

Prediktív és prognosztikai markerek digitális patológiai vizsgálata emlőrákokban

Doktori értekezés

Dr. Micsik Tamás Szabolcs

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Molnár Béla, DSc, Tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók:

Dr. Patonai Attila PhD, egyetemi tanársegéd

Dr. Kővári Bence PhD, egyetemi tanársegéd

Komplex vizsga elnöke:

Dr. Vásárhelyi Barna PhD, DSc

Egyetemi tanár

Komplex vizsga bizottság tagjai:

Dr. Győrffy Balázs DSc

Tudományos főmunkatárs

Dr. Folyovich András PhD

Osztályvezető főorvos

Budapest

2018

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés, irodalmi háttér.....	7
1.1. Emlőrákról röviden - fajtái és kezelése.....	8
1.1.1. Az emlőrák epidemiológiája.....	8
1.1.2. Az emlőrák főbb típusai	8
1.1.3. Az emlőrákok TNM-beosztása	9
1.1.4. Az emlőrákok klinikai/molekuláris alcsoportjai	10
1.1.5. Az emlőrák terápia.....	11
1.2. Az emlőrák prediktív és prognosztikai biomarkerei.....	12
1.2.1. HER2 szerepe emlőrákokban	12
1.2.1.1 HER2 Vizsgálati módszerei.....	14
1.2.2. Megbízható és gyors sejtmagdetektálás	18
1.2.3. Ösztrogén és progeszteron receptorok szerepe emlőrákban	19
1.2.3.1 Ösztrogén és progeszteron receptorok vizsgálati módszerei	19
1.2.4. Ki-67 proliferációs marker szerepe emlőrákokban	21
1.2.4.1 Ki-67 vizsgálati módszere	22
1.3. A digitális patológiai módszerek és automatizált képfeldolgozó algoritmusok	24
1.3.1. Markerek hagyományos, illetve digitalizált metszeteken történő kiértékelésének összehasonlítása.....	28
1.3.2. Immunhisztokémiai reakciók digitális/félautomatizált kiértékelése.....	28
1.3.3. HER2 Immunreakciók digitális vizsgálata.....	29
1.3.4. Ösztrogén és progeszteron receptor immunreakció digitális kiértékelése	29
1.3.5. Ki-67 proliferációs marker digitális kiértékelése	30
2. Célkitűzések	31
3. Módszerek	32
3.1. A vizsgálatok során alkalmazott immunreakciók.....	32
3.2. Markerek hagyományos, illetve digitalizált metszeteken történő kiértékelésének összehasonlítása	34
3.3. Immunhisztokémiai reakciók digitális/szemiautomatikus kiértékelésének validálása.....	36
3.3.1. HER2 Immunreakció digitális vizsgálatának validálása	36
3.3.2. Megbízhatóan reprodukálható magdetektáló algoritmus fejlesztése és validálása	41

3.3.3.	Ösztrogén és progeszteron receptor immunreakció digitális kiértékelésének validálása	45
3.3.4.	Ki-67 proliferációs marker digitális kiértékelésének validálása	47
3.4.	Statisztikai módszerek	49
4.	Eredmények	52
4.1.	Markerek hagyományos üveg, illetve digitalizált metszeteken történő kiértékelésének összehasonlítása	52
4.1.1.	HER2 immunreakciók értékelésének összehasonlítása	52
4.1.2.	Ösztrogén receptor immunreakció kiértékelésének összehasonlítása	54
4.1.3.	Progeszteron receptor immunreakció kiértékelésének összehasonlítása ..	56
4.2.	Immunhisztokémiai reakciók digitális/szemiautomatikus kiértékelésének validálása.....	58
4.2.1.	HER2 immunreakció kiértékelésének összehasonlítása	58
4.2.2.	HER2 IHC 2+ esetek elemzése FISH-szemponjtjából	59
4.2.3.	Megbízhatóan reprodukálható magdetektáló algoritmus implementációja és validációja	61
4.2.4.	Ösztrogén és progeszteron receptor immunreakció digitális kiértékelésének validálása	63
4.2.5.	Ki-67 proliferációs marker digitális kiértékelésének validálása	65
5.	Megbeszélés	70
5.1.	Markerek hagyományos üveg és digitalizált metszeteken történő kiértékelésének összehasonlítása	70
5.1.1.	HER2 immunreakciók kiértékelésének összehasonlítása	70
5.1.2.	Hormonreceptorok immunreakcióinak kiértékelésének összehasonlítása	72
5.2.	Immunhisztokémiai reakciók digitális/szemiautomatikus kiértékelésének validálása.....	74
5.2.1.	HER2 immunreakciók kiértékelésének összehasonlítása	74
5.2.2.	HER2 IHC 2+ esetek elemzése FISH-szemponjtjából	77
5.2.3.	Megbízhatóan reprodukálható magdetektáló algoritmus implementációja és validálása	81
5.2.4.	Ösztrogén és progeszteron receptor immunreakció digitális kiértékelésének validálása	85
5.2.5.	Ki-67 proliferációs marker digitális kiértékelésének validálása	88
6.	Következtetések.....	92
7.	Összefoglalás	93
8.	Summary	94

9.	Új megfigyelések	95
10.	Irodalomjegyzék.....	96
11.	Saját publikációk jegyzéke.....	118
11.1.	Disszertációhoz tartozó teljes közlemények	118
11.2.	Disszertációhoz tartozó egyéb publikációk	119
11.3.	Disszertációhoz tartozó felkért előadások	119
11.4.	Nem a disszertációhoz tartozó teljes publikációk.....	120
11.5.	Nem a disszertációhoz tartozó egyéb publikációk.....	123
12.	Köszönetnyilvánítás	126

Rövidítések jegyzéke

AQI	Allred Quick Index
CD	Color deconvolution
CISH	Chromogenic In Situ Hybridization
Ck5/6	Cytokeratin 5/6 (bazális cytokeratin)
DAB	Diamino benzidin
DCIS	Ductal Carcinoma In Situ
DIA	Digital Image Analysis
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
ER	oEstrogen Receptor
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded
FISH	Fluorescens In Situ Hybridization
HER2	Human Epithelial growth factor Receptor 2
HR	Hormone Receptor
IS	Intensity Score
LI	Labeling Index
MC	Mitotic Count
MDA	Membrane Detection Algorythm
MI	Mitotic Index
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
PCC	Pearson's Correlation Coefficient
PDL1	Programmed Death Ligand 1
PHH3	Phospho-Histon H3

PI Proliferation Index

PPÉ Pozitív Prediktív Érték

PR Progesteron Receptor

PS Proportional Score

RGB Red Green Blue

ROI Region Of Interest

SISH Silver In Situ Hybridization

TS Total Score

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

WHO World Health Organization

WSI Whole Slide Imaging

1. Bevezetés, irodalmi háttér

A daganatok keletkezését és progresszióját feltáró molekuláris diagnosztikai kutatások hatására napjainkra a rutin patológia mindennapos részévé váltak a prediktív és prognosztikai markerek. Kifejezetten fontos azon prediktív markerek pontos kiértékelése, melyek alapján a betegnél célzott terápiát lehet indítani. A prognosztikai markerek a betegkövetés személyre szabásában segíthetnek.

A célzott terápiás prediktív markerek egyik legjobb példája az emlőrákok HER2 vizsgálata. A HER2 az EGFR családba tartozó sejtfelszíni receptor, mely az emlőrákok 15-25%-ban fokozottabban jelenik meg a sejtfelszínen és emiatt a daganat gyorsabb progresszióval és kedvezőtlenebb prognózissal bír (negatív prognosztikai marker). Ugyanakkor ez a sejtmembrán receptor hatékony támadáspontot szolgáltat a daganat növekedésének megfékezésére, hiszen ha a túlexpresszált HER2-receptorokat specifikus antitestekkel gátoljuk, akkor egyrészt blokkolni tudjuk a tumorsejtek szaporodását hajtó szignáltranszdukciós utat, másrészt pedig a receptorhoz kötődött antitestek aktiválják az immunrendszert, ami az így a megjelölt daganatsejteket sikeresen tudja elpusztítani. A HER2-pozitív emlőrákok anti-HER2 terápiája kifejezetten javítja a betegség kontrollját: a negatív prognosztikai markerből így válik pozitív prediktív marker. Emlőrákokban a HER2 receptor expresszió fehérjeszintű vizsgálata általában immunhisztokémiával történik. Ha az eredmény nem egyértelmű, akkor gén szinten kell kimutatni a *HER2* amplifikációját, általában fluorescens in situ hibridizációval (FISH). Emlőrákokban hasonló jelentőséggel bír az ösztrogén és progeszteron receptorok, valamint a Ki-67 proliferációs marker rutinszerű vizsgálata, melyek alapján a kemo- és hormon-terápia indításának szükségessége ítéltető meg. A rutin patológiában ezen markereket tipikusan immunhisztokémiával vizsgáljuk, melyek kiértékelése tehát a lelet fontos és a terápiát döntően befolyásoló része.

A diagnosztika fejlődése a nagyobb munkaterheléssel párhuzamosan felelősségteljes és pontos prediktív és prognosztikai markermeghatározást is igényel. Ugyanakkor a rohamléptekben fejlődő digitális patológiai alkalmazások, azon belül a képfeldolgozó algoritmusok (DIA: Digital Image Analysis), fejlettsége és pontossága olyan szintre ért, melynek alkalmazása segítheti a standardizált, reprodukálható és pontos markermeghatározást és ezáltal javíthatja a személyre szabott diagnosztikát és terápiát.

1.1.Emlőrákról röviden - fajtái és kezelése

1.1.1. Az emlőrák epidemiológiája

A nők körében az emlőrák az egyik leggyakoribb malignus folyamat, de globálisan is a harmadik leggyakoribb carcinoma, melynek morbiditása 2012-ben világszerte 1,671 millióra, míg mortalitása közel félmillióra becsülhető (1). Nagy különbség van a betegség végzetessége között a fejlett és fejlődő országokban. Míg a fejlett országokban - főképp a korai diagnózis és a kombinált kezelések hozzáférhetősége miatt - a mortalitás csökkenő tendenciát mutat, addig a fejlődő országokban mind a morbiditási, mind a mortalitási adatok emelkednek (2).

1.1.2. Az emlőrák főbb típusai

Az emlőrákoknál a WHO-klasszifikáció az elfogadott, mely az összes neoplasticus és prekursor léziót egységesen csoportosítja. Ezek részletes tárgyalása nem tárgya az értekezésnek, ezért csak röviden, táblázatban ismertetjük (1. Táblázat).

1.Táblázat. Az emlőrákok jelenleg érvényes (4.)WHO-klasszifikációja (Sinn et al. Breast Care 2013 (3) alapján, módosítva)

Az emlőrákok főbb típusai WHO 4. kiadás 2013	Ritka típusok WHO 4. kiadás 2013
Invazív carcinoma NST	Adenoid cysticus carcinoma
Invazív lobuláris carcinoma	Carcinoma neurendokrin differenciációval
Tubularis carcinoma	Secretoros carcinoma
Cribriiform carcinoma	Invazív papilláris carcinoma
Mucinosus carcinoma	Mucoepidermoid carcinoma
Carcinoma medulláris fenotípussal	Polymorph carcinoma
Carcinoma apocrin differenciációval	Oncocytaer carcinoma
Carcinoma pecsétgyűrűsejtes differenciációval	Lipid-gazdag carcinoma
Invazív mikropapilláris carcinoma	Glikogén-gazdag carcinoma
Metaplasticus carcinoma	Sebaceus carcinoma
Adenomyoepithelioma carcinomával	Acinársejtes carcinoma

A korábbi, 2003-as WHO-klasszifikációhoz képest a legfőbb változás, hogy az invazív emlőrákok többségét kitevő csoportot invazív emlőkarcinoma NST-re (No special type) keresztelték át, szakítva a ductalis invazív emlőrák NOS (Not otherwise specified) kifejezéssel (3). Ennek okaként a ductalis eredet esetenként nem bizonyított, illetve esetlegesen félrevezető volta szolgált. A lényeg azonban továbbra is a kizáró diagnózis, vagyis azon daganatok tartoznak ebbe a csoportba, melyeket nem lehet egyik speciális alcsoportba sem besorolni.

1.1.3. Az emlőrákok TNM-beosztása

Természetesen a kezelési modalitások kiválasztásánál a tumor stádiuma is alapvető tényező, ebben a TNM-beosztás a mérvadó, melynek jelenleg a 2017-ben kiadott 8. kiadása van érvényben (4) (2. és 3. Táblázat).

2. Táblázat. Az emlőrákok jelenleg érvényes 8. patológiai TNM beosztása (2017) (4)

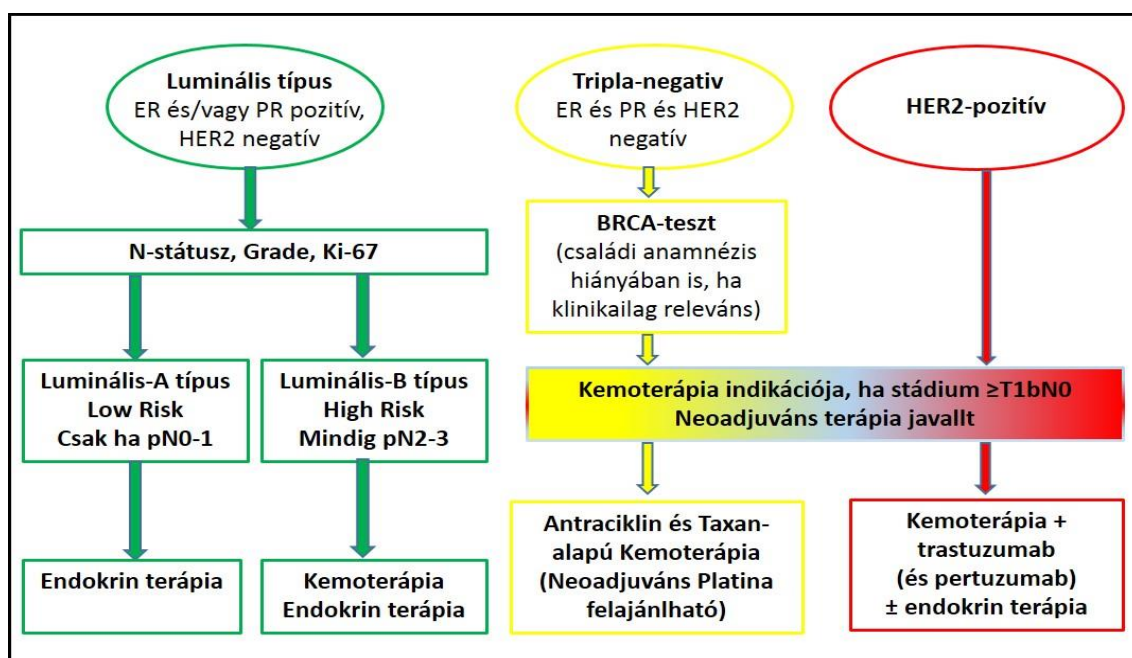
pTX	Primaer tumor nem mutatható ki
pT0	Nincs primer tumor
pTis	Carcinoma in situ DCIS: intraductalis cc LCIS: lobularis cc in situ Paget: az emlőbimbó Paget-kórja tumor nélkül
pT1	2 cm, vagy annál kisebb tumor pT1mi 1 mm, vagy annál kisebb microinvasio pT1a A tumor 1 mm-nél nagyobb, de nem nagyobb, mint 5mm pT1b A tumor 5mm-nél nagyobb, de nem nagyobb, mint 10mm pT1c A tumor 10mm-nél nagyobb, de nem nagyobb, mint 20mm
pT2	A tumor 2 cm-nél nagyobb, de nem nagyobb, mint 5 cm
pT3	A tumor legnagyobb átmérője több, mint 5 cm
pT4	Bármilyen méretű tumor, ha a mellkasfalra vagy a bőrre terjed pT4a Mellkasfalra terjedés pT4b Oedema, narancsbőr, ulceratio, vagy satellit göbök ugyanazon emlőben pT4c T4a+T4b pT4d Gyulladásos emlőrák
pNX	Regionalis nyirokcsomó nem vizsgálható vagy ismeretlen
pN0	Nincs regionalis nyirokcsomó áttét
pN1	Mobilis azonos oldali pozitív I. vagy II. szintű nyirokcsomó(k) pN1mi Micrometastasis (>0,2mm és/vagy >200 sejt, de <2,0mm) pN1a 1-3 nyics pozitív, legalább egyik nagyobb 2mm-nél pN1b Mammaria interna nyirokcsomó áttéte (klinikailag negatív) pN1c 1-3 axilláris és mammaria interna nyirokcsomópozitivitás
pN2	4-9 azonos oldali (fixált) nyirokcsomó érintett vagy klinikailag pozitív mammaria interna nyirokcsomók negatív axillaris nyirokcsomók esetében pN2a 4-9 axilláris nyirokcsomó érintett, egyik legalább 2mm-s pN2b A. mammaria interna melletti klinikailag pozitív nyirokcsomó, axilla negatív

- N3 III. Szintű nyirokcsomóérintettség és/vagy axillaris és mammaia interna lánc érintettség
- pN3a Infraclavicularis nyirokcsomóáttét vagy legalább 10 axillaris nyirokcsomó, egyik>2mm
- pN3b Klinikailag pozitív azonos oldali mammaia interna és axillaris nyirokcsomóérintettség vagy legalább 3 pozitív axillaris nyirokcsomó és a mammaia interna nyirokcsomók makroszkópos/mikroszkópos érintettsége
- pN3c Azonos oldali supraclavicularis nyirokcsomóáttét
- pMX Távoli áttét nem vizsgálható vagy ismeretlen
- pM0 Nincs távoli áttét
- pM1 Távoli áttét van

3. Táblázat. Az emlőrák jelenleg érvényben lévő 8. TNM (2017) stádium beosztása

0	Tis	N0	M0	IIIA	T0, T1, T2	N2	M0
IA	T1	N0	M0		T3	N1, N2	M0
IB	T0, T1	N1mi	M0	IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
IIA	T0, T1	N1	M0	IIIC	Bármely T	N3	
	T2	N0	M0	IV	Bármely T	Bármely N	M1
IIB	T2	N1	M0				
	T3	N0	M0				

1.1.4. Az emlőrákok klinikai/molekuláris alcsoportjai



1. Ábra. Az emlőrákok kezelési sémája a prognosztikai és prediktív markerek alapján történő típusbesorolás alapján. (Harbeck et al. Lancet 2017 (2) alapján módosítva)

Az emlőrákok osztályozására onkológiai szempontból az úgynevezett 4-es felosztás terjedt el: Luminális A- és B-típus, HER2-pozitív és tripla-negatív típusok (1. Ábra) (5).

Újabb tanulmányok szerint már inkább 10 klinikailag releváns alcsoportot érdemes elkülöníteni (6-8), de ez utóbbi még nem terjedt el a gyakorlatban. A főbb csoportokba sorolást el lehet végezni génszintű vizsgálatokkal is, de a gyakorlatban a formalinban fixált és paraffinba ágyazott (FFPE) metszeteken végzett rutinból elvégzett ER- ösztrogén receptor, PR – progeszteron receptor, HER2, Ki-67 immunhisztokémiai reakciók is elegendő segítséget nyújthatnak a további prognózis, illetve terápia meghatározásához (8). Fentiek alapján a következő főbb emlőrák típusokat használjuk (4. Táblázat).

4.Táblázat. Az emlőrákok főbb típusai az immunreakciók alapján.

Típus	ER	PR	HER2	Ki-67 vagy egyéb jellemzők
Luminális A	valamelyik+		-	< St.Galleni érték 2015 (20%)
Luminális B	valamelyik+		-	> St.Galleni érték 2015 (20%)
HER2, non-luminális	-	-	+	
HER2, luminális	valamelyik+		+	
Tripla-negatív (bazális típus)	-	-	-	Ck5/6+ és/vagy EGFR+
Apocrin	-	-	+/-	Androgén Receptor +

Klinikailag a legnagyobb probléma a Luminális A- és B-típus elkülönítése, leginkább a Ki-67 proliferációs ráta nem standardizált meghatározása miatt (2). Elfogadott a 10% alatti, alacsony és a 30% feletti, magas proliferációs ráta, de a két szélsőérték közötti intervallum nehezen kategorizálható. Éppen ezért ilyen tumorok esetén a Ki-67 proliferációs ráta önmagában nem elegendő az adjuváns kemoterápia indikálásához (2).

1.1.5. Az emlőrák terápiája

A részletes terápiás útmutatást a dolgozat keretei nem teszik lehetővé, ezért csak röviden emelnénk ki a fő irányvonalakat.

A szűrővizsgálatoknak és korai diagnózisnak, valamint a számos terápiás, illetve kombinált kezelési lehetőségnek köszönhetően, mára a korai emlőrák egy potenciálisan gyógyítható betegséggé szelődött. Mind a lokoregionális és szisztémás kezeléseknél, mind

a sebészi beavatkozásoknál a kemoradioterápiás kezelési intenzitás csökkentése és az életminőség maximalizálása vált az egyik fő szemponttá (2).

Az adott eset kuratív célzatú kezelési tervét multidiszciplináris onkológiai bizottsági üléseken határozzák meg, általában a beteggel is egyeztetve. Főképp a tripla-negatív és HER2+ tumorok esetében a neoadjuváns terápia is lehet az első lépés, amit általában sebészi kimetszés, majd pedig kombinált kemoradioterápia követ a patológiai vizsgálat során talált tumor- és nyirokcsomó-státuszának, illetve a tumor molekuláris- és/vagy klinikai tumortípusának megfelelően. Anti-HER2, illetve endokrin terápia mellett újabban egyre több célzott terápia is rendelkezésre állhat, mint például trastuzumab emtanzin, pertuzumab, lapatinib, PARP1 inhibitorok, mTOR-gátlók, EGFR-gátló cisplatinnal a tripla-negatív eseteknél, VEGF-gátlók, immunterápia PDL1-gátlókkal, CDK4/6 gátlók (9, 10). Az újabb és kombinált terápiás lehetőségeknek köszönhetően mára az áttétes emlőrákos esetekben is a kezelés célja a jó életminőség melletti túlélés meghosszabbítása, és a betegség hosszú távú kontrollja is reális alternatíva (2).

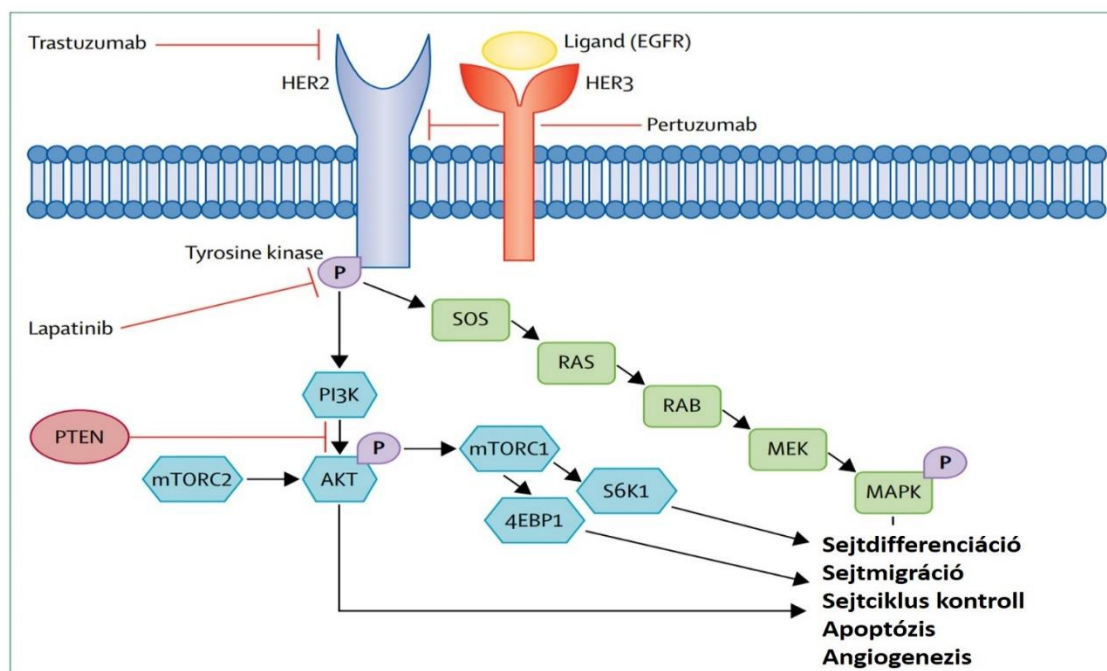
1.2. Az emlőrák prediktív és prognosztikai biomarkerei

Az emlőrákok esetében számos prognosztikai és prediktív markerről találhatunk információt a szakirodalomban, melyek ismertetése meghaladja a dolgozat keretét. Ezért itt röviden csak a legfontosabb, rutinban és általunk is vizsgált markerekre térünk ki.

1.2.1. HER2 szerepe emlőrákokban

A HER2 vagy EGFR2 az Epidermális Növekedés Faktor Receptor (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR1-4) csoportba tartozó I. típusú tirozin kináz (2. Ábra).

A 17q21-es lókuszon elhelyezkedő *HER2 (Neu2, ErbB2) gén* terméke a 185kD-os protein, mely a sejtmembránban helyezkedik el (11). Nincs endogén ligandja, ugyanakkor igen aktív dimerizációs hurokkal rendelkezik és ezért kiváló partnerként szolgál a receptorcsoport többi tagjával (EGFR, HER3, HER4) való homo- és heterodimer képzésen keresztül a szignáltranszdukciós út aktiválásában. A fokozott sejtfelszíni expresszió oka általában a normál génszakasz amplifikációja, melynek következtében a sejtfelszínen található receptorok száma nagyságrendekkel nő meg (12).



2.Ábra. A HER2 szignáltranszdukciós út a leggyakoribb terápiás lehetőségek indikálásával (Loibl et al. Lancet 2017 (13) alapján, módosítva)

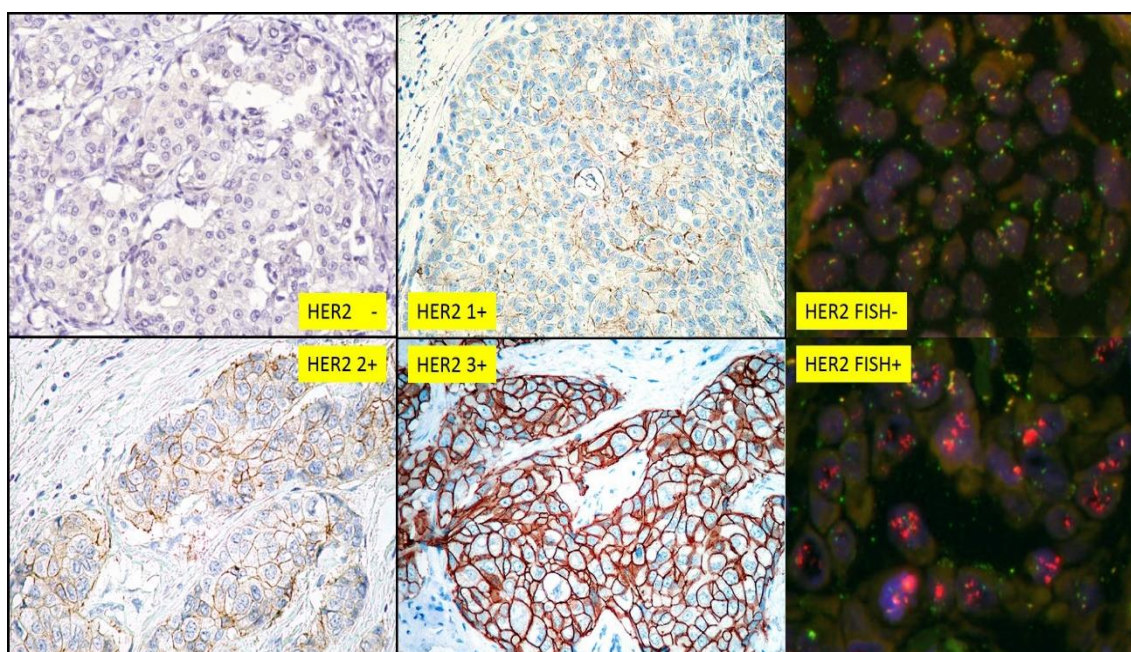
Az emlőrákok 15-25%-ban figyelhető meg a HER2-receptor amplifikációja, mely a tumorsejteket agresszívabb és gyorsabb növekedésre sarkallja (11). Ezek a daganatok általában a magasabb grádusú, differenciálatlan daganatok közül kerülnek ki. A HER2, amplifikált emlőrákok rosszabb prognózissal rendelkeznek (kedvezőtlen prognosztikai marker), rövidebb a betegek relapsusmentes és általános túlélése is (14), illetve bizonyos kemoterápiás szerekre is rezisztensek (kedvezőtlen prediktív marker)(12).

A rosszabb prognózis ellenére mára ezek az emlőrákok a jobban kontrollálható daganatok közé kerültek, mert a sejtfelszíni HER2-receptor specifikus antitesttel való blokkolása hatékonyan tudja a daganat növekedését gátolni (15). Ennek megfelelően a trastuzumab-bal végzett anti-HER2 terápia a célzott terápiák egyik zászlóshajója lett (16). Kezdetben a trastuzumab alapvetően intravénás adagolást igényelt, mára a nagyobb flexibilitást lehetővé tevő szubkután beadható depo hasonlóan jó hatékonyságúnak bizonyult (17). A receptorhoz kapcsolódó antitest blokkolja a receptor-dimerizációt és így a szignáltranszdukciós utat is (2.Ábra). Ezzel egyidőben az antitesttel megjelölt receptorok aktiválják az immunrendszert, ami az ADCC-n (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity), illetve a CDC-n (Complement-Dependent Cytotoxicity) keresztül is tudja a rákos sejteket pusztítani (18, 19). Az újabb lehetőségek közé tartozik a trastuzumab és kemoterápiás szer direkt összekötése (trastuzumab-emtansine, T-DM1, Kadcyla), amikor is az

antitest közvetlenül a tumorsejtekhez juttatja a daganatellenes szert és így elősegíti annak hatékonyságát (20), vagy a HER-receptorok dimerizációját megakadályozó antitestek (például pertuzumab), vagy a HER1 és HER2-t egyaránt gátló lapatinib (21).

1.2.1.1 HER2 Vizsgálati módszerei

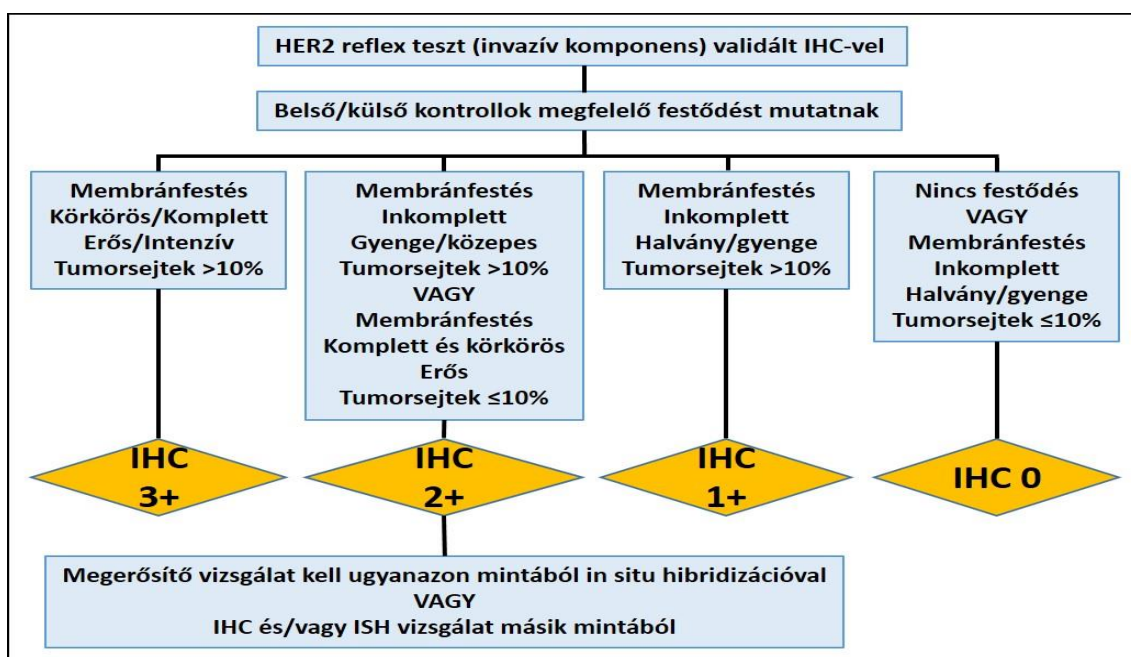
A HER2 vizsgálata alapvetően immunhisztokémiával történik. Számos klinikailag validált antitest és a HER2 érték megállapítására is rendszeresen felülvizsgált guideline, standardizált módszer, kit áll rendelkezésre (11). Az évek során a tapasztalatokkal folyamatosan csiszolgatva, jelenleg a 2013-as ASCO/CAP guideline van érvényben (22). Az ajánlás szerint a HER2 vizsgálatát validált centrumokban javasolt végezni, mert így lehet az anti-HER2 kezelések hatásosságát maximalizálni. Fontos, hogy az útmutatások kiterjednek a preanalitikai fázisra is, mert a sok kedvezőtlen tapasztalat rávilágított, hogy a fixálási körülmények és idők befolyásolhatják az IHC-, de főképp a FISH-vizsgálatok eredményeit (22).



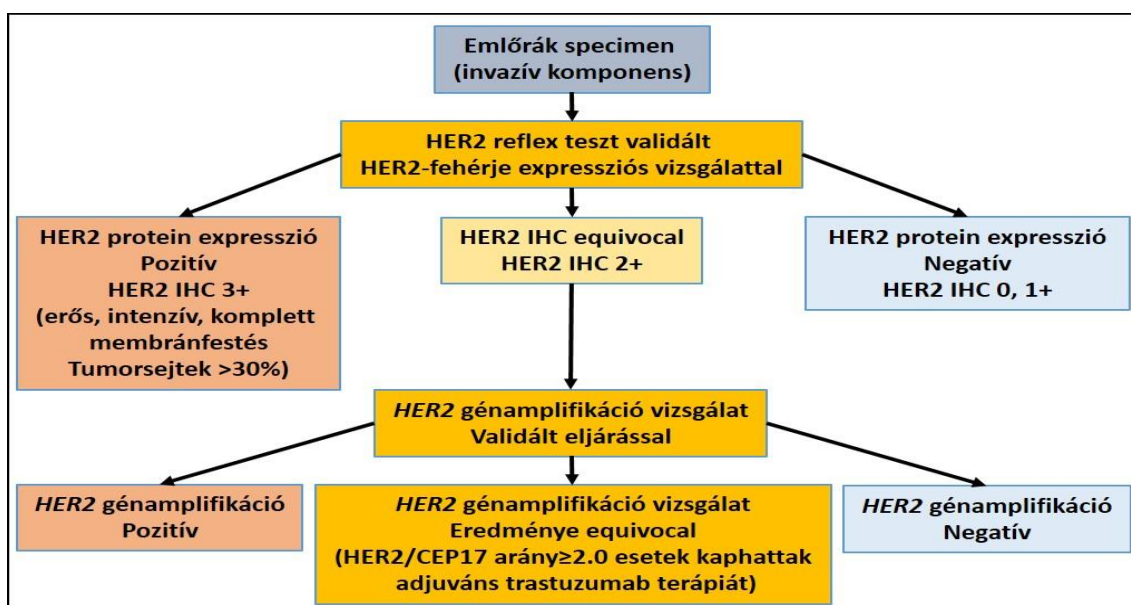
3.Ábra. A HER2 immunhisztokémiai és FISH kiértékelése (HER2 4B5 és FISH, saját képek)

A HER2 tesztelésben két lépcsőt lehet megkülönböztetni. Első körben rutinául minden emlőrákon el kell végezni a HER2 immunhisztokémiai reakciót. Attól függően, hogy a jól végrehajtott reakció milyen membránpozitivitást eredményez a tumorsejteken, négy csoportba lehet sorolni a betegeket. HER2 negatívnak (IHC -) tekinthetők azok a

betegek, akiknél az immunreakció negatív, vagy a tumorsejtek kevesebb, mint 10%-ban látható gyenge vagy alig észlelhető, inkomplett membránpozitivitás. A HER2 1+ csoportba azon esetek tartoznak, ahol a tumorsejtek több mint 10%-a mutat inkomplett, gyenge, vagy alig észlelhető membránpozitivitást. Ezen két csoport IHC alapján HER2-negatívnak tekintendő (3-5.Ábrák).



4.Ábra. A 2013-as ASCO/CAP HER2 IHC ajánlás (Wolff et al. 2013 (22) alapján, módosítva)



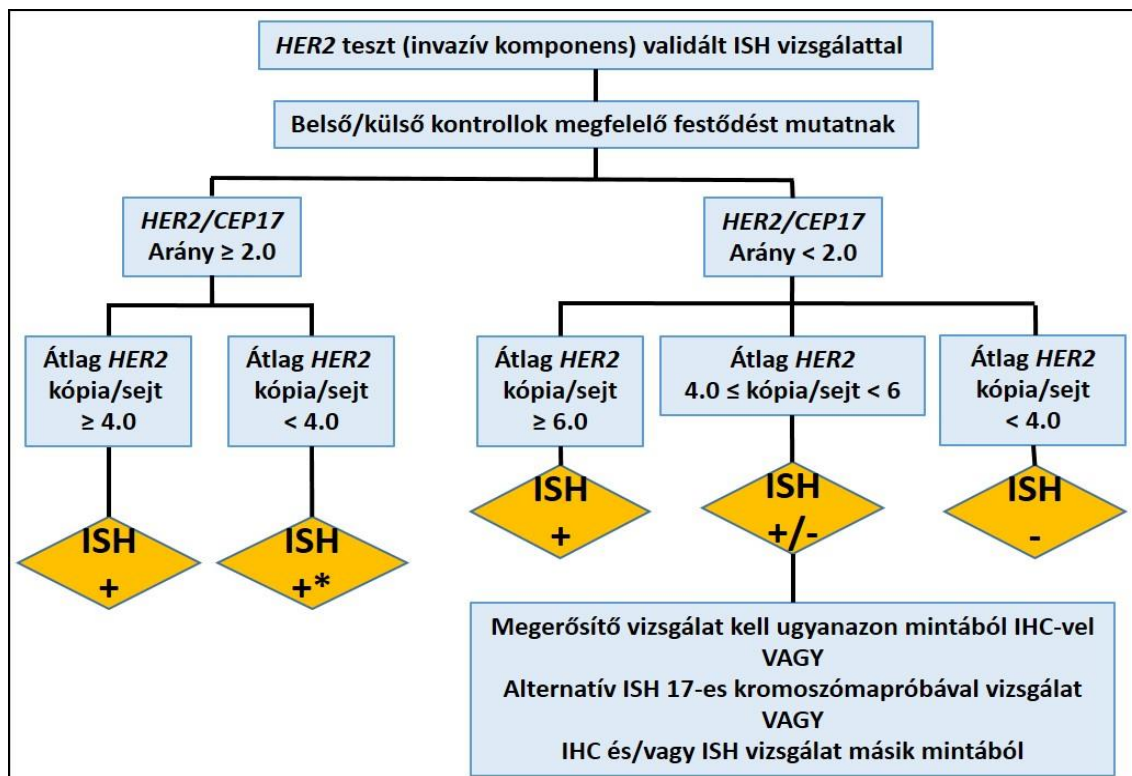
5.Ábra: A vizsgálatunk idejében érvényes 2007-es ASCO/CAP HER2 IHC ajánlás (Wolff et al. 2007 (11) alapján, módosítva)

A HER2 2+ csoportban következett be a legnagyobb változás az új ajánlások alapján. Eddig ide a circumferentialis (körkörös, komplett), mérsékelt erősségű membránpozitivitású esetek soroltattak, ha az invazív tumorsejtek 10%-nál többjén jelent meg pozitív reakció (11) (3. és 5. Ábra). (Mi a vizsgálatunk során ezt, az akkor érvényben lévő 2007-es ajánlást követtük. 5.Ábra) Az újabb ajánlás azonban ezt a csoportot alapvetően átdefiniálta (22). Egyrészt ide kerültek a tumorsejtek 10%-ánál kevesebbjén látható erős, körkörös membránpozitivitású esetek. Másrészt ebbe a csoportba kerültek azok az inkomplett membránpozitivást mutató esetek is, amelyekben a reakció többnyire circumferentialis, gyenge, vagy közepes erősségű és a tumorsejtek több mint 10%-ban jelenik meg. Ennek a HER2 2+ (úgynevezett equivocal) csoportnak a lényege, hogy itt további, génszintű vizsgálatokra van szükség, melyek a *HER2* amplifikációját hivatottak kimutatni (4. Ábra). Ez általában in situ hibridizációs technikákkal: FISH - fluorescens in situ hybridization, SISH – silver in situ hybridization, CISH – chromogenic in situ hybridization történik (23). A HER2 2+ csoport kibővítésére éppen az eddig felgyülemlett HER2 diagnosztikai tapasztalatok miatt került sor, mely szerint a jelenleg gold-standardnak számító FISH-vizsgáló eljárásokkal több HER2+, vagyis *HER2* génamplifikált eset volt észlelhető a HER2 2+ csoportban.

