

Mikroszatellita-instabilitás előfordulása, intratumoralis heterogenitása, prognosztikus és prediktív potenciálja primer colorectalis carcinomák és párosított májattéteik sebészi kezelését követően

Ágoston Emese Irma dr.¹ ■ Baranyai Zsolt dr.¹ ■ Dede Kristóf dr.⁴
 Bodoky György dr.³ ■ Kulka Janina dr.² ■ Bursics Attila dr.⁴
 Harsányi László dr.¹ ■ Szász A. Marcell dr.²

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, ¹I. Sebészeti Klinika, ²II. Patológiai Intézet, Budapest

³Egyesített Szt. István és Szt. László Kórház, Onkológiai Osztály, Budapest

⁴Fővárosi Önkormányzat Uzsoki Utcai Kórház, Sebészeti-Onkosebészeti Osztály, Budapest

Bevezetés: A vastagbél-daganatokra jellemző genetikai instabilitás megnyilvánulhat több úton: kromoszomális instabilitás, mikroszatellita-instabilitás, illetve „CpG-island metylator phenotype”. Ezek pontosabb karakterizálásával a rendelkezésre álló kezelések elviekben optimalizálhatók lehetnek. **Célkitűzés:** A szerzők a mikroszatellita-instabilitás előfordulását, heterogenitását, prognosztikus és prediktív potenciálját vizsgálták 122 primer colontumor szisztematikusan szelektált régióban és 69 párosított májmetasztázisban. **Módszer:** Szöveti multiblokkok kialakítása után az MLH1, MSH2, MSH6 és PMS2 kifejeződését vizsgálták immunhisztokémiai módszerrel. **Eredmények:** A betegek 11,5%-a (14/122) rendelkezett mikroszatellita-instabil fenotípusú daganattal. A különböző tumorregiók fehérjékifejeződésében nem volt jelentős különbség. A primer tumor–májmetasztázis párok esetében 20,2%-ban a kettő más mismatch repair státusba volt sorolható. A relapsusmentes és teljes túlélést tekintve a mismatch repair státus nem volt prognosztikus. Az 5-fluorouracil-, oxaliplatin-, irinotecan-, bevacizumab-, cetuximab-, panitumumabterápia hatékonyságát tekintve mismatch repair státus nem volt prediktív a progressziómentes és teljes túlélés adatai alapján. **Következtetések:** A prognosztikus faktorok pontosabb meghatározása nagyobb esetszámú, pontosan szelektált vizsgálat keretében hatékonyabbá teheti a kezelés megválasztását. Orv. Hetil., 2015, 156(36), 1460–1471.

Kulcsszavak: colorectalis carcinoma, májmetasztázis, mikroszatellita-instabilitás

Occurrence, intratumoral heterogeneity, prognostic and predictive potential of microsatellite instability following surgical resection of primary colorectal carcinomas and corresponding liver metastases

Introduction: Besides clinicopathological parameters, molecular markers can be very important, and further characterize colorectal carcinomas into chromosomally unstable, microsatellite instable and “CpG-island metylator phenotype” groups. **Aim:** To study the frequency of microsatellite instability using immunohistochemical evaluation of MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 proteins in colorectal carcinoma. **Method:** 122 colorectal carcinomas as well as in 69 paired liver metastases were evaluated. Additionally, prognostic and predictive potential of mismatch repair status was tested. **Results:** Microsatellite instable phenotype was identified in 11.5% (14/122) of the tumours. There were no differences regarding staining intensity of tumour regions. Mismatch repair status was discordant in primaries vs. metastases in 20.2%. There was no difference in progression free- and overall survival according to mismatch repair

status. The mismatch repair status was not predictive for survival within systemic therapy regimen groups. *Conclusions:* The subgroups of colorectal carcinomas could be evaluated in a larger and homogenised patient cohort to predict prognosis and response to therapy.

Keywords: colorectal cancer, liver metastasis, microsatellite instability

Ágoston, E. I., Baranyai, Zs., Dede, K., Bodoky, Gy., Kulka, J., Bursics, A., Harsányi, L., Szász, A. M. [Occurrence, intratumoral heterogeneity, prognostic and predictive potential of microsatellite instability following surgical resection of primary colorectal carcinomas and corresponding liver metastases]. *Orv. Hetil.*, 2015, 156(36), 1460–1471.

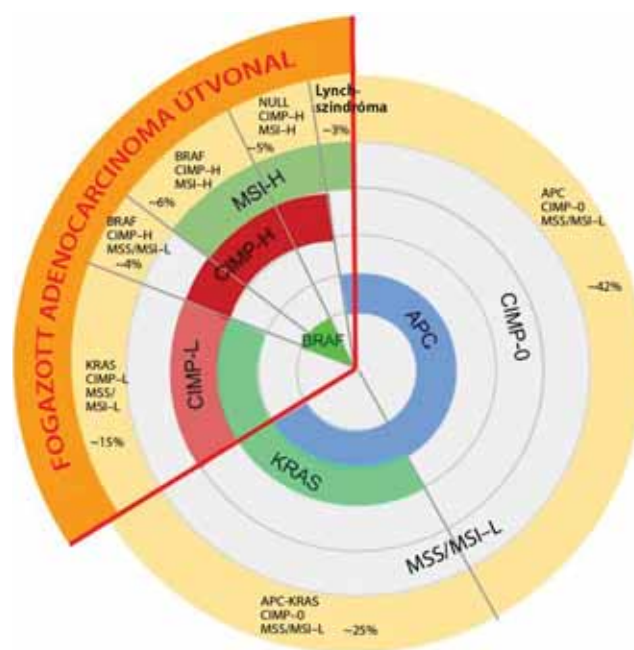
(Beérkezett: 2015. május 21.; elfogadva: 2015. június 18.)

Rövidítések

5-FU = 5-fluorouracil; CIMP = CpG-sziget-metilációs fenotípus; CIN = kromoszomális instabilitás; CRC = colorectalis carcinoma; EGFR = epidermalis növekedési faktor receptor; EMEA = European Medicines Agency; FDA U.S. = Food and Drug Administration, United States; FOLFIRI = folinsav, 5-fluorouracil, irinotecan; FOLFOX = folinsav, 5-fluorouracil, oxaliplatin; KRAS = Kirsten patkány szarkóma vírusos onkogén homológ; LV = leucovorin; mAC = módosított Astler–Coller-beosztás; MMR = mismatch repair; MLH1 = MutL homológ 1, vastagbélrák, nem polyposis típus 2; MSH2 = MutS homológ 2, vastagbélrák, nem polyposis típus 1; MSH6 = MutS homológ 6; MSI = mikroszatellita-instabilitás; PFS = progressziómentes túlélés; PMS2 = posztmeiotikus szegregációban emelkedett 2; RFS = relapsusmentes túlélés; RR = válaszarány; OS = teljes túlélés; TNM = tumorméret, nyirokcsomóstátus, távoli áttét

A colorectalis daganat világszerte az egyik leggyakoribb daganatos halálok nőkben és férfiakban egyaránt [1]. A daganatok felismerése hazánkban leggyakrabban III-as stádiumban következik be, azonban ekkor már a távoli áttétek kialakulásának veszélye a tapasztalatok szerint fokozott. Az angiogenezisgátlás mellett az epidermalis növekedési faktor receptor (EGFR-) ellenes terápia a célzott kezelések alapja metasztatikus colorectalis carcinoma esetén. A klasszikus klinikai és patológiai paraméterek (életkor, nem, lokalizáció, reszekció radikalitása, tumorméret, nyirokcsomóstátus, stádium, Dukes- és módosított Astler–Coller-beosztás) mellett a molekuláris biológia fejlődésével egyre több lehetőség nyílik a daganatos progresszió során létrejövő azon génhibák és hibás géntermékek megismerésére, amelyek a daganatok keletkezésében, növekedésében és terjedésében kulcsfontosságú szerepet játszanak. A jövő kezelési stratégiája a daganatok molekuláris genetikai sajátosságainak minél pontosabb feltérképezése, a terápiás érzékenységet, illetve a prognózist előre jelző molekulák (biomarkerek) kimutatása és ezáltal „személyre szabott terápia” meghatározása.

