a markerek prediktív potenciálját javította.

A core-biopsziás szövettani mintákban a Ki-67 és MCM2 magas expressziója erősen összefügg a high grade, tripla negatív daganatok jelenlétével.

5.2. FDG-PET/CT hatékonysága a PST-re adott tumorválasz mérésében

A PST során a tumorválasz egzakt értékelése a patológia tárgykörébe tartozik, azonban a modern képalkotó diagnosztika hatékonyan képes segíteni a klinikust a terápiás döntések meghozatalában. Eredményeink alapján elmondható, hogy az FDG-PET/CT alkalmas modalitás a terápiás válasz mérésére és a metabolikus aktivitás illetve annak változása jól tükrözi a daganat klinikopatológiai tulajdonságait. A SUVmax változása pontosabb prediktora a patológiai remisszióknak, mint a tumorméret csökkenése.

A PET/CT vizsgálatok értékelésére a PERCIST kritériumrendszer kiválóan alkalmas, azonban vizsgálataink során a RECIST fontossága is előtérbe került a pCR előrejelzésében. A restaging képalkotás során nem csupán a PERCIST szerint érdemes értékelnünk a PET/CT vizsgálat eredményeit, de egy módosított RECIST értékelés bevezetése hasznos információval járulhat hozzá a tumorválasz értékeléséhez és a patológiai válasz előrejelzéséhez.

Fentiek alapján vizsgáltuk két új, egyszerűsített PET/CT kiértékelési módszer hatékonyságát a pCR előrejelzésében. Mindkét módszer a komplett remissziót különíti el az egyéb tumorválasztól, az első módszer PERCIST kritériumok szerint értékeli, a második pedig PERCIST és RECIST kritériumokat is alkalmaz a klinikai komplett remisszió definiálására.

A konvencionális UH-al végzett válaszméréssel szemben mindkét módszert pontosabbnak találtuk a válaszmérésben a Her2 overexpressziót mutató betegcsoportban vizsgálva.

A PST-t követő válasz mérésében a bemutatott kombinált kiértékelés különösen jelentős előnyt mutatott, mind standard kemoterápia mind kombinált monoklonális antitest terápia esetén.

Fontos kiemelnünk, hogy a Her2 overexpresszáló emlődaganatos betegcsoportban a PST kezelés részeként a trastuzumab terápia létjogosultsága nem lehet kérdés, alkalmazásával a napi gyakorlatban a klinikai vizsgálatokban talált eredményeknél is kedvezőbb pCR rátát értünk el. Azonban a Luminális B/Her2-pozitív daganatok biológiai viselkedése eltérő, a pCR elérése ritkább. A Luminális B/Her2-pozitív daganatok esetén indokolt lehet további alcsoportok elkülönítése, a PST indikációs körének szűkítése.

A biológiai szubtypusok hatása a metabolikus és morfológiai válaszra sem elhanyagolható: mind a SUVmax, mind a méret változása szignifikánsan eltér az egyes szubtypusok esetében. Azonban mindkét alkalmazott válaszmérő kritériumrendszer képes volt a tumorválaszt pontosan előrejelezni szubtypus szerint heterogén betegcsoportban is, így alkalmazásukkal a FDG-PET/CT-vel végzett válaszmérést optimalizálhatjuk.

A kombinált válaszmérő kritériumok alkalmazásával az FDG-PET/CT prediktivitása igen magas volt a pCR-ra. Nagyobb, prospektív vizsgálatok tervezésével eredményeink validálhatóak, és a kombinált kritériumrendszer a klinikai gyakorlatba bevezethető.

5.3. Dinamikus PET/CT vizsgálatok és a korai tumorválasz értékelése

A dinamikus PET/CT vizsgálatok alkalmasak az FDG-felvétel pontos kvantifikálására, így új prediktív és prognosztikai markerek lehetőségét hordozzák. Az FDG-influx sebessége és az MRFDG prediktívnek bizonyult a kedvező patológiai válaszra, és irodalmi adatok alapján összefügg a kedvezőbb prognózissal is. A dinamikus vizsgálatok kivitelezése azonban időigényes, így fontos definiálnunk azt a betegcsoportot, ahol alkalmazásuk a legkedvezőbb haszon/kockázat aránnyal jár. A mozgási műtermékek minimalizása mellett a megfelelő kiértékelő szoftver kiválasztása kulcsfontosságú.