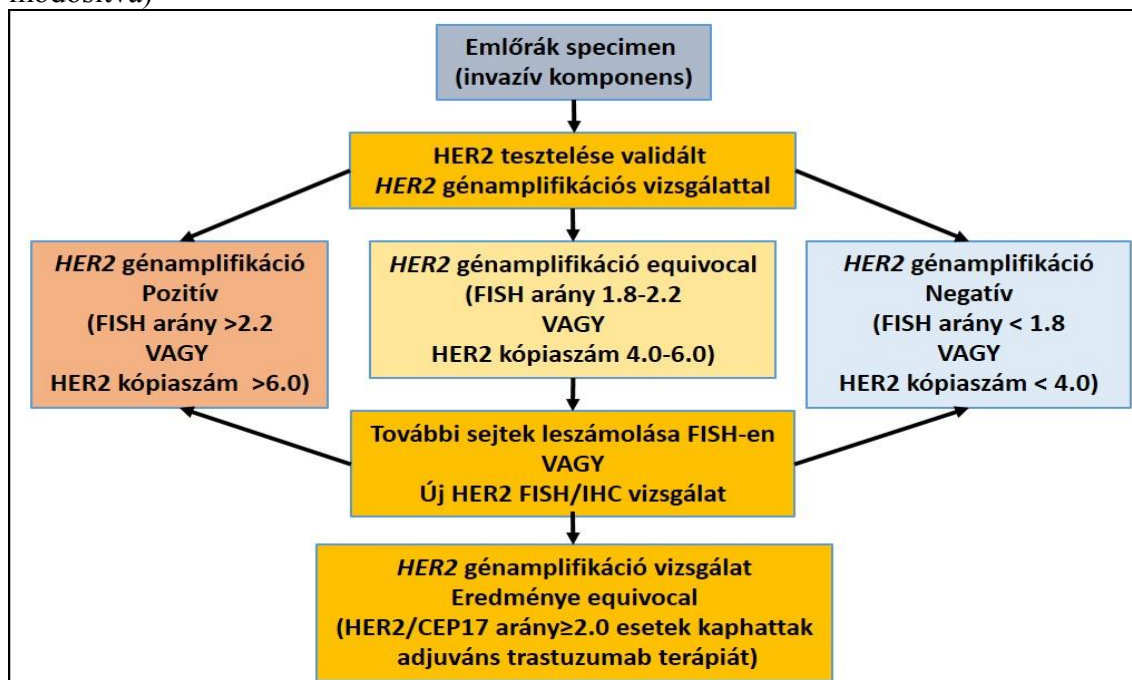
A HER2 3+ eseteknél az anti-HER2 terápia az immunreakció alapján megkezdhető. Ebben az új ajánlás 10%-nyi, komplett, erős membránpozitivitású tumorsejttel megelégszik (22), míg a 2007-es ajánlásban még 30% szerepelt (3-5.Ábra) (11).

A klinikailag legérdekesebbek és legnehezebben interpretálhatóak az IHC alapján HER2 2+ csoportba tartozó esetek, melyekről nem lehet dönteni csupán az immunreakció alapján. Itt a kezelést alapvetően a FISH vizsgálat dönti el, melyet a *HER2*-gént felismerő, ahhoz hibridizálódó fluoreszcens próbákkal tesznek láthatóvá és értékelik ki az adott esetet. Természetesen a vizsgálat igen nagy horderejű, ezért itt is szigorú ajánlások vannak, melyek alapeleme, hogy a 17-es kromoszóma centromerjéhez kapcsolódó, más színű fluoreszcens próbát (CEP17) is ajánlott használni, hogy pontosan meg lehessen adni a HER2/CEP17 hányadost, illetve az átlagos HER2 kópiaszámot, és ezzel az amplifikációt számszerűen lehessen jellemezni. A hányados esetében régebben az 1,8-2,2 arányszám volt a küszöbérték (11), de az újabb ajánlásban már a 2 arányszám szerepel. 2 és efelett a tumor HER2 ISH-pozitív, alatta a HER2 kópiaszáma alapján lehet dönteni: szimpla próbával 6 génkópia felett ISH pozitív, míg 4 alatt ISH negatív az eset. A

HER2/CEP17<2, és 4-6 HER2 kópiaszámú esetek az indeterminisztikus (FISH equivocal) esetek, melyeknél tovább kell folytatni a vizsgálatot kiegészítő módszerekkel, másik ISH eljárással, vagy másik mintán, illetve több sejten leszámolva (6. Ábra) (22).



6.Ábra: A 2013-as ASCO/CAP HER2 (F)ISH ajánlás (Wolff et al. 2013 (22) alapján módosítva)



7.Ábra: A 2007-es ASCO/CAP HER2 (F)ISH ajánlás (Wolff et al. 2007 (11) alapján, módosítva)

Vizsgálatunk idején még a 2007-es ajánlás volt érvényben, mely szerint ISH pozitívnak a $HER2/CEP17 > 2,2$, vagy $HER2 \geq 6$ feletti kópiaszámú; míg ISH negatívnak a $HER2/CEP17 < 1,8$, vagy $HER2 \leq 4$ alatti kópiaszámú esetek számítottak (7.Ábra).

1.2.2. Megbízható és gyors sejtmagdetektálás

Könnyen belátható, hogy a megfelelően megbízható adatokat szolgáltató DIA algoritmusok előfeltétele a jól reprodukálható, megbízható sejt, illetve sejtmagdetektálás, amely lehetővé teszi egyszerre nagyobb terület automatizált vizsgálatát.

A tumorsejtek nagyátersztő-képességű vizsgálatakor az alábbi kérdések merülhetnek fel:

1. A szuboptimális fixálás, vagy feltárás miatt a FISH, de az IHC metszetek esetén a sejtmembránok, magmembránok kissé elkentebbekké válnak, illetve az autofluoreszcencia is fokozódhat (24, 25).
2. Az amúgy is változó méretű, sokszor zsúfoltan, rendezetlenül és szabálytalanul megjelenő tumorsejt(mag)ok a metszetekre sokszor nem kerülnek rá teljes keresztmetszetükben, ezért a formai és festődési diverzitás méginkább fokozódik, melyek miatt adaptív eljárás szükséges a magok megbízható detektálásához (26-28).
3. Az egymással összefekvő, zsúfolt sejt(mag)okat szeparálni kell egymástól a kiértékelés során, hogy megbízható sejtszámokat eredményezzenek a DIA-eljárások (26, 27, 29, 30).
4. A magasabb grádusú tumoroknál gyakran látunk vesiculáris magstruktúrát, ami miatt az amúgy homogénebb magban nagyfokú inhomogenitás lesz, így a magfelismerés még nehezebbé válik (26).
5. A DIA során általában csak kisebb területeket (Region Of Interest, ROI) vizsgálnak, melyek azonban csak limitált információt nyújthatnak a biomarkerekről. Kifejezetten fontossá válik ez a tumoroknál egyre inkább előtérbe kerülő heterogenitás ismeretében, amiért is egyre inkább a teljes metszeten elvégzett analízis (WSI: Whole Slide Imaging) az igény (28, 31).

A különböző gépi algoritmusokat lényegében bármennyig lehet finomítani, aminek csak a számítási kapacitás szab határt. Ugyanakkor a reális felhasználáshoz olyan alkalmazásokra van szükség, melyek futási ideje lehetővé teszi a gyors kiértékelést és nem igényel túl nagy számítási kapacitást. Vagyis ez a fenti két megfontolás egymásnak

ellentmondó igényeket támaszt, amit egy megfelelően megtervezett a két igényt harmonizáló algoritmus megtervezésével lehetne kielégíteni.

Kifejezetten hasznos lehet tehát egy kellően megbízható és reprodukálható eredményeket szolgáltató, de reális számítási kapacitásokon alapuló és kellően gyors magdetektáló algoritmus kialakítása és tesztelése, különböző teljes metszeteken való validálása. Mivel a célzott terápiákhoz használt prediktív és prognosztikai markerek főként immunohisztokémiai vagy FISH-technikával készült metszeteken kerülnek meghatározásra, lehetőség szerint mindkét technikát elemezni képes algoritmus lenne üdvözlendő.

1.2.3. Ösztrogén és progeszteron receptorok szerepe emlőrákban

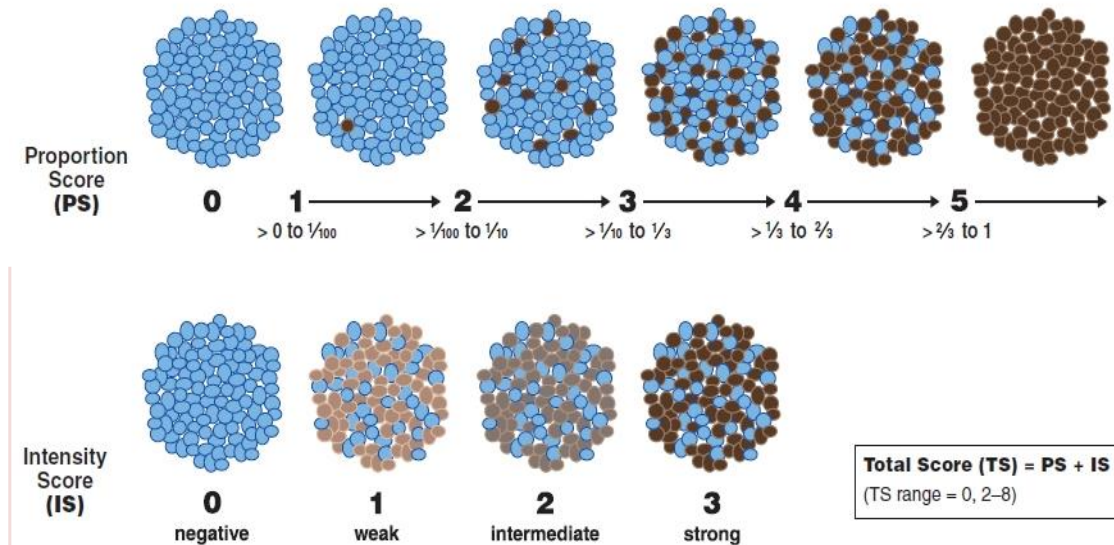
Az ösztrogén és progeszteron receptorok (ER, PR), vagy közös nevükön hormonreceptorok (HR) intracellularis receptorok, melyek a zsírdékony szteránvázas hormonokkal kapcsolódva a sejtmagba vándorolnak és ott proliferációs aktivátorként hatnak(16).

Az emlőrákok mintegy kétharmada hormonreceptor pozitív, vagyis azokban expresszálódik ER és/vagy PR, ami jól kihasználható ezen emlőrákok célzott kezelésére (32). A tumor növekedését serkentő hormonreceptorok hormon-receptor antagonistákkal (pl. tamoxifen) való gátlása, vagy a hormon kialakulását elősegítő enzim blokkolása (aromatáz inhibitor) a HR+ emlőrákok szisztémás kezelésének bevett, hatékony terápiás módja, mellyel a betegek túlélését meghosszabbíthatjuk, illetve a daganatok kiújulását késleltethetjük (32, 33).

1.2.3.1 Ösztrogén és progeszteron receptorok vizsgálati módszerei

A hormonreceptorok meghatározására az immunhisztokémiai vizsgálat a legelterjedtebb és legbeváltabb. Az évek óta folyó vizsgálatok tapasztalatait rendszeresen felülvizsgálva szokták itt is az irányelveket aktualizálni (34). A jelenleg érvényben lévő ajánlások szerint 1% feletti nukleáris pozitivitás esetén adott beteg tumora hormonreceptor-pozitívnak tekintendő és hormonterápiája indikálható.

A magi hormonreceptorok (ösztrogén és progeszteron) immunreakcióinak értékelésére nemzetközileg elfogadott módszer az Allred féle Quick Index (AQI) (35) (8.Ábra).



8.Ábra: Kirtékelési segédlet az Allred-féle Quick Index-hez (AQI) (Forrás: <http://www.slideshare.net/mohamedalhefny/er-pr-and-her2-discordance-between-1ry-and-recurrent-breast-cancer>)

Ez a séma a tumorsejtek százalékában meghatározott magpozitivitás, „Proportional Score - PS” és a magpozitivitás erősségének jellemzésére használt „Intensity Score - IS” kombinációja. A PS lehetséges értékei a következők: 0=nincs pozitivitás, 1<1%, 2=1-10%, 3=11-33%, 4=34-66%, és 5>67%, Az IS lehetséges értékei pedig: 0=nincs pozitivitás, 1=gyenge, 2=közepes és 3=erős magi pozitivitás. A két index összeadásából ered a Total Score (Total Score – TS=PS+IS), amely 0, ill. 2-8 közötti érték lehet (**8.Ábra**) és a leletben például a 4+2=6 formában adható meg (35). Hormonpozitívnak a 2-nél nagyobb AQI/TS-ral rendelkező emlőkarcinómák tekinthetőek (34).

Az esetek többségében az ER és PR reakciók hasonlóak, de előfordulnak diszkrepanciák is: lehet az ER negatív és a PR pozitív, de a konszenzus az ilyen esetekben is indikálhatónak tartja az endokrin terápiát (34). Ezen esetek részletesebb felülvizsgálatával gyakran technikai hibának volt tulajdonítható az immunnal látott HR-diszkrepancia, mely felhívja a figyelmet az immunhisztokémiai reakciók, illetve kiértékelésük preanalitikai, analitikai és posztanalitikai standardizálására (36).

A preanalitikai hatások demonstratív elemzését végezte el egy munkacsoport. Tanulmányukban emlőrákos mintákon tudták a sósavas dekalifikáció kedvezőtlen hatását számszerűsíteni digitális platformmal, lényegében minden vizsgált magi marker esetében (ER, PR, p53: 15-20%-os csökkenés; Ki-67 >90%-os csökkenés) (37). Az irányelveket taglaló cikk szerint még napjainkban is kb. 20%-ra tehető a téves (álnegatív vagy álpozitív) HR-IHC eredmények aránya (34).

1.2.4. Ki-67 proliferációs marker szerepe emlőrákokban

A rosszindulatú daganatok egyik alapvető tulajdonsága a fokozott sejtciklus progresszió, melyet a szövettani metszeteken a mitotikus rátával, vagy a sejtek proliferációs indexszével jellemezhetünk. A Ki-67 protein a sejtciklus minden fázisában kifejeződik kivéve a nyugvó G0-fázist. Habár a Ki-67 fehérje celluláris funkciója nem teljesen ismert, a változó mértékű, de a nem nyugvó sejtekben megjelenő expressziója miatt széles körben elterjedt a proliferációs ráta (Proliferációs Index – PI, Ki-67 Labeling Index - LI) meghatározására, melyet általában a tumorsejtek magi expressziójának százalékos arányában, becsléssel szoktunk megadni (38). Újabban más proliferációs, illetve sejtciklus markerek használata is elterjedőben van (PHH3, MCM), de a legtöbb tapasztalat a Ki-67 rutinszerű immunhisztokémiai alkalmazásával áll rendelkezésre (39).

Emlőrákokban a Ki-67 prognosztikai és prediktív markerként való alkalmazása máig vitatott kérdés (40). Habár a rutinban általában megkérlik és segít is a grade besorolás valamint szubtípus meghatározásában, de önálló prediktív és prognosztikai biomarkerként való alkalmazása egyes vizsgálatok szerint elfogadott, máshol kérdéses, illetve csak bizonyos altípusokban fogadják el validáltnak. Számos tanulmány foglalkozik a kérdéskörrel, és ezek eredményei néhol kissé ellentmondásosak (38, 41-44). Ehhez hozzájárul az is, hogy a proliferációs index prediktív és prognosztikai tartalma is kétélű: a magasabb proliferációs ráta rosszabb prognózist, de jobb terápiás választ sejtet, míg az alacsony proliferációs ráta önmagában kedvezőbb prognosztikai marker, de prediktivitás szempontjából alacsony kemoterápiás válaszráta predispónál (45). Tovább tarkítja a képet, hogy a Ki-67 meghatározására még nem állnak rendelkezésre elfogadott nemzetközi standardok (44, 46) és ezért esetenként a laboratóriumok és vizsgálók közötti variabilitás is meglehetősen magas lehet (47).

A kérdéskört az ún. St. Gallen-i kritériumokban vizsgálják részletesen, melyek legfrissebb konszenzusa alapján az alacsony és magas proliferációs ráta közötti határérték 20% (48), de régebben 14% volt (49). Fontos megjegyezni azonban, hogy a legtöbb probléma az intermedier esetek (10-30%) proliferációs rátájának pontos számszerűsítésével, illetve klinikai relevanciájának meghatározásával van. Valamint az is kihangsúlyozandó, hogy ez a 20%-os érték úgynevezett „konszenzus-érték”, és nem teljes egyetértéssel született, tudván, hogy nincs optimális határérték (43, 50). Nemzetközileg jelenleg is több projekt és erőfeszítés folyik a Ki-67 jobb és megbízhatóbb prognosztikai és prediktív biomarkerként való alkalmazásának elősegítésére, melyek része a validált és standardizált kiértékelési módszerre való törekvés is (38, 41, 45, 47).

1.2.4.1 Ki-67 vizsgálati módszere

A Ki-67 index meghatározását általában egyszerűnek tartják, mert a több évtizedes tapasztalat alapján a magi fehérje immunhisztokémiai módszerrel való kimutatása egy jól reprodukálható, rutin immunhisztokémiai laboratóriumi eljárásnak tekinthető (38). Az immunreakció kiértékelése során a tapasztalt vizsgáló a proliferáló tumorsejtek arányát megbecsli és százalékosan adja meg. Mivel ez az eljárás „szemi”-kvantitatív, vagy nevezhetjük empirikusnak is, becslést értékeket ad meg, melyek alapján bizonyos intervallumokba vagy osztályokba lehet sorolni az adott tumort.

Klinikailag a <10%, 10-30% és >30% csoportok elkülönítése releváns, és a kb- 5%-os pontossággal történő becslés a reális. Ugyanakkor a nem becslést érték, hanem pontos, számszerű, esetleges digitális képanalízissel történő proliferációs index meghatározással még kevés tapasztalat van. Újabb vizsgálatok jó konkordanciát találtak a vizuális és gépi kiértékelés között (51-53), sőt arra a következtetésre vezettek, hogy a gépi meghatározás segíthet a „hot-spotok” (leggyorsabban szaporodó és ezáltal „legmalignusabb” tumorterületek) beazonosításában (Pareto-hotspot) (54, 55), valamint a pontosabb és klinikailag releváns Ki-67 LI határérték megállapításában is (51).

Nem elhanyagolható fontosságú megfigyelés ugyanakkor, hogy a vizsgálatok szerint az interobserver variancia a közepes proliferációjú (11-30%) tumorcsoportban volt a legnagyobb (52), vagyis pont azon eseteknél, ahol nehéz lehet az adott emlőrák kezelésének meghatározása. Ilyen esetekben sajnos a Ki-67 PI-értéke esetenként még tovább bonyolíthatja vagy nehezítheti a terápiás döntést.

További nehézség, hogy a tumorok proliferációs rátája nem feltétlenül homogén eloszlású és az a jelenség gyakran felelős lehet az interobserver eltérések egy részéért is (31). Régebbi megfigyelés, hogy a tumor vagy osztódik, vagy pedig a környezetét infiltrálva terjed (52). Mivel mindkét folyamat energiaigényes, az amúgy is oxigénhiányos környezetben lévő és nem tökéletes energetikájú tumorsejtek a két folyamatot nem feltétlenül tudják egyidőben végezni, ami a proliferációs ráta heterogenitását eredményezheti.

Klinikailag fontos kérdés, hogy melyik tényező relevánsabb, de ennek megválaszolása jelenleg még várat magára. A proliferációs ráta megadása általában becsült, valamiféle középértéket jelent és a heterogenitás kérdését nem tudja megfelelően megcímezni, hiszen szemünkkel nagyon bonyolult és időigényes lenne a tumor különböző régióira vonatkozó proliferációs rátákat külön-külön meghatározni. Az újabb, képanalízissel végzett vizsgálatokban már ezek a szempontok is felmerülnek és a PI-n felül a heterogenitás jellemzésére is igyekeznek mérőszámokat (pl. entropy, bimodality, cellularity)(52, 54, 55), illetve megfelelő mintavételi technikákat javasolni (56). Egy tanulmány szerint homogén festődésű biomarker esetén már 5-6 ROI (region of interest) vizsgálata is elég lehet, de heterogén eloszlás esetén ennek a duplája kellhet ahhoz, hogy 10%-os hibahatáron belül maradhassunk (57). Ugyanez a tanulmány mutatta ki, hogy különösen fontos az alacsony proliferatív aktivitású tumoroknál a megfelelő számú mag (minimum 6250) vizsgálata a PI biztos és reprezentatív meghatározásához.

Ismert, hogy a Ki-67 mag festődési intenzitásában intratumoralisan eltérések észlelhetőek (54). Ezt jelenleg nem vesszük figyelembe a kiértékeléskor, mert nincs rá bevett kiértékelési mód és ezért a jelenleg ajánlás szerint bármilyen kis magi pozitivitás esetén az adott magot pozitívnak kell tekinteni, illetve javasolt legalább 500-100 sejt tüzetes vizsgálatára alapulva kimondani az eredményt (45). A heterogenitás mennyiségi és minőségi információtartalmának klinikai relevanciáját jelenleg még nem ismerjük, ehhez számos újabb, alapvetően a DIA-módszerek robusztusságát kiaknázó, komplexebb metódusú vizsgálatra van tehát szükség.

Figyelembe véve a tumorok heterogenitásának jelentőségét, az egyre jobban hozzáférhetővé váló képanalízis módszereket és azok adta új lehetőségeket (pl. Whole Slide Imaging – WSI, Teljes metszet vizsgálata, Hot-Spot meghatározás, Hexagonal

Tiling) a jelenlegi, általában becsléssel történő PI/LI-meghatározáshoz képest újabb vizsgálati módszerek standardizálása, validálása és elterjedése várható. Ezek segítségével a proliferációs index pontosabb meghatározása vélhetően újabb muníciót ad majd a Ki-67 szerepének és klinikai relevanciájának tisztázásához emlőrákok és más daganatok esetében is (41, 45).

1.3.A digitális patológiai módszerek és automatizált képfeldolgozó algoritmusok

Mára számos sikeres validációs vizsgálatról olvashatunk a szakirodalomban, melyek különböző aspektusokból hasonlították össze a digitális és hagyományos mikroszkópos leletalkotást. Ezek általában azt mutatják, hogy a digitális leletezés mindennapi gyakorlatban is reális alternatíva lehet: az elkövetett hibák nem különböznek szignifikánsan a hagyományos leletezés hibáitól és sok esetben inkább a vizsgáló figyelmetlenségének, lapsusának tulajdoníthatóak, nem pedig a módszerből fakadó hibának (58-63). Több esetben a pontosabb és standardizált meghatározás potenciális előnyeit is kiemelték, illetve már az irányelvekbe is bekerültek javaslatok a digitális leletezésre vonatkozóan, hangsúlyozva a digitális platformok különböző célfeladatokra való validálásának szükségességét. Konkrét ajánlások is vannak már a validációs vizsgálatok megtervezésére (64-66). Fontos kiemelni azt a vizsgálatot is, amely a digitális platformok reprodukálhatóságát jobbnak találva támasztotta alá a digitális módszer jobb objektivitását (67).

Az orvostudomány fejlődésével a patológiai diagnózisalkotás elengedhetetlen részévé vált a prediktív és prognosztikai biomarkerek vizsgálata (40). Ezek a beteg további terápiáját, ellátását alapvetően befolyásolják, attól függetlenül, hogy éppen milyen felkészültséggel, odafigyeléssel és technikai módszerrel végezzük a kiértékelést. Ez a terület azonban különbözik az általános patológiai leletalkotástól, mert általában specifikus immun- vagy FISH-reakciókon alapul és sokkal részletesebb, figyelmesebb vizsgálatot és kiértékelést igényel. Teljesen más információt hordoz az adott immunreakció sejten belüli különböző kompartmentekben való megjelenése: HER2-nél az esetleges magi és citoplazmatikus immunreakció figyelmen kívül hagyandó, míg hormonreceptorok esetén a citoplazmatikus pozitivitás nem számít. A biomarkerek kiértékelésénél tehát általában nagyobb nagyításokat használunk, illetve a színhúség

sokkal fontosabbá válik. Épp ezért a digitális patológia rutinban - főképp HE-metszeteken - való alkalmazását validáló vizsgálatok nem feleltethetők meg automatikusan a biomarkerek kiértékelésére.

A kiértékelés standardizált és archiválható, reprodukálható formája csökkenthetné a hagyományos, mikroszkópos kiértékelés szubjektívitasát és potenciálisan pontosabb adatokat szolgáltathat. Kézenfekvő ötlet tehát az interobserver variabilitás csökkentése és jobb terápiás előrejelzés érdekében a digitális patológia eszköztárának fejlődéséből fakadó lehetőségeket kihasználni. Ezen a téren egyre több specifikus biomarker kiértékelését validáló vizsgálatról olvashatunk, de itt néhány speciális szempontra ki kell előzetesen térni.

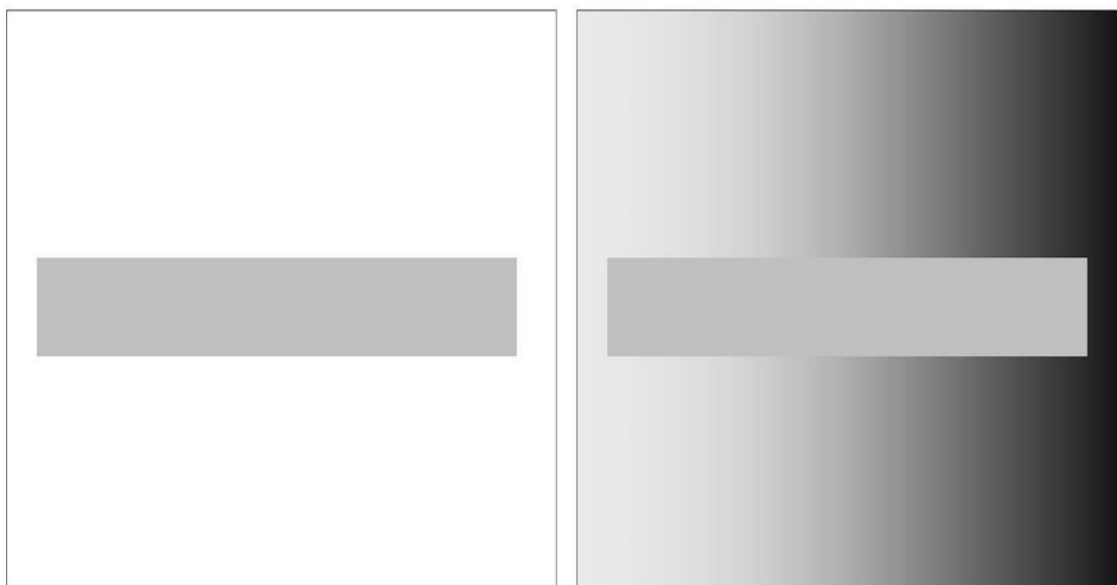
A biomarkerek kiértékelésénél nagyon fontos a nem tumoros; nem invazív de már tumoros (pl. DCIS), illetve a valóban invazív elemek egymástól való elkülönítése. Emlőrákoknál például a normál emlőmirigyekben gyakoriak a hormonreceptor pozitív sejtek, az invazív tumorok melletti DCIS-régiók pedig kifejezetten HER2 pozitívak. Ezek szintén hámelemek, tehát esetleges kettős jelöléssel (68, 69)(pl. hám-marker és HR/Ki67/HER2) sem lehet biztonságosan elválasztani a tumoros résztől, ugyanakkor az ezeken a struktúrákon megjelenő pozitivitás nem befolyásolja a betegség lefolyását. Gyakorló és tapasztalt patológusok számára is néha nehéz feladat lehet a fenti nehézségek gondos kikerülése.

A digitális képanalízis (DIA) módszerei nagyon különbözőek lehetnek automatizáltság szempontjából. Sok esetben a tumoros területet előzetesen ki kell jelölni és csak az így meghatározott ROI területeken lehet az analízist lefuttatni (70-72), de egyre több olyan hám- vagy tumorfelismerő alkalmazás létezik, amelyekkel teljesen automatikusan lehet a metszeten belül (WSI is) a tumoros részeket megkeresni és azon belül bizonyos kompartmentet (mag, membrán, citoplazma) kiértékelni (73-75). Több esetben, tanulmányban nincs pontosan leírva, hogy mennyire automatikus a tumorsejtek felismerése és azon belül a kiértékelés. A platformok pontossága/megbízhatósága még változó és a nem tumoros, de szintén epitheliális elemek, a nagyon infiltráló tumor közti vékony kötőszövetben lévő stromális, illetve inflammatorikus sejtek a tumorfelismerő alkalmazásokat félrevezethetik. Sok esetben a finom beállításokkal a félreméréseket

mérsékelni lehet, de ez egyelőre mindenképpen fokozott odafigyelést és a patológusi szem kontrollját igényli, vagyis egy felhasználó által felügyelt folyamatot jelent (76).

A tumorok, illetve biomarkerek esetében egyre gyakrabban merül fel a heterogenitás és annak klinikumra kifejtett hatásának kérdése (31, 54, 55, 77, 78). Ezek számos újabb szempontot vetnek fel, melyekre célszerű a validációs vizsgálatok során is kitérni.

Mindenképpen elgondolkodtató, hogy a patológusi szem által meghatározott értéket tekintjük 'gold standard'-nak, holott számos adat hívja fel a figyelmet arra, hogy ez mennyire ki van téve az emberi szubjektivitásnak (79). Az interobserver (patológusok közötti) eltérések mellett lehetnek intraobserver (ugyanazon patológus két időpontban adott osztályzatai közötti) eltérések is. Természetesen a patológus gyakorlottsága és adott biomarker kiértékelésével kapcsolatos tapasztalatai potenciálisan csökkentik ezt a variabilitást, de az emberi szem szubjektivitása nem eliminálható. A 9. Ábra jól illusztrálja, hogyan befolyásolja a környezet szemünk képalkotását.



9.Ábra. A közepen futó szürke csík az ábra mindkét oldalán egyforma intenzitású. A bal oldalon a homogén környezetben ezt így is látjuk, de jobb oldalon a szemünk automatikusan a változó intenzitású környezethez viszonyítja a szürke sávot, ezért azt változó intenzitásúnak látjuk, attól függően, hogy környezeténél sötétebb, vagy világosabb. Szemünk alapvető képalkotó mechanizmusából fakadó „szubjektivitását”, illetve ennek hatását nem tudjuk eliminálni a kiértékelésünk során. Gépi kiértékelésnél az intenzitások abszolút értékben történnek, tehát a környezetnek nincs rá hatása. (ábra Krenács Tibor szívességéből)

A „DIA paradox” tehát abban rejlik, hogy egy potenciálisan objektívebb, reprodukálhatóbb és standardizálható eljárást próbálunk egy szubjektivitással terhelt, időben és térben sokkal diverzebb kiértékelési eljáráshoz validálni, hozzáilleszteni. Ezen erőfeszítéseinkben alapvetően benne van a kudarc lehetősége, ennek ellenére számos sikeres validációs vizsgálatot közöltek már. Az ily módon megszervezett validációk racionális alapja természetesen az, hogy jelenleg csak az eddigi, szemmel szerzett tapasztalatokat tudtuk összevetni a klinikummal, kellő evidenciát csak ilyen adatokkal kaphatunk, tehát a DIA-eredményeket is jelenleg csak így tudjuk validálni. Fontos, hogy tudatában legyünk a jelenlegi módszereink és gyakorlatunk korlátaival.

A DIA módszerek objektívitásása és reprodukálhatóságának és klinikai relevanciájának alátámasztása csak a DIA-val szerzett adatok alapján elvégzett klinikai vizsgálatokkal igazolható vissza. Ehhez tehát új, másfajta alapokon nyugvó klinikai vizsgálatokra van szükség (80). Erre lehet jó példa egy olyan cikk megközelítése, ahol a betegeket a HER2-ellenes terápiára való válaszadás alapján dichotomizálták, majd próbálták meg a két csoport között DIA módszerekkel eltéréseket találni (81). A tanulmány szerint a központilag kiértékelte TMA-immunreakciók, illetve egy részben fluoreszcens alapú DIA-módszer (AQUA) tudta legjobban prediktálni a tumorok válaszkészségét.

Az emlőcarcinomában a HER2 FISH-vizsgálatok éppen azért váltak „arany standard”-dá, mert jól értelmezhető mennyiségi eredményt adnak, és a megfelelően végzett vizsgálat jól reprodukálható, klinikailag megbízható, hasznos és releváns információt hordoz (82).

A digitális patológia fegyvertárának hasznos és kifejezetten előremutató felhasználási lehetőségei lehetnek azok a weben működő, digitális metszeteken alapuló, képző (training) programok, melyekkel jártasságot lehet szerezni az adott immunreakció kiértékelésében (83). Így is csökkenthető a szubjektív hatás, hiszen az adott intézményben a biomarker kiértékelését végző patológus tapasztaltsága jelentősen befolyásolja az értékelés megbízhatóságát (84).

Az emlőrákok diagnosztikájában és terápiás algoritmusának meghatározásában egyre több molekuláris vizsgálat lehet segítségünkre, melyek közül már vannak klinikailag validáltak is (Oncotype DX, MammaPrint)(85). Újabban felmerül a digitális patológiai módszerek inkorporálása a biomarker kutatásba, ahol is a standardizált vizsgálatoktól megbízhatóbb és klinikailag relevánsabb biomarker-meghatározást remélnék (74, 86-93).

Egyre több olyan cikk is megjelenik, ahol a mammográfiás kiértékelés automatizálásával, illetve digitális módszerekkel történő feldolgozásával próbálják az emlőrák-szűrés eredményességét növelni (94). Ez is mutatja, hogy a digitális képfeldolgozás a képalkotó eljárások más területein is izgalmas megoldásnak és potenciális segítségnek mutatkozik.

1.3.1. Markerek hagyományos, illetve digitalizált metszeteken történő kiértékelésének összehasonlítása

A patológusok döntő többsége a hagyományos mikroszkóp mögött szocializálódott, és állandó kérdés, hogy a hagyományos, optikai mikroszkópon az általunk látott kép mennyire egyezik meg a beszkenelt, digitális metszeteken látott képpel. Ezzel kapcsolatban számos validációs vizsgálat jelent már meg a hagyományos hematoxilín-eosin és speciálisan festett metszetek alkalmazásával (64, 95-97), többek között a mi intézetünkben is (59, 63). Külön kérdés lehet azonban, hogy a biomarkerek vizsgálatára általában alkalmazott immunhisztokémiai metszetek beszkenelésének van-e bármilyen kimutatható hatása a reakciók kiértékelésére. Ezzel kapcsolatban ezidáig kevesebb tanulmány jelent meg (98-100).

1.3.2. Immunhisztokémiai reakciók digitális/félautomatizált kiértékelése

Az adott biomarkerek képi analízisében való segítségként egyre több DIA-módszer hozzáférhető (61). A biomarkerek vizsgálata hol membránok (HER2), hol magi (ER, PR, Ki-67) reakciók kiértékelését jelenti, de mindkét lokalizáció esetében fontos a megbízható, standardizált, lehetőleg archiválható osztályozási módszer, ahol a DIA-módszerek potenciálisan pontosabb adatokat szolgáltathatnak.

Jelenleg az ilyen validációs vizsgálatok az eddig bevett, tradicionális, üveglemezeken történő manuális vagy szemmel történő kiértékelésekkel való összevetésen alapulhatnak. Ugyanakkor a tumorok heterogenitása egyre inkább világossá válik, és az esetek egy részében ezzel lehet magyarázni az interobserver eltéréseket is (100). Erre részben megoldást jelenthet a gépi analízis, illetve a teljes metszetek analízálása (Whole Slide Image Analysis, WSI), mellyel esetenként akár több százezer sejtmagot, sejtet is egyesével és apránként elemezhetünk, (31, 101) és ezáltal számszerűleg nagyságrendekkel pontosabb és az adott tumorra lényegesen reprezentatívabb adatokat

szerezhetünk. Kérdés, hogy mit tesz ez hozzá az eddigi ismereteinkhez, illetve milyen szintű/fontosságú klinikai relevanciával bír. A kérdéskör megközelítéséhez jelenlegi adataink és vizsgálati módszereink nem voltak elegendőek, de későbbiekben ezt is érdemes lesz megvizsgálni.

1.3.3. HER2 Immunreakciók digitális vizsgálata

Az emlőrák diagnosztika része a HER2 immunhisztokémia kiértékelése ami nagymértékben befolyásolja a beteg terápiáját. Az esetek nagy részében a HER2 immunhisztokémiai reakciók kiértékelése könnyűnek mondható. Ilyenek a negatív, vagy enyhén pozitív esetek (IHC 0, IHC 1+), illetve az erősen pozitív esetek (IHC 3+). Ugyanakkor az HER2 2+ esetek (főképp az újabb ajánlásban megengedett nem-körkörös/komplett membránpozitivitás és alacsonyabba tett %-os arány miatt (22)) kiértékelése nem ilyen magától értetődő, és az eredmény függhet a kiértékelő szemének gyakorlottságától, fáradtságától is. Ugyanakkor ezen esetekből is írásos lelet készül, amelyet felelősségünk teljes tudatában kell aláírnunk.

A DIA módszerek segítségünkre lehetnek a HER2 IHC standardizált, archiválható és dokumentálható kiértékelésében, mely főképp a nehezebben kiértékelhető (főleg IHC 2+) vagy rosszabb minőségű immunreakciók esetében lehet igazán hasznos opció.