A vastagbél-daganatokat genetikai instabilitás jellemzi, amely geno- és fenotípusosan megnyilvánulhat több úton is, mint például a mikroszatellita-instabilitás (MSI),



1. ábra | A colorectalis daganatok háttérben feltételezett meghatározó molekuláris eltérések

kromoszomális instabilitás (CIN), illetve „CpG-island methylator phenotype” (CIMP) (1. ábra). Az egyes molekuláris eltérések bizonyos tumorokban együttesen is előfordulhatnak [2].

A mikroszatellita-instabilitás a genom instabilitásának egyik formája, amely a DNS nukleotidhibáinak felismerésére és kijavítására szolgáló mismatch repair (MMR) gének mutációja következtében jön létre [3]. A mikroszatellita-DNS-régiók 1–6 bázispárnyi szekvenciák, amelyek 8–50 kópiában ismétlődnek. Instabilitásuk a sporadikus daganatok között leggyakrabban a vastagbél daganataiban fordul elő, itt 10–15%-ban mutatható ki [4]. Ezzel szemben az örökletes MMR-diszfunkcióval járó Lynch-szindrómás betegek túlnyomó többségében ez a génhiba áll a daganat kialakulásának háttérben, közel 90%-ban [5, 6]. Az MSI-tumorokon belül a mikroszatellita-régiók érintettsége szempontjából két meghatározható csoport különül el: „MSI-high” (MSI-H,

későbbiekben MSI), amikor a mikroszatellita-régiók 30%-a vagy annál nagyobb aránya instabil, és „MSI-low” (MSI-L), amikor e régiók kevesebb mint 30%-a instabil. A mikroszatellita-régiók stabilitása esetén a tumorokat mikroszatellita-stabilnak (MSS) tekintjük. Az MSI-H-daganatok klinikai, patológiai és molekuláris jellemzői sporadikus vagy familiáris eredettől függetlenül különböznek az MSI-L- és MSS-daganatoktól [7]. Az MSI-tumorok MSS-tumorokhoz viszonyítva kevésbé agresszívek és jobb prognózisúak [8, 9], obes betegekben ritkábban [10], míg nőkben gyakrabban fordulnak elő [11]. Az MSI-tumorok a flexura lienalistól inkább proximálisan helyezkednek el [9], sokszor alacsonyán differenciáltak [12], mucinosus [9] és kevert szövettani típusúak, és jellegzetes peri- és intratumoralis lymphoid sejtes infiltrációt mutatnak [13, 14]. CD8+ lymphocytapopuláció jelenléte pozitív korrelációt mutat MSI-fenotípust kifejező tumorokkal, és egyes eredmények szerint hozzájárulhat a jobb prognózishoz [15]. Afroamerikai populációban az MSI-CRC gyakorisága hozzávetőleg fele a kaukázusi populációban találtak, továbbá hiányzik a jellegzetes intraepithelialis CD8+ T-lymphocytainfiltráció is, amely összefüggésben lehet e csoport rosszabb prognózisával ezen betegekben [15]. A III-as stádiumú és magas rizikójú II-es stádiumú colorectalis daganatok sebészi reszekciót követő adjuváns kemoterápiája 5-FU-alapú, amely a betegek túlélési esélyeit átlagosan 10–20%-kal javítja [16]. Az irodalmi adatok még ellentmondásosak az MSI-daganatok optimális adjuváns kezelésének megválasztását illetően. A különböző vizsgálati eredmények alapján egyre inkább elfogadott, hogy II-es és valószínűleg a III-as stádiumú MSI vastagbélrákos betegek nem profitálnak az 5-FU-alapú kemoterápiából. Az elégtelen hibajavító rendszer mellett az 5-FU-alapú adjuváns kemoterápia nem javítja a betegségmentes (RFS) vagy teljes túlélést (OS) [17], sőt csökkentheti is az RFS-t és az OS-t [18, 19].

Vizsgálatunkban az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

1. Milyen gyakori az MSI progrediáló vastagbél-daganatos betegek sebészeti mintáiban immunhisztokémiai meghatározás alapján?
2. Az MMR-markerek kifejeződésüket tekintve a primer tumorok különböző régióiban és a nyirokcsomó-metasztázisokban mutatnak-e eltérést?
3. Lévéen az MSI-tumorok irodalmi adatok alapján kevésbé agresszívek, a primer tumorok és sebészileg reszekált májjáttétek MMR-státusa megegyezik-e?
4. Beteganyagunkban milyen a rendelkezésre álló klinikopatológiai faktorok prediktív potenciálja?
5. Az MMR-státus prognosztikus-e betegek betegségmentes és teljes túlélését tekintve a sebészi reszekciót követően?
6. Az MMR-státusnak van-e prediktív értéke az 5-FU-alapú (oxaliplatint vagy irinotecant is tartalmazó) vagy a célzott biológiai kezeléssel kiegészített (bevacizumab

vagy cetuximab, vagy panitumumab) kemoterápiás kezeléseket esetén?

7. A II-es és III-as stádiumú MSI vastagbél-daganatok 5-FU-alapú kezelésre eltérően reagálnak-e, illetve a II-es stádiumú betegek kimenetele 5-FU-kezelés után kedvezőtlenül alakul-e azonos stádiumú MSS-tumorokhoz viszonyítva?

Betegek és módszer

A vizsgálatba 122 beteget vontunk be a regionális kutatási etikai bizottság jóváhagyásával (IKEB #207/11). A Semmelweis Egyetem (SE) I. Sebészeti Klinikáján került műtetre 89 beteg, tumoraik feldolgozása és a KRAS-státus meghatározása az SE II. Patológiai Intézetben történt. A posztoperatív onkológiai kezelés az Egyesített Szt. István és Szt. László Kórház Onkológiai Osztályán zajlott. 33 beteg cetuximab-, 21 beteg bevacizumab- és 2 beteg panitumumabkezelést is kapott a kemoterápia mellett első, második és többedik vonalban. Az előrehaladott (idővel metasztázist képző) tumorok között 61 KRAS vad típusú mellett 28 KRAS-mutáns szerepelt. 69 beteg esetében vizsgáltuk párosított távoli áttéteiket is, mert a májmetasztázisukat is ugyanazon intézetben távolították el (SE I. Sebészeti Klinika). Kontrollcsoportként 33 beteget vizsgáltunk, akik az Uzsoki Utcai Kórház Sebészeti-Onkosebészeti Osztályán kerültek operációra, és minimum 5 éves betegségmentes túlélők, valamint ezen idő alatt nem alakult ki náluk sem lokális relapsus, sem távoli áttét (KRAS-, illetve BRAF-státusukat nem ismertük).

A betegek formalinban fixált és paraffinba ágyazott (FFPE) mintáiból szöveti multiblokkot (TMA) készítettünk (Tissue Microarray Builder, Hisztopatológia Kft., Pécs). Minden daganatból 2, esetenként 3 darab 2 mm átmérőjű részletet vizsgáltunk (összesen 265 hengert). Immunhisztokémiai eljárással Ventana Benchmark XT automatában a mikroszatellita-instabilitás jellemzésére MLH1-, MSH2-, MSH6- és PMS2-reakciót végeztünk. Az alkalmazott antitesteket az 1. táblázat részletezi. A metszeteket Panoramic 250beta metszetszkennel segítségével digitalizáltuk, és Panoramic Viewer 1.15.2 TMA modul segítségével értékeltük az alábbi séma szerint: intenzitás (0–3), frekvencia (0–5) (3DHitech Kft., Budapest). A statisztikai értékelést SPSS 17.0 szoftverrel végeztük (SPSS Inc., Chicago, IL, Amerikai Egyesült Államok). A nemparametrikus változókat Fisher-féle eg-

1. táblázat | A vizsgálatban alkalmazott elsődleges antitestek és részleteik

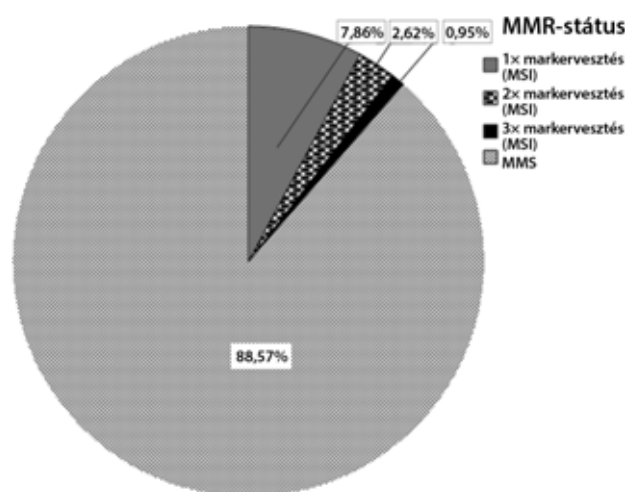
Antitest	Klón	Azonosító	Gyártó	Program	Hígítás
MLH1	G168-728	760-4264	Ventana	864	Ready-to-use
MSH2	G219-1129	760-4265	Ventana	880	Ready-to-use
MSH6		790-4455	Ventana	866	Ready-to-use
PMS2	EPR3947	760-4531	Ventana	879	Ready-to-use

zakt teszttel hasonlítottuk össze. A prognosztikus és prediktív vizsgálatokat Kaplan–Meier-analízissel végeztük, amelyhez log-rank statisztikai támogatást alkalmaztunk.