A statikus FDG-PET/CT vizsgálatok indikációs területe még mindig formálódik, mind a nemzetközi, mind a hazai ajánlásokban a kezelést követő restaging mellett a korai terápiás válasz mérése is előtérbe került. Az interim, egy illetve két ciklust követő FDG-PET/CT vizsgálatok emlődaganatok esetén sikeresnek bizonyultak a korai tumorválasz mérésében: az FDG-felvétel korai csökkenése a pCR jó prediktora. Esettanulmányunk rávilágít a tumor metabolikus válaszának korai mérésének jelentőségére a biológiai viselkedés szempontjából ellentmondásokat mutató daganatok esetében.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. A disszertációval összefüggő közlemények

1. Tőkés T, Torgyik L, Szentmártoni Gy, Somlai K, Kulka J, Lengyel Zs, Györke T, Dank M. (2015) Complexity of response evaluation during primary systemic therapy of breast cancer: scoring systems and beyond – preliminary results. *Anticancer Res*, 35: 5063-72.
IF: 1.826
2. Tőkés T, Szentmártoni Gy, Torgyik L, Kajáry K, Lengyel Zs, Györke T, Molnár B Á, Tőkés AM, Kulka J, Dank M. (2015) Response evaluation after primary systemic therapy of Her2 positive breast cancer - an observational cross-sectional study. *Croat Med J*, 56: 128-38.
IF: 1.305
3. Kajáry K, Tőkés T, Dank M, Kulka J, Szakáll S Jr, Lengyel Zs. (2015) Correlation of the value of 18F-FDG uptake, described by SUVmax, SUVavg, metabolic tumour volume and total lesion glycolysis, to clinicopathological prognostic factors and biological subtypes in breast cancer. *Nuclear Med Comm*, 36: 28-37.
IF: 1.669
4. Tőkés T, Torgyik L, Kulka J, Borka K, Szasz AM, Tóth A, Harsányi L, Lengyel Zs, Györke T, Dank M. (2014) FDG-PET-CT in the early response evaluation for primary systemic therapy of breast cancer. *Cent Eur J Med*, 9: 306-312.
IF: 0.153
5. Tőkés T, Somlai K, Székely B, Kulka J, Szentmártoni Gy, Torgyik L, Galgóczy H, Lengyel Zs, Györke T, Dank M. (2012) Az FDG-PET-CT szerepe az emlőrák primer szisztémás kezelése során: a metabolikus változások és a patológiai remisszió összefüggései. *Orv Hetil*, 153: 1958-64.
6. Tőkés T, Torgyik L, Szentmártoni Gy, Somlai K, Tóth A, Kulka J, Dank M. (2015) Primary systemic therapy for breast cancer: Does the patient's involvement in decision-making create a new future? *Patient Educ and Couns*, 98: 695-703.
IF: 2.199
7. Tőkés T, Szentmártoni Gy, Lengyel Zs, Györke T, Dank M. (2014) Tumorválasz mérése az emlőrák primer szisztémás kezelése során, *Lege Artis Medicinae*, 24: 99-105.
8. Dank M, Tőkés T. (2013) Monoklonális antitest-terápia emlőrákban. *Magy Onkol*, 57: 157-165.
9. Tőkés T, Kajáry K, Torgyik L, Lengyel Zs, Györke T, Dank M. (2013) PET-CT imaging in breast cancer patients: new tracers, future directions. *J Mol Imaging Dynam*, 2: 111-116.

6.2. A disszertációtól független közlemények

1. Dank M, Szentmártoni Gy, Orosz Zs, Tóth A, Tőkés T (2014). Immun(onko)terápia – út a jövőbe. *Klin Onkol*, 1:237-243.
2. Dank M, Szentmártoni Gy, Tőkés T. (2014) Genetika az általános onkológiában. *Magyar Belorvosi Archivum*, 67: 363-365
3. Dank M, Nagy Zs, Sebők S, Tőkés T. (2013) Orális mukozitisz. *Orvostovábbképző Szemle*, 20: 9-13.
4. Györke T, Tőkés T, Lantos A, Korom Cs, Gyebnár J, Garai I, Tóth Z, Szepesi Á, Timár B, Demeter J, Nagy Z, Sári E, Illés Á, Gergely L, Sipos A, Mikala G, Masszi T. (2013) Két ciklus kemoimmunoterápia után végzett interim FDG-PET prognosztikai értéke diffúz nagy B-sejtes lymphoma esetén: a vizuális és szemikvantitatív értékelés összehasonlítása *Magyar Radiológia*, 87: 43-55.