1.3.4. Ösztrogén és progeszteron receptor immunreakció digitális kiértékelése

Megjegyzendő, hogy a hormonreceptorok immunreakcióinak kiértékelése meglehetősen szubjektív. Az Allred index Proporciónális Score-ját (PS) egyszerű becsléssel szokás meghatározni, aminél potenciálisan pontosabb manuális módszereket (pl. kinyomtatott immunreakció képén pozitív és negatív magok jelölése), tényleges sejtszámolást, esetlegesen képanalízist (Digital Image Analysis, DIA) is lehet alkalmazni. Az intenzitás megítélése (IS) is erősen szubjektív, nincs bevett gyakorlat a gyenge, közepes és erős festés meghatározására, tehát ez lényegében egyénileg kalibrált, ami szintén interobserver varianciákat is eredményezhet. Ugyanakkor - mivel az 1% feletti bármilyen pozitivitás már lényegében a hormonterápia indikációját jelenti - ennek jelenleg klinikai relevanciája nem jelentős. Ennek ellenére a józan ész szerint jelentős eltérés lehet pl. a 2%, ill. a 80% pozitív receptor sejtet magában foglaló daganatok hormonterápiára adott válaszában,

melynek esetenként klinikai relevanciája is lehet. Ezért a klinikusok jogos elvárása lenne a viszonylag pontos értékek megadása, amire a reprodukálható, standardizált DIA analízissel sokkal nagyobb az esély.

Az emlőrákok esetében a hormonpozitivitást immunhisztokémiai reakciók alapján ítéljük meg, és az e vizsgálat alapján megkezdett hormonterápia továbbiakban a betegek kezelésének alapját képezi (35). Ennek hagyományos, szemikvantitatív módon történő leolvasásának eredményét a gépi analízis adta eredménnyel több vizsgálatban összevetették (102, 103), illetve nagy hangsúlyt helyeznek a detektáló platform pontosabbá tételére is (104). A digitális kiértékelés a több évtizedes, úttörő munkának számító próbálkozások (105-107) után, a közelmúltban lett népszerűbb (31, 101, 108-111).

1.3.5. Ki-67 proliferációs marker digitális kiértékelése

A korábbiakban már említettük, hogy a Ki-67 proliferációs index meghatározása általában szemmel történő, kb. 5%-os pontosságú becsléssel valósul meg (52). Gépi analízissel ugyanakkor tetszőleges, akár ezredszázalékos pontossággal lehet meghatározni a proliferáló sejtek arányát. A vizsgálatok során tehát elsődlegesen a már meglévő manuális proliferációs index meghatározási módszer eredményeit célszerű összehasonlítani a digitális módszerekével, különös tekintettel a tumor heterogenitásra.

2. Célkitűzések

1. Markerek hagyományos üveg és digitalizált metszeteken történő kiértékelésének összehasonlítása

A rutin immunhisztokémiai reakcióval festett ösztrogén, progeszteron receptor, valamint HER2 immunreakciók digitális metszeteken és hagyományos üvegmetszeteken történő kiértékelésének összehasonlítása. Annak vizsgálata, hogy ezek milyen mértékben korrelálnak egymással.

2. Immunhisztokémiai reakciók digitális kiértékelésének validálása

a. HER2 Immunreakciók vizsgálata

A hagyományos, mikroszkópos kiértékelés eredményének összevetése a sejtmembrán reakció automata, DIA-analízisének eredményével, különös tekintettel a mikroszkóposan nem egyértelműen besorolható, HER2 2+ esetekre. Vizsgálni a mélyebb, részletesebb digitális patológiai képanalízis módszerek alkalmazásának és járulékos információhozadékanak lehetőségeit.

b. Reprodukálható sejtmagfelismerő algoritmus fejlesztése és validálása

Megbízható, jól reprodukálható, de reális számítási kapacitásokon alapuló és kellően gyors sejtmagfelismerő algoritmus kialakítása és validálása eltérő minőségű és korú teljes metszeteken. Mivel a nukleáris prediktív és prognosztikai markerek immunohisztokémiai, vagy FISH-módszerrel készült metszeteken kerülnek meghatározásra, ezért mindkét módszerben a sejtmagokat elemezni képes algoritmus kialakítása célszerű.

c. Hormonreceptorok vizsgálata

A sejtmagi ösztrogén, ill. progeszteron receptor immunreakciók digitális képanalízissel végzett kiértékelésének validálása a hagyományos metszeten történő empirikus kiértékeléshez képest.

d. Ki-67 Proliferációs Index vizsgálata

Ki-67 proliferációs marker digitális kiértékelésének validálása a hagyományos metszeteken meghatározott értékekhez képest.

3. Módszerek

3.1.A vizsgálatok során alkalmazott immunreakciók

A vizsgálatok a Semmelweis Egyetem 7/2006-os Regionális TUKEB engedélyével készültek.

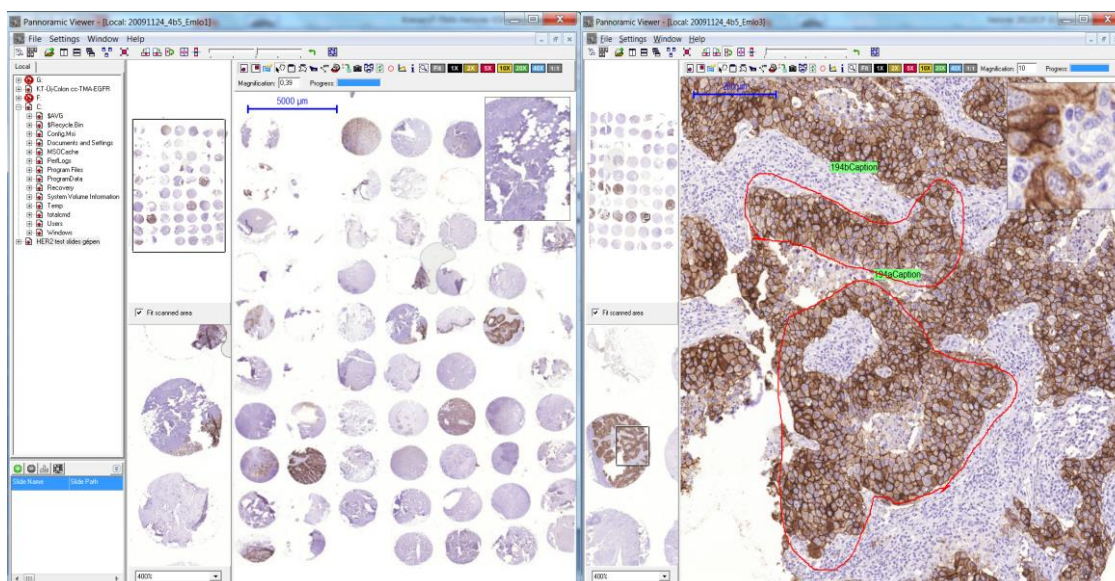
Az immunreakciókat 4µm vastag metszeteken Bond-Max™ (Leica Microsystems GmbH, Németország) immunfestő automatával végeztük el a rutin protokoll szerint, melynek lépéseit az 5. táblázat mutatja.

5.Táblázat A vizsgálatok során alkalmazott immunreakciók lépéseinek leírása (RTU: Ready To Use antitest) (Forrás: I.sz Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Immunlabor, Tamási Anna és Paulusz Mónika szívésségéből)

Immunreakció lépés	HER2	ER	PR	Ki-67
Antigén feltárás	Leica Bond pH.9, 20 perc, 100°C			Leica Bond pH.9, 30 perc, 100°C
Antitest Klón Katalógus szám	4B5, Ventana (240)05278368001	6F11, Leica NCL-L-ER-6F11	1A6, Leica NCL-L-PGR-312	MIB1, DAKO M7240
Inkubálás	RTU antitest: 30 perc, szobahő			
Peroxidáz blokkolás	3 perc (kitből)			
Post-primer	10% állati sérum TRIS pufferben oldva 0,09% proCLIN, (kitből) 8 perc			
Detektálás	Leica, Bond Polymer Refine Detection Kit Cat. No: DS 9800			
DAB	10 perc (kitből)			
Hematoxilín	3 perc (kitből)			

A HER2 FISH reakciókat szintén a rutin diagnosztikában használt Kreatech HER2/SE17 FISH-probákkal végeztük (KBI- 10701, Kreatech, The Netherlands) és a kiértékelést az akkor érvényes irányelveknek megfelelően végeztük (11).

Az elvégzett reakciók után az immunmetszeteket és TMA-kat Panoramic SCAN (3DHISTECH, Budapest, Magyarország) szkennerekkel digitalizáltuk be 0,2325 µm/pixel felbontással (Zeiss plan-apochromat objektív, 20× nagyítás, NA: 0,8, Kamera: Hitachi HV-F22CL 3CCD). A digitalizált metszeteket a Panoramic Viewer (3DHISTECH, Budapest) programmal kezeltük (10.Ábra).



10.Ábra. Az emlőkarcinómás esetekből készült TMA metszet digitalizált HER2 immunreakcióinak a Pannoramic Viewer platformon megjelenő kis és nagy nagyítású képei saját anyagból.

A HER2 reakciót az akkor érvényes 2007-es ASCO/CAP irányelvek szerint (11) értékeltük: 0=nincs membránfestődés; 1+= gyenge, inkomplett membránpozitivitás; 2+= gyenge/közepes, de komplett membránpozitivitás a tumorsejtek több mint 10%-ában; 3+= erős, egyenletes és komplett membránpozitivitás a tumorsejtek több mint 30%-ában (3-5.Ábra, lásd korábban). A vizsgálat befejezése után látott napvilágot a 2013-as ASCO/CAP ajánlása (22), ami lényegesen megváltoztatta az addig érvényben lévő alosztályok kritériumait, de ezt már nem tudtuk az elvégzett vizsgálatra adaptálni.

A hormonreceptoroknál az AQI protokollt (8.Ábra, lásd korábban) használtuk a kiértékeléskor.

A proliferációs index meghatározásánál is az érvényes irányelvek alapján jártunk el (45).

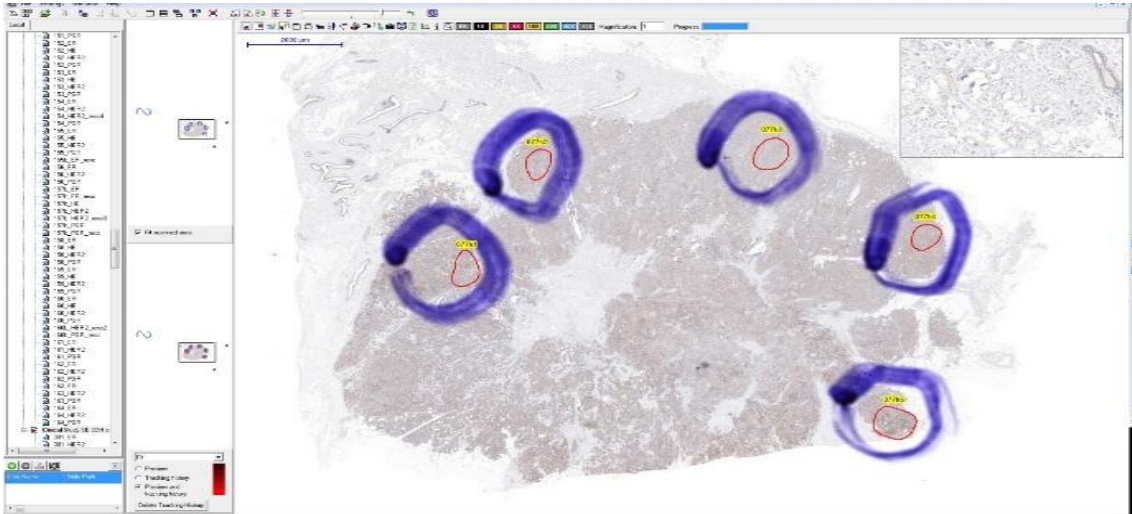
Minden kijelölt ROI (Region Of Interest) területet kiértékelünk mind a hagyományos, mind a digitális metszeteken.

3.2. Markerek hagyományos, illetve digitalizált metszeteken történő kiértékelésének összehasonlítása

A hagyományos, mikroszkópos és digitális lemezen történő összehasonlítást összesen 186, a Semmelweis Egyetem I. számú Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, illetve a Bajcsy-Zsilinszky Kórház archivumában található emlőrákos mintán a 3-féle immunreakció teljes metszetein végeztük el.

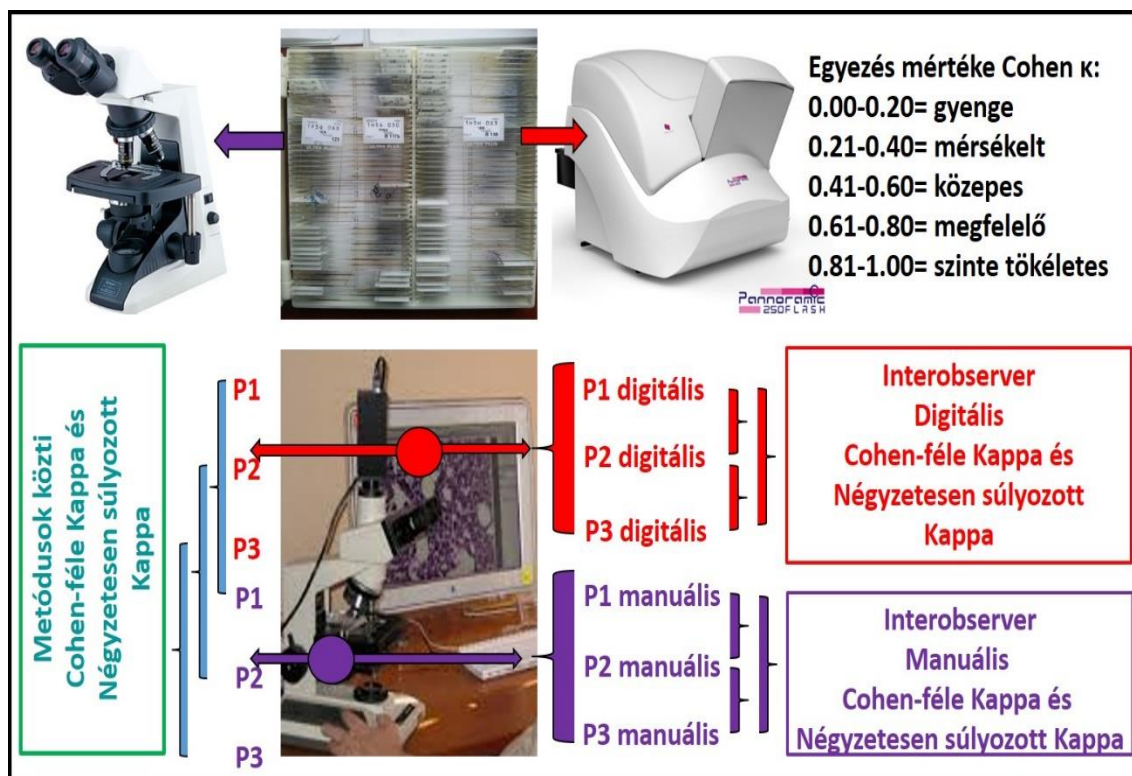
Az emlőrákoknál rutinszerűen kiértékelt ösztrogén, progesteron és HER2 immunhisztokémiai reakciókat három patológus (Turányi Eszter, Sági Zoltán, Micsik Tamás; akkoriban mindannyian a Semmelweis Egyetem I. számú Patológia és Kísérleti Rákkutató Intézet munkatársai) értékelte ki a 186 kiválasztott emlőrák metszetein.

A teljes metszeteken, mindhárom immunreakció lemezein, előzetesen manuálisan 3-5 invazív daganatfészeket tartalmazó területet (ROI) jelöltünk ki, melyek egyenként kb. 200-1000 sejtből álltak (11.Ábra). Erre azért volt szükség, hogy az esetlegesen heterogén immunreakciók ne tegyék összehasonlíthatatlanná a kiértékeléseket. A kijelölt mintákban a lehetséges pozitivitások teljes spektruma képviseltette volt.



11.ábra: Egy digitális metszet lupe-nagyítású képe a manuálisan és azon belül digitálisan is bejelölt kiértékelendő (ROI - Region Of Interest) területekkel, saját anyagból.

A leírt vizsgálati menetből következően rendelkezésünkre állt tehát 186 tumor 3 féle immunhisztokémiai (ER, PR, illetve HER2) reakciójának 3 patológus (P1, P2, P3) általi, mindkét módszerrel (manuális és digitális) történt kiértékelési eredménye (186x3x3x2=3348 értékelés), amit többféle módon hasonlíthattunk össze (12. ábra).



12.Ábra: A metszetek hagyományos módon való vizsgálata (felül balra), illetve beszkenyelése digitális platformon történő további vizsgálatokra (felül, közepén-jobbra); illetve a különböző kiértékelési módszerek közti összehasonlítási lehetőségek.

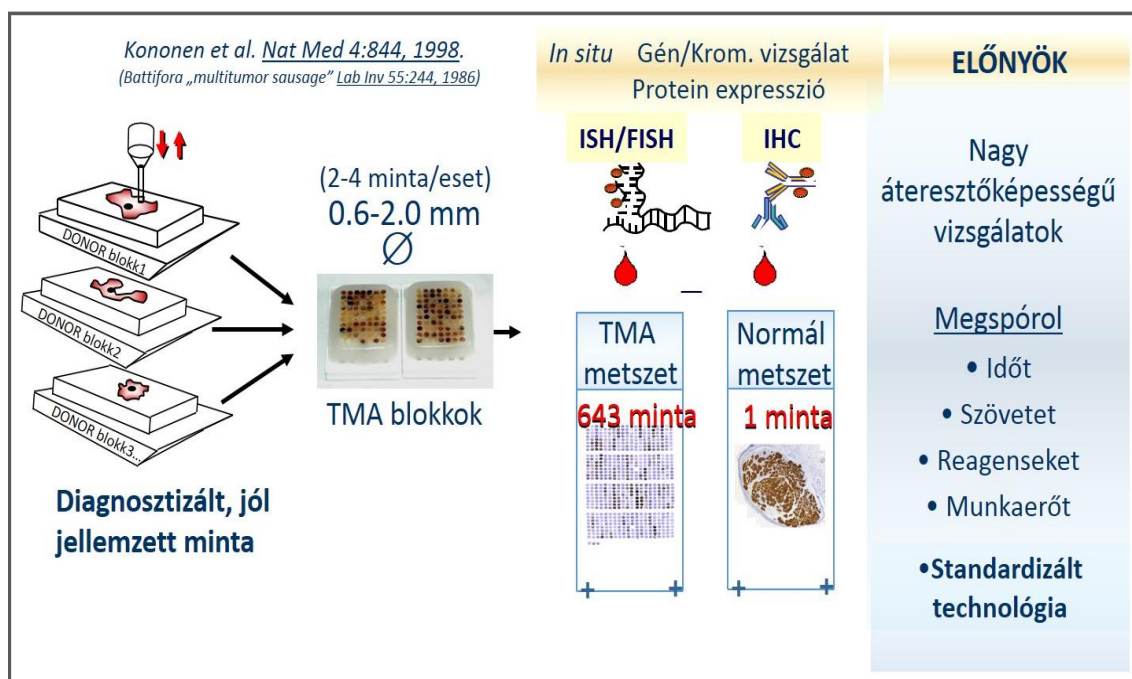
Kétfajta interobserver összehasonlításra nyílt lehetőség: a hagyományos mikroszkópos (M1 vs. M2 vs. M3) és digitális mikroszkópos (D1 vs. D2 vs. D3) értékeket lehetett összehasonlítani a három patológus között. Így arról tudtunk meggyőződni, hogy a kétféle leolvasási mód befolyásolta-e a patológusok értékeit, de ez a mérőszám inkább a patológusokra volt jellemző.

Ugyanakkor lehetőség nyílt ugyanazon patológus különböző módszerekkel végzett kiértékelésének módszerek-közötti („intermetódus”) (pl. M1 vs. D1) összehasonlítására is. A digitális patológia megítélésében ez az összehasonlítási mód sokkal többet segít, hiszen azt mutatja, vajon ugyanazon patológus máshogy értékeli-e digitálisan az adott immunhisztokémiai reakciót, mint hagyományosan. Ilyen módon mindhárom immunhisztokémiai reakció kiértékeléseit összehasonlítottuk.

3.3. Immunhisztokémiai reakciók digitális/szemiautomatikus kiértékelésének validálása

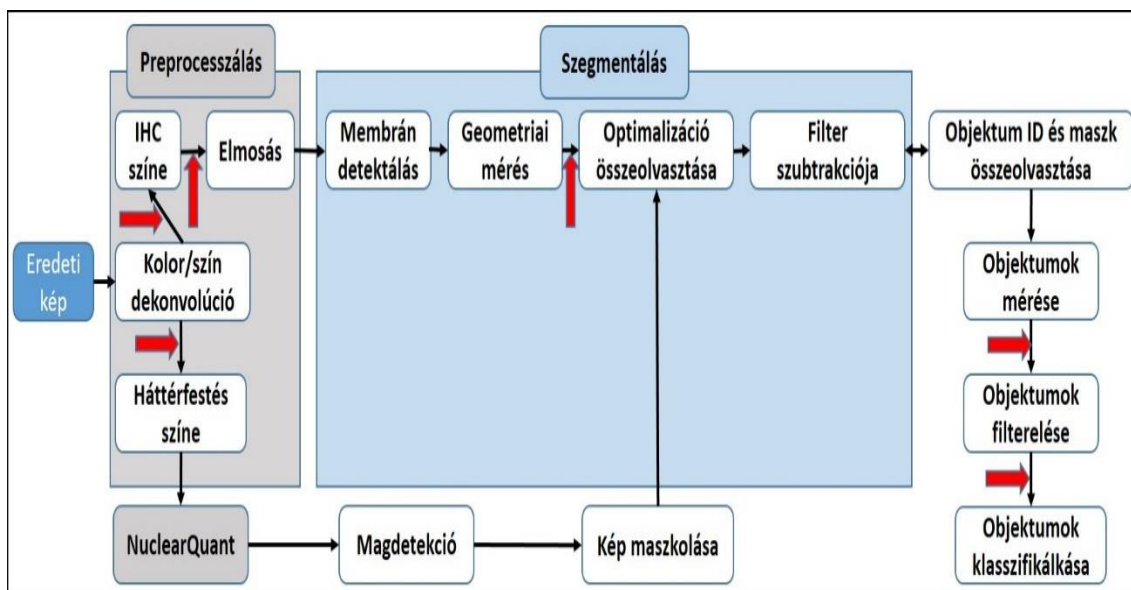
3.3.1. HER2 Immunreakció digitális vizsgálatának validálása

A HER2-vizsgálat során a Semmelweis egyetem I. számú Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet archivumában szereplő emlőrákos esetek formalin-fixált és paraffinba ágyazott blokkjait használtuk. Összesen 107 esetből (26-86 éves nők esetei) használtunk TMA-kat (Tissue MicroArray – szöveti multiblokk) (10.Ábra). Az esetek blokkjaiból általában 2 darab 2mm-es szövethengerek (core-ok) kerültek mindösszesen 3 darab, 7x10-es TMA-ba. Minden TMA első core-jába egy májmetszet került orientációs célból, így összesen 207 core-hely állt rendelkezésünkre, melyekbe 16 DCIS, 126 primer invazív ductalis carcinoma - IDC, 4 invazív lobularis carcinoma – ILC és 61 áttéti daganat szövethengere került.



13.Ábra: A TMA (szöveti multiblokk) alapvető tulajdonságai (Krenács Tibor szívességéből)

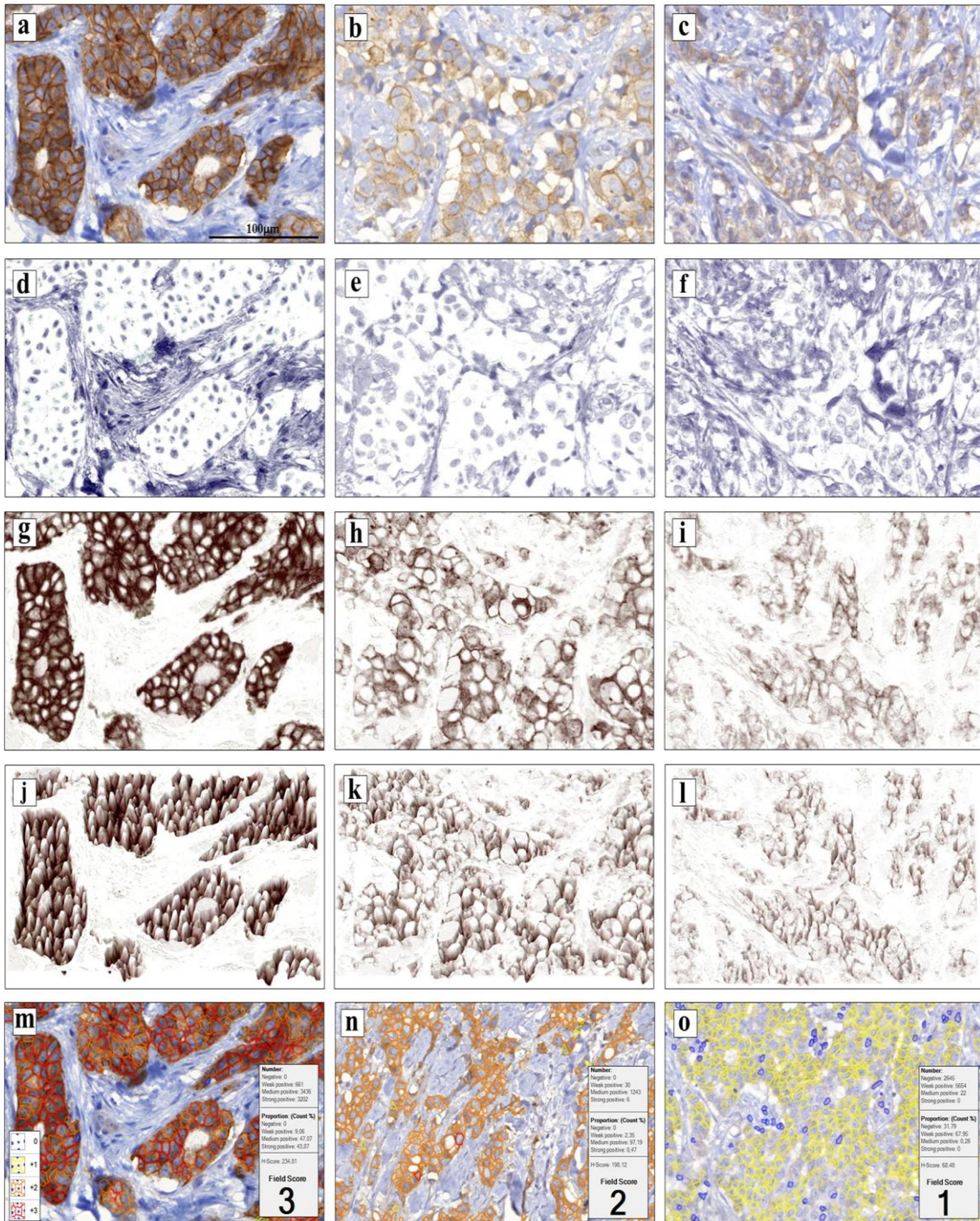
A vizsgálat során a 3DHitech cég által kifejlesztett MembránDetekciós Algoritmust használtuk, mely *MembraneQuant* (3DHitech, Budapest, Magyarország) néven a cégtől beszerezhető.



14.Ábra: A MembraneQuant membrándetektáló algoritmus működése (112). A program a színszeparációval szétválasztja az értékelendő immunreakciók barna csatornáját a háttérfestés kék csatornájától. Utóbbin a NuclearQuant modul segítségével lehet a magokat detektálni, mely az összes (esetlegesen negatív) sejt detektálásához szükséges. Az immunreakció intenzitását a barna csatornán elvégzett membránazonosítás után határozzuk meg. Később a két különböző színű csatorna egymásra vetítésével lehet az individuális sejtekre vonatkozó membránpozitivitást meghatározni, majd az ezen értékekből eredő és az esetre jellemző HER2-osztályt meghatározni. A (↑ és →) piros nyilak azon pontokat jelölik, ahol a modulban lehetőség van a különböző adatok finomhangolására, beállítására. (Micsik et al 2015 alapján, módosítva(112))

A modul működése röviden a következő (14. és 15. Ábra): első lépésben a digitalizált metszeten az immunreakció színét (DAB – barna csatorna) egy úgynevezett „Color Deconvolution” (CD, Szindekonvolúció) színszeparációs módszerrel a program elválasztja az alapfestés kék színétől (Hematoxilin – kék csatorna). Ehhez a patológusnak meg kell adni a látott képen referencia szint és intenzitást, külön az alkalmazott chromogén színének és külön a háttérfestésnek megfelelőt. A beállított színek alapján a mintát két képre osztjuk, egy pozitívra (immunfestést tartalmazó) és egy negatívra (háttérfestés). Optimális beállítás esetén a membránpartikulumok a pozitív csatornán, a sejtmagok pedig a negatív csatornán lesznek láthatóak. A beállított színprofil egy color description file-ként (*.ccc-file) elmenthető és a későbbiekben alkalmazható a hasonlóan festett metszetekhez. Ez a módszer alkalmas arra, hogy a szoftvert az alkalmazott festési protokollhoz, festőautomatához kalibráljuk.

A CD-vel az eredeti digitális metszetből két szürkeárnyaltos képet kapunk, melyeket a továbbiakban külön kezel a program.



15.Ábra: A HER2 digitális kiértékelési algoritmusának lépései képekben (112) A három különböző pozitívítású HER2 Immunreakció (a-c) képét a színdekonzolúcióval kék (d-f) és barna (g-i) csatornára bontjuk. Ezt követően a barna csatornán intenzitás-térképet (j-l) alakítunk ki, majd a modul ebből állapítja meg az egyedi sejtek pozitivitása alapján az adott esetre jellemző HER2 osztályt (m-o). (Micsik et al 2015(112)alapján)

A későbbiekben a barna-csatornán történik a membrándetektálás és az immunreakció kiértékelése. Az immunreakcióval negatív sejteket a magi hematoxin pozitivitásuk alapján a kék-csatornán lehet detektálni a *NuclearQuant* (3DHitech, Budapest, Magyarország) modullal (72), és ezáltal lehet a negatív, immunreakciót nem adó sejteket felismerni. Az algortimusban alkalmazott szegmentációs módszer a membránokat a barna-csatorna lokális minimumainak összekapcsolt pixel-görbéjeként kezeli és méret alapján tudja kiszűrni a nem membránnak tekinthető zavaró, álpozitív jeleket. A HER2 immunreakcióban a megjelenő membránpozitivitás folyamatossága, körkörös volta fontos a HER2 2/3+ esetek diagnosztizálásánál. A pozitív csatornán a membrán vonalak átlag pixel intenzitása mellett a membrán vonal intenzitásának szórását is méri az alkalmazás, így a membránfestés heterogenitása is mérhető. A kiértékelésnél elkülöníthetünk folyamatosan festődött (minimális szórású intenzitással rendelkező) és részlegesen festődött (nagyobb szórású intenzitással rendelkező) membrán struktúrákat. Végül a patológusnak definiálnia kell az egyes HER2-csoportokhoz tartozó intenzitás küszöbököt és ez alapján történik meg az egyes sejtek megfelelő HER2 osztályba sorolása. A folyamat legvégén a két modul adatainak összevetésével lehet az adott területen detektált összes sejt HER2-immunpozitivitását és ebből az adott terület vagy eset HER2 osztályát meghatározni (14. és 15. Ábra).

A MembraneQuant program a magfestés folytonosságát az átlagérték és annak szórása alapján azonosítja. Magasabb átlagérték nagyobb szórása esetén a membránfestés nem tekinthető folytonosnak. Ez a korábbi irányelvek szerint kizárja a HER2 2+ csoportba sorolást, de a szoftver beállításainak megváltoztatásával ez könnyedén átsorolható az újabb irányelveknek megfelelő nem komplett, de erősebb membránfestődést is HER2 2+-ként elfogadó csoportba.

A *MembraneQuant* program a sejtek analízise során minden egyes sejtről számos individuális (intenzitásbéli és morfológiai) információt szolgáltat, melyeket sokféleképpen lehet a későbbiekben elemezni. Ezekből az individuális értékekből lehet később kiszámítani az adott területre vagy daganatra jellemző HER2 osztályzatot, amelyhez a szükséges adatokat és küszöbértékeket a mindenkori érvényes irányelvek alapján lehet előre beállítani a *MembraneQuant*-ban. Ily módon a modul tetszőlegesen és egyedileg hangolható be különböző reakciók kiértékeléséhez. Ez a gyors állíthatóság és finomhangolhatóság a legutóbbi HER2-irányelv az osztályok drasztikus - mind a pozitív

sejtek százalékos arányát, mind a pozitivitás circumferentialis voltát érintő - megváltoztatása ismeretében igen hasznos tulajdonságnak bizonyul, hiszen az új irányelveknek megfelelő kiértékelésre való átállás ily módon lényegesen egyszerűbb, és a módszer standardizálható. Ugyanakkor a membránetekciós modul futása során keletkezett minden más információt tárolva egy olyan adatbázist lehet létrehozni, melynek különböző módon történő elemzésével további információkhoz is juthatunk.

A TMA 207 emlőcarcinomából származó core-ja közül technikai okok (leúszott, sérült core, vagy technikailag kifogásolható immunreakció) miatt 34 nem volt értékelhető, melyeket kihagytunk a vizsgálatból. A fennmaradó 173 core-t két vizsgáló értékelte.

A reakciók kiértékelése során a jobb „interobserver” összehasonlítás és a tumorheterogenitás zavaró hatásainak elkerülése érdekében az egyik vizsgáló a core-okra 1-6 annotációt tett. Az így meghatározott 309 területet (Region Of Interest – ROI) ezt követően egymástól függetlenül értékelte ki a két vizsgáló, majd ezt követően a *MembraneQuant* program. Ha a manuális kiértékelésnél eltérés volt, akkor a két vizsgáló a végső HER2-osztályzatban konszenzust hozott. Egy eset anyaga több core-on is szerepelt, így az adott esethez tartozó HER2 osztályzatot ezek átlagaként határoztuk meg.

A statisztikai elemzés során konszenzus osztályzat értékeit hasonlítottuk össze a *MembraneQuant* program által szolgáltatott értékekkel és számítottuk ki ezek Cohen-féle κ értékét, illetve Spearman-féle rangkorrelációját. Az esetleges eltérések klinikai relevanciáját is figyelembe veendő, a négyzetesen súlyozott κ értékeket is meghatároztuk. (lásd „*Statisztikai módszerek alfejezet*).

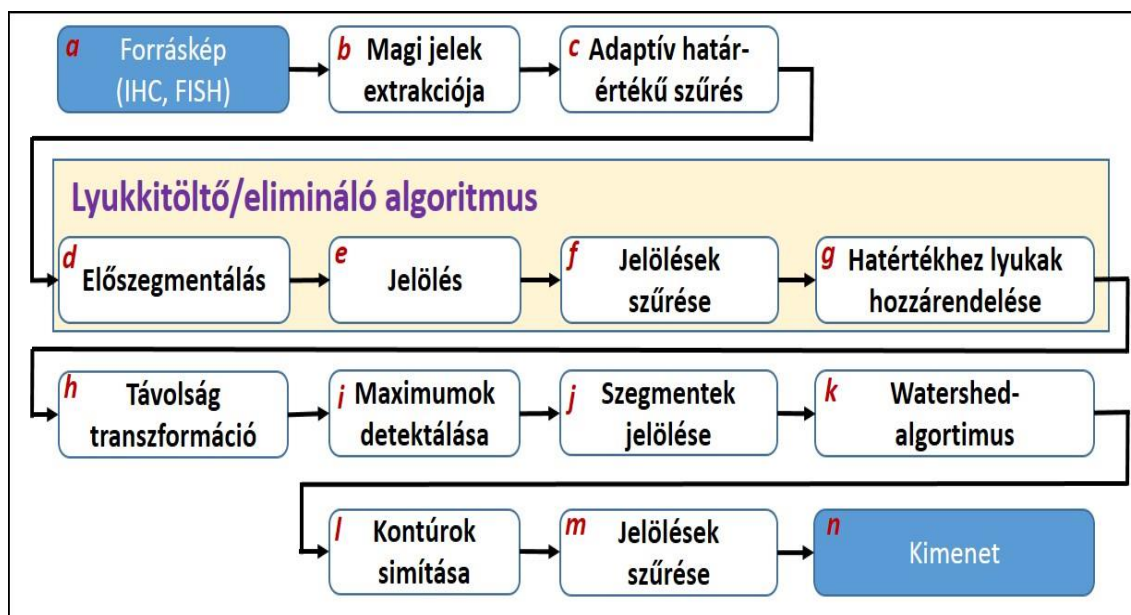
Mivel a HER2 2+, bizonytalan („equivocal”) eseteknél az anti-HER2 terápia indikálásához további in situ hibridizációs vizsgálatok szükségesek, ezen esetekben mi is elvégeztük a FISH vizsgálatokat. Ezt követően egy alvizsgálatot végeztünk, melyben a FISH-vizsgálattal pozitív, tehát HER2-génamplifikáltnak bizonyuló esetek gépi HER2-osztályait, illetve a gépi kiértékelés során szerzett individuális sejtekre vonatkozó adatait hasonlítottuk össze a HER2-amplifikációt nem mutató esetek ugyanilyen adataival. Ily módon azt vizsgáltuk, hogy van-e különbség a FISH pozitív és negatív esetek gépi HER2 osztályzatai között, vagyis a HER2 immunreakció gépi kiértékelése alapján megjósolható lehet-e a FISH vizsgálat eredménye.

3.3.2. Megbízhatóan reprodukálható magdetektáló algoritmus fejlesztése és validálása

A Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetének archívumából 25 ER, PR, Ki-67 és p53 immunreakció metszetét vettük alapul, melyek felölelték a teljes pozitivitási panelt (Allred 0, 2-8, illetve PI: 1-100%) Ezen kívül fenti esetekhez tartozó 5 HER2 FISH metszetet is vizsgáltunk, ahol szintén sejtmagokat kell elkülöníteni és magi jeleket vizsgálni a *HER2* génamplifikáció kimutatásához. Az immun- és FISH-metszetek a házban a korábban már ismertett rutinban használt módszerekkel készültek.

A magdetekciós algoritmus teszteléséhez kiválasztott metszetek között szándékosan voltak régebben készült és scannelt, illetve újabban digitalizált metszetek is. Ezzel kívántuk a módszer reprodukálhatóságát és felbontás függetlenségét tesztelni. A digitális lemezek mérete 0.8 és 2.4 GB között, a pixelszámuk 50k x 50k és 100k x 170k között volt. A FISH metszetek mérete 9-10 GB, pixelszámuk 85k x 75k volt.

A magdetektáló (CellQuant) algoritmus blokk-diagramját, egymásra épülő lépéseit a 16. ábra mutatja be. Az alábbiakban néhány fontos lépés jelentőségét vázoljuk röviden.



16.Ábra: A magdetektáló (CellQuant) algoritmus részeinek blokkdiagrammja (a) Bemeneti kép, mely lehet RGB (IHC esetén) vagy szürkeárnyaltos (FISH esetén), (b-c) Magokat reprezentáló jelek elkülönítése a háttértől adaptív módszerrel, (d-g) A túlszegmentálást elimináló 'Lyukkitöltő metódus', (h) Távolság transzformáció, (i) lehetséges magközpontok (seed-ek) detektálása, (j) szegmentek jelölése, (k) Watershed régiónövelés és objektumszeparálás, (l) Kontúrsimítás, (m) Szűrés, (n) Kimeneti adatok (Paulik et al, 2017, (113) alapján módosítva)

Magi jelek extrakciója (16. Ábra: b): A magdetektáló algoritmus először elkülöníti a festett struktúrákat a háttértől. Ehhez IHC metszeteknél RGB-képekből (17. Ábra: a) kiindulva a három különböző szín csatornáját szürkeárnyalatos képpé konvertálva és a kalkulált átlagértéket felhasználva intenzitásképpé alakítja (17. Ábra: b). A szürkeárnyalatos képet invertálja a következő lépésben, így a sejtmag jelek lesznek intenzívek, a háttér pedig sötét. Ez az eljárás lehetővé teszi, a fluorescens minták szürkeárnyalatos felvételeinek kiértékelését is.