Eredmények

Az MSI-tumorok gyakorisága immunhisztokémiai meghatározás alapján

14 tumor mutatott MSI-fenotípust: egyszeres marker-vesztést mutatott az összes tumor 7,8%-a, kétszerest 2,6% és háromszorost 0,9% a 122 daganatból. A daganatok 88,5%-a (108/122) valamilyen mértékben mind a négy markert kifejezte (2. ábra).



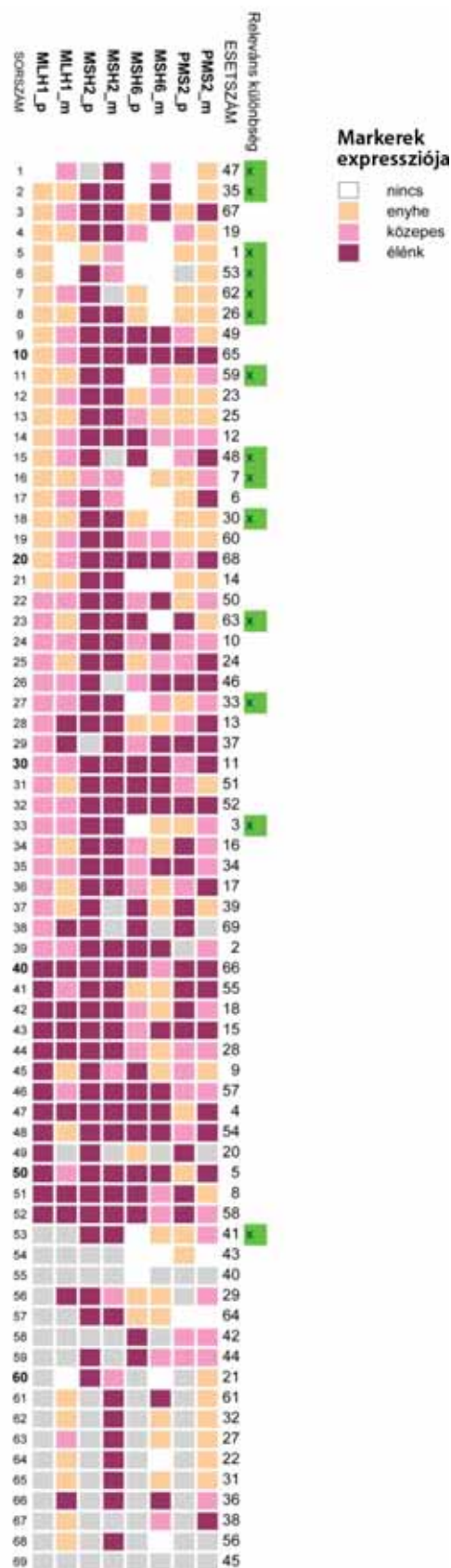
2. ábra | A tumorok megoszlása az MSI-státusz szerint: 88,5% MSS és 11,5% MSI

Az MSI-markerek kifejeződése a primer tumorok különböző régióiban és nyirokcsomó-metasztázisokban

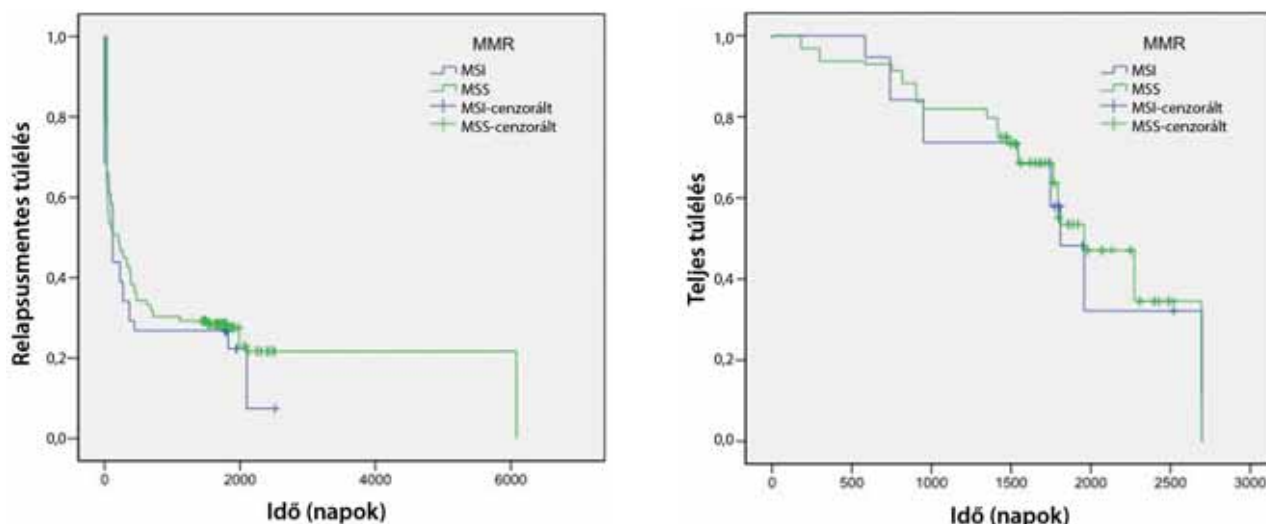
56 beteg sebészeti mintáiban vizsgáltuk részletesen a primer colorectalis tumor különböző régióit. A normál colon, normál tumor határ, a daganat fő tömege, az invazív front és az esetleges nyirokcsomóáttétben elhelyezkedő daganatos területeket összesen 265 régióban tudtuk elemezni (2. táblázat). Az MSI-markerek kifejeződésében intenzitásbeli különbségek ugyan látszóttak, de a rele-

2. táblázat | A tumorok egyes régióiban (n = 265) kifejeződő markerek alapján az MSI-státusz állandónak bizonyult (p = 0,873)

	Normál	Tumor-határ	Fő tumor-tömeg	Invazív front	Nyirokcsomó
MSS	42	41	79	67	17
MSI	1	3	6	6	1
Összesen	43	44	85	73	18



3. ábra | A primer tumorok (MARKER_p) és metasztázisai (MARKER_m) összehasonlítása az egyes markerek tekintetében. A színskála intenzitásától függően a markerek expressziója nő, fehér szín jelzi a marker kiesését. Jobb oldalon külön sorban jelöltük a releváns különbségeket mutató betegeket



4. ábra | Az MSI- és MSS-tumork relapsusmentes (bal) és teljes (jobb) túlélése között nem volt jelentős különbség

váns különbségek (az adott marker egyértelmű eltűnése/megjelenése) statisztikai értékelése során nem volt különbség az egyes területek között az egyes tumork különböző régióinak, illetve ezek és a nyirokcsomóáttétek összehasonlításában ($p = 0,873$).

A primer tumorok és májajttétek MSI-státusának összevetése

69 beteg esetében vizsgáltuk a primer tumor és a hozzá tartozó májajttét MSI-státusát. Ebben a vizsgálatban is az

3. táblázat | A prognosztikus vizsgálatba bevont betegek ($n = 122$) klinikopatológiai tulajdonságai

Nem	Férfi	68
	Nő	54
Életkor (Átlag \pm SD)		68,3 \pm 10,7
Grade	1	3
	2	78
	3	24
	Nem ismert	13
	Dukes	A
	B	37
	C	51
	D	21
	Nem ismert	3
Stádium	1	11
	2	36
	3	50
	4	21
	Nem ismert	4

adott marker egyértelmű eltűnése vagy megjelenése került statisztikai elemzésre. 14 (20,2%) esetben releváns különbséget igazoltunk, amely alapján a primer tumor és a metasztázis más MMR-státusba volt sorolható (3. ábra).