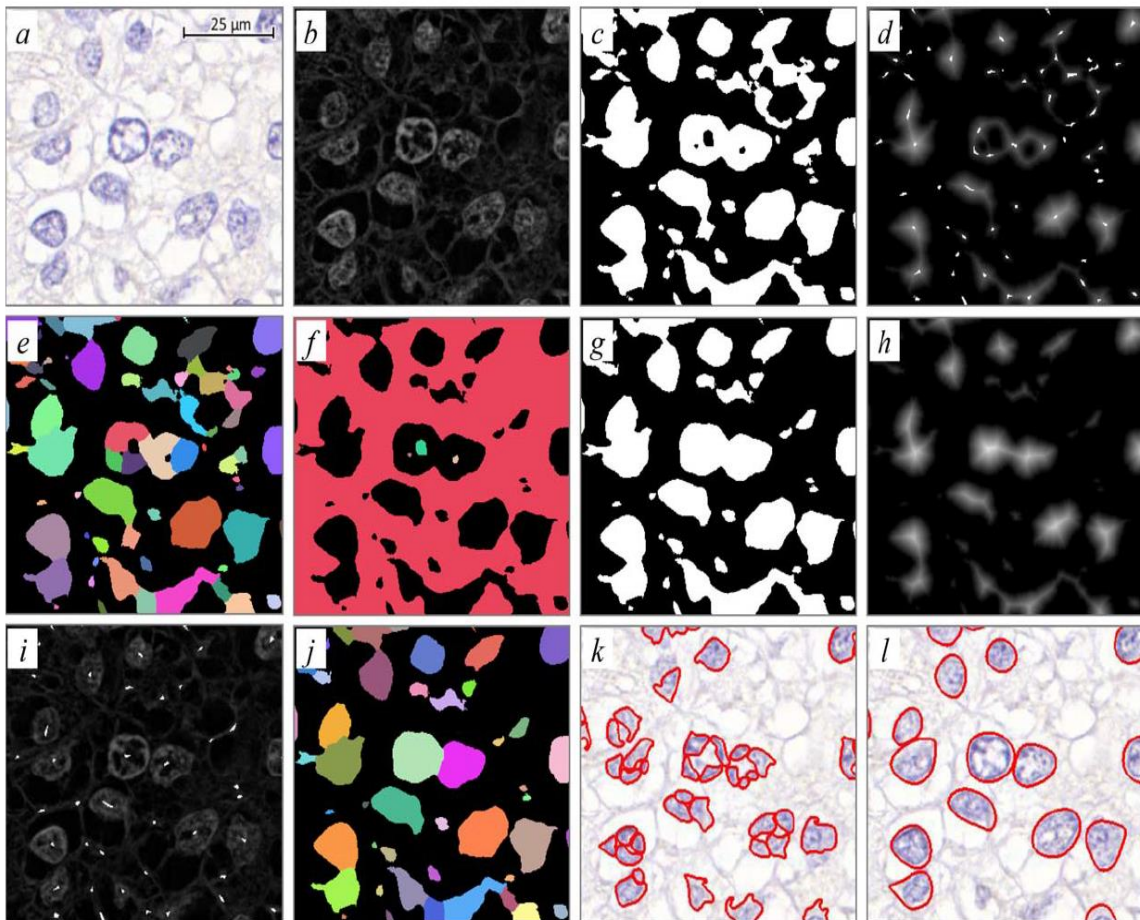
Adaptív határértékű szűrés (16. Ábra: c): Az esetleges autofluoreszcencia, a zavaró zajok, a kiindulási metszetek minősége és eltérő intenzitása miatt adaptív szűrésre van szükség. Ez 'Box Filter', Near and Far Kernel Matrix eljárásokkal valósítható meg (17. Ábra: c). Ennek során beállítható az átlagos magméret, mely paraméter alapján működik a 'Near' és 'Far' mátrix.

Maximumok detektálása (16. Ábra: i): A magrészletek lehetséges központját (seed) az intenzitástérképen látható lokális maximumok adják meg (17. Ábra: d). A túlszegmentálás elkerülését úgy oldottuk meg, hogy a bemeneti paraméterként megadható minimum magméretnél kisebb távolságra lévő lehetséges magcentrumokat a gép összeolvasztja.

Szegmentek jelölése (17. Ábra: j): Minden 'seed' alapján detektált objektum külön jelölődik, és egyéni azonosítót kap (17. Ábra: e).

'Watershed' régiónövelés és objektumszeparálás (16. Ábra: k): A detektált seed-eket fokozatosan növelve kapjuk meg a megfelelő objektumokat, mérettől függetlenül (17. Ábra: j). A régiónövelő eljárás alkalmas cirkuláris objektumok pontos detektálására és szeparálására, így külön objektum szeparáló alkalmazás integrálására nincs szükség.

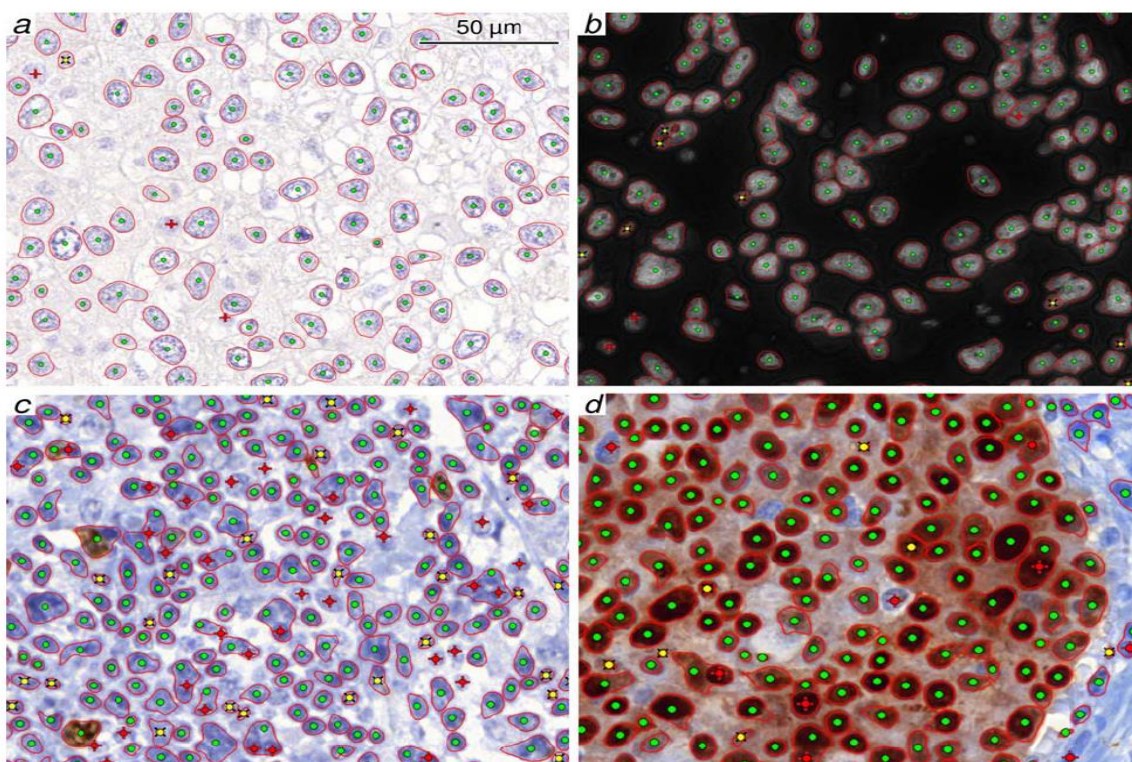
Kontúrsimítás és szűrés (16. Ábra: l, m): Az objektumok durva kontúrjait egy egyszerű Gauss-szűrővel ki lehet simítani, majd az esetlegesen objektumként azonosított artefaktumokat, aspecifikus jelölődéseket és egyéb 'nem mag struktúrákat' terület, intenzitás, kontraszt vagy alak alapján ki lehet szűrni. (17. Ábra: i, j)



17.Ábra: A magdetektáló algoritmus működésének demonstrálása a képfeldolgozás lépéseivel (a) Bemeneti IHC képe (RGB), (b) Magok extrakciója, (c) Magi jelek adaptív detektálása lyukakkal, (d) A magrészletek/lehetséges magközpontok (seed)-ek jelölése, (e) Jelölt magrészletek, (f) Magokon belül bejelölt lyukak, (g) Objektumok jelölése betöltött lyukakkal, (h) Távolság transzformált térkép, (i) Valódi magközpontok (seed), (j) Jelölt magok, (k) Szegmenáció lyuk-kitöltés nélkül, (l) Szegmentáció a lyukak kitöltésével, eliminálásával (Paulik et al, 2016.(113))

Lyukkitöltő/elimináló algoritmus (16. Ábra: d-g): Az elsődlegesen detektált magok közepén esetlegesen jelen lévő lyukak, illetve festődési inhomogenitás miatt az elsődlegesen szegmenetált kép gyakran túlszegmentált lesz (17. Ábra: k). Ezért a valódi magok egy egységként való detektálásához – főképp a vesiculáris magoknál – szükség van egy további iterációs lépésre. Ehhez az elsődleges szegmentálás után a mag-részletek közti lyukakat az algoritmus megfelelő paraméterezéssel bejelöli, majd az eredeti képhez hozzáadva eliminálja a zavaró és a kiértékelést potenciálisan félrevezető lyukakat, majd a 'watershed' mechanizmust a lyukmentes képen lehet lefuttatni és így már valós magokat

kapunk végeredményül. (17. Ábra: g és l) A lyukak kitöltésének másik fontos hatása, hogy a fehér háttérpixelok eliminálásával a magon belüli átlagintenzitás meghatározása is pontosabbá válik. Ezt a hibajavítást szemünk – adottságai miatt – magától és automatikusan elvégzi. De az eleve túl korrekt, abszolút értékű pixelintenzitáson alapuló gépi képfeldolgozásnak ezt megfelelő módon kezelni kell, különben a mag átlagintenzitása alacsonyabbnak mérődik és esetlegesen más erősségi csoportba fog kerülni, ami miatt a végső pozitívítási osztály is megváltozhat. A gépi magdetekció eredményét manuális sejtszámolással ellenőriztük (18.Ábra).



18.Ábra: A magdetektáló algoritmus eredményének elemzése ER (a), DAPI-fluoreszcens (b), Ki-67 (c) és PR (d) IHC metszetein. (zöld kör: valódi pozitív; sárga X: álpozitív; vörös +: valódi negatív magok) (Paulik et al, 2017.(113))

A hagyományos kiértékeléskor általában használt Nagy Nagyítású Látótér-ekvivalens, (angolszász irodalomban: High Power Field, HPF) látómezőkön lefuttattuk a magdetektáló algoritmust, majd manuálisan ellenőriztük az eredményt. Ennek során 3 kategóriát különítettünk el: **Valódi pozitív (VP)**: a magot a gépi és a manuális kiértékelés is detektálta. **Álpozitívak (ÁP)** voltak a DIA által magnak detektált, de manuálisan nem annak tartott objektumok: túlszeparált magok, műtermék stb. **Álnegatívak (ÁN)** pedig a manuálisan detektált, de a DIA-által nem megtalált magok voltak. A fenti értékekből a

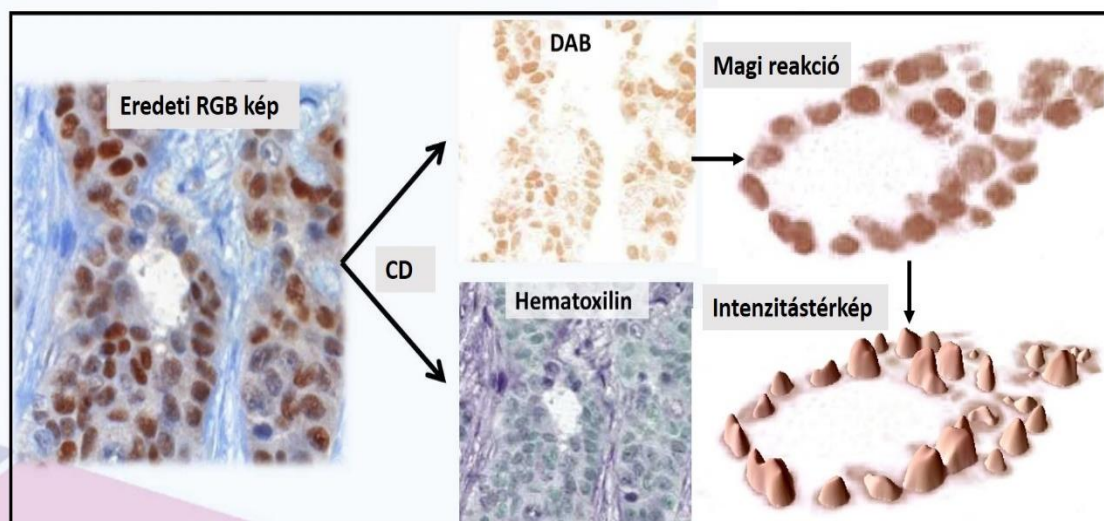
VP/(VP+ÁN) egyenlettel a Recall Rate vagy **Szenzitivitás**, míg a VP/(VP+ÁP) egyenlettel a Precision Rate, vagy **Pozitív Prediktív Érték (PPÉ)** volt kiszámítható. Specificitást és Negatív Prediktív Értéket (NPÉ) a képeken definiálhatatlan valódi negatív pontok hiányában nem tudtuk meghatározni.

Az általunk optimalizált módszer működését és eredményét a szakirodalomban közölt két másik, ismertebb és hozzáférhető DIA-módszer (QuPath, CellProfiler) által szolgáltatott értékekkel is összehasonlítottuk (114, 115). A szenzitivitás és PPÉ mellett a módszerek időigényét is össze tudtuk hasonlítani.

3.3.3. Ösztrogén és progeszteron receptor immunreakció digitális kiértékelésének validálása

A HR-vizsgálat során a Semmelweis egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet archivumából 14 invasív ductalis carcinoma (IDC) és 2 invasív lobularis carcinoma (ILC) formalin-fixált és paraffinba ágyazott blokkjait használtuk.

A magok detektálása a Panoramic Platformon futó NuclearQuant (NQ) (3DHitech, Budapest) algoritmussal történt, mely alkalmas a magszerűnek detektált objektumokat megfelelően szeparálni is.



19.Ábra: A NuclearQuant modul működése. Az algoritmus elsőként a színszeparációval (CD) egy kék (Hematoxin) és egy barna (DAB) képre választja szét az eredeti RGB képet. A magokban észlelhető pozitív reakciót (jobb felül) intenzitástérképpé (jobb alul) átalakítva végzi az automatikus kiértékelést. (Krecsák et al. 2011 (72) alapján, módosítva)

A sejtmagdetekciós algoritmus első lépésben ugyanazt a színszeparációs (ColorDeconvolution) eljárást alkalmazza, mint a MembraneQuant algoritmus. A bemeneti kép a digitális tárgylemez színes (RGB) képe, amiből a szeparációt követően két szürkeárnyaltos, egy a pozitív sejtmagokat tartalmazó, barna csatorna (DAB) és egy a negatív sejtmagokat tartalmazó, kék csatorna (Hematoxin) kép keletkezik (19. Ábra). Ez az elkülönítés a kiértékeléshez szükséges, mert a pozitív intenzitások a barna csatornán lesznek meghatározva, a kék csatornán detektált sejtmagok a negatív, immunreakcióval nem jelölődő sejtek lesznek. A programban lehetőség van a sejtmagdetekció kalibrálására, az átlagos sejt átmérő, valamint a festési intenzitás és a kontraszt szabályozásával. A sejtmagdetekció háttérében egy régiónövelő algoritmus áll. A szürkecsatornás képen elsőként egy intenzitás térkép készül, amin a potenciális sejtmagvak egy középponttal jelölődnek. Ez a kép a bemenete a következő analitikai szintnek, ahol ezekből a központokból egy régiónövelő algoritmus fokozatosan felépíti a sejtmagdetekciós eredményképet. A méret és intenzitás beállítások a régiónövelő algoritmus viselkedését befolyásoló paraméterek. A magdetekció eredményképén meghatározzuk a festett sejtmagok átlagintenzitását, majd ez alapján csoportosítjuk azokat a patológus által beállított határértékeknek megfelelően. Végül az NQ a sejtek individuális értékei és az irányelveknek megfelelően beállított küszöbértékek alapján kikalkulálja az adott látótérre (ROI) vagy azok összességéből az esetre jellemző magi, esetünkben Allred féle Quick Index értékét.

A detektáló algoritmust a megfelelő működéshez kalibrálni kellett, melyhez a különböző pozitivitású reakciót adó digitális metszeteken 38, átlagosan 195 sejtet tartalmazó területet jelöltünk ki, majd ezeket Allred szerint kiértékeljük. A NuclearQuant applikációt ezeken a kijelölt területeken futtattuk le, majd az eredményt a digitális metszeteken történő manuális pozitívítási jelöléssel összevetve addig finomítottuk a detektálási beállításokat, míg a manuális detekciót megközelítő eredményt nem kaptunk. A kalibrálás során a hormonpozitivitás vizsgálatára bevett gyakorlat szerint az Allred-indexet használtuk, és ennek megfelelően állítottuk be a NuclearQuant szoftver detektálási paramétereit. Fenti beállításokat később *.misp kiterjesztésű fájlba elmentve tudtuk a detektálási beállításokat standardizálni, a többi validálandó metszetre is alkalmazni.

Ezt követte a második, validációs lépés, melynek során a minden digitális metszeten bejelölt 3-5, összességében 53 informatív területet (átlagos sejtszám 5069; 2780-19740)

elemztük a már jól beállított, kalibrált NuclearQuant szoftverrel. A kapott eredményeket az interobserver variancia megítélésre nemzetközileg elfogadott Cohen-féle κ , négyzetesen súlyozott κ értékkel, illetve Spearman-féle rangkorrelációval értékeltük. (Lásd Statisztikai módszerek alfejezet)

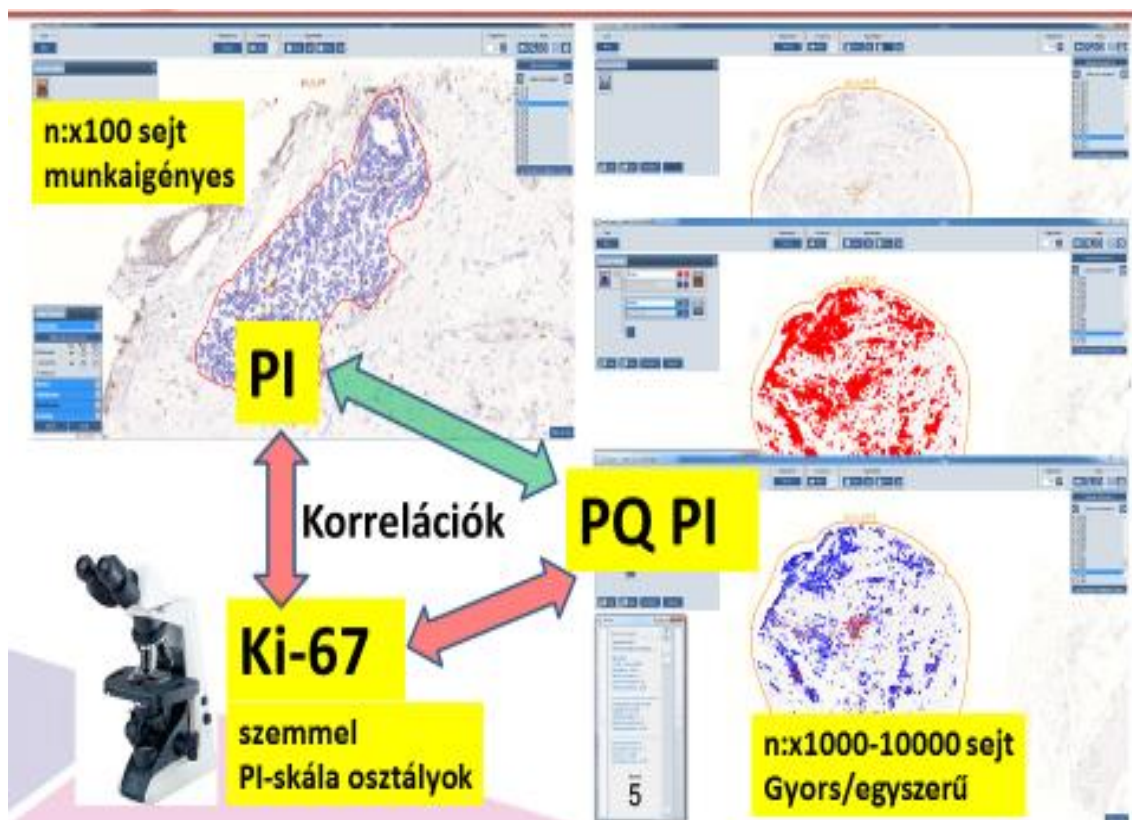
Az összehasonlítás itt diszkrét csoportok (Allred Index) és a gépi értékek alapján osztályokba sorolás között történt. Újabb, és potenciálisan érdekes, újat nyújtó metodika lehetne a gépi eredmények adta folyamatos változók túlélési adatokkal való összevetése, de ehhez még hosszas követéses vizsgálatokra és klinikai adatgyűjtésre van szükség.

3.3.4. Ki-67 proliferációs marker digitális kiértékelésének validálása

A Ki-67 validációs vizsgálatot pilot-study-ként 177 a Budai MÁV kórházban 1999-2004 közt műtött, HR-pozitív emlőrákos betegek blokkjaiból készült TMA-kon végeztük el. A betegek klinikai követése a Semmelweis Egyetem Kutatásetikai Bizottság IKEB,#7-1/2008 engedélyének birtokában történt. Későbbiekben a proliferációs index vizsgálatát Ács Balázs és munkatársai folytatták és validálták nagyobb beteganyagban.

Az immunmetszetek kiértékelése először a bescannelt metszeteken történt, hagyományos, szemikvantitatív becsléssel, 10 osztályba sorolással: 0:0%, 1:≤1%, 2: 2-5%, 3:6-10%, 4:11-14%, 5:15-20%, 6:21-33%, 7:34-50%, 8:51-66%, 9:67-80%, 10:81-100%. (Ki-67: a humán szemmel, becsléssel meghatározott proliferációs index, 10 osztályba sorolt, diszkrét változó.) A kiértékelést 3 egymástól független patológus végezte el térben és időben elkülönítve (SQ1, SQ2, SQ3). A későbbiekben ezen kiértékelések konszenzus értékeivel (Ki-67C, SQRef) számoltunk.

Ezt követően a tumoros core-ok proliferációs indexét két gépi módszerrel is meghatároztuk (20. Ábra). Az egyikben a patológus körbejelölte a tumoros területeket, majd azon az előzőekben validált NuclearQuant applikációval határoztuk meg a proliferáló sejtek százalékát. Ez egy időigényesebb módszer, hiszen a tumoros részeket kézzel, a digitális lemezen kell kijelölni és ezekre kell lefuttatni a programot. A kijelölt területektől függően a módszer többszáz sejten meghatározott, tetszőleges pontosságú, folyamatos változót ad eredményül. (PI: Proliferációs Index a manuálisan lerakott annotációkon gépi meghatározással (NuclearQuant), folyamatos változó).



20.Ábra: A különböző módon kapott proliferációs index-ek jellegzeteségei és összehasonlítási módjai. PI: Proliferációs Index a manuálisan lerakott annotációkon gépi meghatározással (NuclearQuant) folyamatos változót ad eredményül; Ki-67: a humán szemmel, becsléssel meghatározott proliferációs index, 10 osztályba sorolt, diszkrét változó, PQPI: A tumorfelismerő program (PatternQuant) által felismert tumoros területeken gépi (NuclearQuant) proliferációs index meghatározása. Piros nyíl: nonparametrikus tesztek, Zöld nyíl: parametrikus tesztek.

Ennél lényegesen kényelmesebb és gyorsabb lehetőség a teljesen automatizált meghatározás, melynek során először meg kell tanítani a gépnek a tumoros részek felismerését. Ez a tanítási fázis több jellemző tumoros, kötőszöveti, gyulladással terület kijelölésével kezdődik, mellyel megfelelő kijelölések esetében a PatternQuant program (3DHitech, Budapest) először biztonsággal ismeri fel a tumoros területeket, majd ezt követően az előbb ismertetett gépi proliferációs index meghatározás folyamata indul el. Ezzel a módszerrel gyorsan és egyszerűen lehet több ezer-tízezer sejten meghatározni a proliferáló sejtek százalékát, folyamatos változóként. Nehézséget jelenthet, ha nehezen elkülöníthető tumoros és nem tumoros területek vannak a metszeteken, melyek elkülönítését a program esetleg nem megfelelő biztonsággal tudja elvégezni (pl. DCIS, ILC). (PQPI: PatternQuant által felismert tumoros területeken gépi, NuclearQuant proliferációs ráta meghatározás, folyamatos változó.) (20. Ábra).

3.4. Statisztikai módszerek

Az adatok statisztikai analízisét SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) és MedCalc for Windows v. 11.2.1.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium), valamint Statistica 12 (StatSoft, Tulsa, OK) programokkal végeztük és ábráztuk.

Validációnk során részben folyamatos változókat (gépi analízis eredményei), részben diszkrét változókat (hagyományos kiértékeléssel meghatározott becsült osztályok) kaptunk és ezeket kellett korreláltatni egymással, vagyis azt vizsgálni, hogy mennyire mozognak egymással, mennyire függenek egymástól. Ugyanakkor sok változónál a normál eloszlás nem teljesül és ilyenkor a kapcsolat vizsgálata számos statisztikai próbával lehetséges, ami sajnos a szakirodalomban is igen változó és néha nehezen összehasonlítható eredmények publikálásához vezet.

Normál eloszlású változók esetén lineáris kapcsolat lehetősége merül fel, melynek mérésére a Pearson-féle Korrelációs Koefficiens (PCC, nevezhetik Interclass Correlation-nek is), vagy regressziós együttható (R, r) használható. Ennek alternatívája lehet az ICC (IntraClass Correlation) mérőszáma, amely nem a csoportok közötti különbséget, hanem a csoportokba rendezett minőségi változók csoporton belüli hasonlóságát, homogenitását vizsgálja. Pozitív érték esetén párhuzamos, míg negatív érték esetén ellentétes irányú összefüggésről van szó. Ha az érték bármely irányból a 0-hoz közelít, akkor az a két változó függetlenségére utal. Általánosságban az mondható, hogy minél közelebb van az adott mérőszám a ± 1 -hez, annál szorosabb az összefüggés, vagyis jobb az egyezés és a két változó annál jobban függ egymástól. Ha a korrelációs együttható $\pm 0,2$ - $0,4$ közötti, akkor gyenge kapcsoltságról van szó. $\pm 0,4$ - $0,7$ között közepes, $\pm 0,7$ - $0,9$ között markáns, $\pm 0,9$ felett erősen függő kapcsolatról van szó.

Az interobserver egyezés vagy megbízhatóság mértékének megítélésére régebben egyszerűen százalékos arányt adtak meg, de mára legelterjedtebb a Cohen-féle kappa (Cohen's κ) érték lett, mely a véletlenszerű találgatás hatását kimutató mérőszám. Ha például $\kappa=0,3$ eredmény jön ki, az azt jelenti, hogy az adott biomarker interim jellemzője az eredményt kb. 30%-ban határozza meg, míg a különböző vizsgálóktól kapott, interobserver eltérések 70%-ban befolyásolják a végső értéket. Nemzetközileg a Landis & Koch (116) által javasolt csoportok terjedtek el, mely szerint megkülönböztetünk: 0-

0,2: gyenge egyezést; 0,21-0,4: mérsékelt egyezést; 0,41-0,6: közepes egyezést, 0,61-0,8: megfelelő egyezést, 0,81-1,00: szinte tökéletes egyezést.

Az adatok, illetve összefüggések klinikai relevanciájának megítélésére még alkalmasabb a négyzetesen súlyozott κ (Quadratic Weighted Kappa, QWK) érték, amely kiszámításánál nagyobb súllyal szerepelnek a különböző csoportok (pozitív vs. negatív) közötti átsorolást eredményező tévedések, míg az ugyanazon klinikai csoportokon belüli osztályok (pozitivitás vagy negativitás mértéke) kisebb súllyal szerepelnek. Ehhez tehát előre kell definiálni egy mátrixot, amelyben a különböző értékek és klinikailag releváns csoportok közti átsorolás súlyszámait meghatározzuk. A négyzetesen súlyozott κ értékkel olyan mérőszámot kapunk az egyezés megítélésére, mely figyelembe veszi az esetleges eltérés klinikai következményét is és ezért pontosabban tudja jellemezni az egyezést klinikai kontextusban és nem csak matematikailag számolja ki azt. HER2 esetében a HER2 0, 1+ és HER2 2+, 3+ csoportok közötti átsorolás kedvezőtlen hatású, hiszen a beteg vagy feleslegesen kap anti-HER2 terápiát, vagy pedig elesik annak potenciálisan jótékony hatásától. HR-esetében az AQI 0-2 és AQI 3-8 csoportok közötti átsorolás szintén kedvezőtlenül befolyásolja a hormonterápia megkezdését. Ki-67 esetében az alacsony és magas proliferációs index-ű csoportok közötti félresorolás, vagyis leginkább a luminális A- és B-típus közti distinkció szenvedhet csorbát, alapvetően befolyásolva a betegnél folytatandó kezelést. Ezen tévedések tehát nagyobb súlyszámmal szerepelnek, mint a csoportokon belüli finomabb eltérések. A mérőszám eredményének megítélésére itt is a fentebb javasolt egyezési-csoportokat használtuk.

Korrelációk számításánál szintén gyakran használt módszer a Spearman féle rangkorreláció (Spearman's ρ , rho). Ez főleg a nem folyamatós változók esetében jelent hasznos lehetőséget, hiszen itt a különböző csoportok közötti, nem parametrikus összefüggések vizsgálatára nyílik lehetőség. Ez lényegében a lineáris korreláció speciális esete, ahol a különböző csoportokba sorolt változók egymástól való távolságát, illetve egyirányba történő változását vizsgáljuk. A Spearman-féle rangkorreláció alternatívája a Kendall-féle rangkorreláció τ (tau)-értéke. Ez a pozitív és negatív kapcsolatok arányának a különbségét számolja ki.

A különböző tesztek pontosságát leíró F-measure vagy F-score vagy F-érték egy újabb mérőszám, mely a Precision Rate, vagyis Pozitív Prediktív Érték (PPÉ) és Recall Rate

(RR) vagy Szenzitivitás súlyozott harmonikus közepeként került definiálásra ($F=2PPÉ*RR/(PPÉ+RR)$).

A kapott értékek biológiai relevanciáját Kaplan-Meier féle túlélési görbéken tanulmányoztuk. Hasonló mérőszám az ún. kockázati tényező (HR, Hazard Ratio), mely egy vizsgált esemény bekövetkezésének valószínűségét jellemzi a kontrollcsoporthoz képest. Az 1-nél nagyobb szám emelkedett valószínűséget, vagyis fokozott rizikót jelent. Az 1-nél kisebb érték csökkent valószínűséget, csökkent rizikót jelent.

Két adatsor egyezőségének vizsgálatára gyakran használt módszer a Student-féle t-teszt.

4. Eredmények

4.1. Markerek hagyományos üveg, illetve digitalizált metszeteken történő kiértékelésének összehasonlítása

4.1.1. HER2 immunreakciók értékelésének összehasonlítása

6.Táblázat: HER2 immunreakció hagyományos módon (M) végzett kiértékelésének patológusok közötti, interobserver összehasonlítása.

HER2	Cohen-féle κ (95% CI)	Négyzetesen súlyozott κ	Spearman féle rang- korreláció (df, 95% CI)
M1 vs. M2	0.779 (0.744-0.813)	0.942 (0.930-0.953)	0.940 (782, 0.932-0.948)
M1 vs. M3	0.712 (0.674-0.750)	0.925 (0.913-0.937)	0.927 (782, 0.916-0.936)
M2 vs. M3	0.725 (0.687-0.763)	0.936 (0.925-0.947)	0.936 (782, 0.925-0.947)

7.Táblázat: HER2 immunreakció digitális lemezeken (D) végzett kiértékelésének patológusok közötti, interobserver összehasonlítása.

HER2	Cohen-féle κ (95% CI)	Négyzetesen súlyozott κ	Spearman féle rang- korreláció (df, 95% CI)
D1 vs. D2	0.722 (0.684-0.760)	0.917 (0.902-0.933)	0.916 (782, 0.904-0.927)
D1 vs. D3	0.712 (0.674-0.750)	0.916 (0.902-0.930)	0.917 (782, 0.905-0.928)
D2 vs. D3	0.698 (0.659-0.736)	0.912 (0.897-0.928)	0.912 (782, 0.900-0.923)

A HER2 immunhisztokémia reakciók hagyományos (6.Táblázat) és digitális módon (7.Táblázat) történő kiértékelésének patológusok közti összehasonlításánál látható, hogy a κ értékek minden esetben a megfelelő (0,61-0,8) osztályba estek, míg a négyzetesen súlyozott κ és a Spearman-féle rangkorreláció értékei a szinte tökéletes (0,81-1) kategóriába illettek.

8.Táblázat: HER2 immunreakció hagyományos módon (M) és digitális (D) metszeten végzett kiértékelésének módszerek közötti összehasonlítása patológusonként.

HER2	Cohen-féle κ (95% CI)	Négyzetesen súlyozott κ	Spearman féle rang- korreláció (df, 95% CI)
M1 vs. D1	0.820 (0.788-0.852)	0.951 (0.942-0.961)	0.951 (782, 0.944-0.957)
M2 vs. D2	0.634 (0.593-0.674)	0.901 (0.886-0.916)	0.904 (782, 0.890-0.916)
M3 vs. D3	0.579 (0.538-0.621)	0.876 (0.858-0.894)	0.905 (782, 0.892-0.917)

A 8.Táblázat mutatja ugyanazon patológus hagyományos módon és digitális módon történő (módszerek közötti) HER2 immunreakció kiértékelésének összehasonlítását. P1

minden κ értéke a szinte tökéletes (0,81-1) osztályba esett, míg P2 és P3 esetében a κ értékek 0,6 körül alakultak. A klinikailag relevánsabb négyzetesen súlyozott κ és Spearman-féle rangkorreláció minden esetben a szinte tökéletes (0,81-1) osztályba esett.

A 9. táblázat mutatja összesítve a HER2 immunreakciók kiértékelésének összehasonlításait. A felső részben a κ -értékek általában 0,6-0,8 közöttiek, vagyis legalább a megfelelő egyezést mutató osztályba esnek, míg az alsó táblázatrészben a négyzetesen súlyozott κ értékek általában legalább 0,9 körüliek vagy a felettié, és így a szinte tökéletes egyezést mutató kategóriába sorolandók.

9.Táblázat: A különböző értékek összesített összehasonlító táblázata HER2 esetében. Szürkével kiemelt a hagyományos üveglemez alapú, sárgával kiemelt a digitális lemez alapú interobserver összehasonlítás, míg a zölddel kiemelt ugyanazon patológus módszerek közötti összehasonlítása. Felső rész a Cohen κ -értékeket, míg alsó a négyzetesen súlyozott κ -értékeket mutatja.

HER2 Cohen κ	P1 Digitális	P2 Manuális	P2 Digitális	P3 Manuális	P3 Digitális
P1 manuális	0.82 (0.788-0.852)	0.779 (0.744-0.813)	0.698 (0.659-0.736)	0.712 (0.674-0.750)	0.67 (0.631-0.710)
P1 digitális		0.692 (0.654-0.730)	0.722 (0.684-0.760)	0.597 (0.556-0.639)	0.712 (0.674-0.750)
P2 manuális			0.634 (0.593-0.674)	0.725 (0.687-0.763)	0.596 (0.554-0.637)
P2 digitális				0.599 (0.558-0.641)	0.698 (0.659-0.736)
P3 manuális					0.579 (0.538-0.621)
HER2 QWK, κ^2	P1 digitális	P2 Manuális	P2 Digitális	P3 Manuális	P3 Digitális
P1 Manuális	0.951 (0.942-0.961)	0.942 (0.930-0.953)	0.915 (0.901-0.929)	0.925 (0.913-0.937)	0.904 (0.889-0.919)
P1 Digitális		0.917 (0.904-0.930)	0.917 (0.902-0.933)	0.892 (0.877-0.907)	0.916 (0.902-0.930)
P2 Manuális			0.901 (0.886-0.916)	0.936 (0.925-0.947)	0.884 (0.869-0.901)
P2 Digitális				0.876 (0.856-0.895)	0.912 (0.897-0.928)
P3 Manuális					0.876 (0.858-0.894)

4.1.2. Ösztrogén receptor immunreakció kiértékelésének összehasonlítása

10.Táblázat. ER immunreakció hagyományos módon (M) végzett kiértékelésének patológusok közötti, interobserver összehasonlítása.

ER	Cohen-féle κ (95% CI)	Négyzetesen súlyozott κ	Spearman féle rang- korreláció (df, 95% CI)
M1 vs. M2	0.456 (0.417-0.496)	0.917 (0.903-0.931)	0.918 (783, 0.906-0.928)
M1 vs. M3	0.645 (0.607-0.682)	0.956 (0.947-0.966)	0.947 (783, 0.939-0.954)
M2 vs. M3	0.447 (0.408-0.486)	0.917 (0.903-0.932)	0.921 (783, 0.909-0.931)

11.Táblázat. ER immunreakció digitális lemezekon (D) végzett kiértékelésének patológusok közötti, interobserver összehasonlítása.

ER	Cohen-féle κ (95% CI)	Négyzetesen súlyozott κ	Spearman féle rang- korreláció (df, 95% CI)
D1 vs. D2	0.580 (0.541-0.618)	0.935 (0.920-0.951)	0.925 (783, 0.914-0.935)
D1 vs. D3	0.633 (0.595-0.670)	0.961 (0.953-0.969)	0.945 (783, 0.937-0.952)
D2 vs. D3	0.532 (0.493-0.572)	0.930 (0.914-0.946)	0.919 (783, 0.907-0.929)

A 10., illetve 11.Táblázatban az ösztrogén receptor immunreakciók hagyományos és digitális módon történő kiértékelésének patológusok közti összehasonlítását mutatjuk. A κ értékek a hagyományos és digitális módon is a közepes (0,41-0,6) és megfelelő (0,61-0,8) osztályba estek, habár a digitális módszernél kapott értékek általában magasabb egyezést mutattak. Ugyanakkor a négyzetesen súlyozott κ és a Spearman-féle rangkorreláció értékei minden esetben a szinte tökéletes (0,81-1) kategóriába estek.

12.Táblázat. ER immunreakció hagyományos módon (M) és digitális (D) metszeten végzett kiértékelésének módszerek közötti összehasonlítása patológusonként.

ER	Cohen-féle κ (95% CI)	Négyzetesen súlyozott κ	Spearman féle rang- korreláció (df, 95% CI)
M1 vs. D1	0.767 (0.738-0.800)	0.973 (0.966-0.980)	0.968 (783, 0.963-0.972)
M2 vs. D2	0.484 (0.444-0.524)	0.909 (0.890-0.928)	0.910 (783, 0.897-0.921)
M3 vs. D3	0.559 (0.521-0.598)	0.935 (0.921-0.948)	0.943 (783, 0.935-0.950)

Az ugyanazon patológus hagyományos módon és digitális módon történő kiértékelését tagláló **12.Táblázatban** látható, hogy P1 κ értéke magasabb volt és a megfelelő (0.61-

0.8) kategóriába estek, míg P2 és P3 esetében a κ értékek 0.5 körül alakultak, vagyis a közepes osztályba (0.41-0.6) estek. Ugyanakkor a klinikai relevanciát figyelembe vevő négyzetesen súlyozott κ és a Spearman-féle rangkorreláció minden esetben 0.9 felettinek adódott, vagyis szinte tökéletes (0.81-1) osztályúnak adódott.