Klinikopatológiai faktorok és prediktív potenciáljuk

A vizsgált betegek és tumoraik klinikopatológiai jellemzőit a 3. táblázat mutatja. A relapsusmentes túlélés (RFS) tekintetében a Dukes beosztás/stádium egyaránt jelentős előrejelző képességgel rendelkezett ($p = 0,001$). Az egyes faktorok az OS tekintetében leginkább tendenciát mutattak, de a stádium jelentős prognosztikus potenciált mutatott ($p = 0,009$). A lokalizáció (bal vagy jobb colonfél) tekintetében megállapítható volt, hogy az RFS ($p = 0,275$), PFS ($p = 0,072$) és OS ($p = 0,227$) tekintetében is csak tendencia érvényesül, amely szerint a legkedvezőbb kimenetellel a balcolonfél-tumorral rendelkező betegek rendelkeztek, őket követték a rectum-, majd a jobbcolonfél-daganatos betegek. A daganatok lokalizációját és sebészi kezelését illetően nem mutatkozott jelentős túlélésbeli különbség: RFS ($p = 0,257$) és OS ($p = 0,765$).

Az MSI-státus prognosztikus értéke a relapsusmentes és teljes túlélést tekintve a sebészi reszekciót követően

A 122 betegnél az RFS és OS tekintetében az MMR-státus vizsgálatunkban nem volt prognosztikus ($p/RFS = 0,437$, $p/OS = 0,907$) (4. ábra).

4. táblázat | A betegek MMR-státus alapján az alábbi kezelési összetevőket kapták

		MSI		Összes
		Nem	Igen	
5-FU	Nem	26	4	30
	Igen	57	10	67
Összes		83	14	97

		MSI		Összes
		Nem	Igen	
Oxaliplatin	Nem	40	4	44
	Igen	43	10	53
Összes		83	14	97

		MSI		Összes
		Nem	Igen	
Irinotecan	Nem	52	6	58
	Igen	31	8	39
Összes		83	14	97

		MSI		Összes
		Nem	Igen	
Bevacizumab	Nem	55	11	66
	Igen	28	3	31
Összes		83	14	97

		MSI		Összes
		Nem	Igen	
Cetuximab	Nem	67	6	73
	Igen	16	8	24
Összes		83	14	97

		MSI		Összes
		Nem	Igen	
Panitumumab	Nem	79	10	89
	Igen	4	4	8
Összes		83	14	97

Az MSI-státus prediktív potenciálja az adott szisztémás kezelésre

97 betegnél vizsgáltuk a posztoperatív kezelés és a molekuláris eredmények összefüggéseit (4. táblázat). A teljes túlélést vizsgálva az 5-FU-tartalmú kezeléseken az MSI-státus nem volt prediktív ($p = 0,968$), és hasonló eredményeket kaptunk az oxaliplatin ($p = 0,936$), az irinotecan ($p = 0,609$), a bevacizumab ($p = 0,561$), a cetuximab ($p = 0,755$), a panitumumab ($p = 0,617$) esetében is (5. ábra). A progressziómentes túlélés tekintetében az oxaliplatin- ($p = 0,897$), irinotecan- ($p = 0,961$), bevaci-

zumab- ($p = 0,946$), cetuximab- ($p = 0,910$), panitumumab- ($p = 0,951$) kezelésre sem volt az MSI-státus prediktív (6. ábra).

A II-es és III-as stádiumú MSI vastagbél-daganatok 5-FU-alapú kezelésre adott válasza

A vizsgálatokat elvégeztük külön a II-es és III-as stádiumú betegeinkben, arra a kérdésre keresve a választ, hogy az MSI vastagbél-daganatok 5-FU-alapú kezelésre ezen stádiumokban eltérően reagálnak-e, illetve a II-es stádiumú betegek esélye 5-FU-kezelés után kedvezőtlenül alakul-e. Mindössze 12 II-es stádiumú tumoros beteget tudtunk bevonni a vizsgálatba, akik 5-FU-alapú kezelést is kaptak. Ezen vizsgálatunkban sem a relapsusmentes, sem a teljes túlélés tekintetében nem tudtunk statisztikai különbséget kimutatni (7. A és B ábra). Hasonlóan alakultak az eredmények, amikor a 35 III-as stádiumú esetet elemeztük (7. C és D ábra).