A **13. Táblázatban** az ER immunreakciók különböző módon történő kiértékeléseinek összehasonlítását foglaltuk össze. A felső részében a κ -értékek változatosabbak, általában 0,3-0,8 közöttiek, ami alapvetően az Allred-index szélesebb lehetséges értéktartományára (0, 2-8) vezethető vissza. A táblázat alsó részének klinikailag relevánsabb négyzetesen súlyozott κ értékei ugyanakkor általában 0,9 körüliek vagy magasabbak, tehát a szinte tökéletes egyezést mutató kategóriába sorolandók.

13.Táblázat. Az ösztrogén receptor (ER) IHC értékek összesített összehasonlító táblázata. Szürkével kiemelt a hagyományos üveglemez alapú, sárgával kiemelt a digitális lemez alapú interobserver összehasonlítás, míg a zölddel kiemelt ugyanazon patológus módszerek közötti összehasonlítása. Felső táblázat a κ -, alsó a négyzetesen súlyozott κ -értékeket mutatja.

ER Cohen κ	P1 Digitális	P2 Manuális	P2 Digitális	P3 Manuális	P3 Digitális
P1 Manuális	0.767 (0.738-0.800)	0.456 (0.417-0.496)	0.597 (0.559-0.635)	0.645 (0.607-0.682)	0.556 (0.517-0.595)
P1 Digitális		0.43 (0.391-0.469)	0.58 (0.541-0.618)	0.645 (0.607-0.682)	0.633 (0.595- 0.670)
P2 Manuális			0.484 (0.444-0.524)	0.447 (0.408-0.486)	0.329 (0.291-0.366)
P2 Digitális				0.558 (0.519-0.596)	0.532 (0.493-0.572)
P3 Manuális					0.559 (0.521-0.598)
ER QWK, κ^2	P1 Digitális	P2 Manuális	P2 Digitális	P3 Manuális	P3 Digitális
P1 Manuális	0.973 (0.966-0.980)	0.917 (0.903-0.931)	0.932 (0.917-0.948)	0.956 (0.947-0.966)	0.95 (0.940-0.960)
P1 Digitális		0.914 (0.901-0.928)	0.935 (0.920-0.951)	0.956 (0.947-0.965)	0.961 (0.953-0.969)
P2 Manuális			0.909 (0.890-0.928)	0.917 (0.903-0.932)	0.894 (0.878-0.910)
P2 Digitális				0.922 (0.904-0.940)	0.93 (0.914-0.946)
P3 Manuális					0.935 (0.921-0.948)

4.1.3. Progeszteron receptor immunreakció kiértékelésének összehasonlítása

A PR immunhisztokémiai reakciók hagyományos, illetve digitális módon történő kiértékelésének patológusok közti összehasonlítását mutatja a 14., illetve 15. Táblázat. Mindkét módszerrel közepes (0.41-0.6) vagy megfelelő (0.61-0.8) osztályba estek a κ értékek, de az egyezés jobb volt a digitális módszerrel. A négyzetesen súlyozott κ és a Spearman-féle rangkorreláció értékei minden esetben a szinte tökéletes (0.81-1) osztályba estek, ami mindkét módszer klinikai relevanciáját erősen alátámasztja.

14. Táblázat. PR immunreakció hagyományos módon (M) végzett kiértékelésének patológusok közötti, interobserver összehasonlítása.

PR	Cohen-féle κ (95% CI)	Négyzetesen súlyozott κ	Spearman féle rang- korreláció (df, 95% CI)
M1 vs. M2	0.496 (0.459-0.534)	0.924 (0.906-0.942)	0.936 (787, 0.927-0.943)
M1 vs. M3	0.642 (0.606-0.678)	0.955 (0.945-0.965)	0.958 (787, 0.952-0.964)
M2 vs. M3	0.501 (0.464-0.538)	0.932 (0.916-0.949)	0.922 (787, 0.911-0.932)

15. Táblázat. PR immunreakció digitális lemezekon (D) végzett kiértékelésének patológusok közötti, interobserver összehasonlítása.

PR	Cohen-féle κ (95% CI)	Négyzetesen súlyozott κ	Spearman féle rang- korreláció (df, 95% CI)
D1 vs. D2	0.638 (0.602-0.675)	0.962 (0.953-0.970)	0.958 (787, 0.952-0.964)
D1 vs. D3	0.640 (0.604-0.677)	0.943 (0.927-0.959)	0.942 (787, 0.933-0.949)
D2 vs. D3	0.618 (0.580-0.655)	0.945 (0.929-0.960)	0.940 (787, 0.931-0.948)

16. Táblázat. PR immunreakció hagyományos módon (M) és digitális (D) metszeten végzett kiértékelésének módszerek közötti összehasonlítása patológusonként.

PR	Cohen-féle κ (95% CI)	Négyzetesen súlyozott κ	Spearman féle rang- korreláció (df, 95% CI)
M1 vs. D1	0.781 (0.749-0.814)	0.982 (0.977-0.987)	0.987 (787, 0.969-0.976)
M2 vs. D2	0.545 (0.517-0.583)	0.939 (0.923-0.955)	0.933 (787, 0.923-0.941)
M3 vs. D3	0.669 (0.633-0.706)	0.942 (0.926-0.958)	0.943 (787, 0.935-0.951)

A 16. Táblázatban ugyanazon patológus hagyományos módon és digitális módon történő PR immunreakciók kiértékelését hasonlítottuk össze. P1 értékei itt is magasabbak voltak és magasan a megfelelő (0.61-0,8) kategóriába estek. P2 és P3 kiértékeléseinél a κ értékek

kissé alacsonyabbak voltak, 0.6 körül alakultak, vagyis a közepes (0.41-0.6) és megfelelő (0.61-0.8) osztályba estek. A klinikai relevanciát erősebben figyelembe vevő négyzetesen súlyozott κ és a Spearman-féle rangkorreláció azonban már minden esetben szinte tökéletesnek (0.81-1) bizonyult.

A 17. Táblázat foglalja össze a PR immunreakciók kiértékelésének összehasonlítását. A felső részében a változatosabb κ -értékekben (0,4-0,8) is tükröződik az Allred-index szélesebb értéktartománya, de ezen κ -k is legalább a közepes kategóriába tartoznak. Ugyanakkor az alsó részben látható és a klinikai relevanciát jobban tükröző négyzetesen súlyozott κ értékek általában 0,9 körüliek vagy magasabbak, vagyis a szinte tökéletes egyezést mutató kategóriába sorolandók.

17.Táblázat.A különböző értékek összesített összehasonlító táblázata, progesteron receptor IHC. Szürkével kiemelt a hagyományos üveglemez alapú, sárgával kiemelt a digitális lemez alapú interobserver összehasonlítás, míg a zölddel kiemelt ugyanazon patológus módszerek közötti összehasonlítása. Felső táblázat a κ -értékeket, míg alsó a négyzetesen súlyozott κ -értékeket mutatja.

PR Cohen κ	P1 Digitális	P2 Manuális	P2 Digitális	P3 Manuális	P3 Digitális
P1 Manuális	0.781 (0.749-0.814)	0.496 (0.459-0.534)	0.65 (0.614-0.687)	0.642 (0.606-0.678)	0.585 (0.549-0.622)
P1 Digitális		0.475 (0.438-0.512)	0.638 (0.602-0.675)	0.661 (0.625-0.698)	0.64 (0.604-0.677)
P2 Manuális			0.545 (0.517-0.583)	0.501 (0.464-0.538)	0.432 (0.395-0.468)
P2 Digitális				0.612 (0.575-0.649)	0.618 (0.580-0.655)
P3 Manuális					0.669 (0.633-0.706)
PR QWK, κ^2	P1 Digitális	P2 Manuális	P2 Digitális	P3 Manuális	P3 Digitális
P1 Manuális	0.982 (0.977-0.987)	0.924 (0.906-0.942)	0.959 (0.950-0.968)	0.955 (0.945-0.965)	0.934 (0.917-0.951)
P1 Digitális		0.926 (0.908-0.943)	0.962 (0.953-0.970)	0.952 (0.942-0.963)	0.943 (0.927-0.959)
P2 Manuális			0.939 (0.923-0.955)	0.932 (0.916-0.949)	0.904 (0.882-0.926)
P2 Digitális				0.956 (0.947-0.965)	0.945 (0.929-0.960)
P3 Manuális					0.942 (0.926-0.958)

4.2. Immunhisztokémiai reakciók digitális/szemiautomatikus kiértékelésének validálása

4.2.1. HER2 immunreakció kiértékelésének összehasonlítása

A 18. Táblázatban látható, hogy a patológusok által megadott HER2-osztályok (P1 és P2), illetve a Konszenzus Osztály (CS, Consensus Score) és a MembraneQuant (MQ) által adott HER2-osztályok a megfelelő és szinte tökéletes kategóriába eső egyezést mutattak (MQ vs. P1:0.668, MQ vs. P2: 0.663, MQ vs. CS:0.872). A klinikai relevanciát is figyelembe vevő Négyzetesen súlyozott κ értékek végig a szinte tökéletes egyezés kategóriájába estek (MQ vs. P1: 0.905, MQ vs. P2:0.901, MQ vs. CS: 0.967). A Spearman féle rang-korreláció is erősnek bizonyult és a szinte tökéletes kategóriába esett (MQ vs. P1: 0.861, MQ vs. P2:0.842, MQ vs. CS: 0.928).

18.Táblázat. Az emlőkarcinomás minták HER2 immunhisztokémiai kiértékelésének egyezése a gépi (MembraneQuant, MQ) és a patológusok egyedi (P1, P2) és Konszenzus Score-jával (CS)

	Cohen-féle κ (95% CI)	Négyzetesen súlyozott κ	Spearman féle rang- korreláció (df, 95% CI)
MQ vs. P1	0.668 (0.575-0.761)	0.905 (0.870-0.941)	0.861 (172, 0.817-0.895)
MQ vs. P2	0.663 (0.569-0.756)	0.901 (0.864-0.938)	0.842 (172, 0.793-0.881)
MQ vs. CS	0.872 (0.805-0.939)	0.967 (0.947-0.986)	0.928 (172, 0.904-0.946)

Az áttétes esetek kizárásával, az így fennmaradó 135 darab csak primer daganat kiértékelésénél is hasonló eredményeket kaptunk a patológusok HER2-osztályai (P1 és P2), illetve a Konszenzus Osztály (CS) és a MembraneQuant (MQ) által HER2-osztályok között (19.Táblázat). Ezek a megfelelő és szinte tökéletes kategóriába estek (MQ vs. P1:0.635, MQ vs. P2: 0.629, MQ vs. CS:0.868). A klinikai relevanciát is figyelembe vevő Négyzetesen súlyozott κ értékek végig a szinte tökéletes egyezés kategóriájába estek (MQ vs. P1: 0.906, MQ vs. P2:0.901, MQ vs. CS: 0.970). A Spearman féle rang-korreláció is erősnek bizonyult és a szinte tökéletes kategóriába esett (MQ vs. P1: 0.864, MQ vs. P2:0.840, MQ vs. CS: 0.937).

19.Táblázat. A primer emlőkarcinomás minták HER2 immunhisztokémiai kiértékelésének egyezése a gépi (MembraneQuant, MQ) és a patológusok egyedi (P1, P2) és Konszenzus Score-jával (CS)

	Cohen-féle κ (95% CI)	Négyzetesen súlyozott κ	Spearman féle rang- korreláció (df, 95% CI)
MQ vs. P1	0.635 (0.528-0.743)	0.906 (0.868-0.945)	0.864 (134, 0.815-0.902)
MQ vs. P2	0.629 (0.521-0.738)	0.901 (0.861-0.942)	0.840 (134, 0.783-0.884)
MQ vs. CS	0.868 (0.792-0.946)	0.970 (0.949-0.990)	0.937 (134, 0.912-0.955)

A hagyományos módon történő HER2-kiértékelés során 12 esetet találtunk HER2 IHC 2+ pozitívnek, melyeket a program is ugyanebbe a csoportba sorolt 11 esetben. Az IHC-vel pozitívnek (IHC 2+ és IHC 3+) talált esetekből FISH vizsgálatot is végeztünk, melynek során ezek fele bizonyult FISH pozitívnek. A HER2 3+ esetek mindegyike FISH-pozitív lett. A vizsgálat során a programmal összességében 12 IHC 2+ és 23 IHC 3+ esetet értékeltünk és szinte tökéletes egyezést találtunk a konszenzus HER2-osztállyal.

4.2.2. HER2 IHC 2+ esetek elemzése FISH-szemponyjából

Említettem, hogy a *MembraneQuant* program a HER2-osztály automatikus meghatározásánál számos különböző adatot számít ki minden egyes sejtre. Ezen adatokat kimentve és tovább analizálva a FISH-pozitivitás prediktálását elősegítő különbségeket próbáltunk keresni. 15 IHC2+ esetet vizsgáltunk meg ilyen módon, melyek közül 9 bizonyult FISH-negatívnak, 6 pedig FISH-pozitívnak HER2-amplifikáció szempontjából. Ezen eseteket a FISH pozitivitás alapján dichotomizálva, összehasonlítottuk a *MembraneQuant* által szolgáltatott különböző adatokat. Mivel a program számos különböző értéket, illetve származtatott értéket kalkulál ki, itt nem ismertetem mindet, csak azokat, melyek az elemzés során szignifikáns különbséget mutattak a FISH pozitív és negatív esetek között.

A FISH negatív esetek digitalizált képein t-próbával vizsgálva magasabb volt a HER2 IHC-negatív sejtek aránya, és alacsonyabb volt a HER2 2+ és 3+ sejtek aránya, mint a FISH pozitív esetekben (2+: 8.38% vs. 15.27%; $p=0.0797$; 3+: 1.26 vs. 4.07%; $p=0.0178$), de ez csak a 3+ sejtaránynál ért el szignifikáns szintet. (20.Táblázat; 21.Ábra felső része) A különböző csoportokba sorolt sejtek súlyozott összegeként kalkulált H-Score ($H\text{-Score}=(1*IHC1+\%)+(2*IHC2+\%)+(3*IHC3+\%)$) értéke magasabb volt a

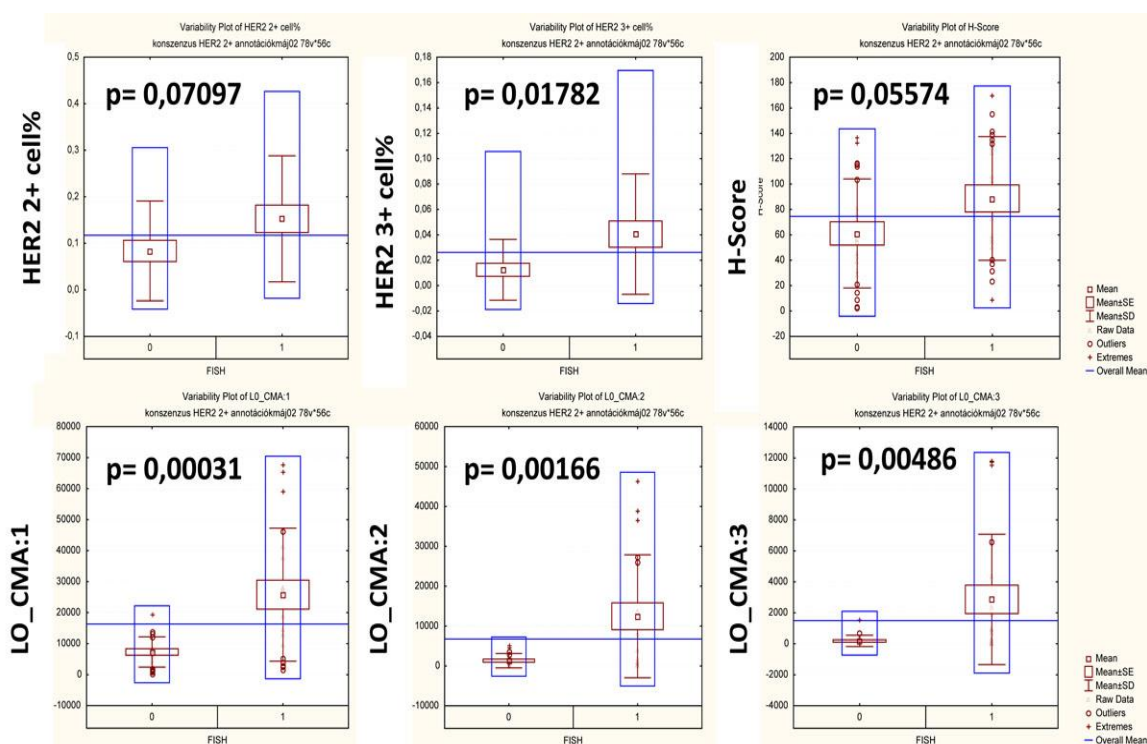
FISH pozitív esetekben, de ez nem érte el a szigorúan vett szignifikancia szintjét (61.25 vs. 88.8; $p=0.05574$), inkább csak trendként jellemezhetjük.

20.Táblázat. A HER2 2+ és HER2 3+ sejtek arányainak, illetve a H-Score értékének különbsége a FISH-pozitivitás alapján dichotomizált csoportokban. A FISH+ és FISH- csoportok értékeinek eltérését t-próbával vizsgáltuk.

	FISH-	FISH+	FISH-	FISH+	FISH-	FISH+
p=	0.07097		0.01782		0.05574	
	HER2 2+ % RATIO		HER2 3+ % RATIO		H-Score	
Átlag	8.38%	15.27%	1.26%	4.07%	61.25	88.80

21.Táblázat: A különböző HER2 IHC-pozitivitási csoportokba tartozó eseteknek szignifikánsan magasabb „Mask Area” értékeik voltak a FISH pozitív esetekben.

	FISH-	FISH+	FISH-	FISH+	FISH-	FISH+
p=	0,00031		0,00166		0,00486	
	LO_CMA:1+		LO_CMA:2+		LO_CMA:3+	
Átlag	7315	25794	1317	12464	184	2866

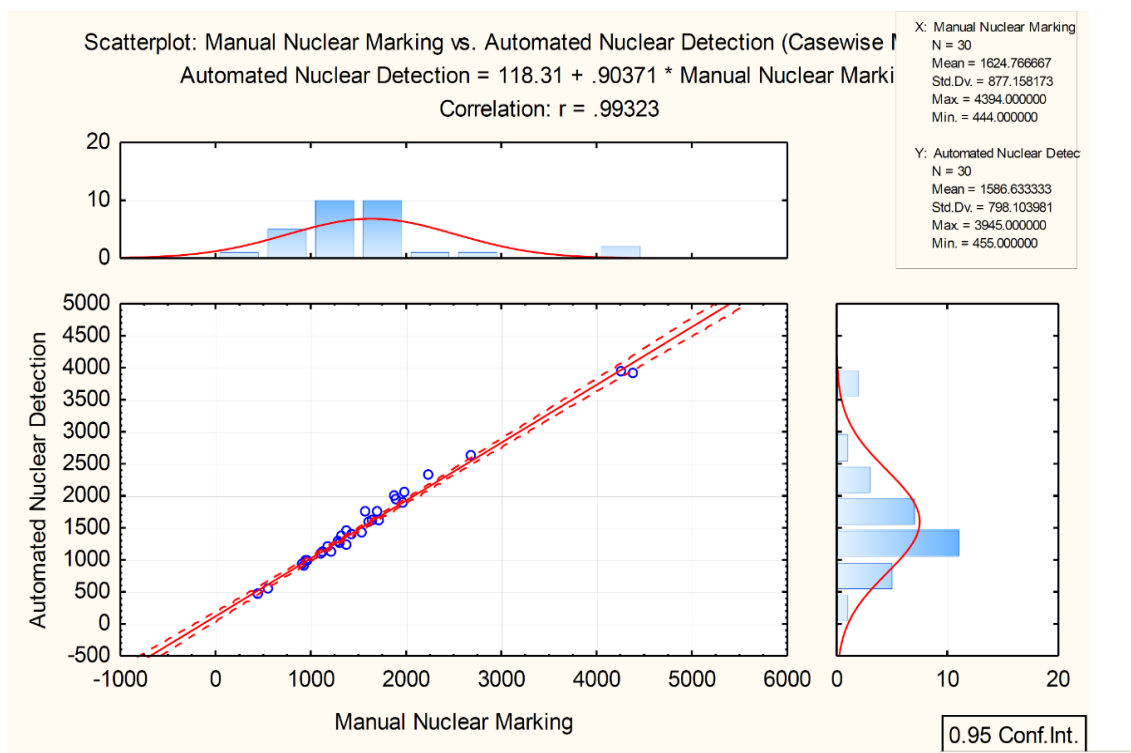


21.Ábra: A FISH-negatív és pozitív esetek közötti trendeket és szignifikáns különbségeket mutató változók grafikonjai. Legerősebb szignifikáns különbség a „mask area”-ban mutatkozott mindegyik IHC pozitivitási csoportban, de szignifikánsan magasabb volt a HER2 3+ sejtek aránya is a FISH-pozitív esetekben. A H-Score és a HER2 IHC 2+ sejtarány is magasabb volt a FISH-pozitív csoportban, de ez nem érte el a szigorúan vett szignifikancia szintjét. (Micsik et al 2013.(117))

Magasan szignifikáns különbségek jöttek ki azonban az egyik származtatott értéket tekintve a FISH-negatív és pozitív esetek között. (21.Táblázat, 21.Ábra alsó része) A különböző kategóriákba tartozó sejtek „mask area”-ja (ez a mérőszám az adott csoportba tartozó erősségű pozitivitást mutató, tehát adott immunreakció erősségét jelző értékű csoportba tartozó objektumok adott látótérre jellemző arányszámát adja meg) mindhárom IHC-pozitivitási csoportban (1+...3+) szignifikánsan alacsonyabb volt a FISH negatív csoportban (IHC1+: 7315 vs. 25794, $p=0.00031$, IHC2+: 1317 vs. 12464, $p=0.00166$; IHC3+: 184 vs. 2866, $p=0.00486$)

4.2.3. Megbízhatóan reprodukálható magdetektáló algoritmus implementációja és validációja

Összeségében 45861 manuálisan bejelölt magot tudunk 44508 DIA-módszerrel azonosított maggal összevetni. A két módszer között kiváló, igen szoros, majdnem tökéletes korrelációt találtunk ($r=0,99323$). (22.Ábra) A szenzitivitás $90,23\pm 4,29\%$, míg a PPÉ $88,23\pm 4,84\%$ volt. Az értékek hasonlóak voltak a különböző alcsoportokban (ER, PR, Ki-67, HER2, p53), tehát nem mutattak festés-, vagy technika-specifikus eltérést.



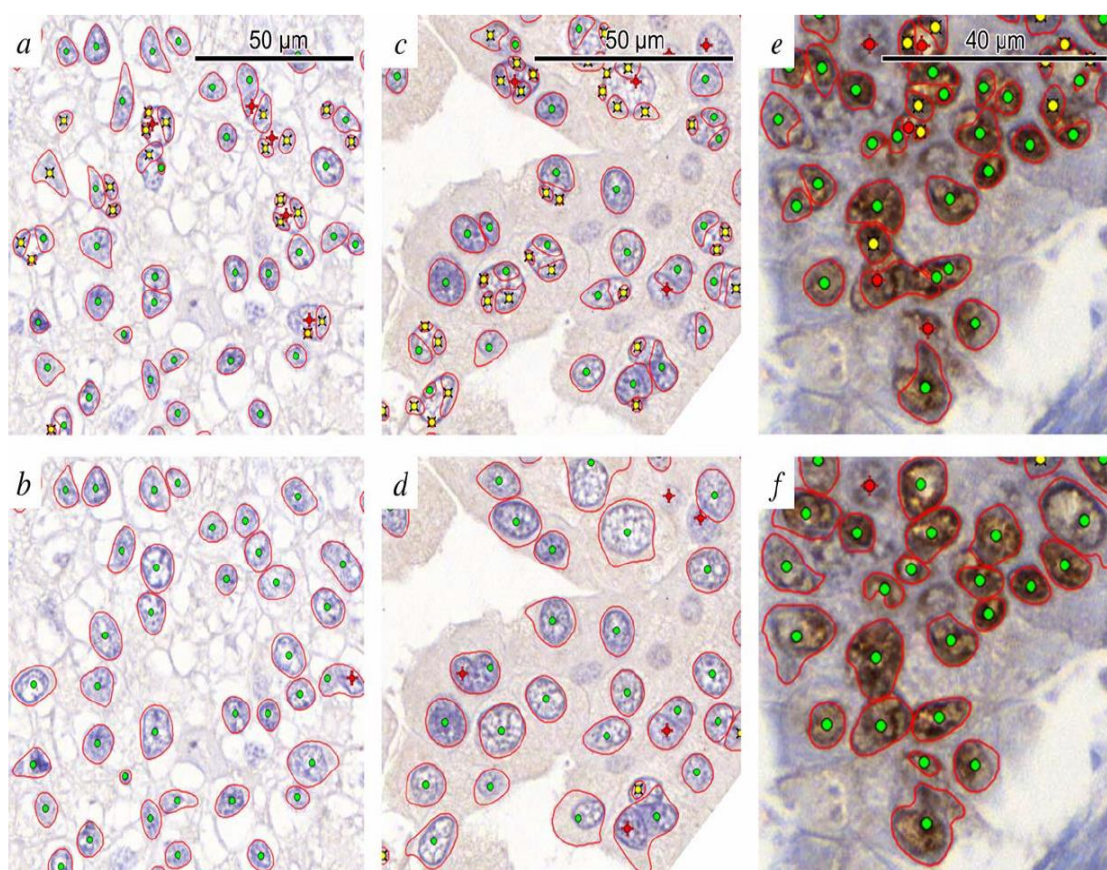
22.Ábra: A manuális és gépi magdetektálás összehasonlítása. A két módszer által szolgáltatott értékek igen szoros korrelációt ($r=0,99323$) mutattak. (Paulik et al 2017.(113))

A teljes metszet (WSI) elemzésénél átlag 145mm^2 ($22\text{-}324\text{mm}^2$) területet elemeztünk, melyeken az átlagos sejtszám 340310 volt (33896-912178 db) A WSI-re vonatkoztatott teljes futási idő átlaga $8'38''$ ($39''\text{-}43'28''$) volt. Ebben a tekintetben a scannelés felbontása és minősége kifejezetten befolyásolta a feldolgozási időt.

Egy kisebb alcsoportban megvizsgáltuk a lyuk-elimináló algoritmus hatását. Ha kihagytuk ezt a lépést, a vesiculáris magstruktúra zavaró hatása szignifikánsan csökkentette az algoritmus szenzitivitását és PPÉ-jét. (22.Táblázat és 23.Ábra)

22.Táblázat. A Lyukkitöltő algoritmus hatása a magdetektálás szenzitivitására és PPÉ-jére. Mindkét érték szignifikánsan javul a magokon belüli inhomogenitások elsimításával.

DIA	Szenzitivitás (%)	PPÉ (%)
Lyukkitöltés nélkül	63,71 (57-69)	82,5 (78-85)
Lyukkitöltéssel	90,92 (90-92)	91,1 (89-93)



23.Ábra: A lyuk-kitöltő algoritmus hatása a magok megfelelő szeparálására és detektálására. Különböző erősségű IHC-metszeteken a felső sor képein (a, c, e) lényegesen több túlszegmentált mag látható. A lyukkitöltő algoritmussal ezek száma drasztikusan csökkent (b,d,f képek) és igen jó egyezést mutat a manuálisan bejelölt magokkal. (zöld kör: valódi pozitív; sárga X: álpozitív; vörös +: valódi negatív magok) (Paulik et al, 2017.(113))

23.Táblázat: A saját (CellQuant) és két másik, ismertebb DIA-módszer (QuPath és CellProfiler) eredményeinek összehasonlítása a különböző értékek tükrében.

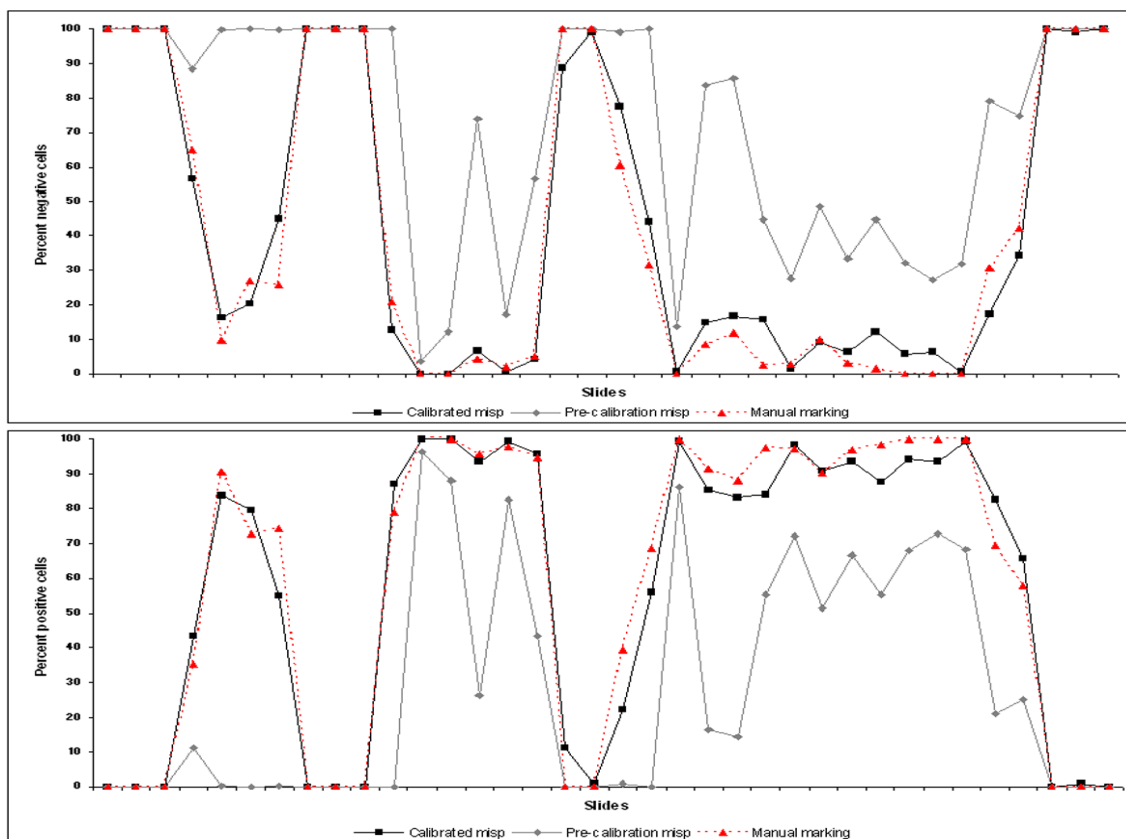
DIA	Szenzitivitás (%)	PPÉ (%)	Számítási sebesség (MP/perc)
CellQuant	94 (90-98)	92 (88-96)	360,6 (252,5-460,4)
QuPath	88 (83-92)	82 (66-93)	90,4 (51,6-124,1)
CellProfiler	87 (81-93)	87 (71-96)	12,0 (7,7-17)

Az interneten szabadon hozzáférhető két ismertebb DIA-módszerrel (QuPath: (<https://qupath.github.io>(114) és CellProfiler: <https://github.com/CellProfiler> (115)) történő összehasonlítás hasonló beállításokkal és hardveres háttérrel történt. Utóbbi közepes erősségű, átlagos számítógépes kapacitást jelöl. Az eredmények a saját algoritmusunk (CellQuant) tekintetében jobbnak bizonyultak a Szenzitivitás, Pozitív Prediktív Érték, illetve a számítási sebesség tekintetében is, valamint kisebb volt az adott értékekben tapasztalt variabilitás is (23.Táblázat). Az eredmény a CellQuant (3DHistech, Budapest, Hungary) metódus megbízhatóságát igazolta.

4.2.4. Ösztrogén és progeszteron receptor immunreakció digitális kiértékelésének validálása

A vizsgálat elején a még kalibrálatlan NuclearQuant szoftver adta eredmények és a patológusi kiértékelés közti egyezés igen alacsonynak bizonyult, de a kalibrálás végére az applikáció 87%-os pontossággal találta meg a magokat és szinte tökéletes egyezést mutatott a Cohen-féle κ (0.859), a négyzetesen súlyozott κ (0.986) és a Spearman féle rang-korreláció (0.953) értéke is. (24.Ábra, 24.Táblázat) A program ugyanannyi esetet sorolt a pozitív (n=30) és negatív (N=8) osztályba, mint a patológus.

Ezt követte a már kalibrált NQ applikációval történő újabb 53 annotáció elemzése, vagyis a kalibrált applikáció validálása. Ennek során a Cohen-féle κ (0.795), a négyzetesen súlyozott κ (0.981) és a Spearman féle rang-korreláció (0.975) mindegyike kiváló értékűnek a szinte tökéletes egyezést jelentő osztályba sorolódott. (24.Táblázat) A program a validáció során is ugyanannyi esetet sorolt a pozitív (n=46) és negatív (N=7) osztályba, mint a patológus, de 3 esetben kissé gyengébbnek értékelte a pozitivitást, illetve egy esetben magasabbnak, mint a patológus

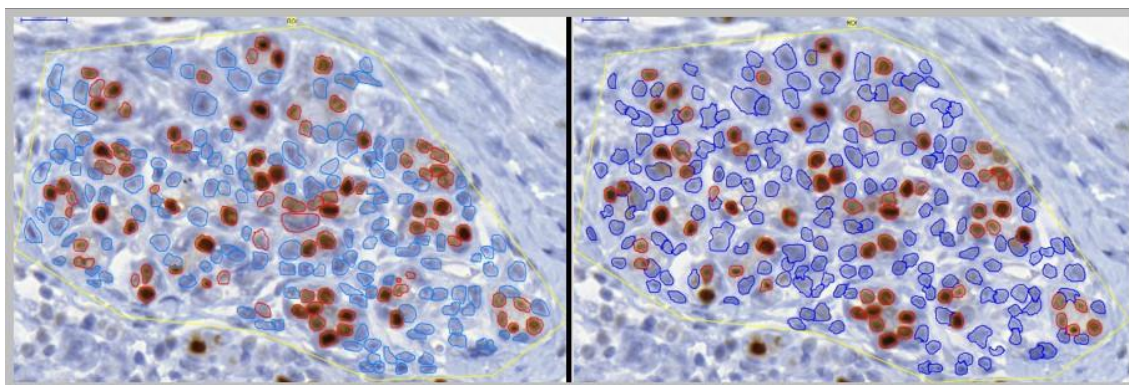


. 24.Ábra: Egyezés a manuális jelölés (vörös vonal), a kalibrálatlan NQ (szürke vonal) és a kalibrált NQ (fekete vonal) találati aránya között a negatív (felső grafikon) és pozitív (alsó grafikon) magok/sejtek esetében a különböző vizsgált tumor régióknál. (Krecsák et al.2011. (72))

24.Táblázat: A korrelációk változása a kalibrálás hatására, illetve a validáció eredménye.

	Cohen-féle κ (95% CI)	Négyzetesen súlyozott κ	Spearman féle rang- korreláció (df, 95% CI)
Kalibrálatlan NQ	0.138 (0.0217-0.298)	0.485 (0.870-0.941)	
Kalibrált NQ	0.859 (0.729-0.990)	0.986 (0.864-0.938)	0.953 (37, 0.911-0.976)
NQ validálás	0.795 (0.664-0.926)	0.981	0.975 (52, 0.958-0.986)

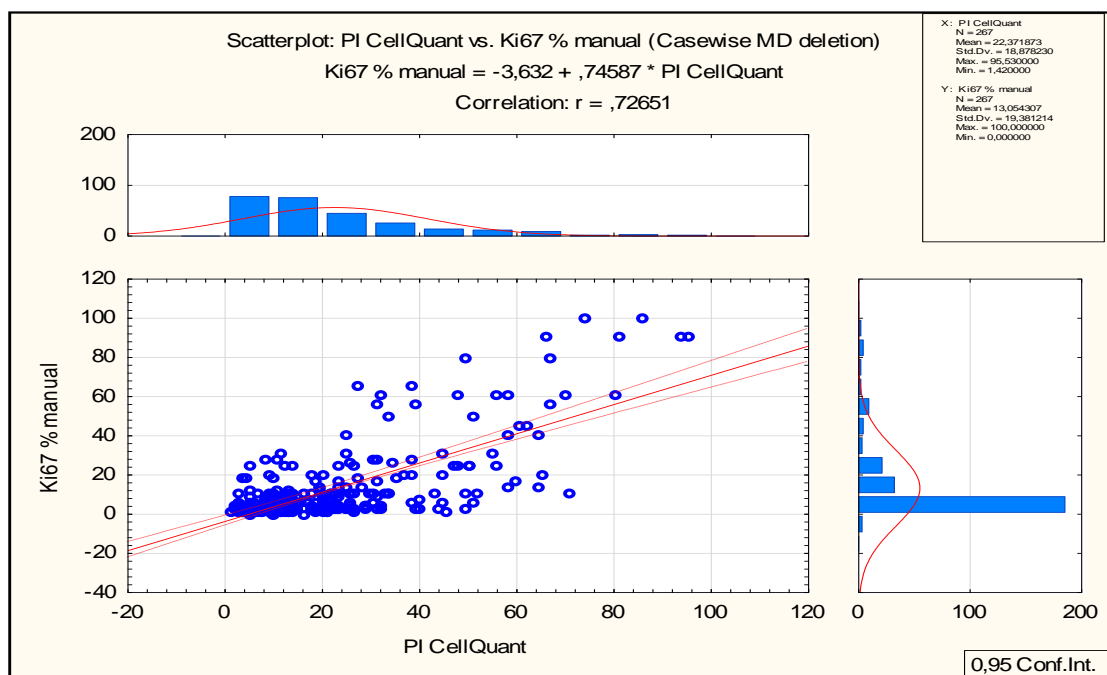
A 25.Ábra mutatja a manuális és automatikus sejtmagdetektálás összehasonlítását.



25.Ábra: A manuális sejtmagdetektálás (bal oldal) és a NuclearQuant applikáció által elvégzett sejtmagdetektálás (jobb oldal) eredményének képi összehasonlítása. Sárga (1+), narancssárga (2+) és vörös (3+) kontúrral vannak a pozitív, míg kék kontúrral a negatív sejtmagok körülrajzolva. (Krecsák et al.2011. (72))

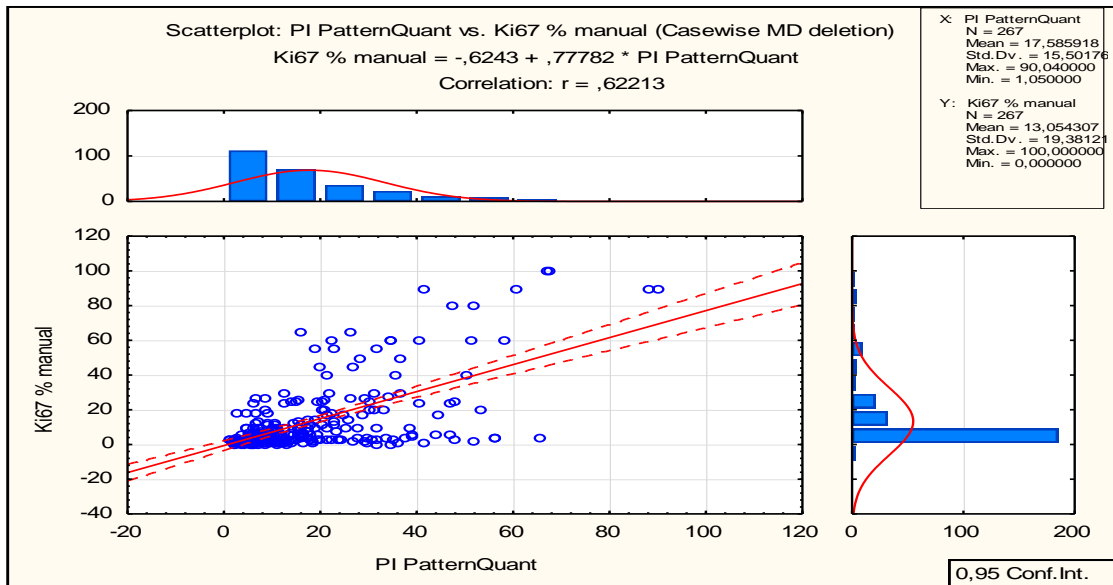
4.2.5. Ki-67 proliferációs marker digitális kiértékelésének validálása

Alábbiakban annak a pilot-study vizsgálatnak az eredményeit mutatom be (118, 119), amely Ács Balázssal és munkatársaival végzett, a DIA-módszereknek a PI-kiértékelésében történő használhatóságát vizsgáló kutatásunkhoz tartozik (76). A különböző módon történt PI (manuális, félautomata, automata) összehasonlításait grafikonokon, illetve táblázatos formában is bemutatjuk.