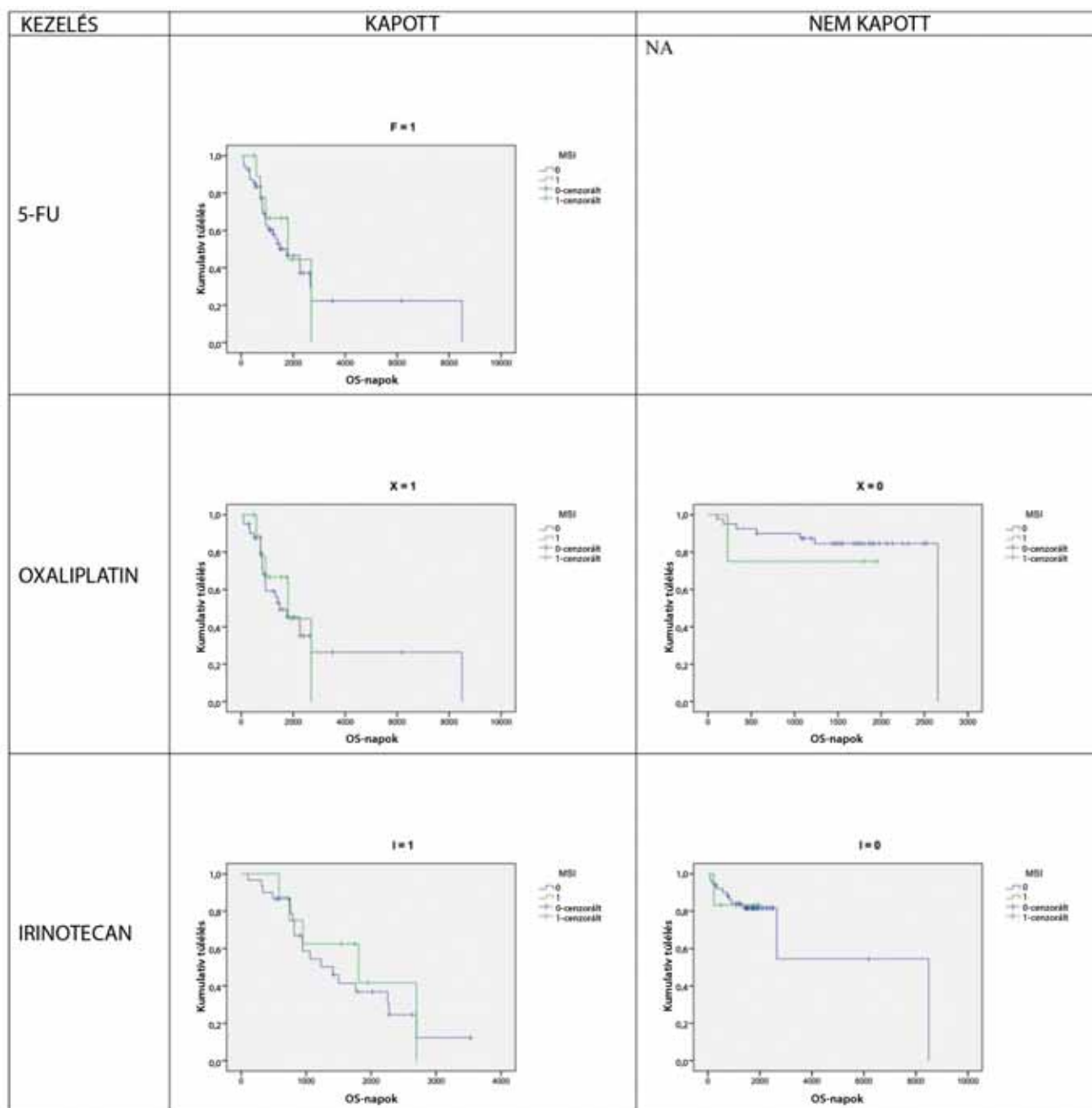
Megbeszélés

A daganatok klasszikus klinikopatológiai változói közül ma is releváns információk nyerhetők a betegek várható túlélésének megítélésére. Az egyes kezelési csoportokban azonban – vélhetően a terápia hatásossága következtében – már a daganatok biológiai viselkedését tükröző rutinfaktorok működése árnyalódik. A colorectalis daganat genetikai heterogenitásának feltérképezése – mind etiológiáját, mind pedig az adjuváns terápiára adott választ illetően is – számos vizsgálat tárgyát képezi. A megbízható prognosztikus faktorok meghatározására kiterjesztett, igen nagyszámú beteganyag vagy szoros klinikai vizsgálat keretein belül nyílhat optimális lehetőség. Az MMR-rendszer jelentősége régóta ismert, mint a colorectalis carcinogenesis egyik fontos mechanizmusa [20]. Az MMR-gének öröklött mutációja HNPCC-szindróma (Lynch-szindróma) néven ismert, az érintett egyéneknél kialakuló daganatok többnyire jellegzetes lokalizációt és szöveti képet mutatnak [21, 22]. Ugyancsak ismert, hogy ezen daganatok prognózisa is eltér (általában kedvezőbb) a hasonló lokalizációjú és stádiumú sporadikus daganatokétól [23]. Az MMR-rendszer meghibásodása sporadikus vastagbél-daganatokban is bekövetkezhet, az irodalmi adatok szerint sporadikus mikroszatellita-instabilitás a vastagbélrákok körülbelül 15%-ában mutatható ki [4]. Munkánkban 122, vastagbélrákban szenvedő beteg sebészeti mintáit dolgoztuk fel, és tudomásunk szerint korábban részben még nem vizsgált kérdésekre is válaszokat kerestünk. A primer daganatok különböző területeit és esetleges nyirokcsomóáttéteit (56 beteg) és primer tumorokhoz párosított reszekált májattéteket (69 beteg) vizsgáltunk MSI-t jelző fehérjék (MLH1, MSH2, MSH6, PMS) expressziója szempontjából annak tisztázására, hogy kimutatható-e intratumoralis, illetve a pri-

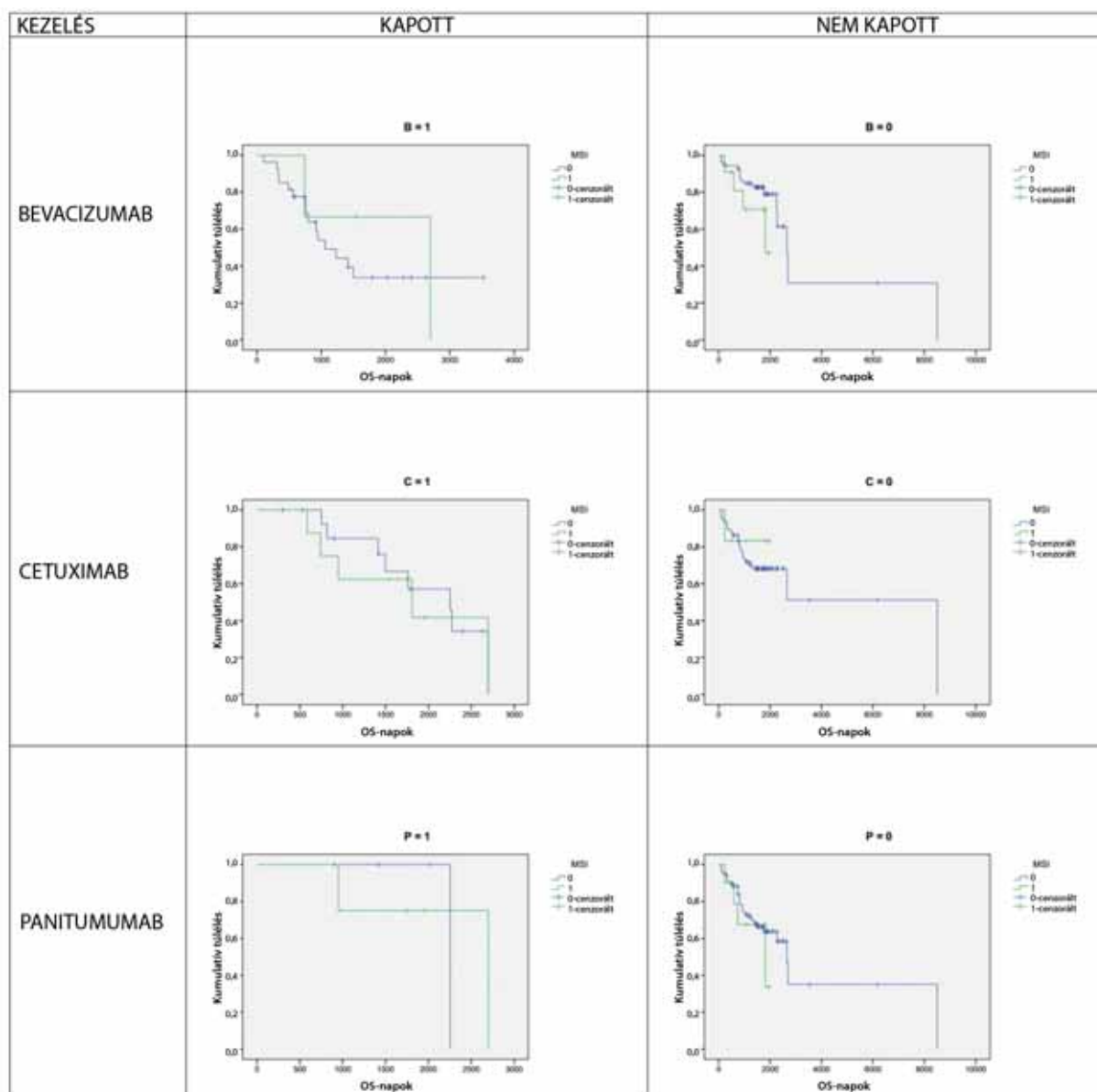
mer daganat–metasztázis párok esetén egy betegen belül heterogenitás ezen fehérjék kifejeződésében. Beteganyagunkban 14 tumor (11,4%) mutatott MSI-fenotípust, amely arány az irodalmi adatokkal összhangban van [24]. A tumor régiók elemzése során a normál colon, normál tumor határ, a daganat fő tömege, az invazív front és az esetleges nyirokcsomóáttétben elhelyezkedő daganatos területek MSI-marker-kifejeződésében intenzitásbeli különbségek látszóttak, de nem volt statisztikailag jelentős eltérés az egyes területek között, valamint a primer tumorok és nyirokcsomóáttétek között. A szakirodalomban idáig kevés olyan tanulmányt találtunk, amely hozzánk hasonló kérdést vizsgált colorectalis [25,

26] vagy más carcinomában [27]. A mintavétel szempontjából megállapíthatjuk, hogy az MSI-státus a colorectalis tumor bármely területéről származó anyagból meghatározható.

Egyelőre egyértelmű összefüggés nem vonható le arra vonatkozóan, hogy a mikroszatellita-instabilitás a tumorigenezis korai vagy késői szakaszára tehető, illetve hogy lenne-e egy meghatározott génmutációs kaszkád az MSI colorectalis daganatok carcinogenesis során. Ezen eltérések véletlenszerű halmozódása feltételezhető, amelynek háttérében egy „mutator fenotípus” állhat [26]. A primer tumorokat májáttéteikkel összevetve 20,2%-ban volt olyan különbség a daganatokban, amely