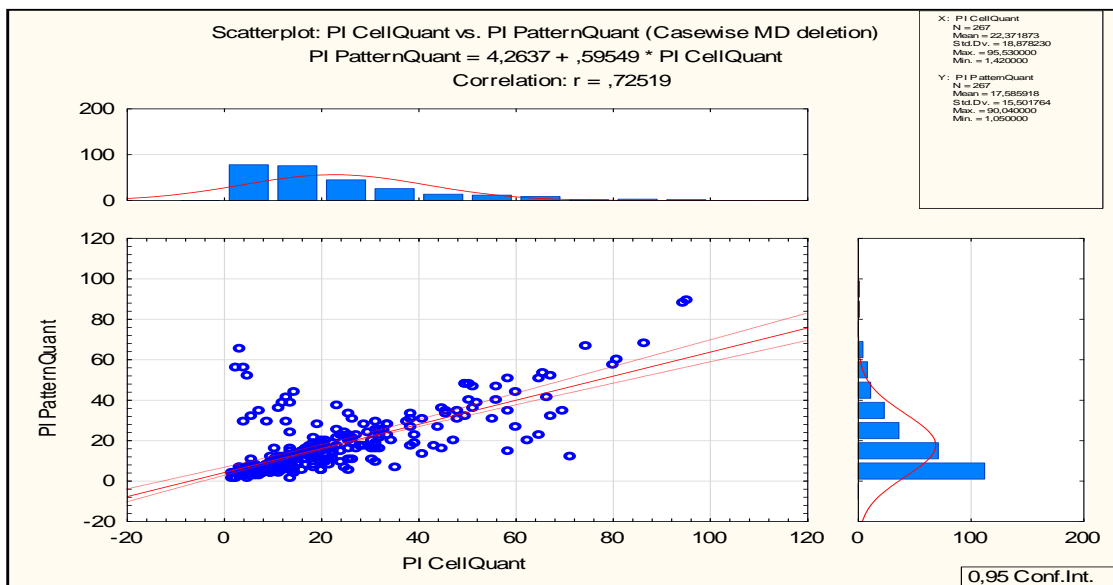


26.Ábra. A manuális (Ki67 % Manual) és félautomata (PI CellQuant) proliferációs indexek összehasonlítása. A két változó szoros korrelációjára utal az $r=0,72651$ -es korrelációs együttható.

Ha a hagyományos, empirikus módon meghatározott proliferációs indexet (Ki-67% manual) korreláltattuk az annotációkon lefuttatott automatikus meghatározással (PI CellQuant), akkor $r=0,72651$ értékű, erős egyezést találtunk (26.Ábra). Ha ugyanezt (Ki-67 % manual) a teljesen gépi (automata tumorfelismerés és azon gépi kiértékelés, PI PatternQuant) módszerrel hasonlítottuk össze, akkor is jó, szignifikáns korrelációt találtunk $r=0,62213$ (27.Ábra).



27.Ábra. A manuális (Ki67 % Manual) és teljesen automata (PI PatternQuant) proliferációs indexek összehasonlítása. A két változó szignifikáns korrelációjára utal az $r=0,62213$ -as korrelációs együttható.



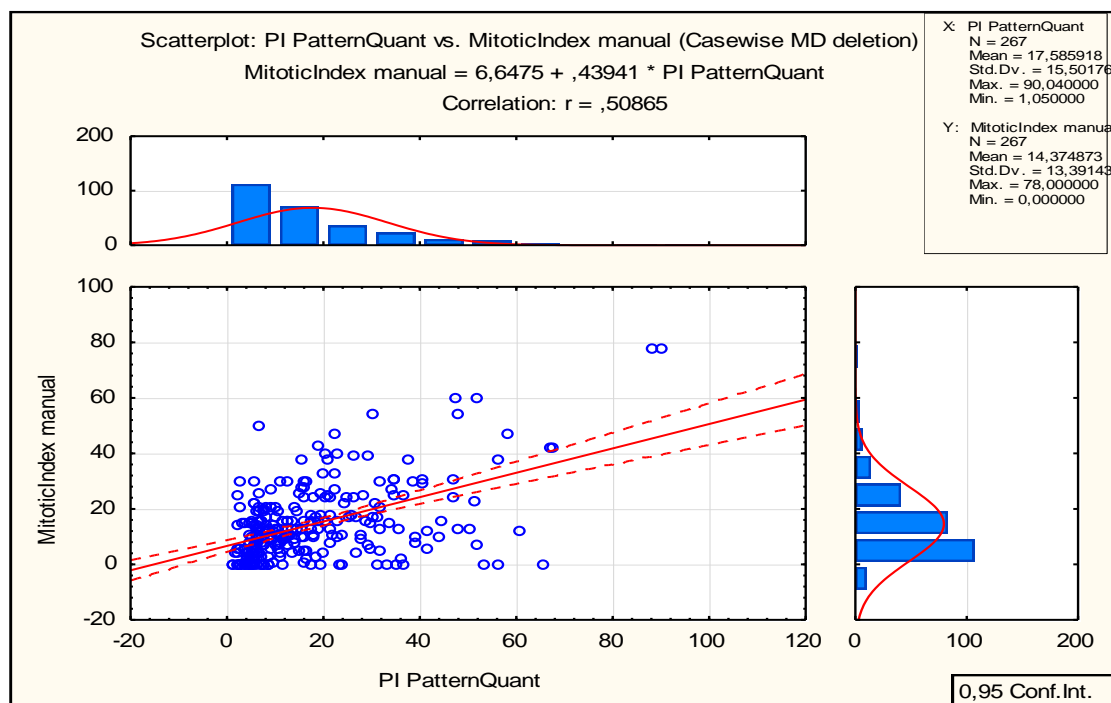
28.Ábra. A félautomata (PI CellQuant) és teljesen automata (PI PatternQuant) proliferációs indexek összehasonlítása. A két változó szoros korrelációjára utal az $r=0,72519$ -es korrelációs együttható.

A félautomata és teljesen automata gépi módszer (PI vs. PQ PI) eredményeit összehasonlítva is erősen szignifikáns korrelációt találtunk: $r=0,72519$. (28.Ábra). A 25. Táblázat összefoglalóan mutatja fenti összehasonlítások eredményét.

25.Táblázat. A különböző módon meghatározott proliferációs indexek parametrikus módon történő összehasonlítása. Látható, hogy mindegyik viszonylatban szignifikáns és jó korreláció volt található. (Micsik et al.2014 (118) és 2015 (119, 120) alapján)

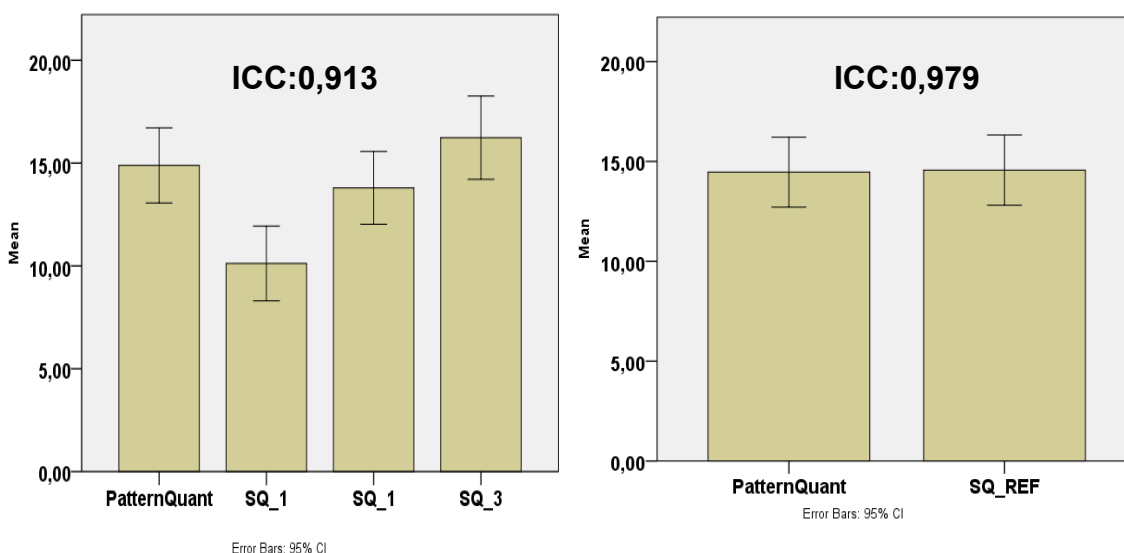
	Manuális Ki-67	PI CellQuant	PI PatternQuant
Manuális Ki-67	-	0,72651	0,62213
PI CellQuant	0,72651	-	0,72519
PI PatternQuant	0,62213	0,72519	-

Az emlőrákok gradálásánál a nagy nagyítású látóterenkénti mitózisok számolása bevett gyakorlat, annak ellenére is, hogy sajnálatos módon a mitotikus alakok felismerése a mikroszkóp alatt nem olyan egyszerű, illetve meglehetősen szubjektív és ez esetenként magasabb interobserver eltérést is eredményezhet (121). Ez is tükröződhet abban, hogy a manuális mitotikus index (MI) és a teljesen automata proliferációs index (PI PatternQuant) összehasonlításával kaptuk a legalacsonyabb, de még mindig szignifikáns korrelációt ($r=0,50865$) (29.Ábra).



29.Ábra. A hagyományos módon számolt mitotikus index (MI, Mitotic Index Manual) és teljesen automata (PI PatternQuant) proliferációs indexek összehasonlítása. A két változó korrelációjára utal az $r=0,50865$ -ös korrelációs együttható, de ez alacsonyabb, mint a különböző módon számolt proliferációs indexek korrelációja.

Ha a teljesen automata kiértékelés (PatternQuant) eredményeit a manuális kiértékeléssel (SQ_1, SQ_2, SQ_3) Intraklassz korrelációval összehasonlítva (ICC – IntraClass Correlation) igen jó, szinte tökéletes egyezést találtunk (ICC= 0,913). Ha a hagyományos kiértékelés konszenzusának (SQ_Ref) eredményét vetettük össze Itraklassz korrelációt alkalmazva a teljesen automatizált gépi kiértékeléssel, akkor majdnem tökéletes egyezést találtunk: ICC=0,979 (30. Ábra).

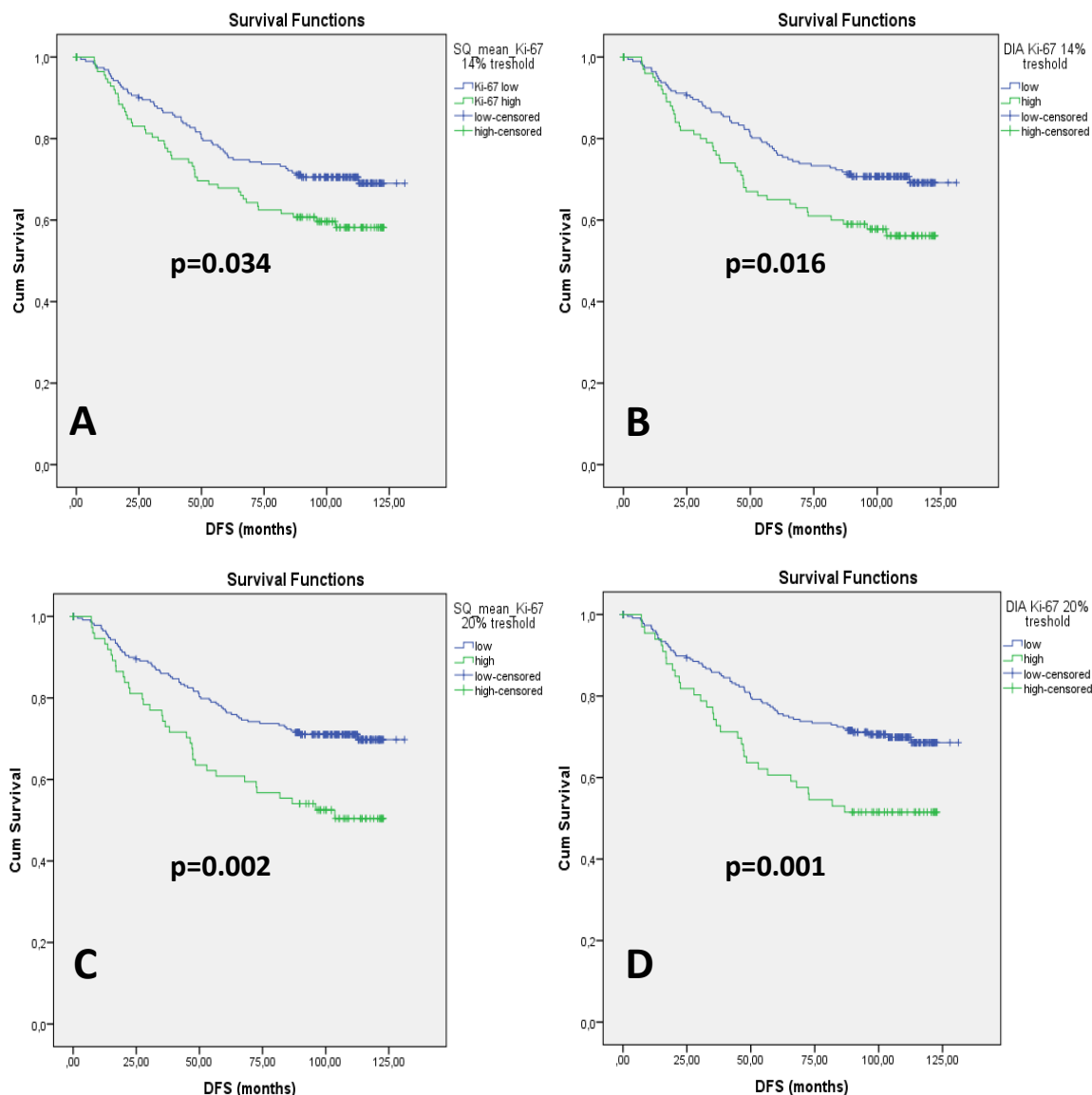


30.Ábra. IntraClass Correlation (ICC) értékei a teljesen automata (PQ) és manuális kiértékelés egyedi (SQ_1, SQ_2, SQ_3) és konszenzus (SQ_REF) értékei között mind a szinte tökéletesen egyező kategóriába estek. (Ács et al 2018 (76) alapján, módosítva)

A proliferációs ráták klinikai tartalmát Kaplan-Meier grafikonokon tudjuk szemléltetni (31.Ábra). A Ki-67 proliferációs ráta esetében az ún. St. Galleni konszenzus-értékek a mérvadóak. Ennek értékét a rendszeresen tartott kongresszusokon az újabb vizsgálatok eredményeinek tükrében felülvizsgálják, és így időnként újabb értékben határozzák meg: volt ez 13,6%, 14%, 15% is és legújabban 20% (49, 122). Ennek megfelelően a vizsgálatunk során két különböző érték mentén is dichotomizáltuk a betegeket.

14%-os proliferációs ráta mentén dichotomizálva szignifikáns túlélési különbség volt látható az alacsonyabb és magasabb proliferációs rátába tartozó betegek csoportja között (SQmeanKi-67@14%, p=0,034), mely a digitális kiértékeléssel erősebbnek mutatkozott (DIAKi-67@14%, p=0,016) (31.Ábra: A és B). Ha a betegeket a 20%-os proliferációs ráta mentén dichotomizáltuk, akkor ez a túlélési különbség még szignifikánsabbá vált:

SQmeanKi-67@20%, $p=0,002$) és digitális kiértékeléssel szintén kissé erősebbnek mutatkozott (DIAKi-67@20%, $p=0,001$) (31.Ábra: C és D).



31.Ábra. Kaplan-Meier grafikonok a betegek Betegségmentes Túlélési (Disease Free Survival - DFS) adataival. A betegeket 14%-os Proliferációs Index (PI) érték (A, B), illetve 20%-os PI érték (C, D) mentén is dichotomizáltuk. Mind a hagyományos (A, C; SQ_mean_Ki-67), mind a digitálisan meghatározott (B, D; DIA_Ki-67) proliferációs index-szel is szignifikáns különbség adódott a magas és alacsony Ki-67-indexű csoportok túlélése között, de a digitális index esetében erősebb volt a szignifikancia értéke (0,034 vs. 0,016 és 0,002 vs. 0,001) (Ács et al 2018 (76) alapján, módosítva)

5. Megbeszélés

5.1. Markerek hagyományos üveg és digitalizált metszeten történő kiértékelésének összehasonlítása

5.1.1. HER2 immunreakciók kiértékelésének összehasonlítása

Speciálisan a biomarkerek képernyőn, bedigitalizált metszeten történő leolvasásával és hagyományos, mikroszkópos módon történő kiértékelésének összehasonlításával, illetve a digitális leolvasás hatásaival foglalkozó vizsgálat még viszonylag kevés látott napvilágot.

Egy brazil vizsgálatban 200 emlőrákot hasonlítottak össze hagyományos módszerrel és WSI-kiértékeléssel három különböző HER2 antitesttel (HercepTest, CB11, SP3) végzett Immunreakció szempontjából. Kifejezetten jó κ -értékeket találtak (SP3:0,8; CB11 és HercepTest: 0,81). A WSI-kiértékelés javította a szenzitivitást az SP3 és HercepTest (100%), valamint a CB11 esetében is (97%), míg a WSI-specifititás kissé alacsonyabb lett (SP3 87%, HercepTest 86,4% és CB11 89,4%) (98) (26.Táblázat).

26.Táblázat. Három különböző antitesttel (HercepTest, CB11, SP3) végzett HER2 Immunreakció hagyományos (Optical Microscopic, OM) és digitalizált metszeten (Whole Slide Imaging, WSI) kiértékelésének összehasonlítása és ezek hatása a szenzitivitásra és specifitásra. (Nunes et al Pathology Research and Practice 2014 (98))

Antitest	κ (OM vs. WSI)	Szenzitivitás		Specifitás	
		OM	WSI	OM	WSI
SP3	0,8	98	100	97,1	87
CB11	0,81	92,1	97	97,1	89,4
Herceptest	0,81	97	100	95,2	86,4

Amikor 30 patológus nézett át 30 esetet mindkét módszerrel, akkor alapvetően jó egyezést találtak a két módszerrel megállapított HER2-osztályok között ($\kappa=0,719$), habár a vizsgálat szerint a monitoron történő kiértékelésnél tendenciózan kissé magasabb HER2-osztályokba sorolták az eseteket, de ez nem mutatkozott statisztikailag releváns felülkiértékelésnek (99).

Egy a különböző patológusokat és a mikroszkópos, valamint a hagyományos módon történő HER2-Kiértékelés eredményeit többféle módon is (interobserver, intermetódus) is összehasonlító tanulmány ekvivalensnek találta a különböző módszereket (123).

Egy másik vizsgálatban 180 emlőkarcinomás esetet értékelt ki 3 patológus először hagyományos, mikroszkópos módon, majd később a bescannelt digitális metszeteket monitoron. Alapvetően jó egyezést találtak a két módszerrel történő kiértékelés között (61,3%-92,5%) és a patológusok közötti eltérések is hasonlóak voltak mind a hagyományos (76,3%-91,3%), mind a monitoros (70,0%-86,0%) kiértékelés esetében (124).

A legösszetettebb vizsgálatban 8 patológussal elemezték 50 esetről a hagyományos és digitális metszeten, teljes metszeten és TMA-kon történő kiértékelés hatásait membranózus (HER2) és magi (Ki-67) reakciók, illetve folyamatos és diszkrét változók esetében is.(100) Az ő eredményeik is alapvetően jó egyezést mutattak a különböző módon (Intermodality és/vagy Interobserver) történő kiértékelések eredményei között HER2 IHC esetében (Kendall Tau: 0,67-0,83). Itt is megjelent, hogy a monitoron történő kiértékelésnek lehet egy kis „felértékelő” hatása HER2 esetében, már csupán azért is, mert az ember több időt tölt a metszetek meg/átnézésével és könnyebben tud nagyobb nagyításokra menve enyhe pozitívításokat is felfedezni. A TMA-k esetében kisebb volt a detektált interobserver vagy intermethod eltérés. Ki-67 proliferációs ráta meghatározásakor szintén alapvetően jó, még pontosabb egyezést találtak (Interobserver Kendall Tau: 0,71-0,76; Intermethod Kendall Tau: 0,78), melyre a TMA/teljes metszet vizsgálata nem volt hatással. Az is kiderült azonban, hogy az eredmények különbségéért sokszor inkább az egyéni/vizsgálói attitűd, valamint a nem teljesen standardizált kiértékelési mód is felelhet, mely tényezők nem a digitalizálás által befolyásolt változók. Vagyis konklúzióként a digitális kiértékelési mód potenciális hasznossága mellett inkább az eredeti immunhisztokémiai folyamat standardizálására, a vizsgált biomarker jellegzetességeire, a megfelelő mintavételre és körültekintő irányelvek megfogalmazására irányuló igény jelent meg (100). Természetesen felmerül, hogy nem a patológus szeméhez kell kalibrálni a dolgot, hanem a klinikai relevanciához, vagyis az igazi döntő érvényű vizsgálat az lesz, amelyben a kiértékelési módok különböző eredményeit a klinikai kórlefolyással lehet összevetni.

HER2 IHC kiértékelésénél alapvetően jó (megfelelő és szinte tökéletes osztályba sorolandó) egyezést találtunk a különböző kiértékelések között, bármilyen módon (mikroszkóp vagy digitális metszet monitoron) is történt a kiértékelés. Ha a klinikailag releváns eltéréseket súlyozva értékeltük, az egyezés majdnem minden esetben 0,9 felett, a szinte tökéletes osztályba tartozó értéket mutatott.

A viszonylag kevés ezirányú nemzetközi vizsgálat hasonló eredményei is alapvetően jó egyezést mutattak a HER2 membrános reakciójának mikroszkópos és monitoros kiértékelését összevetve, habár egy minimális „felértékelő” tendenciát jeleztek, ami azonban nem változtatta meg szignifikánsan az értékeket (98-100, 124). Utóbbi hatás eredhet a digitális metszetekkel való hosszabb foglalkozás, nagyobb figyelem és könnyebb kezelhetőség, lényegében végtelen nagyíthatóság miatti alaposabb odafigyelésből. Az egyik vizsgálatban nézték a digitális kiértékelés szenzitivitására és specifitásra gyakorolt hatását, mely szintén azt mutatta, hogy a kissé nagyobb figyelem hatására a szenzitivitás majdnem 100%-ossá emelkedett, annak árán, hogy néhány kevésbé pozitív eset is bekerült, ami a specifitást kissé csökkentette (98).

Fentiek alapján a hagyományos és digitális lemezen történő HER2 IHC kiértékelést egyenértékűnek mondhatjuk. A digitalizációnak nem volt kedvezőtlen hatása az értékekre, ugyanakkor a munkakörnyezet kényelmesebb/flexibilisebb volt. Fenti és saját vizsgálatok eredményeinek alapján a különböző biomarkerek digitális módon történő kiértékelése tehát reális alternatíva és segítségül hívható a mindennapi gyakorlatban.

Érdekességként lehet megemlíteni, hogy a vizsgálat során a P1-el jelölt patológus végig magasabban korreláló értékeket szolgáltatott, amikor a hagyományos és digitális metszeten történő kiértékelést hasonlítottuk össze. Ennek egyik oka lehetett, hogy P1 már régebben foglalkozott digitális patológiával és ezáltal jobban hozzászokott a digitális platform és tárgylemezek használatához. Ezt a tanulási görbe hatást más vizsgálatok is megerősítették már korábban (58, 125, 126).

5.1.2. Hormonreceptorok immunreakcióinak kiértékelésének összehasonlítása

A különböző értékeket megvizsgálva azt láthatjuk, hogy hormonreceptorok esetében az egyezés a közepes (0,41-0,6) és megfelelő (0,61-0,8) osztályokba esett, vagyis

alacsonyabb volt a HER2-nél. Érdekes, hogy a digitális metszeteken meghatározott osztályok általában magasabb egyezést mutattak, ami szintén fakadhat a nagyobb odafigyelésből és a digitális metszetek, valamint a monitoron látható képek szabadabb bejárhatóságának, nagyíthatóságának lehetőségéből. Vagyis csupán abból, hogy egyszerűen a monitoros megtekintés jóval flexibilisebb és több betekintési lehetőséget nyújt és csábít az alaposabb megtekintésre, körültekintőbb vizsgálatra.

Fontosnak tartom kiemelni, hogy az interobserver eltérések már alapesetben is magasabbak voltak a hormonreceptorok esetében a HER2-höz viszonyítva. Ez azonban könnyen érthető is, hiszen a hormonreceptorok magi immunreakcióinak kiértékelésénél használt Allred féle Quick Index (AQI) 0, 2-8 között bármilyen érték lehet, tehát itt a lehetséges kategóriák/értékek száma a HER2 IHC-nek duplája (8 versus 4). Azt is meg kell említeni, hogy a PS (%) számolása becsléssel történik, de ennél fontosabb, hogy az IS (intenzitás) esetében nincs standardizáltan meghatározva mit kell gyenge, közepes, illetve erős pozitivitásnak nevezni. Ezek alapján könnyen elfogadható, hogy az AQI esetében tapasztalt nagyobb eltérések inkább a kiértékelési rendszer intrinsic tulajdonságának tarthatóak.

Klinikailag azonban az $AQI > 2$ eseteket kell pozitívnak tekinteni és ha az ezt figyelembe vevő négyzetesen súlyozott κ -t, vagy a Spearman féle rang-korrelációt használjuk, akkor a fentebb említett eltérések klinikai relevanciája nem tűnik lényegesnek, hiszen így minden érték a szinte tökéletes egyezés osztályába sorolódik át, bőven 0,9-es érték felett minden esetben.

Hasonló vizsgálatot keveset találtunk. Egy 120-fős vizsgálatban 3 patológusi manuális/hagyományos leolvasást összehasonlítva ER esetében 94,9%-os, PR esetében 94,4%-os interobserver egyezést találtak. Ugyanezen esetek digitális metszeten való kiértékelésénél ER esetében 92%-os, PR esetében 94%-os interobserver egyezést találtak, de a két módszer közti kiértékelés eredményeit nem hasonlították össze (71).

Egy másik vizsgálatban 3 patológus 260 ER és PR metszet hagyományos és digitális platformon történő kiértékelését hasonlították össze. Alapvetően jó egyezést találtak (83,8-100%), de több esetben a digitális lemezekkel pontosabb egyezés jött ki, ami alapján ők is legalább ekvivalensnek gondolják a hagyományos és képernyőn történő kiértékelést (127).

Sajnálatos módon a hormonreceptorok mikroszkópos és monitoros kiértékelését direkt összehasonlító vizsgálatot keveset találtunk, de azok is saját tapasztalatainkkal megegyező eredményekre utaltak. Összességében kimondható, hogy a magi immunpozitivitás digitális kiértékelése az üveglemezeken történő kiértékeléssel megfelelő egyezést mutatott. A digitális kiértékelés során a Cohen-féle κ és négyzetesen súlyozott κ értékek jobbak lettek, főleg progeszteron-receptorok esetén. Az Allred-index viszonylag széles tartományai miatt, a standardizált digitális kiértékelés segíthet az optimális hormonterápia megválasztásában.

5.2. Immunhisztokémiai reakciók digitális/szemiautomatikus kiértékelésének validálása

5.2.1. HER2 immunreakciók kiértékelésének összehasonlítása

Mivel az emlőrákok anti-HER2 terápiája a célzott kezelések egyik legsikeresebb zászlóshajójává vált az elmúlt évtizedben, az ezzel foglalkozó irodalom igen bő. Ezek szerint általában hatékonyak bizonyul a terápia és mindenképpen választandó modalitásként ítélik meg (128, 129), de a cikkek egy része magas interobserver variabilitásról számol be a HER2-osztályok esetében (82, 84, 130-133), illetve a trastuzumabbal kezelt betegek közel felénél nem kapnak megfelelő terápiás effektust, melynek részben lehet oka a tumor heterogenitása is (31, 78, 134, 135). Továbbmenve, egyes meta-analízisek arra az eredményre konkludáltak, hogy az anti HER2-terápiák közel ötöde nem megfelelő módon történik (22, 136), ami még fontosabb lehet annak ismeretében, hogy trastuzumab cardiovascularis betegeknél nem kívánt mellékhatásokat is okozhat (137, 138).

Az általunk vizsgált emlőkarcinomás esetekben a patológusok által meghatározott konszenzus HER2-osztályokkal jó egyezést mutatott a szemiautomatikus módon, a *MembraneQuant* modullal meghatározott HER2 immunhisztokémiai kiértékelés. A több, mint 100 betegből származó, de összességében több mint 300 régióon tesztelve az általunk kifejlesztett membránfelismerő algoritmust validálni tudtuk. A program a kijelölt területen hatékonyan ismerte fel a sejteket és azokat a megfelelő pozitivitási csoportba sorolta. A klinikai relevanciát is figyelembe vevő négyzetesen súlyozott κ értékei 0.901 és 0.970 között mozogtak, ami a szinte tökéletes egyezést jelenti. Ez alapján a

MembraneQuant modult klinikai értelemben hasznosnak mondhatjuk, hiszen segíthet a kiértékelések standardizált és archiválható módon történő végrehajtásában.

Számos, a miénkhez hasonlóan sikeres validációs vizsgálatról szóló cikket találhatunk az irodalomban, melyekben jó egyezést találtak a HER2-IHC hagyományos módon történő kiértékelése és a gépi, vagy semi-automated vagy Digital Image Analysis (DIA, IA) kiértékelése között. Nehéz lenne ezeket részletesen ismertetni, ezért inkább táblázatos formában térnek ki ezekre (27.Táblázat) (71, 74, 102, 112, 135, 139-145).

27.Táblázat. A fontosabb HER2 IHC DIA vizsgálatok (PCC: Pearson's Correlation Coefficient, DIA: Digital Image Analysis, κ : Cohen-féle κ , $^2\kappa$: Négyzetesen súlyozott κ , ρ : Spearman-féle ρ)

Szerző	Év	n (db)	Konkordancia	Módszer	platform
Bankhead	2018	293	PCC=0,886; ρ =0,843	manuális vs. DIA	QuPath
Barnes	2017	120	93,8-100%	manuális vs. digitális leolvasás vs. DIA	VMSI
Brüggmann	2012	167+8 6	92,3%; κ = 0,864	manuális és FISH vs. DIA	HER2-Connect
Dobson	2010	275	91%	manuális és FISH vs. DIA	Tissue IA
Helin	2015	750	$^2\kappa$ = 0,92	Patológus vs. kutató és vs. ISH	ImmunoMembrane
Holten-Rossing	2015	462	93,6%	manuális vs.DIA	HER2-Connect
Howat	2014	8267	κ =0,69	TMA, manuális vs. DIA, túlélés	Ariol
Koopman	2018	319	85,6% ; $^2\kappa$ = 0,8	manuális vs. DIA	
Laurinaviciene	2011	195	κ =0,86	manuális és FISH vs. DIA	HER2-Connect
Marcuzzo	2016	176	92,5%	HER2 IHC 2+ vs. FISH	VISIA
Micsik	2015	107	κ =0,872; κ =0,967	2 patológus vs. DIA	MembraneQuant
Tuominen	2012	144	$^2\kappa$ = 0,8	manuális és FISH vs. DIA	ImmunoMembrane

Fenti táblázatból látható, hogy a szakirodalomban összességében 9-féle platformon közel 11000 eseten elvégzett vizsgálatokról találhatunk sikeres beszámolókat. A számos vizsgálat sajnos sokszor különböző metodikával készült, ezért pontos és mindenre kiterjedő összehasonlításuk nehézkes, ugyanakkor ezekben 80-90%-os egyezéssel, illetve 0,8 feletti Pearson's Correlation Coefficient, Cohen-féle κ , Négyzetesen súlyozott κ , Spearman-féle ρ értékekkel találkozhatunk, ami alapvetően jó, szinte tökéletes egyezést jelent (116). Az ennek fényében általunk, illetve számos más munkacsoport által

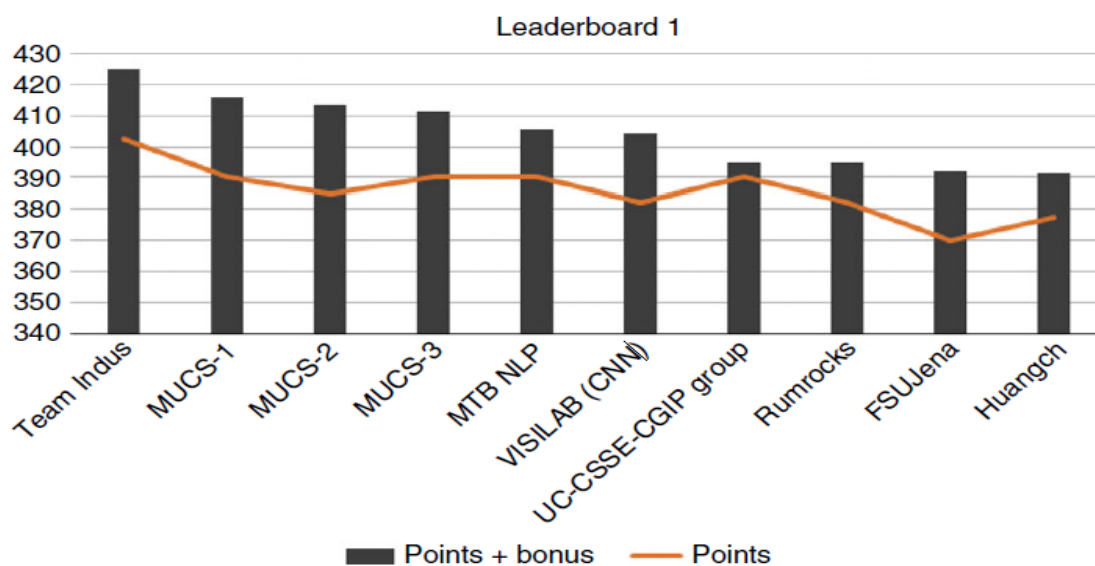
lefolytatott vizsgálat alapján is az emlőkarcinomás esetekben a patológusok által meghatározott HER2 kiértékelés jó egyezést mutatott a DIA eredményeivel.

Emellett több vizsgálatban is megjelent az a tendencia, hogy a DIA-kiértékeléssel az 'equivocal', vagyis HER2 2+ esetek számát csökkenteni lehet, vagyis digitális kiértékeléssel ezen betegek egy része megbízhatóan átsorolható volt az IHC 1+ vagy pedig az IHC 3+ csoportba és így FISH-vizsgálat potenciálisan megspórolható lehet (64-66). A fenti eredmények biztatóak és mára már a különböző irányelvekben is a digitális patológia és különböző DIA-módszerek használatára biztatják a patológusokat (112, 139, 140). Szintén ezen vizsgálatok tapasztalata, hogy a DIA-kiértékelés képes csökkenteni az interobserver eltéréseket is (133).

Közelmúltban látott napvilágot egy tanulmány, melyben több DIA-platformot versenyeztettek egymással, illetve patológus expertekkel (146). 105 DIA-csapat nevezett a versenyre, de ezek közül végül csak 14 csapat, 18 kiértékelési eredményt küldött be. Emellett két patológus expertet is bevontak a vizsgálatba, hogy a DIA-értékeket azokhoz is tudják viszonyítani. A pontozás alapja a felhasznált 86 eset egyetemi vizsgálóközponti HER2 IHC-osztályától (gold standard) való eltérés volt. Ebben a klinikai relevancia alapján súlyozva kaptak pontokat a kiértékelők: minél közelebbi volt a két érték, annál több pont járt a kiértékelőnek (28.Táblázat). Ezen felül bónusz-pontok jártak a komplett-membránpozitivitást mutató sejtek helyes meghatározásáért (32.Ábra).

28.Táblázat. A HER2-Contest-ben használt, klinikai relevanciát figyelembe vevő, súlyozott pontértékek az egyezés mértékétől függtek. Tökéletes egyezésnél 15 (zöld), kisebb félre-értékeléseknél 2,5 vagy 5 vagy 10, csoportváltást okozó tévesztésért (HER2 pozitív vagy negatív) 0 (piros) pont járt. (Qaiser et al 2018 (146) alapján, módosítva)

	DIA Score 0	DIA Score 1+	DIA Score 2+	DIA Score 3+
Standard score 0	15	15	10	0
Standard score 1+	15	15	10	0
Standard score 2+	2,5	2,5	15	5
Standard score 3+	0	0	10	15



32.Ábra. A 2016-os HER2-Contest eredményei. A versenyben részt vevő csoportok különböző DIA-módszereinek pontszámait látjuk fekete hasábokban és a bonus pontokat a narancssárga vonal jelzi. (Kaiser et al 2018, (146))

Érdemes megemlíteni, hogy a vizsgálat részeként DIA és patológus szakértők által meghatározott kiértékelés összehasonlítása is megtörtént. Ebben az egyik DIA-módszer kicsit magasabb pontszámmal szerepelt, mint a legjobb patológus (29.Táblázat), ami jól illusztrálja a standardizálás és objektív kiértékelés pozitív hozadékát.

29.Táblázat. A különböző DIA-módszerek és patológusok eredményének összehasonlítása. Kiemelendő, hogy az egyik DIA-módszer magasabb pontszámot tudott elérni a nagy tapasztalattal bíró patológus szakértőnél. (Kaiser et al 2018 (146) alapján, módosítva)

Hely	Név	Pont	Bónusz	Összes
1	Team Indus	220	12.5	232.5
2	PatExpert1	210	20.5	230.5
3	Visilab	212.5	15	227.5
4	MUCS-1	205	20.5	225.5
5	PatExpert2	185	10	195
6	PatExpert3	180	13	193

5.2.2. HER2 IHC 2+ esetek elemzése FISH-szemponyjából

A HER2 immunhisztokémiai vizsgálatok kiértékelésekor a negatív (IHC0, IHC 1+) és erősen pozitív (IHC 3+) esetek általában nem okoznak nagy nehézséget. Sok esetben elég az immunreakció is, de az ún. 'equivocal', vagyis a HER2 2+ eseteknél nem. Ez az a

betegcsoport, ahol a hagyományos, manuális/mikroszkópos kiértékelés felbontása nem elégséges és ezért általában in situ hibridizációval lehet és kell kimutatni a HER2 gén kópiaszámát és ezáltal a génamplifikáció meglétét és pontos értékét vagy hiányát. A hétköznapi gyakorlatban ezt a csoportot néhol kissé kiszélesítve, hajlamosak vagyunk ide sorolni a biztonsággal nem megítélhető, vagy éppen heterogén eseteket.

A HER2 FISH vizsgálatok kiértékelése nagy gyakorlatot és drága instrumentáriumot igényel, illetve maga a vizsgálat sem hozzáférhető mindenhol, hanem csak bizonyos centrumokban. A nemzetközi irányelvek is azt hangsúlyozzák, hogy a FISH-t olyan centrumokban lehet megbízhatóan elvégezni és kiértékelni, ahol évente nagyobb számú vizsgálatot végeznek el (147, 148). A közelmúltban kifejlesztett alternatív in situ hibridizációs eljárások (CISH, SISH) igyekeznek a speciális műszerigényt kikerülni, de maga az in situ vizsgálat megvalósítása is nagyobb gyakorlatot igényel, illetve a normál mikroszkópokkal való detektálás és kiértékelés sem egyszerű, ezért az évi kis számú vizsgálatot végző helyeken ez nem reális alternatíva (23, 131). Az onkológiai kezeléseknél az idő is limitáló tényező, általában a műtétet követő pár héten belül illik megkezdeni a további terápiát. A további vizsgálatok megrendelése, az anyag centrumokba juttatása azonban időigényes lehet, ami esetlegesen hátráltathatja a terápia idejekorán való megkezdését.

A FISH-eredmények viszonylag standardizáltak, ugyanakkor nem szabad elfelejteni, hogy a gén által kódolt fehérje valódi működéséhez még további lépések is szükségesek. Egyes megfigyelések szerint a HER2 receptor fehérjeszintje, vagyis az expresszált fehérje mennyisége jobban korrelál az anti-HER2 terápia sikerességével, ami tulajdonképpen logikus is (80, 81). Ennek megfelelően az immunhisztokémiai vizsgálóeljárások alapján jelenleg használt 4-osztatú skála helyett, bizonyos alternatív skálákat is kialakítottak (pl. H-Score), ami a sejtek százalékos arányában veszi figyelembe a különböző erősségű expressziókat. Ezáltal egy sokkal szélesebb (1-300), lényegében folytonos változó áll rendelkezésünkre a HER2-expresszió jellemzéséhez, melyek alapján finomabb csoportosítás, illetve a folyamatos változók klinikai relevanciájának vizsgálata is lehetségessé válhat. Az ilyen módon lefolytatott, illetve a terápiára adott válasz alapján csoportosított betegvizsgálatok DIA-módszerrel történő vizsgálata újabb lehetőséget teremthetnek az anti-HER2 terápia pontosabb célzására.

Ugyanakkor a HER2 immunhisztokémiát lényegében minden emlőrákos esetben panelban, reflex-teszt szerűen vizsgálják, vagyis az immunreakció rendelkezésre áll (22). Az emberi (vagy jobban mondva: patológusi) szem megbízhatóan tud néhány pozitívítási csoportot elkülöníteni és HER2 IHC esetében a négy csoportba sorolás általában megoldható, de alkalmatlan a százalékos pozitívítás pontos megállapítására, főleg, ha különböző erősségű csoportokba is lehet sorolni a reakciókat. Rutin gyakorlatban a becslés általában reális alternatíva és a klinikum számára hasznos útmutatást nyújt, ugyanakkor a becslés pontossága nagyon függhet a szem gyakorlottságától, a munkakörülményektől, pillanatnyi pszichés állapottól és a fáradtság szintjétől. A leletbe azonban be fog kerülni az általunk elvégzett HER2 kiértékelés eredménye és ez a beteg szempontjából, a terápiát illetően meghatározó, valamint később számon is kérhető (149).

A DIA során a különböző platformok általában sejtszintű vizsgálatot végeznek, rengeteg és minden egyes sejtre vonatkozó információ állhat rendelkezésünkre az adott esetekről. Fentiek figyelembevételével egy standardizált módon működő, archiválható leleteket, képeket, adatokat eredményező képanalizáló program hatékony segítségünkre lehet. No persze nem kell minden esetet ezzel kiadni, hiszen az egyértelműen negatív és pozitív eseteknél ez felesleges munkához és idővesztéshez vezethet. De az érdekesebb, vagy nem egyértelműen interpretálható eseteknél a digitális metszeteken történő képanalízis reális alternatíva, segítség lehet patológiai munkánkban. Az újabb irányelvek egyértelműen támogatják a képanalízist végző szoftverek ilyen esetekben való alkalmazását (22, 133, 142, 145).

Ezért vizsgáltuk meg és sikeresen validáltuk a MembraneQuant programot, mely megbízhatóan sorolta a daganatokat azokba a HER2 IHC-pozitívítási csoportokba, ahová azok a két patológus által megállapított konszenzus osztályba is kerültek volna. Külön érdekesség, hogy a HER2 2+ eseteken végzett alvizsgálattal, ugyan kis betegszámon, de sikerült az ezen izgalmas, további FISH vizsgálatokat igénylő alcsoport esetei között FISH-pozitívítás szempontjából különbséget találni. A MembraneQuant által szolgáltatott többféle adat, származtatott és az individuális sejtekre kalkulált mérőszámokat vizsgálva, különbséget tudunk tenni az ugyanazon HER2 2+ csoportba tartozó betegek között, vagyis felmerült a lehetősége, hogy a rendelkezésre álló HER2 immunhisztokémiai reakciók alapján talán meg lehet jósolni a FISH vizsgálat eredményét.

Ezt a hipotézist egyelőre ugyan csak kis beteganyagban (15 beteg, 9 FISH-negatív, 6 FISH-pozitív) teszteltük, de eredményeink alapján vannak olyan mérőszámok (HER2 IHC23, HER2 3+ sejtek %-os aránya, H-Score, a program futása során kiszámolt „mask area”), melyek használatával talán a FISH vizsgálat eredménye megelőlegezhető. Ha belegondolunk, ez egyáltalán nem meglepő, hiszen mi a HER2 immunhisztokémiai reakciók kiértékelésekor durva egyszerűsítést végzünk, mikor a mesterségesen meghatározott és az emberi szem által könnyebben megkülönböztethető négy csoportot használjuk. Vélhetően az immunhisztokémiai metszetekben még számos olyan információ bújjik meg, melyek hasznosításához, az információtartalom kiaknázásához eddig nem állt rendelkezésünkre megfelelő módszer. Az ebben rejlő lehetőségeket a mostani digitális patológiai, képanalízis vizsgálatok kezdhetik el feltérképezni, melyek véleményem szerint alapvetően meg fogják változtatni hozzáállásunkat és információkinyerési képességünket az eddigiekhez képest.

Több cikk szerint is érdemes ezen adatbázisban további elemzéseket végezni, mert ezek alapján a gyűjtőkosár jellegű ún. 'equivocal', vagyis a HER2 2+ esetek számát csökkenteni lehet, illetve ezen csoporton belül a rendelkezésre álló sejtszintű adatok alapján esetlegesen meg lehet jósolni a beteg FISH pozitivitását, illetve negativitását. A nemzetközi irodalomban talált ilyen jellegű vizsgálatokat a 30. Táblázatba foglaltuk össze (117, 139, 150-152).

30. Táblázat. A HER2 2+-nak bizonyult eseteket DIA-val továbbvizsgáló fontosabb tanulmányok. (DIA: Digital Image Analysis, κ : Cohen-féle κ)

Szerző	Év	n (db)	Konkordancia	módszer	platform
Ayad	2015	15	3DIA+ (FISH+: 2), 12DIA- (13FISH-)	DIA vs. FISH	iScan, MECES
Marcuzzo	2016	176	92,5%	DIA vs. FISH	Visia
Micsik	2013	15	FISH +/- DIA szign. eltér	DIA	MembraneQuant
Skaland	2009	60	100%, 71%	DIA vs. FISH	ImageJ
van der Logt	2015	328	98,8% ($\kappa=0,94$), 93,8% ($\kappa=0,88$)	FISH, TMA	Visia

Ezek viszonylag kisebb esetszámmal dolgoztak, mintegy pilot-study-ként, de összességében itt is közel 600 beteget fognak össze. A vizsgálatok néha külön a HER2 2+ betegcsoportra irányultak, de egy részük a HER2 IHC-k DIA kiértékelése közben

identifikálta ezt az érdekesebb HER2 2+ csoportot, és ezen belül próbálta a gépi értékek alapján tovább vinni az analízist. Az eredményeket tekintve általában itt is 70%-feletti korrelációkat, illetve 0,8 feletti κ -értékeket találunk, melyek a szinte tökéletes egyezés kategóriába tartoznak (116).

A vizsgálatokban alapvetően kétféle hozzáállás volt megfigyelhető. Az egyik szerint a hagyományos mikroszkópos kiértékeléssel HER2 2+ eseteket DIA-val megpróbálták az IHC1+ vagy IHC3+ csoportba átsorolni és így elkerülni a FISH-vizsgálatot. A másik lehetőség pedig a HER2 2+ pozitív eseteken belül különbséget tenni a FISH+ és FISH- esetek között. Mindkét eljárás hasznosnak és járhatónak bizonyult, de véleményem szerint az utóbbi forgatókönyv követendő, mert ameddig a DIA-módszeres vizsgálatok nem egyértelműen validáltak, a jelenlegi irányelveknek megfelelő ISH vizsgálatot nem lehet kikerülni, hiszen a betegek az anti-HER2 terápiából sokat profitálhatnak. Mindazonáltal a fenti biztató eredmények alapján a közeljövőben reálisnak tartom a DIA fegyvertárát bevetni ilyen tekintetben is.

Az 5 különböző platformon elvégzett vizsgálatok igen biztató eredményeket szolgáltattak tekintetben, hogy a digitális patológia fegyvertárával módunkban állhat a FISH-költségeket csökkenteni (117, 139, 150-152). Ezek alapján egyes projekteket úgy terveznek, hogy a hatékonyabb vizsgálatokkal megspórolt pénzből fedeznék a digitális patológia eszköztárának bekerülési költségét (153). Ugyanakkor itt is meg kell említeni, hogy a vizsgálatok különböző metodikával és 5 különböző platformon készültek, vagyis nem könnyen összehasonlíthatóak.

5.2.3. Megbízhatóan reprodukálható magdetektáló algoritmus implementációja és validálása

A korábbi pontokban sokat foglalkoztunk a daganatok heterogenitásával, a különböző biomarkerek esetlegesen nem homogén eloszlásával, illetve ezen problémák esetleges megoldásával. Könnyen belátható, hogy minél nagyobb területet nézünk át, annál nagyobb a valószínűsége, hogy a minta reprezentatív lesz, illetve hogy csökkenni fog az interobserver variabilitás (31, 57, 154). Mindenképpen hatékony opció lehet, ha lehetőleg a teljes metszetet vizsgáljuk a kiértékeléskor (WSI). Ezt gyakorlott patológusi rutinnal is csak bizonyos szintig tudjuk csak kivitelezni, mert különben túl sok időt igényelne, illetve

nem állnak rendelkezésünkre bevett sémák és algoritmusok. Általában valamiféle átlag értékkel kell tehát dolgoznunk, ugyanakkor pont a DIA-módszerek adta lehetőségek adhatnak megoldást ezen kérdéskör tisztázására, hiszen ezek segítségével lényegében bármilyen mélységig mehetünk a különböző festések kiértékelésében. Másfelől a minél részletesebb elemzés természetesen nagyobb számítási igénnyel és ebből következően hosszabb ráfordított idővel társul. Ezt leküzdhetjük csúcs-számítógépek alkalmazásával is, de reálisabb lehet a kiértékelési algoritmust optimalizálni.

Munkacsoportunk egy ilyen optimalizálást igyekezett elvégezni, melyben a számítási igények viszonylag közepes szinten tartásával igyekeztünk belátható elemzési idővel magdetektálást elvégezni. Ennek során a képfeldolgozásban rendelkezésünkre álló különböző, jórészt már korábban is meglévő, illetve alkalmazott technológiai elemkekből igyekeztünk olyan algoritmust (CellQuant) felépíteni, mely kellően robusztus a különböző minőségű és technikájú (IHC, FISH) metszetek elemzéséhez, ugyanakkor ezt viszonylag gyorsan el is tudja végezni teljes metszeten. Mivel a magfelismerés az alapja a későbbi immun- és FISH-reakciók kiértékelésének is, fontos, hogy megbízható alapon indulhasson a beteg terápiáját alapvetően befolyásoló biomarkerek kiértékelése.

A daganatok jellemző vonása a sejtek polimorfíája és a magasabb osztódási ráta miatti igen változatos alak- és méretbeli megjelenés, illetve a sejtek heterogén csoportokba való rendeződése. Vagyis az igen változatos magstruktúra, illetve a magokon belüli inhomogenitás, valamint a magok egymással való összefekvése, zsúfolódása miatt egy adaptív szűréssel lehet az inhomogén sejtmagok megbízható felismerését, illetve az összefekvő magok egymástól való elszeparálását megoldani (26-30).

Fenti hatást metszeteinken külön megvizsgáltuk. Az összefekvő sejtek, tumorsejt-clusterek átlagban $38,13 \pm 12,43\%$ -át ($13,8-56,01\%$) tették ki az összes tumorsejtnek, vagyis volt olyan daganat, ahol a tumorsejtek több mint fele egymáshoz zsúfolódva és egymásra ráfeküdve volt fellelhető. Ezen esetekben specifikusan megnéztük, hogy milyen százalékban maradt el az összefekvő sejtek megfelelő elkülönítése. Az így kapott $5,01 \pm 2,71\%$ -os hibaarány alacsonyabb volt a magdetektálás hibaarányánál, és az így elmaradt magseparálás következtében sem kaptunk szignifikánsan eltérő magszámot a különböző esetekben (t-próba: 0,674410). Eredményeink alapján a CellQuant szoftverrel a hagyományos, szem alapúhoz hasonló eredményességű magdetektálást lehetett még a

zsúfoltan elhelyezkedő, magasabb grádusú tumorok esetében is, mely alapján ezen tumoroknál is megbízható segítség lehet a modul használata.

Vesiculáris magstruktúra megjelenhet a metszeteken akár műtermékként, akár a magasabb grádusú tumorokra jellemző fenotípus miatt is. A magok közepén lévő világosabb területtel az emberi szem könnyen elboldogul, de ez pixelekre fordítva a DIA-kban nagy intenzitáskülönbséghez, kontraszthoz és következményesen a magok túlszeparálásához vezethet. Vagyis lényegesen több sejtet detektálnánk adott területen, mely a biomarkerek %-osan feldolgozandó értékét szignifikánsan megváltoztathatja. Eme potenciális hatást vizsgáltuk a CellQuant modulban alkalmazott lyukkitöltő algoritmus ki/be-kapcsolásával. A manuálisan, szemmel ellenőrzött adatok és képek alapján az algoritmus fontos szerepet játszott a kiváló szenzitivitás és PPÉ-érték elérésében, hiszen enélkül a detektálás szenzitivitása közel 27%-os, míg PPÉ-je közel 9%-os rosszabbodást mutatott.

További nehézséget okozhat, hogy sajnálatos módon a műtéti preparátumok preanalitikai kezelése nem minden esetben megoldottan standardizált, ezért előfordulnak suboptimális minőségű metszetek, melyekben a szövettani kép inhomogén, rossz minőségű lehet. FISH vizsgálatoknál a szükséges előkezelés okozta sejtkárosodás, valamint az autofluoreszcencia hatásainak eliminálása okozhat nehézséget (24, 25).

Ezt megvizsgálандó többféle technikával és eltérő időpontokban készült, különböző minőségű metszeteket is analizáltunk. A CellQuant algoritmusnak a gyengébb minőségű, illetve halványabb festődésű metszeteken a rosszabb kontrasztarány miatt a megbízható magdetektálás több időt vett igénybe és több volt a kevésbé jól körülhatárolt mag. Ugyanakkor a standardizált, jól fixált és ezért jól festődő IHC és FISH-metszeteken a szenzitivitás ($93,5 \pm 1,91\%$) és PPÉ ($92,9 \pm 0,31\%$) is jobbnak bizonyult. Mindazonáltal összességében a sikerráta így is 90%-ot meghaladta, így szinte tökéletes egyezésre utalt.

A piacon több DIA-algoritmus is fellelhető. A QuPath (114) és CellProfiler (115) programok szabadon hozzáférhetőek, ezért célszerűnek láttuk a három módszert összehasonlítani. Habár a különböző platformok beállítási lehetőségei több esetben nem teljesen 'csereszabatosak', igyekeztünk hasonló paramétereket és azonos számítógépes kalkulációs háttérrel biztosítani. Vizsgálatunk a CellQuant algoritmust hozzávetőlegesen négyszer gyorsabbnak mutatta, ami a reális időben való használhatóságot mindenképpen

előremozdíthatja. A szenzitivitás és PPÉ is magasabbnak bizonyult az optimalizált algoritmusunk esetében, mint a másik két DIA-módszerrel.

A képfeldolgozásban általában hasonló rész-algoritmusokat használnak és lényegében mi is a különböző publikációkban, szakirodalomban talált eljárásokból válogatva, és adott feladatra optimalizálva állítottuk össze a saját algoritmusunkat. Ezzel a felépítéssel a két összehasonlított módszernél szignifikánsan gyorsabb és jobb eredményeket adó detektáló algoritmust tudunk megalkotni. Vagyis már most bőven rendelkezésre állnak olyan algoritmusok, melyek egymáshoz való gondos illesztésével és optimalizálásával hatékony DIA-módszereket tudunk kialakítani bizonyos célfeladatokra.

Mivel sok esetben másra kell kihegyezni az adott DIA-módszert, a különböző rész-algoritmusok megfelelő kiválasztása, paraméterezése és egymással való kombinálása, illetve ennek pontos sorrendje vélhetően finom iterációkkal közelíthető meg és gondos figyelmet, körültekintő munkát igényel. Külön kiemelendő, hogy ennek optimalizálásában, az algoritmus megtervezésében a gyakorlott patológus szeme, illetve rutinja sokszor elengedhetetlen ahhoz, hogy a modul megfelelő eredményre konkludálhasson.

Ezen DIA-módszerek validációját jelenleg csak az emberi-patológusi szem kontrollja jelentheti, amely adott esetben kifejezetten nagy munka lehet (pl: 310 ezer sejtet egyesével bejelölni hosszú idő). Ezért üdvözljük olyan validációs célzatú digitális patológiai adatbázisok létrehozását, melyben nagyobb mennyiségű, korábban már az emberi validáláson átesett és megfelelően annotált metszetek állhatnak rendelkezésre (155).

Az emlőrákoknál használt többféle biomarker is magi pozitivitást mutat, melyek közül jelenleg sincs mindegyik diagnosztizálása standardizálva. Egyre több irányelv áll ugyan rendelkezésre, de ezek követése nem teljesen megoldott. Másfelől sok esetben a tumor heterogenitása, a minta mérete, a mintavétel technikai kérdései, a fixálás és preanalitikai kondíciók esetlegessége is hozzájárulhat a nagyobb fokú intratumorális, intraobserver, interobserver különbségek létrejöttéhez (31, 54, 77, 78, 154, 156).

Habár nem mindenre jelent megoldást, de a minél nagyobb mennyiségű, lehetőleg a teljes metszeten (WSI) fellelhető összes tumorsejt vizsgálata és megbízható kiértékelése által

rendelkezésre álló információ-többlet hozzájárulhat a fenti problémák orvoslásához. Ehhez már most is elegendő és megfelelő képfeldolgozó technika és rész-algoritmus áll rendelkezésünkre, melyek szakavatott, patológusi szem és rutin mellett történő, körültekintő és optimalizált kombinálásával felépítve hatékony, megfelelően sebességgel és jó szenzitivitással működő DIA-algoritmusok reális kiértékelési segítséget nyújthatnak akár mindennapi gyakorlatunkban is (113).

5.2.4. Ösztrogén és progeszteron receptor immunreakció digitális kiértékelésének validálása

A hormonreceptorok alkalmazása az emlőrákoknál régóta bevett és elég jó effektussal használt terápiás modalitás. A hosszú évek alatt sok evidencia gyűlt össze, ennek megfelelően a szélesen elfogadott terápia hatásait már sokezeres beteganyagot felölelő tanulmányok elemzik (32, 33, 35).

Saját validációs vizsgálatunk során a NuclearQuant applikáció előzetes kalibrálása után a kalibrált programmal végzett rutin ösztrogén és progeszteron immunhisztokémiai reakciók gépi analízisének eredménye szinte tökéletes egyezést mutatott a patológus által megadott értékekkel. A Cohen-féle κ (0.795), a négyzetesen súlyozott κ (0.981) és a Spearman féle rang-korreláció (0.975) mindegyike egyhez közeli értéket mutatott, és a szinte tökéletes egyezést jelentő osztályba került.

Kézenfekvő a tehát az adatok digitális patológiai feldolgozása, illetve a vizsgálatok DIA-módszerekkel történő lefolytatása. A szakirodalmat átnézve természetesen számos ilyen témájú közleményt találhatunk, melyek részletes ismertetése meghaladná a dolgozat keretét ezért itt is a legfontosabb HR DIA vizsgálatokat a 31. Táblázatba foglaltuk össze (lásd következő oldal)(71, 72, 74, 102, 103, 108-111, 157-160).

Sokféle platform, többféle megközelítés látható és természetesen ez esetben is megállapítható, hogy a módszertanban és a végpontokban sokszínűség látható, és így nehezen lehet a különböző értékeket pontosan összehasonlítani.

31.Táblázat. A fontosabb HR DIA vizsgálatok (AUC: Area Under Curve; PCC: Pearson's Correlation Coefficient, DIA: Digital Image Analysis, κ : Cohen-féle κ , $^2\kappa$: Négyzetesen súlyozott κ , ρ : Spearman-féle ρ ; ICC: Intra Class Corelation; r: Regresszió; F: F-érték)

Szerző	Év	n (db)	IHC	Konkordancia	Módszer	Platform
Ahern	2017	592	ER	AUC(Aperio)=0,97, AUC(Definines)=0,90	Man. vs. DIA, @1%	Aperio, Definiens
Ahern	2017	187	PR	AUC(Aperio)=0,94, AUC(Definines)=0,87	Man.vs. DIA, @1%	Aperio, Definiens
Bankhead	2018	293	ER	PCC=0,908; ρ =0,892	Man. vs. DIA	QuPath
Bankhead	2018	293	PR	PCC=0,862; ρ =0,887	Man. vs. DIA	QuPath
Barnes	2017	120	ER	95,3-98,3%	Man. vs. DigLeolvasás vs. DIA	VMSI
Barnes	2017	120	PR	94,1-96,6%	Man. vs. DigLeolvasás vs. DIA	VMSI
Bolton	2010	440	ER, PR	κ =0,86-0,91	Man. vs. DIA, TMA,Histoscore	Ariol, Aperio, TMAX
Faratian	2009	397	ER	ICC=0,93	Man. vs. DIA, Histoscore	Ariol
Faratian	2009	397	PR	ICC=0,96	Man. vs. DIA, Histoscore	Ariol
Holmström	2015	170	ER	R=0,93-0,98 κ =0,69-0,84	Man. vs. DIA 2 scanner	MoMic, ImmunoRatio2
Howat	2014	8267	ER	κ =0,76 90,1%	TMA, Man. vs. DIA túlélés	Ariol
Howat	2014	8267	PR	κ =0,67 84%	TMA Man. vs. DIA túlélés	Ariol
Krecsák	2011	16	ER, PR	κ =0,859; $^2\kappa$ =0,986	Man. vs. DIA	NuclearQuant
Mohammed	2011	459	ER	κ =0,91, ICC=0,98	Man. vs. DIA, Histoscore	Tissue IA
Mohammed	2011	459	PR	κ =0,95, ICC=0,99	Man. vs. DIA, Histoscore	Tissue IA
Mungle	2017	65	ER	F=0,9626, ICC>0,90	Man. vs. DIA	AI (Markov random field)
Rexhepaj	2008	639	ER	ρ =0,9, R=0,860	Man. vs. DIA, @7%	Aperio, Matlab
Rexhepaj	2008	622	PR	ρ =0,9, R=0,681	Man. vs. DIA, @5%	Aperio, Matlab
Tuominen	2010	144	HER2	$^2\kappa$ = 0,8	Man. vs. DIA	ImmunoRatio
Turbin	2008	4049	ER, PR	κ =0,88-0,9	Man. vs. DIA, @10%	Aperio

Saját és a fentebb ismertetett szakirodalmi adatok összességében közel 26000 esetet ölelnek fel és a táblázat értékei itt is a szinte tökéletes egyezést jelentő kategóriákba kerültek, hiszen általában 0,8, de inkább 0,9 feletti értékeket vettek fel (116).

Összességében tehát fentiek alapján nem hezitálhatunk kimondani, hogy a gépi analízis reális segítséget adhat a mindennapi, rutin gyakorlatunkban is.

Az eredeti, a hormonterápiát indikáló Allred-beosztás közleménye közel 20 éves (35), ezért újabb információk finomíthatják majd a képet. Mivel a hormonpozitivitás küszöbértéke igen alacsony – korábban a sejtek 10%-a, de jelenleg már 1%-a – vagyis $AQI \geq 3$ -tól a betegek egységesen a hormonpozitív csoportba sorolandóak, függetlenül a pozitivitás számszerű értékétől, tehát elég széles pozitív tartomány áll rendelkezésre a kezeléshez.

Mivel a betegek csoportosítása, dichotomizálása általában a hormonpozitív és hormonnegatív csoportok szerint történik, igen nagy, de távolról sem homogén populációkról beszélhetünk, legalábbis a hormonpozitív csoportban. Vélhetően a magasabb arányban hormonreceptort expresszáló tumorok jobban reagálnak a hormonterápiára, aminek vizsgálatára újabban láthatunk példákat (110, 161, 162). Ezen hormonpozitív csoporton belüli finomabb kategóriák elkülönítése és ezen csoportok szerinti további túlélési, illetve terápia-responderségi vizsgálatokra lesz még szükség a kérdéskör pontosabb tisztázása érdekében. Mivel azonban az AQI-kiértékelésben sok szubjektív tényező van - hiszen a százalékos arány megadása becsléssel történik és az intenzitás enyhe, közepes és erős osztályokba sorolására nincs bevett útmutatás - éppen a DIA-segíthetne ennek standardizálttá tételében és így megbízhatóbb adatok szolgáltatásában, melyek alapján újabb, finomabb, klinikailag potenciálisan relevánsabb alcsoport-distinkciókra is lehetőség nyílhat (110, 161). Meggyőződésem, hogy a digitális immunhisztokémiai kiértékelés módszere új lehetőségeket nyit a hormonterápia pontosabbá tételére és e témában számos, újabb metodológiával készülő/szervezett vizsgálatot várhatunk a közeljövőben.

Mivel a normál emlőszövet és ductusok, illetve az in situ carcinomák is általában hormonreceptorokat expresszálnak, lényegében belső pozitív kontrollként is használhatóak. Kifejezetten előremutatóak a teljesen automatizált tumorfelismeréssel foglalkozó DIA-módszerek, a fejlődő képanalízis lehetőségei kapcsán megjelenő tanulmányok, kecsegtető, a normál epitheliális elemeken és in situ carcinomákon belüli hormonpozitivitás és ettől a tumorsejtfrakción belüli hormonpozitivitás megbízható

elkülönítésével a tumorok teljesen automatizált pontos kiértékelését felcsillantó eredményekkel (73, 108).

5.2.5. Ki-67 proliferációs marker digitális kiértékelésének validálása

Habár a Ki-67 proliferációs index széles körben elterjedt az emlőrákok rutin diagnosztikájában, az általában használt Ki-67 immunhisztokémiai eljárások, illetve annak kiértékelésének módja mai napig nincs standardizálva (38). Különböző laborokban eltérő módon végzik az immunreakciót, melynek eredményét emellett a tumoros specimen laborba érkezését megelőző prefixációs ichtaemiás idő, a fixálás körülményei, az alkalmazott vegyszerek, immunreagensek, anitestek is befolyásolhatják (163).

Szintén eltérő módon történhet a kiértékelés, egyrészt a hagyományos módon történő manuális, vagy szemi kiértékelés során figyelembe vett sejtek számát, másrészt a proliferáló sejtek térbeli eloszlásának egyenlőtlenségét illetően. Nem meglepő tehát, hogy a proliferációs index egyértelműen elfogadottan validált prediktív és prognosztikai szerepe, illetve a legmegbízhatóbb küszöbérték meghatározására tett konszenzusos kísérletek is jelenleg kissé ellentmondásosak vagy bizonytalanok. Általában a 15-30% körül húzzák meg a határokat. Az ún. St.Gallen-i konszenzus érték különböző időpontokban 10%, 13%, 15% volt, majd újabban 20%, de egyes vizsgálatok szerint ennél nagyobb, legalább 25%, vagy inkább 45%-os proliferációs küszöb tudná a betegeket megbízhatóan külön prognosztikai és prediktív csoportokba sorolni (41, 43, 45, 49, 164).

Fenti eltérő adatoknak, illetve vizsgálati eredményeknek részben oka lehet az elterjedten használt Ki-67 immun a különböző vizsgálatok által feltárt nagyobb interobserver variabilitás, mely főképp az átmeneti, vagy közepes proliferációs tartományban legszembetűnőbb (54, 165-167). Míg az alacsony és magasabb proliferációs rátatartományokban viszonylag jó egyezést találtak a különböző összehasonlító vizsgálatokkal, a kifejezetten érdekes és klinikailag vitatott 15-30%-os ráták esetében az interobserver variancia sajnálatos módon magasabbnak adódott. Nem véletlen tehát, hogy az újabb vizsgálatokkal ezen átmeneti tartományokat igyekeznek leginkább megcélolni, hogy a klinikailag releváns csoportokat biztonságosabban lehessen egymástól elválasztani (52, 53), illetve más potenciális biomarkerek bevonása is megfontolandó (39).

A 32.Táblázatban összefoglaltuk a nemzetközi szakirodalomban található legfontosabb PI DIA vizsgálatok adatait (52, 53, 70, 71, 74, 76, 100, 154, 160, 165, 168-172).

32.Táblázat. A fontosabb PI DIA vizsgálatok (PCC: Pearson's Correlation Coefficient, DIA: Digital Image Analysis, κ : Cohen-féle κ , $^2\kappa$: Négyzetesen súlyozott κ , ρ : Spearman-féle ρ ; ICC: intra Class Corelation; Rs: Regresszió, τ : Kendall-féle τ ; HR: Hazard Ratio)

Szerző	Év	n (db)	Konkordancia	módszer	platform
Ács	2018	378	ICC(Man)=0,853; CCC(DIA)=0,963	manuális vs. DIA, 3 patológus	PatternQuant NuclearQuant
Bankhead	2018	293	PCC=0,852; ρ =0,795	manuális vs. DIA	QuPath
Barnes	2017	120	86,8-100%	manuális vs. digitális leolvasás vs. DIA	
Christgen	2015	100	ROI méret hatása LI-re szignifikáns	manuális vs. DIA	Virtuoso, iScan
Fulawka	2016	98	PCC=0,84; ρ =0,83; κ =0,47	sejtszámolás vs. DIA	ImageJ, ImmunoRatio
Gavrielides	2014	50	Interobserver τ =0,71- 0,76; Intermethod τ =0,78	8 patológus; manuális vs. digitális lemezen; TMA vs. WSI	
Gudlaugsson	2012	237	κ (Man)=0,36-0,49; κ (DIA)=0,59-0,73	manuális vs. digitális lemezen vs. DIA	QPRODIT
Jing	2017	71	ICC=0,91-0,99; ICC(DIA,TMA)=0,97	TMA vs. WSI; man. vs. assziszt. vs. DIA	Aperio
Joshi	2015	309	Rs=0,87	manuális vs. digitális lemezen, TMA	opTMA, vizuálisan
Maeda	2016	50	ICC(Man/Dig)=0,885; ICC(DIA)=0,825	manuális vs. digitális lemezen vs. DIA	Tissuemorph, Visiopharm
Stalhammar	2016	436	κ =1,00	manuális vs. DIA	Visiopharm Integrator System
Tuominen	2010	123	HR(20%)=2,2	manuális vs. DIA	ImmunoRatio
Vörös	2013	30	PCC=0,899-0,920; ρ =0,886-0,925	manuális vs. digitális lemezen, 4pat, 3 At	Pannoramic
Yeo	2017	577	κ =0,881 (20% cutoff)	manuális vs. DIA	ImmunoRatio
Zhong	2016	155	ICC (HotSpot)=0,957; ICC (Average)=0,974	5 patológus vs. DIA, HotSpot/AverageScore	Ventana Virtuoso

Christgen és munkatársai 100 esetet felhasználva megvizsgálták a DIA-során figyelembe vett ROI-méretének hatását a PI-re, és szignifikáns eltéréseket detektáltak (154). A ROI-ba kerülő sejtek számával (50-10000 sejt) a PI mediánja (15%-55%), a St.Gallen-i kritériumok alapján az alacsony proliferációjú csoportba sorolt esetek aránya (2%-56%) és a hagyományos módon meghatározott PI és DIA-PI korrelációja (κ = 0,06-0,85) is drasztikusan változott. Ez természetesen nem meglepő, mert más, hagyományos kiértékelési módok esetében is fellelhető volt az interobserver variabilitás ilyen hatása, (45, 46, 57, 164, 171, 173-175). Ugyanakkor Christgen tanulmánya mindenképpen

előremutató a jelenség számszerűsítése és pontos dokumentálása miatt. Hasonló vizsgálatokkal végre olyan eszköz van a kezünkben, mellyel a PI-meghatározás forrongó kérdéseire objektív és számszerűsíthető válaszokat kaphatunk. Részben ezektől várható, hogy a Ki-67 és PI prognosztikai és prediktív szerepének feltárása és jelentősége objektíven eldönthető lehet.

Gudlaugsson vizsgálatában a tradicionális, asszisztált és DIA kiértékelés eredményei közül a DIA volt a leginkább reprodukálható és prognosztikus (170). Ha a patológusok tradicionálisan meghatározott PI-értékeit néztük, azok vagy prognosztikusabbak, vagy reprodukálhatóbbak voltak, de az inter/intraobserver értékek lényegesebb ingadozást mutattak. Ugyanakkor a DIA-értékek esetében mindkét vizsgált minőségi mutató teljesült, vagyis az erős prognosztikai érték mellett a reprodukálhatóság sem sérült.

Jing-ék 5 féle kiértékelést (manuális, asszisztált/asszisztálatlan vizuális, félautomata/teljesen automata DIA) kiértékelés eredményeit hasonlították össze TMA, illetve WSI alapú kiértékelésnél (171). A viszonyítási alap a manuális számolás volt. Általában a DIA-kiértékelés jótékony hatású volt a korrelációra. A TMA-n alapuló értékek magasabbak voltak, ami szintén a ROI kiválasztásának fontosságára mutat. A cikkben azt is vizsgálták, hogy milyen időbefektetéssel lehet a különböző PI-értékekhez hozzájutni, ami szerint az aranystandardnak számított sejtszámoláshoz képest (kb. 25') a DIA-módszerek általában töredéknyi (1-2') idő alatt megbízható és reprodukálható adatot szolgáltatottak (33. Táblázat).

33. Táblázat. Jing cikkében található összehasonlítások értékei TMA-alapú kiértékelésnél (DIA: Digital Image Analysis, ICC: Intra Class Correlation, κ : Cohen-féle κ , IntraO: Intraobserver, InterO: Interobserver) (Jing et al 2017. (171) alapján, módosítva)

Kiértékelés módja	ICC	κ	IntraO ICC	IntraO κ	InterO ICC	InterO κ
Vizuális	0.92	0.84	0.92	0.82	0.83	0.83
Asszisztált vizuális	0.93	0.86	0.95	0.88	0.88	0.78
Félautomata DIA	0.99	0.95	0.98	0.9	n.a.	n.a.
Automata DIA	0.97	0.9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

A PI vagy Ki-67 IHC-vel foglalkozó DIA vizsgálatok a HR és HER2 vizsgálatoknál kisebb esetszámúak, de összességében így is 3000 beteget érintenek. Természetesen a végpontok és az összehasonlítás módszere itt sem volt egységes, de a felsorolt mérőszámok alapján az igen jó, szinte tökéletes egyezés kategóriájába tartozó

eredmények születtek, ami alapján a főképp Ki-67 alapú immunhisztokémiai reakciók DIA-elemzése megbízható, reális alternatívának ígérkezik.

A vizsgálatokban sokszor az ICC-összehasonlítást használták mérőszámként, mivel a Ki-67 PI alapján sorolták a betegeket az alacsony, illetve magas proliferációjú csoportba. Ez a dichotomizáció a túlélési görbékben is megfelelően szignifikánsan választotta el a két csoportot. A különböző vizsgálatok optimális PI-küszöbértéke sokszor eltért, de minden esetben lehetett egy bizonyos tartományon belül olyan optimális küszöbértéket találni, mely mentén a betegeket megbízhatóan lehetett jobb és rosszabb prognózisú csoportba dichotomizálni. Nagyon fontos kiemelni ugyanakkor, hogy ezen értékek meggyőzően reprodukálhatóak voltak, vagyis kellően robusztusnak bizonyultak klinikailag is.

A DIA PI-meghatározás során egyéb tumormarkerrel való kiegészítés hasznosságát elemző vizsgálat a két módszer között jó korrelációt talált ($\rho=0,8$) (176). A hagyományos mikroszkópos kiértékelés interobserver eltéréséhez képest az ismételt DIA kiértékelés lényegesen jobb egyezést mutatott ($\rho=0,7$ vs. $0,98$ és $\kappa=0,32$ vs $0,98$).

Saját vizsgálataink szerint is a különböző módszerekkel történő proliferációs ráták egymással való összehasonlítása során szignifikáns korrelációkat találtunk ($r=0,62213-0,72651$; $ICC=0,913-0,979$), amit megerősített a különböző határtértékek (14%, ill. 20%) mentén történő dichotomizált betegek általános túlélési görbéin látható szignifikánsan elváló két csoport görbéje (76). Vizsgálataink szerint a gépi proliferációs ráta meghatározás reális alternatíva lehet a mindennapokban is.

6. Következtetések

1. Markerek hagyományos üveg és digitalizált metszeteken történő kiértékelésének összehasonlítása

Saját és nemzetközi vizsgálatok eredményei alapján a mikroszkópos és digitális tárgylemezen való kiértékelés ekvivalensnek bizonyult HER2, ER és PR immunhisztokémiai metszeteken.

2. Immunhisztokémiai reakciók digitális kiértékelésének validálása

a. HER2 Immunreakciók vizsgálata

Saját eseteinkkel egybevéve közel 11000 beteg HER2 Immunreakcióinak vizsgálata igazolja a HER2 IHC digitális kiértékelésének alternatíváját. A digitális HER2 kiértékelés nemcsak jól egyezik a hagyományos kiértékelés eredményével, hanem potenciálisan előre jelezheti a génamplifikációt és így a szükséges *HER2* FISH reakciók számát is esetlegesen csökkentheti.

a. Reprodukálható sejtmagfelismerő algoritmus fejlesztése és validálása

Az irodalomban hozzáférhető különböző DIA-algoritmusok körültekintő kombinálásával optimalizáltunk egy közepes hardverigényű platformot, mely FISH és IHC teljes metszeteken reális idejű magdetektálást tesz lehetővé. Algoritmusunk két konkurens DIA-módszerrel összehasonlítva, azoknál pontosabbnak, gyorsabbnak és hatékonyabbnak is bizonyult.

b. Hormonreceptorok vizsgálata

Közel 26000-es esetszámon alapuló DIA-vizsgálatok igazolják, hogy a hormonreceptor pozitivitás kiértékelésére a digitális patológia jól használható. A teljesen automata tumorfelismeréses módszerek, illetve finomabb pozitívítási osztályok klinikai relevanciája további vizsgálatok tárgyát képezi.

c. Ki-67 Proliferációs Index vizsgálata

Szakirodalmi és saját vizsgálatunk közel 3000 esetet átfogva igazolta a DIA alkalmasságát az emlőrákok magas és alacsony proliferációjú prognosztikai csoportokba történő dichotomizálására. A Ki-67 eddig kissé bizonytalan szerepű értékét pontosan a jobban reprodukálható, standardizált, megfelelően kvantifikálható DIA módszerek emelhetik be sikeresen a megbízható klinikai relevanciával bíró prediktív és prognosztikai markerek közé.