5. ábra | Kezelés szerinti prediktív összehasonlítások az MMR-státustól függően



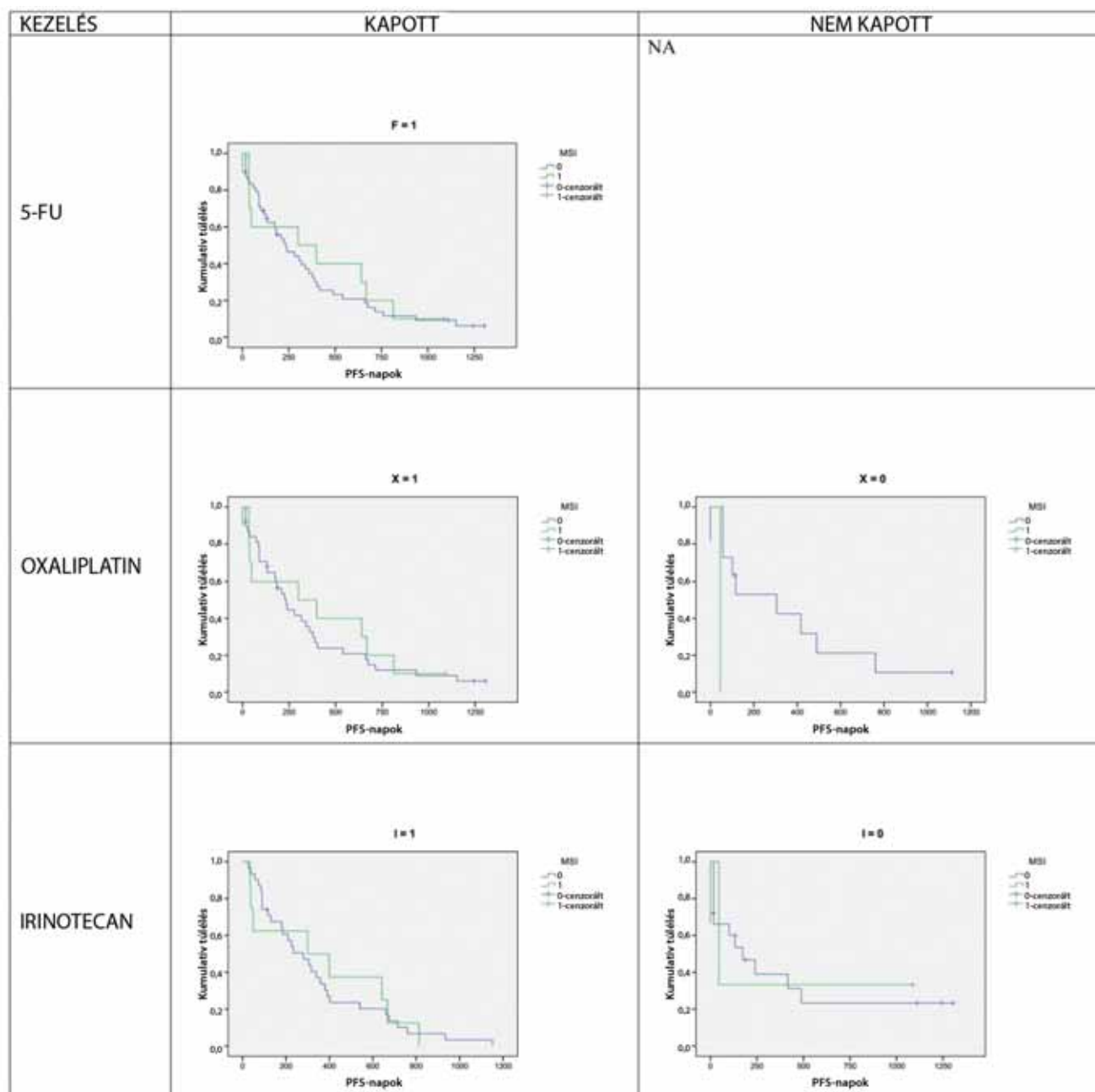
5. ábra (folyt.)

a primer tumort a metasztázisához képest más MMR-státusba sorolta. A tumoros progresszió során a primer tumortól a májmetasztázisig bekövetkező MMR-státusváltozásról eltérő vizsgálati eredmények születtek. Egyesek nagyobb arányban találtak MSI-t a primer tumorban [28, 29, 30], míg mások a hozzá tartozó májattétben [31]. Ezt az eltérést több ok is magyarázhatja. Egyrészt technikai (fixálási faktorokból és festési eljárásból adódó) hiba vagy a vizsgált mikroszatellita-locusok különbözősége [31]; lehet valódi biológiai jelenség: a tumoros progresszió során fokozódó genetikai instabilitás és a metasztázisképződés során bekövetkező klonális szelekció [32, 33]; ezenkívül más, még feltáratlan okok is állhatnak a háttérben. A mi vizsgálatunkban a primer tumorok és májmetasztázisaik között észlelt eltérést nem technikai okokra vezetjük vissza, megfelelő pozitív és negatív kontrollok alkalmazása mellett a TMA-eljárás al-

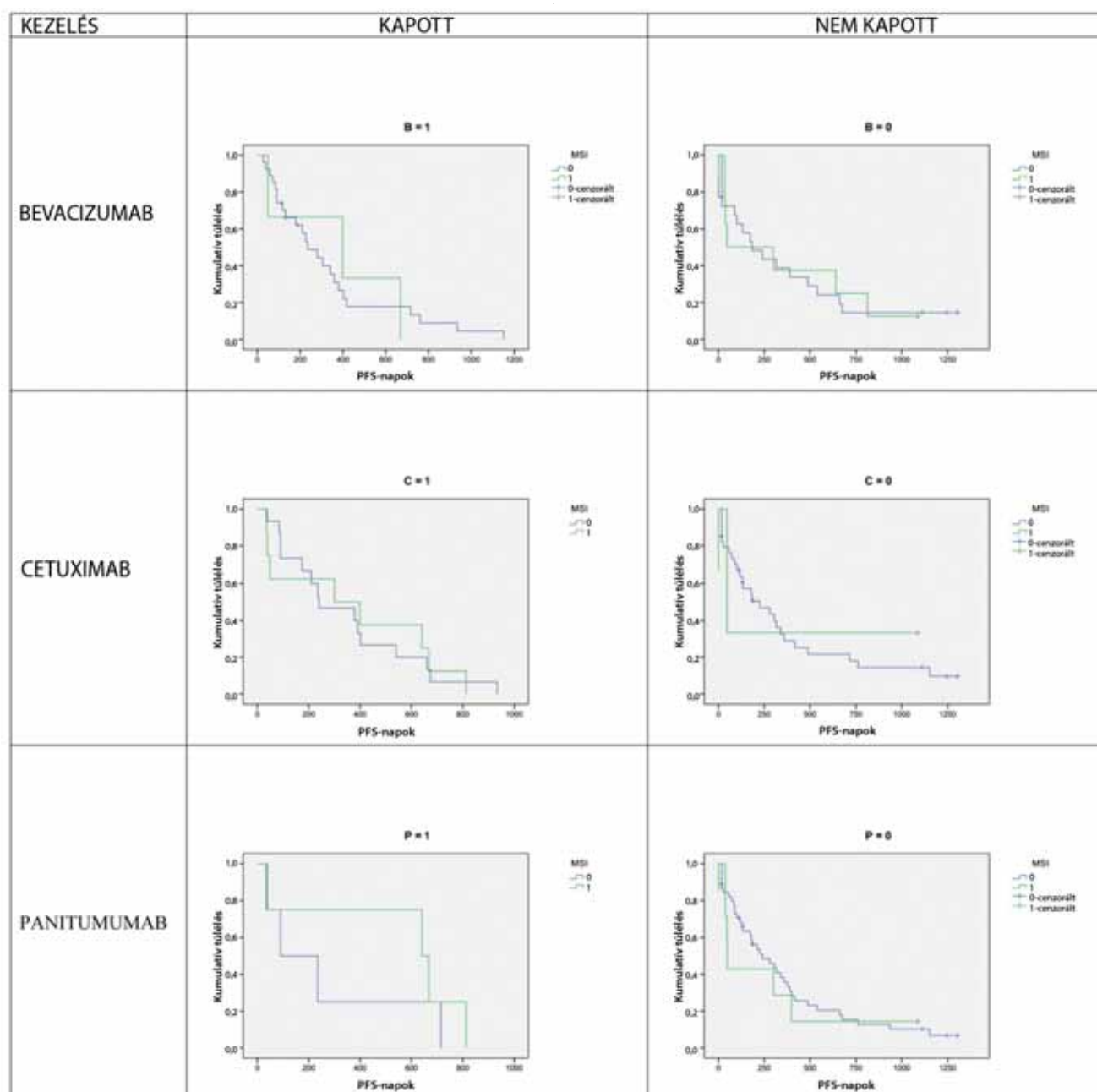
kalmazását megbízhatónak tartjuk [34]. A technikai hiba lehetősége ellen szól a standardizált, automatizált immunhisztokémiai technika is, amelyet tanulmányunkban alkalmaztunk. A sporadikus MSI prognosztikai jelentőségéről vastagbélrákban az elmúlt években jelentek meg kisebb-nagyobb tanulmányok, többségükben arra a következtetésre jutva, hogy a hibás MMR-státus jobb prognózist jelent a DFS és OS tekintetében a mikroszatellita-stabil tumorokhoz viszonyítva [8, 35, 36, 37, 38]. Ezzel az általunk kapott eredmények nincsenek összhangban. A 122 követési adattal rendelkező betegünk relapsusmentes és teljes túlélését elemezve az MSI-státus nem bizonyult prognosztikus jelentőségűnek. Klinikai szempontból nagyon fontos kérdés és az irodalomban is sokat vitatott, hogy az MSI-státus befolyásolja-e, és ha igen, hogyan az adjuvánsan kezelt vastagbélrákos betegek betegségmentes és ösztúlélését. A legtöbb közle-

mény a leggyakrabban alkalmazott 5-FU és az MSI-státus összefüggésével foglalkozik [39]. Egyes vizsgálatok szerint MSI-tumorkok fokozottan szenzitívek 5-FU-kezelésre [40, 41, 42], míg mások nem tapasztaltak terápiás válaszkülönbséget az MMR-státus függvényében [43]. Az elmúlt évek vizsgálati eredményei alapján egyre inkább elfogadottnak látszik, hogy a II-es és III-as stádiumú MSI vastagbélrákos betegek nem profitálnak az 5-FU-alapú kemoterápiából [17], viszont II-es stádiumú MSI colorectalis tumorok adjuváns 5-FU-kezelés mellett is fenntartják a jobb RFS-t és OS-t az MSS-tumorokhoz viszonyítva [44]. Néhány vizsgálat eredménye alapján azonban II-es és III-as stádiumú colorectalis carcinomás

betegek MMR-státusát szükséges lenne meghatározni, mert az adjuvánsan adott 5-FU a pT₃N₀ stádiumú MSI-daganatos betegekben ronthatja a betegségmentes és teljes túlélést [18, 19]. Kilencvenhét betegünk esetében, ahol az onkológiai kezelés pontos adatai rendelkezésünkre álltak, azt tapasztaltuk, hogy sem a relapsusmentes, sem a teljes, sem a progressziómentes túléléshez viszonyítva nem volt prediktív az MMR-státus sem az 5-FU-, sem az oxaliplatin-, sem az irinotecan-, sem pedig a legújabb biológiai terápiák (bevacizumab, cetuximab, panitumumab) vonatkozásában. A mi elemzéseinkben az 5-FU-kezelt stage II és stage III esetekben sem tudtunk statisztikailag jelentős különbséget kimutatni az



6. ábra | Kezelés szerinti prediktív összehasonlítások az MMR-státustól függően



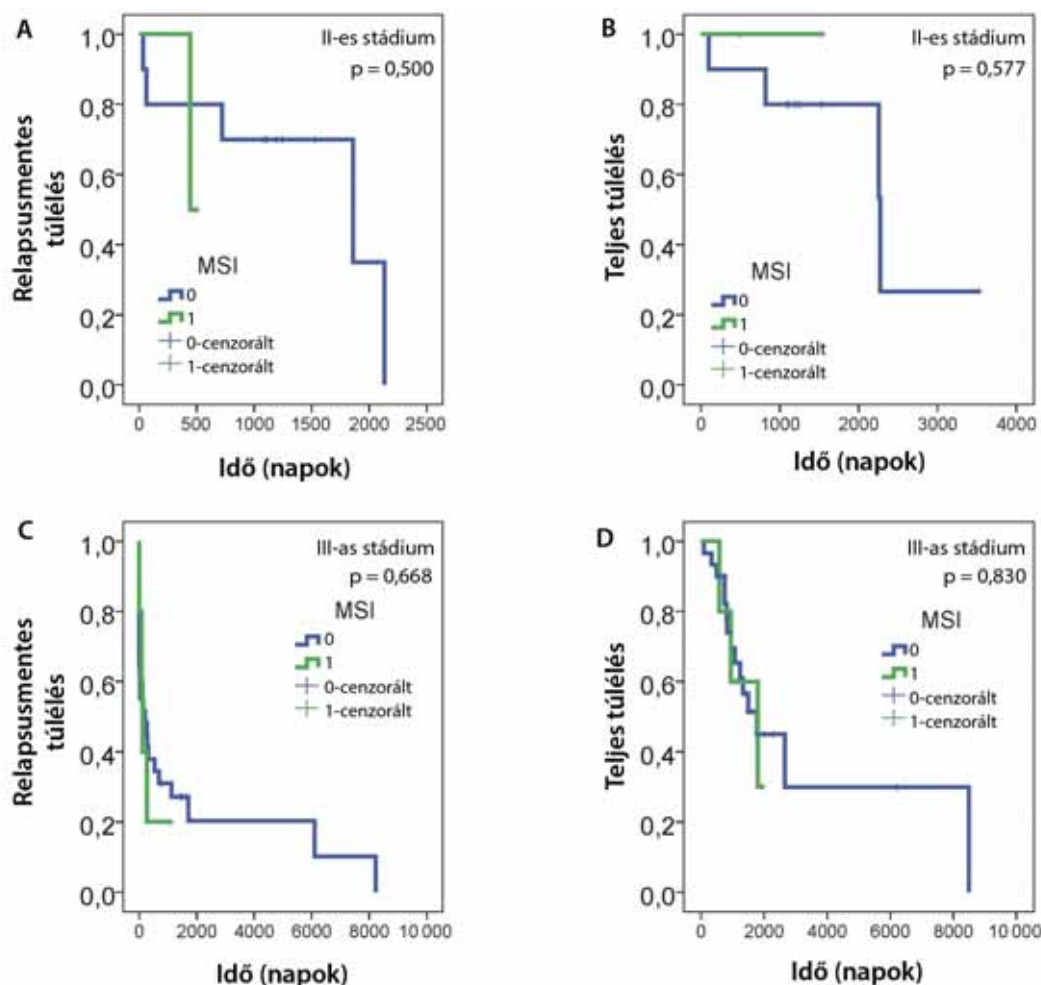
6. ábra (folyt.)

MSI- és MSS-tumorkok között. Hozzá kell tennünk azonban, hogy a multimodális terápia és a több vonalban alkalmazott kombinált szerek alapján nem tudunk klinikai vizsgálatnak megfelelő homogén betegcsoportokat kialakítani felmérésünkhöz.

Vélhetően nagyobb elemszámú vizsgálatban komplex jelátviteli útvonalakban szereplő molekulák expressziója alapján felállított alcsoportok elemzésével a statisztikai erő növekedhet. Olyan patobiológiai faktorok, mint a BRAF-mutáció, alapvető szerepet játszanak az MSI-tumorkok kórlefordulásában [45] és a kezelésre adott válasznak előrejelzésében [46], ezért vizsgálatunkat a betegszám növelése mellett többek között ezen mutáció elemzésével is ki szeretnénk egészíteni.

Anyagi támogatás: A kutatás a TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 azonosítószámú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Szerzői munkamegosztás: Á. E. I.: A betegek utánkövetési adatainak gyűjtése és rendezése, szövetminták összegyűjtése, szöveti multiblokkok készítése, immunhisztokémiai reakciók értékelése, a kézirat megírása és szerkesztése. B. Zs., K. J., H. L.: A laboratórium biztosítása, kézirat megírása és szerkesztése. D. K., B. A.:



7. ábra | Az MSI- és MSS-daganatok a stádium és 5-FU-kezelés tükrében

A betegek utánkövetési adatainak biztosítása. B. Gy.: A betegek posztoperatív kezelése és követése, utánkövetési adatok biztosítása. B. Zs., K. J., H. L.: A laboratóriumi biztosítása, kézirat megírása és szerkesztése. Sz. A. M.: A vizsgálat megtervezése és koordinálása, a szövetszövetminták és az értékelt IHC ellenőrzése, statisztikai analízis, a kézirat megírása és szerkesztése. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekeltségek: A szerzőknek nincsenek érdekeltségeik

Köszönetnyilvánítás

Köszönet illeti *Azumab Erzsébetet* a szövetszövetminták feldolgozásában végzett segítőképző munkájáért.

Irodalom

- [1] *Tusnady, G., Gaudi, I., Rejtő, L., et al.*: Survival chances of Hungarian cancer patients in the National Cancer Registry. [A magyar daganatos betegek túlélési esélye a nemzeti rákregiszter adatai alapján.] *Magy. Onkol.*, 2008, 52(4), 339–349. [Hungarian]
- [2] *Goel, A., Arnold, C. N., Niedzwiecki, D., et al.*: Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res.*, 2003, 63(7), 1608–1614.
- [3] *Liefers, G. J., Tollenaar, R. A.*: Cancer genetics and their application to individualised medicine. *Eur. J. Cancer*, 2002, 38(7), 872–879.
- [4] *Konishi, M., Kikuchi-Yanosita, R., Tanaka, K., et al.*: Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology*, 1996, 111(2), 307–317.
- [5] *Aaltonen, L. A., Peltomäki, P., Leach, F. S., et al.*: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, 1993, 260(5109), 812–816.
- [6] *Kouraklis, G., Misiakos, E. P.*: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): criteria for identification and management. *Dig. Dis. Sci.*, 2005, 50(2), 336–344.
- [7] *Yamamoto, H., Imai, K.*: Microsatellite instability: an update. *Arch. Toxicol.*, 2015, 89(6), 899–921.
- [8] *Popat, S., Hubner, R., Houlston, R. S.*: Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J. Clin. Oncol.*, 2005, 23(3), 609–618.
- [9] *Bubb, V. J., Curtis, L. J., Cunningham, C., et al.*: Microsatellite instability and the role of hMSH2 in sporadic colorectal cancer. *Oncogene*, 1996, 12(12), 2641–2649.
- [10] *Simicrpe, F. A., Foster, N. R., Yoon, H. H., et al.*: Association of obesity with DNA mismatch repair status and clinical outcome in

- patients with stage II or III colon carcinoma participating in NCCTG and NSABP adjuvant chemotherapy trials. *J. Clin. Oncol.*, 2012, 30(4), 406–412.
- [11] Cicek, M. S., Lindor, N. M., Gallinger, S., et al.: Quality assessment and correlation of microsatellite instability and immunohistochemical markers among population- and clinic-based colorectal tumors results from the Colon Cancer Family Registry. *J. Mol. Diagn.*, 2011, 13(3), 271–281.
- [12] Kim, H., Jen, J., Vogelstein, B., et al.: Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am. J. Pathol.*, 1994, 145(1), 148–156.
- [13] Tejpar, S.: The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. The use of molecular markers in the diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2007, 21(6), 1071–1087.
- [14] Gafa, R., Maestri, I., Matteuzzi, M., et al.: Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer*, 2000, 89(10), 2025–2037.
- [15] Carethers, J. M., Murali, B., Yang, B., et al.: Influence of race on microsatellite instability and CD8+ T cell infiltration in colon cancer. *PLoS ONE*, 2014, 9(6), e100461.
- [16] Cascinu, S., Georgoulas, V., Kerr, D., et al.: Colorectal cancer in the adjuvant setting: perspectives on treatment and the role of prognostic factors. *Ann. Oncol.*, 2003, 14 (Suppl. 2), ii25–ii29.
- [17] Sargent, D. J., Marsoni, S., Monges, G., et al.: Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2010, 28(20), 3219–3226.
- [18] Ribic, C. M., Sargent, D. J., Moore, M. J., et al.: Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 349(3), 247–257.
- [19] Donada, M., Bonin, S., Barbazza, R., et al.: Management of stage II colon cancer – the use of molecular biomarkers for adjuvant therapy decision. *BMC Gastroenterol.*, 2013, 13, 36.
- [20] Boland, C. R., Goel, A.: Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 2010, 138(6), 2073–2087. e3.
- [21] Lynch, H. T., Lynch, J. F., Lynch, P. M., et al.: Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam. Cancer*, 2008, 7(1), 27–39.
- [22] Lynch, H. T., Smyrk, T. C., Watson, P., et al.: Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology*, 1993, 104(5), 1535–1549.
- [23] Gryfe, R., Kim, H., Hsieh, E. T., et al.: Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2000, 342(2), 69–77.
- [24] Al-Sohaily, S., Biankin, A., Leong, R., et al.: Molecular pathways in colorectal cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2012, 27(9), 1423–1431.
- [25] Abdel-Rahman, W. M., Georgiades, I. B., Curtis, L. J., et al.: Role of BAX mutations in mismatch repair-deficient colorectal carcinogenesis. *Oncogene*, 1999, 18(12), 2139–2142.
- [26] Barnetson, R., Jass, J., Tse, R., et al.: Mutations associated with microsatellite unstable colorectal carcinomas exhibit widespread intratumoral heterogeneity. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000, 29(2), 130–136.
- [27] Chung, Y. J., Park, S. W., Song, J. M., et al.: Evidence of genetic progression in human gastric carcinomas with microsatellite instability. *Oncogene*, 1997, 15(14), 1719–1726.
- [28] Ishimaru, G., Adachi, J., Shiseki, M., et al.: Microsatellite instability in primary and metastatic colorectal cancers. *Int. J. Cancer*, 1995, 64(3), 153–157.
- [29] Blaker, H., Graf, M., Rieker, R. J., et al.: Comparison of losses of heterozygosity and replication errors in primary colorectal carcinomas and corresponding liver metastases. *J. Pathol.*, 1999, 188(3), 258–262.
- [30] Barnetson, R., Eckstein, R., Robinson, B., et al.: There is no increase in frequency of somatic mutations in metastases compared with primary colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Genes Chromosomes Cancer*, 2003, 38(2), 149–156.
- [31] Chen, W. S., Chen, J. Y., Liu, J. M., et al.: Microsatellite instability in sporadic-colon-cancer patients with and without liver metastases. *Int. J. Cancer*, 1997, 74(4), 470–474.
- [32] Chong, J. M., Fukayama, M., Hayashi, T., et al.: Microsatellite instability in the progression of gastric carcinoma. *Cancer Res.*, 1994, 54(17), 4595–4597.
- [33] Merlo, A., Mabry, M., Gabrielson, E., et al.: Frequent microsatellite instability in primary small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 1994, 54(8), 2098–2101.
- [34] McConechy, M. K., Talhouk, A., Li-Chang, H. H., et al.: Detection of DNA mismatch repair (MMR) deficiencies by immunohistochemistry can effectively diagnose the microsatellite instability (MSI) phenotype in endometrial carcinomas. *Gynecol. Oncol.*, 2015, 137(2), 306–310.
- [35] Korphaisarn, K., Pongpaibul, A., Limwongse, C., et al.: Deficient DNA mismatch repair is associated with favorable prognosis in Thai patients with sporadic colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.*, 2015, 21(3), 926–934.
- [36] Hong, S. P., Min, B. S., Kim, T. I., et al.: The differential impact of microsatellite instability as a marker of prognosis and tumour response between colon cancer and rectal cancer. *Eur. J. Cancer*, 2012, 48(8), 1235–1243.
- [37] Roth, A. D., Delorenzi, M., Tejpar, S., et al.: Integrated analysis of molecular and clinical prognostic factors in stage II/III colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2012, 104(21), 1635–1646.
- [38] Merok, M. A., Ahlquist, T., Røyrvik, E. C., et al.: Microsatellite instability has a positive prognostic impact on stage II colorectal cancer after complete resection: results from a large, consecutive Norwegian series. *Ann. Oncol.*, 2013, 24(5), 1274–1282.
- [39] Des Guetz, G., Schischmanoff, O., Nicolas, P., et al.: Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *Eur. J. Cancer*, 2009, 45(10), 1890–1896.
- [40] Elsaleh, H., Joseph, D., Griew, F., et al.: Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet*, 2000, 355(9217), 1745–1750.
- [41] Hemminki, A., Mecklin, J. P., Järvinen, H., et al.: Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology*, 2000, 119(4), 921–928.
- [42] Jover, R., Zapater, P., Castells, A., et al.: The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. *Eur. J. Cancer*, 2009, 45(3), 365–373.
- [43] Kim, G. P., Colangelo, L. H., Wicand, H. S., et al.: Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: a National Cancer Institute–National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *J. Clin. Oncol.*, 2007, 25(7), 767–772.
- [44] Klingbiel, D., Saridaki, Z., Roth, A. D., et al.: Prognosis of stage II and III colon cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in relation to microsatellite status: results of the PETACC-3 trial. *Ann. Oncol.*, 2015, 26(1), 126–132.
- [45] Neumann, J., Reu, S., Kirchner, T.: Prognostic marker profiles for risk of distant metastases in colorectal cancer. *Pathologie*, 2012, 33(1), 39–44.
- [46] Ooki, A., Akagi, K., Yatsuoka, T., et al.: Combined microsatellite instability and BRAF gene status as biomarkers for adjuvant chemotherapy in stage III colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.*, 2014, 110(8), 982–988.

(Ágoston Emese Irma dr.,
Budapest, Üllői út 78., 1082
e-mail: emescagoston@gmail.com)