7. Összefoglalás

Az emlőrákok kezelésében mára több prediktív és prognosztikai marker vált a rutin patológiai lelet elengedhetetlen részévé, mely a beteg további kezelését alapvetően befolyásolja. Ezen biomarkerek kiértékelése általában immunhisztokémiai módszerekkel történik és a patológusra hárul. Az ER, PR, HER2, Ki-67 reakciók kiértékeléséhez állnak rendelkezésre irányelvek, de standardizálásuk napjainkig sem teljesen megoldott. Az általunk végzett kiértékelés eredménye a lelet szerves részét képezi, ezért felelősségünk kifejezettebbé vált. A digitális patológiai eljárások, a gépi képanalízis nagy léptekben fejlődnek ezért célszerű lehet az azokban rejlő standardizáció, archiválás és mélyebb analízis irányába mutató lehetőségeket kiaknázni, a kiértékeléshez segítségül hívni.

Munkám és kutatásaink során a fenti két területet igyekeztem összeházasítani, és az ER, PR, HER2, Ki-67 kiértékelés gépi módszereiben rejlő lehetőségeket kipróbálni, illetve azokat validálni. Eredményeinket a szakirodalmi adatokkal összevetve tárgyalom.

Elsőként a kiértékeléshoz használt metszetek hagyományos mikroszkópos és digitalizált, képernyőn történő leolvasásának összevetésével igazoltuk a két módszer ekvivalenciáját. Ezt követte a HER2, mint fontos célzott terápiás célpont membránreakcióinak gépi, automatizált módon történő leolvasásának/kiértékelésének sikeres validációja, mely során a kapott adatok komplex elemzésével a FISH-pozitivitással is tudtunk összefüggést igazolni. Vizsgálataink az ER, PR és Ki-67 magi Immunreakciók automatizált kiértékelését is validálták. Ennek során automata tumorfelismerő algoritmust is alkalmaztunk, mellyel az automatizált biomarker-kiértékelés folyamata gyors, napi rutinba beilleszthető és megbízható értékeket szolgáltat.

A tumorokban tapasztalható heterogenitás, a mintavétel esedékessége miatt egyre inkább a teljes metszetek analízise kívánatos. Ehhez a jelenleg is rendelkezésre álló képfeldolgozó algoritmusok optimalizált összeillesztésével olyan robosztus magdetektáló algoritmust implementáltunk és validáltunk, mely szintén napi rutinban is használható.

Saját és a szakirodalmi adatok szerint is a gépi/automatizált biomarker kiértékelés már ma is reális segítséget nyújthat mindennapi gyakorlatunkban és jobbá teheti a terápiák személyre szabását. Emellett olyan eszköztárat kínál, mely a képi információk mélyebb analízisével a biomarkerek vizsgálatának újabb kapuit és klinikailag potenciálisan releváns lehetőségeit nyitja meg.

8. Summary

For today several important predictive and prognostic biomarkers became inevitable part of the routine signout of breast cancer cases with severe impact on patients' further therapy. Those markers are usually scored on immunohistochemically (IHC) stained slides by the pathologists emphasizing our crucial role and responsibility in defining patients' course. There are certain guidelines regarding ER, PR, HER2 and Ki-67 scoring to be followed, but unfortunately these are still not fully standardized, especially in case of Ki-67. Digital pathology and image analysis is constantly and rapidly developing and thus offer more standardized, archivable algorithms for scoring IHC-cases, furthermore deeper image analysis might provide additional information benefiting patients.

During my research work I focused on these two issues. We examined how Digital Image Analysis (DIA) can be involved into biomarker-scoring of ER, PR, HER2 and Ki-67 immunostained slides, how it can help the process and can be validated. Our results are discussed in line with current literature data.

First, we compared the traditional, microscopic scoring with the scoring on scanned, digital slides and proved their equivalency. As HER2 is a very important target at breast cancer therapy, we validated the semiautomated HER2 membranous IHC scoring with success. DIA provides deeper data on IHC-staining, so we tested whether the harvested data can be further utilised and found several measurements for predicting FISH-positivity on HER2 IHC. Furthermore, we also successfully validated ER, PR, Ki-67 automated scoring on nuclear IHC-reactions. This process was partly performed with pattern-recognition methods automatically detecting tumorous tissue within IHC-reaction and thus sparing considerable time and work, fitting and helping our daily routine work.

The upcoming issue of tumor/biomarker heterogeneity and complexity drives our attention towards the need of Whole Slide Imaging (WSI). With different available DIA-algorithms we succeeded in building up and validating an optimized nuclear recognition protocol capable of high throughput and robust analysis on various FISH and IHC slides.

According to our and literature data, validated DIA-methods are available/ready for helping our routine signout of biomarkers, potentially improving tailored therapy. Furthermore, deeper and standardized image analysis may open new gates on biomarker research/development offering clinically relevant additional data on disease's behaviour.

9. Új megfigyelések

Az értekezés alapján új megfigyeléseket az alábbiakban foglaljuk össze:

Jelentős beteganyag ER, PgR, HER2 és Ki67 immunreakcióinak elemzésével nemzetközileg is elsők között:

1) Igazoltuk, hogy az emlőrákok prognosztikus és prediktív reakciónak értékelése, hagyományos mikroszkópos, ill. megfelelő minőségű digitális metszeteken ekvivalens eredményt ad.

2. Sikeresen validáltuk a HER2 sejtmembrán immunreakciók automatizált kiértékelését a hagyományos módszerhez, ahol a reakciók félautomatizált kiértékelésének eredményei a kritikus 2+ pozitív csoportban támogatták a FISH pozitív és negatív esetek előzetes elkülönítését.

3. Fejlesztettünk és validáltunk egy jól reprodukálható automatizált magfelismerő képanalízis algoritmust, mely alkalmas a marker pozitív és negatív sejtmagok standardizált kiértékelésére teljes digitális metszeten.

4. Validáltunk magi ER, PgR, illetve Ki-67 immunreakciók gépi félautomatizált analízisét a hagyományos módszerhez és igazoltuk a képanalízis módszerek klinikai relevanciáját.

10. Irodalomjegyzék

1. GLOBOCAN 2012 (IARC) , S. o. C. S.
2. Harbeck, N., and Gnant, M. (2017) Breast cancer. *Lancet* **389**, 1134-1150
3. Sinn, H. P., and Kreipe, H. (2013) A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast care (Basel, Switzerland)* **8**, 149-154
4. *TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition* (2017) Wiley Blackwell
5. Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O., and Botstein, D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752
6. Curtis, C., Shah, S. P., Chin, S. F., Turashvili, G., Rueda, O. M., Dunning, M. J., Speed, D., Lynch, A. G., Samarajiwa, S., Yuan, Y., Graf, S., Ha, G., Haffari, G., Bashashati, A., Russell, R., McKinney, S., Langerod, A., Green, A., Provenzano, E., Wishart, G., Pinder, S., Watson, P., Markowitz, F., Murphy, L., Ellis, I., Purushotham, A., Borresen-Dale, A. L., Brenton, J. D., Tavaré, S., Caldas, C., and Aparicio, S. (2012) The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* **486**, 346-352
7. Curtis, C. (2015) Genomic profiling of breast cancers. *Current opinion in obstetrics & gynecology* **27**, 34-39
8. Guiu, S., Michiels, S., Andre, F., Cortes, J., Denkert, C., Di Leo, A., Hennessy, B. T., Sorlie, T., Sotiriou, C., Turner, N., Van de Vijver, M., Viale, G., Loi, S., and Reis-Filho, J. S. (2012) Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **23**, 2997-3006
9. Masoud, V., and Pages, G. (2017) Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. *World J Clin Oncol* **8**, 120-134
10. Hu, X., Huang, W., and Fan, M. (2017) Emerging therapies for breast cancer. *Journal of hematology & oncology* **10**, 98

11. Wolff, A. C., Hammond, M. E., Schwartz, J. N., Hagerty, K. L., Allred, D. C., Cote, R. J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P. L., Hanna, W. M., Langer, A., McShane, L. M., Paik, S., Pegram, M. D., Perez, E. A., Press, M. F., Rhodes, A., Sturgeon, C., Taube, S. E., Tubbs, R., Vance, G. H., van de Vijver, M., Wheeler, T. M., and Hayes, D. F. (2007) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* **131**, 18-43
12. Ciampa, A., Xu, B., Ayata, G., Baiyee, D., Wallace, J., Wertheimer, M., Edmiston, K., and Khan, A. (2006) HER-2 status in breast cancer: correlation of gene amplification by FISH with immunohistochemistry expression using advanced cellular imaging system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **14**, 132-137
13. Loibl, S., and Gianni, L. (2017) HER2-positive breast cancer. *Lancet* **389**, 2415-2429
14. Nahta, R., Shabaya, S., Ozbay, T., and Rowe, D. L. (2009) Personalizing HER2-targeted therapy in metastatic breast cancer beyond HER2 status: what we have learned from clinical specimens. *Curr Pharmacogenomics Person Med* **7**, 263-274
15. Shah, S., and Chen, B. (2011) Testing for HER2 in Breast Cancer: A Continuing Evolution. *Patholog Res Int* **2011**, 903202
16. Cornejo, K. M., Kandil, D., Khan, A., and Cosar, E. F. (2014) Theranostic and molecular classification of breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* **138**, 44-56
17. Pinto, A. C., Ades, F., de Azambuja, E., and Piccart-Gebhart, M. (2013) Trastuzumab for patients with HER2 positive breast cancer: delivery, duration and combination therapies. *Breast* **22 Suppl 2**, S152-155
18. Liu, M., Yang, Y. J., Zheng, H., Zhong, X. R., Wang, Y., Wang, Z., Wang, Y. G., and Wang, Y. P. (2014) Membrane-bound complement regulatory proteins are prognostic factors of operable breast cancer treated with adjuvant trastuzumab: a retrospective study. *Oncol Rep* **32**, 2619-2627
19. Albanell, J., Codony, J., Rovira, A., Mellado, B., and Gascon, P. (2003) Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on

- trastuzumab and 2C4. *Advances in experimental medicine and biology* **532**, 253-268
20. Sadeghi, S., Olevsky, O., and Hurvitz, S. A. (2014) Profiling and targeting HER2-positive breast cancer using trastuzumab emtansine. *Pharmacogenomics and personalized medicine* **7**, 329-338
 21. Jones, K. L., and Buzdar, A. U. (2009) Evolving novel anti-HER2 strategies. *The lancet oncology* **10**, 1179-1187
 22. Wolff, A. C., Hammond, M. E., Hicks, D. G., Dowsett, M., McShane, L. M., Allison, K. H., Allred, D. C., Bartlett, J. M., Bilous, M., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Jenkins, R. B., Mangu, P. B., Paik, S., Perez, E. A., Press, M. F., Spears, P. A., Vance, G. H., Viale, G., and Hayes, D. F. (2013) Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* **31**, 3997-4013
 23. Arnould, L., Roger, P., Macgrogan, G., Chenard, M. P., Balaton, A., Beauclair, S., and Penault-Llorca, F. (2012) Accuracy of HER2 status determination on breast core-needle biopsies (immunohistochemistry, FISH, CISH and SISH vs FISH). *Mod Pathol* **25**, 675-682
 24. Levsky, J. M., and Singer, R. H. (2003) Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *Journal of cell science* **116**, 2833-2838
 25. Arslan, S., Ersahin, T., Cetin-Atalay, R., and Gunduz-Demir, C. (2013) Attributed relational graphs for cell nucleus segmentation in fluorescence microscopy images. *IEEE transactions on medical imaging* **32**, 1121-1131
 26. Nandy, K., Gudla, P. R., Amundsen, R., Meaburn, K. J., Misteli, T., and Lockett, S. J. (2012) Automatic segmentation and supervised learning-based selection of nuclei in cancer tissue images. *Cytometry A* **81**, 743-754
 27. Gudla, P. R., Nandy, K., Collins, J., Meaburn, K. J., Misteli, T., and Lockett, S. J. (2008) A high-throughput system for segmenting nuclei using multiscale techniques. *Cytometry A* **73**, 451-466
 28. Loukas, C. G., Wilson, G. D., Vojnovic, B., and Linney, A. (2003) An image analysis-based approach for automated counting of cancer cell nuclei in tissue sections. *Cytometry A* **55**, 30-42

29. Wienert, S., Heim, D., Saeger, K., Stenzinger, A., Beil, M., Hufnagl, P., Dietel, M., Denkert, C., and Klauschen, F. (2012) Detection and segmentation of cell nuclei in virtual microscopy images: a minimum-model approach. *Sci Rep* **2**, 503
30. Mouelhi, A., Sayadi, M., and Fnaiech, F. (2011) Automatic segmentation of clustered breast cancer cells using watershed and concave vertex graph. In *2011 International Conference on Communications, Computing and Control Applications (CCCA)* pp. 1-6
31. Allott, E. H., Geradts, J., Sun, X., Cohen, S. M., Zirpoli, G. R., Khoury, T., Bshara, W., Chen, M., Sherman, M. E., Palmer, J. R., Ambrosone, C. B., Olshan, A. F., and Troester, M. A. (2016) Intratumoral heterogeneity as a source of discordance in breast cancer biomarker classification. *Breast Cancer Res* **18**, 68
32. Tryfonidis, K., Zardavas, D., Katzenellenbogen, B. S., and Piccart, M. (2016) Endocrine treatment in breast cancer: Cure, resistance and beyond. *Cancer treatment reviews* **50**, 68-81
33. Inwald, E. C., Koller, M., Klinkhammer-Schalke, M., Zeman, F., Hofstadter, F., Lindberg, P., Gerstenhauer, M., Schuler, S., Treeck, O., and Ortmann, O. (2015) Adjuvant endocrine therapy in pre- versus postmenopausal patients with steroid hormone receptor-positive breast cancer: results from a large population-based cohort of a cancer registry. *Journal of cancer research and clinical oncology* **141**, 2229-2240
34. Hammond, M. E., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., Badve, S., Fitzgibbons, P. L., Francis, G., Goldstein, N. S., Hayes, M., Hicks, D. G., Lester, S., Love, R., Mangu, P. B., McShane, L., Miller, K., Osborne, C. K., Paik, S., Perlmutter, J., Rhodes, A., Sasano, H., Schwartz, J. N., Sweep, F. C., Taube, S., Torlakovic, E. E., Valenstein, P., Viale, G., Visscher, D., Wheeler, T., Williams, R. B., Wittliff, J. L., and Wolff, A. C. (2010) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med* **134**, e48-72
35. Allred, D. C., Harvey, J. M., Berardo, M., and Clark, G. M. (1998) Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* **11**, 155-168

36. Cserni, G., Francz, M., Kalman, E., Kelemen, G., Komjathy, D. C., Kovacs, I., Kulka, J., Sarkadi, L., Udvarhelyi, N., Vass, L., and Voros, A. (2011) Estrogen receptor negative and progesterone receptor positive breast carcinomas-how frequent are they? *Pathology oncology research : POR* **17**, 663-668
37. Gertych, A., Mohan, S., Maclary, S., Mohanty, S., Wawrowsky, K., Mirocha, J., Balzer, B., and Knudsen, B. S. (2014) Effects of tissue decalcification on the quantification of breast cancer biomarkers by digital image analysis. *Diagn Pathol* **9**, 213
38. Pathmanathan, N., and Balleine, R. L. (2013) Ki67 and proliferation in breast cancer. *J Clin Pathol* **66**, 512-516
39. Jurikova, M., Danihel, L., Polak, S., and Varga, I. (2016) Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem* **118**, 544-552
40. Matsumoto, A., Jinno, H., Ando, T., Fujii, T., Nakamura, T., Saito, J., Takahashi, M., Hayashida, T., and Kitagawa, Y. (2016) Biological markers of invasive breast cancer. *Japanese journal of clinical oncology* **46**, 99-105
41. Kontzoglou, K., Palla, V., Karaolani, G., Karaiskos, I., Alexiou, I., Pateras, I., Konstantoudakis, K., and Stamatakis, M. (2013) Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis. *Oncology* **84**, 219-225
42. Andre, F., Arnedos, M., Goubar, A., Ghouadni, A., and Delaloge, S. (2015) Ki67-no evidence for its use in node-positive breast cancer. *Nature reviews. Clinical oncology* **12**, 296-301
43. Petrelli, F., Viale, G., Cabiddu, M., and Barni, S. (2015) Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Res Treat* **153**, 477-491
44. Kos, Z., and Dabbs, D. J. (2016) Biomarker assessment and molecular testing for prognostication in breast cancer. *Histopathology* **68**, 70-85
45. Denkert, C., Budczies, J., von Minckwitz, G., Wienert, S., Loibl, S., and Klauschen, F. (2015) Strategies for developing Ki67 as a useful biomarker in breast cancer. *Breast* **24 Suppl 2**, S67-72
46. Dowsett, M., Nielsen, T. O., A'Hern, R., Bartlett, J., Coombes, R. C., Cuzick, J., Ellis, M., Henry, N. L., Hugh, J. C., Lively, T., McShane, L., Paik, S., Penault-

- Llorca, F., Prudkin, L., Regan, M., Salter, J., Sotiriou, C., Smith, I. E., Viale, G., Zujewski, J. A., and Hayes, D. F. (2011) Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst* **103**, 1656-1664
47. Polley, M. Y., Leung, S. C., Gao, D., Mastropasqua, M. G., Zabaglo, L. A., Bartlett, J. M., McShane, L. M., Enos, R. A., Badve, S. S., Bane, A. L., Borgquist, S., Fineberg, S., Lin, M. G., Gown, A. M., Grabau, D., Gutierrez, C., Hugh, J. C., Moriya, T., Ohi, Y., Osborne, C. K., Penault-Llorca, F. M., Piper, T., Porter, P. L., Sakatani, T., Salgado, R., Starczynski, J., Laenholm, A. V., Viale, G., Dowsett, M., Hayes, D. F., and Nielsen, T. O. (2015) An international study to increase concordance in Ki67 scoring. *Mod Pathol* **28**, 778-786
48. Coates, A. S., Winer, E. P., Goldhirsch, A., Gelber, R. D., Gnant, M., Piccart-Gebhart, M., Thurlimann, B., and Senn, H. J. (2015) Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **26**, 1533-1546
49. Goldhirsch, A., Ingle, J. N., Gelber, R. D., Coates, A. S., Thurlimann, B., and Senn, H. J. (2009) Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **20**, 1319-1329
50. Untch, M., Harbeck, N., Huober, J., von Minckwitz, G., Gerber, B., Kreipe, H. H., Liedtke, C., Marschner, N., Mobus, V., Scheithauer, H., Schneeweiss, A., Thomssen, C., Jackisch, C., Beckmann, M. W., Blohmer, J. U., Costa, S. D., Decker, T., Diel, I., Fasching, P. A., Fehm, T., Janni, W., Luck, H. J., Maass, N., Scharl, A., and Loibl, S. (2015) Primary Therapy of Patients with Early Breast Cancer: Evidence, Controversies, Consensus: Opinions of German Specialists to the 14th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2015 (Vienna 2015). *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* **75**, 556-565
51. Arihiro, K., Oda, M., Ohara, M., Kadoya, T., Osaki, A., Nishisaka, T., Shiroma, N., and Kobayashi, Y. (2016) Comparison of visual assessment and image

- analysis in the evaluation of Ki-67 expression and their prognostic significance in immunohistochemically defined luminal breast carcinoma. *Japanese journal of clinical oncology* **46**, 1081-1087
52. Zhong, F., Bi, R., Yu, B., Yang, F., Yang, W., and Shui, R. (2016) A Comparison of Visual Assessment and Automated Digital Image Analysis of Ki67 Labeling Index in Breast Cancer. *PLoS One* **11**, e0150505
 53. Yeo, M. K., Kim, H. E., Kim, S. H., Chae, B. J., Song, B. J., and Lee, A. (2017) Clinical usefulness of the free web-based image analysis application ImmunoRatio for assessment of Ki-67 labelling index in breast cancer. *J Clin Pathol* **70**, 715-719
 54. Plancoulaine, B., Laurinaviciene, A., Herlin, P., Besusparis, J., Meskauskas, R., Baltrusaityte, I., Iqbal, Y., and Laurinavicius, A. (2015) A methodology for comprehensive breast cancer Ki67 labeling index with intra-tumor heterogeneity appraisal based on hexagonal tiling of digital image analysis data. *Virchows Arch*
 55. Laurinavicius, A., Plancoulaine, B., Rasmusson, A., Besusparis, J., Augulis, R., Meskauskas, R., Herlin, P., Laurinaviciene, A., Abdelhadi Muftah, A. A., Miligy, I., Aleskandarany, M., Rakha, E. A., Green, A. R., and Ellis, I. O. (2016) Bimodality of intratumor Ki67 expression is an independent prognostic factor of overall survival in patients with invasive breast carcinoma. *Virchows Arch* **468**, 493-502
 56. Laurinavicius, A., Plancoulaine, B., Laurinaviciene, A., Herlin, P., Meskauskas, R., Baltrusaityte, I., Besusparis, J., Dasevicius, D., Elie, N., Iqbal, Y., and Bor, C. (2014) A methodology to ensure and improve accuracy of Ki67 labelling index estimation by automated digital image analysis in breast cancer tissue. *Breast Cancer Res* **16**, R35
 57. Besusparis, J., Plancoulaine, B., Rasmusson, A., Augulis, R., Green, A. R., Ellis, I. O., Laurinaviciene, A., Herlin, P., and Laurinavicius, A. (2016) Impact of tissue sampling on accuracy of Ki67 immunohistochemistry evaluation in breast cancer. *Diagn Pathol* **11**, 82
 58. Nap, M. (2016) Network Consumption and Storage Needs when Working in a Full-Time Routine Digital Environment in a Large Nonacademic Training

- Hospital. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* **83**, 110-120
59. Fonyad, L., Krenacs, T., Nagy, P., Zalatnai, A., Csomor, J., Sapi, Z., Papay, J., Schonleber, J., Diczhazi, C., and Molnar, B. (2012) Validation of diagnostic accuracy using digital slides in routine histopathology. *Diagn Pathol* **7**, 35
 60. Saco, A., Ramirez, J., Rakislova, N., Mira, A., and Ordi, J. (2016) Validation of Whole-Slide Imaging for Histopathological Diagnosis: Current State. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* **83**, 89-98
 61. Griffin, J., and Treanor, D. (2017) Digital pathology in clinical use: where are we now and what is holding us back? *Histopathology* **70**, 134-145
 62. van der Post, R. S., van der Laak, J. A., Sturm, B., Clarijs, R., Schaafsma, H. E., van Krieken, J. H., and Nap, M. (2013) The evaluation of colon biopsies using virtual microscopy is reliable. *Histopathology* **63**, 114-121
 63. Micsik T, E. G., Bergquist AM, Fónyad L. (2015) Experiences with an International Digital Slide Based Telepathology System for Routine Sign-out between Sweden and Hungary. *AIMS Medical Science* **2**, 79-89
 64. Pantanowitz, L., Sinard, J. H., Henricks, W. H., Fatheree, L. A., Carter, A. B., Contis, L., Beckwith, B. A., Evans, A. J., Lal, A., and Parwani, A. V. (2013) Validating whole slide imaging for diagnostic purposes in pathology: guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Arch Pathol Lab Med* **137**, 1710-1722
 65. Boyce, B. F. (2017) An update on the validation of whole slide imaging systems following FDA approval of a system for a routine pathology diagnostic service in the United States. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* **92**, 381-389
 66. Farris, A. B., Cohen, C., Rogers, T. E., and Smith, G. H. (2017) Whole Slide Imaging for Analytical Anatomic Pathology and Telepathology: Practical Applications Today, Promises, and Perils. *Arch Pathol Lab Med* **141**, 542-550
 67. Keay, T., Conway, C. M., O'Flaherty, N., Hewitt, S. M., Shea, K., and Gavrielides, M. A. (2013) Reproducibility in the automated quantitative assessment of HER2/neu for breast cancer. *Journal of pathology informatics* **4**, 19

68. Roge, R., Riber-Hansen, R., Nielsen, S., and Vyberg, M. (2016) Proliferation assessment in breast carcinomas using digital image analysis based on virtual Ki67/cytokeratin double staining. *Breast Cancer Res Treat* **158**, 11-19
69. Nielsen, P. S., Bentzer, N. K., Jensen, V., Steiniche, T., and Jylling, A. M. (2014) Immunohistochemical Ki-67/KL1 double stains increase accuracy of Ki-67 indices in breast cancer and simplify automated image analysis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **22**, 568-576
70. Maeda, I., Abe, K., Koizumi, H., Nakajima, C., Tajima, S., Aoki, H., Tsuchiya, J., Tsuchiya, S., Tsuchiya, K., Shimo, A., Tsugawa, K., Ueno, T., Tatsunami, S., and Takagi, M. (2016) Comparison between Ki67 labeling index determined using image analysis software with virtual slide system and that determined visually in breast cancer. *Breast cancer (Tokyo, Japan)* **23**, 745-751
71. Barnes, M., Srinivas, C., Bai, I., Frederick, J., Liu, W., Sarkar, A., Wang, X., Nie, Y., Portier, B., Kapadia, M., Sertel, O., Little, E., Sabata, B., and Ranger-Moore, J. (2017) Whole tumor section quantitative image analysis maximizes between-pathologists' reproducibility for clinical immunohistochemistry-based biomarkers. *Laboratory Investigation* **97**, 1508
72. Krecsak, L., Micsik, T., Kiszler, G., Krenacs, T., Szabo, D., Jonas, V., Csaszar, G., Czuni, L., Gurzo, P., Ficsor, L., and Molnar, B. (2011) Technical note on the validation of a semi-automated image analysis software application for estrogen and progesterone receptor detection in breast cancer. *Diagn Pathol* **6**, 6
73. Grote, A., Abbas, M., Linder, N., Kreipe, H. H., Lundin, J., and Feuerhake, F. (2014) Exploring the spatial dimension of estrogen and progesterone signaling: detection of nuclear labeling in lobular epithelial cells in normal mammary glands adjacent to breast cancer. *Diagn Pathol* **9 Suppl 1**, S11
74. Bankhead, P., Fernandez, J. A., McArt, D. G., Boyle, D. P., Li, G., Loughrey, M. B., Irwin, G. W., Harkin, D. P., James, J. A., McQuaid, S., Salto-Tellez, M., and Hamilton, P. W. (2018) Integrated tumor identification and automated scoring minimizes pathologist involvement and provides new insights to key biomarkers in breast cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **98**, 15-26

75. Robertson, S., Azizpour, H., Smith, K., and Hartman, J. (2018) Digital image analysis in breast pathology-from image processing techniques to artificial intelligence. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* **194**, 19-35
76. Acs, B., Madaras, L., Kovacs, K. A., Micsik, T., Tokes, A. M., Gyorffy, B., Kulka, J., and Szasz, A. M. (2018) Reproducibility and Prognostic Potential of Ki-67 Proliferation Index when Comparing Digital-Image Analysis with Standard Semi-Quantitative Evaluation in Breast Cancer. *Pathology oncology research : POR* **24**, 115-127
77. Kim, M. A., Lee, H. J., Yang, H. K., Bang, Y. J., and Kim, W. H. (2011) Heterogeneous amplification of ERBB2 in primary lesions is responsible for the discordant ERBB2 status of primary and metastatic lesions in gastric carcinoma. *Histopathology* **59**, 822-831
78. Yang, Y. L., Fan, Y., Lang, R. G., Gu, F., Ren, M. J., Zhang, X. M., Yin, D., and Fu, L. (2012) Genetic heterogeneity of HER2 in breast cancer: impact on HER2 testing and its clinicopathologic significance. *Breast Cancer Res Treat* **134**, 1095-1102
79. Aeffner, F., Wilson, K., Martin, N. T., Black, J. C., Hendriks, C. L. L., Bolon, B., Rudmann, D. G., Gianani, R., Koegler, S. R., Krueger, J., and Young, G. D. (2017) The Gold Standard Paradox in Digital Image Analysis: Manual Versus Automated Scoring as Ground Truth. *Arch Pathol Lab Med* **141**, 1267-1275
80. Mulrane, L., Rexhepaj, E., Penney, S., Callanan, J. J., and Gallagher, W. M. (2008) Automated image analysis in histopathology: a valuable tool in medical diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* **8**, 707-725
81. Giltneane, J. M., Molinaro, A., Cheng, H., Robinson, A., Turbin, D., Gelmon, K., Huntsman, D., and Rimm, D. L. (2008) Comparison of quantitative immunofluorescence with conventional methods for HER2/neu testing with respect to response to trastuzumab therapy in metastatic breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* **132**, 1635-1647
82. Grimm, E. E., Schmidt, R. A., Swanson, P. E., Dintzis, S. M., and Allison, K. H. (2010) Achieving 95% cross-methodological concordance in HER2 testing: causes and implications of discordant cases. *Am J Clin Pathol* **134**, 284-292

83. Engelberg, J. A., Retallack, H., Balassanian, R., Dowsett, M., Zabaglo, L., Ram, A. A., Apple, S. K., Bishop, J. W., Borowsky, A. D., Carpenter, P. M., Chen, Y. Y., Datnow, B., Elson, S., Hasteh, F., Lin, F., Moatamed, N. A., Zhang, Y., and Cardiff, R. D. (2015) "Score the Core" Web-based pathologist training tool improves the accuracy of breast cancer IHC4 scoring. *Human pathology* **46**, 1694-1704
84. Rhodes, A., Jasani, B., Anderson, E., Dodson, A. R., and Balaton, A. J. (2002) Evaluation of HER-2/neu immunohistochemical assay sensitivity and scoring on formalin-fixed and paraffin-processed cell lines and breast tumors: a comparative study involving results from laboratories in 21 countries. *Am J Clin Pathol* **118**, 408-417
85. Hagemann, I. S. (2016) Molecular Testing in Breast Cancer: A Guide to Current Practices. *Arch Pathol Lab Med* **140**, 815-824
86. Bahrami, A., Aledavood, A., Anvari, K., Hassanian, S. M., Maftouh, M., Yaghobzade, A., Salarzaee, O., ShahidSales, S., and Avan, A. (2018) The prognostic and therapeutic application of microRNAs in breast cancer: Tissue and circulating microRNAs. *Journal of cellular physiology* **233**, 774-786
87. Kanwar, N., and Done, S. J. (2017) Molecular Profiling and Significance of Circulating Tumor Cell Based Genetic Signatures. *Advances in experimental medicine and biology* **994**, 143-167
88. Bettaieb, A., Paul, C., Plenchette, S., Shan, J., Chouchane, L., and Ghiringhelli, F. (2017) Precision medicine in breast cancer: reality or utopia? *Journal of translational medicine* **15**, 139
89. Hamilton, P. W., Bankhead, P., Wang, Y., Hutchinson, R., Kieran, D., McArt, D. G., James, J., and Salto-Tellez, M. (2014) Digital pathology and image analysis in tissue biomarker research. *Methods (San Diego, Calif.)* **70**, 59-73
90. Sinn, H. P., Schneeweiss, A., Keller, M., Schlombs, K., Laible, M., Seitz, J., Lakis, S., Veltrup, E., Altevogt, P., Eidt, S., Wirtz, R. M., and Marme, F. (2017) Comparison of immunohistochemistry with PCR for assessment of ER, PR, and Ki-67 and prediction of pathological complete response in breast cancer. *BMC Cancer* **17**, 124

91. Kumar, A., Rao, A., Bhavani, S., Newberg, J. Y., and Murphy, R. F. (2014) Automated analysis of immunohistochemistry images identifies candidate location biomarkers for cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 18249-18254
92. Savage, R. S., and Yuan, Y. (2016) Predicting chemoin sensitivity in breast cancer with 'omics/digital pathology data fusion. *Royal Society open science* **3**, 140501
93. Toss, A., Venturelli, M., Peterle, C., Piacentini, F., Cascinu, S., and Cortesi, L. (2017) Molecular Biomarkers for Prediction of Targeted Therapy Response in Metastatic Breast Cancer: Trick or Treat? *International journal of molecular sciences* **18**
94. Casti, P., Mencattini, A., Salmeri, M., Ancona, A., Mangieri, F., and Rangayyan, R. M. (2014) Development and validation of a fully automated system for detection and diagnosis of mammographic lesions. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference* **2014**, 4667-4670
95. Buck, T. P., Dilorio, R., Havrilla, L., and O'Neill, D. G. (2014) Validation of a whole slide imaging system for primary diagnosis in surgical pathology: A community hospital experience. *Journal of pathology informatics* **5**, 43
96. Campbell, W. S., Lele, S. M., West, W. W., Lazenby, A. J., Smith, L. M., and Hinrichs, S. H. (2012) Concordance between whole-slide imaging and light microscopy for routine surgical pathology. *Human pathology* **43**, 1739-1744
97. Loughrey, M. B., Kelly, P. J., Houghton, O. P., Coleman, H. G., Houghton, J. P., Carson, A., Salto-Tellez, M., and Hamilton, P. W. (2015) Digital slide viewing for primary reporting in gastrointestinal pathology: a validation study. *Virchows Arch* **467**, 137-144
98. Nunes, C., Rocha, R., Buzelin, M., Balabram, D., Foureaux, F., Porto, S., and Gobbi, H. (2014) High agreement between whole slide imaging and optical microscopy for assessment of HER2 expression in breast cancer: whole slide imaging for the assessment of HER2 expression. *Pathology, research and practice* **210**, 713-718

99. Kondo, Y., Iijima, T., and Noguchi, M. (2012) Evaluation of immunohistochemical staining using whole-slide imaging for HER2 scoring of breast cancer in comparison with real glass slides. *Pathol Int* **62**, 592-599
100. Gavrielides, M. A., Conway, C., O'Flaherty, N., Gallas, B. D., and Hewitt, S. M. (2014) Observer performance in the use of digital and optical microscopy for the interpretation of tissue-based biomarkers. *Analytical cellular pathology (Amsterdam)* **2014**, 157308
101. Laurinavicius, A., Laurinaviciene, A., Ostapenko, V., Dasevicius, D., Jarmalaite, S., and Lazutka, J. (2012) Immunohistochemistry profiles of breast ductal carcinoma: factor analysis of digital image analysis data. *Diagn Pathol* **7**, 27
102. Howat, W. J., Blows, F. M., Provenzano, E., Brook, M. N., Morris, L., Gazinska, P., Johnson, N., McDuffus, L. A., Miller, J., Sawyer, E. J., Pinder, S., van Deurzen, C. H. M., Jones, L., Sironen, R., Visscher, D., Caldas, C., Daley, F., Coulson, P., Broeks, A., Sanders, J., Wesseling, J., Nevanlinna, H., Fagerholm, R., Blomqvist, C., Heikkilä, P., Ali, H. R., Dawson, S. J., Figueroa, J., Lissowska, J., Brinton, L., Mannermaa, A., Kataja, V., Kosma, V. M., Cox, A., Brock, I. W., Cross, S. S., Reed, M. W., Couch, F. J., Olson, J. E., Devillee, P., Mesker, W. E., Seyaneve, C. M., Hollestelle, A., Benitez, J., Perez, J. I. A., Menéndez, P., Bolla, M. K., Easton, D. F., Schmidt, M. K., Pharoah, P. D., Sherman, M. E., and García-Closas, M. (2015) Performance of automated scoring of ER, PR, HER2, CK5/6 and EGFR in breast cancer tissue microarrays in the Breast Cancer Association Consortium. *The Journal of Pathology: Clinical Research* **1**, 18-32
103. Turbin, D. A., Leung, S., Cheang, M. C., Kennecke, H. A., Montgomery, K. D., McKinney, S., Treaba, D. O., Boyd, N., Goldstein, L. C., Badve, S., Gown, A. M., van de Rijn, M., Nielsen, T. O., Gilks, C. B., and Huntsman, D. G. (2008) Automated quantitative analysis of estrogen receptor expression in breast carcinoma does not differ from expert pathologist scoring: a tissue microarray study of 3,484 cases. *Breast Cancer Res Treat* **110**, 417-426
104. Hicks, D., Dell'Orto, P., Falzon, M., Hoff, K. D., Levy, Y. Y., McMahon, L., Miller, K., Russo, L., and Viale, G. (2017) Immunohistochemical Performance of Estrogen and Progesterone Receptor Antibodies on the Dako Omnis Staining

- Platform: Evaluation in Multicenter Studies. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* **25**, 313-319
105. Colley, M., Kommoss, F., Bibbo, M., Dytch, H. E., Franklin, W. A., Holt, J. A., and Wied, G. L. (1989) Assessment of hormone receptors in breast carcinoma by immunocytochemistry and image analysis. II. Estrogen receptors. *Anal Quant Cytol Histol* **11**, 307-314
 106. Layfield, L. J., Saria, E. A., Conlon, D. H., and Kerns, B. J. (1996) Estrogen and progesterone receptor status determined by the Ventana ES 320 automated immunohistochemical stainer and the CAS 200 image analyzer in 236 early-stage breast carcinomas: prognostic significance. *J Surg Oncol* **61**, 177-184
 107. Vesoulis, Z., Rajappannair, L., Define, L., Beach, J., Vesoulis, Z., Schnell, B., and Myers, S. (2004) Quantitative image analysis of estrogen receptors in breast fine needle aspiration biopsies. *Anal Quant Cytol Histol* **26**, 323-330
 108. Rexhepaj, E., Brennan, D. J., Holloway, P., Kay, E. W., McCann, A. H., Landberg, G., Duffy, M. J., Jirstrom, K., and Gallagher, W. M. (2008) Novel image analysis approach for quantifying expression of nuclear proteins assessed by immunohistochemistry: application to measurement of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer. *Breast Cancer Res* **10**, R89
 109. Mohammed, Z. M., Edwards, J., Orange, C., Mallon, E., Doughty, J. C., McMillan, D. C., and Going, J. J. (2012) Breast cancer outcomes by steroid hormone receptor status assessed visually and by computer image analysis. *Histopathology* **61**, 283-292
 110. Ahern, T. P., Beck, A. H., Rosner, B. A., Glass, B., Frieling, G., Collins, L. C., and Tamimi, R. M. (2017) Continuous measurement of breast tumour hormone receptor expression: a comparison of two computational pathology platforms. *J Clin Pathol* **70**, 428-434
 111. Mungle, T., Tewary, S., Das, D. K., Arun, I., Basak, B., Agarwal, S., Ahmed, R., Chatterjee, S., and Chakraborty, C. (2017) MRF-ANN: a machine learning approach for automated ER scoring of breast cancer immunohistochemical images. *Journal of microscopy* **267**, 117-129
 112. Micsik, T., Kiszler, G., Szabo, D., Krecsak, L., Hegedus, C., Tibor, K., and Molnar, B. (2015) Computer Aided Semi-Automated Evaluation of HER2

- Immunodetection--A Robust Solution for Supporting the Accuracy of Anti HER2 Therapy. *Pathology oncology research : POR* **21**, 1005-1011
113. Paulik, R., Micsik, T., Kiszler, G., Kaszal, P., Szekely, J., Paulik, N., Varhalmi, E., Premusz, V., Krenacs, T., and Molnar, B. (2017) An optimized image analysis algorithm for detecting nuclear signals in digital whole slides for histopathology. *Cytometry A* **91**, 595-608
 114. Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernandez, J. A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., Dunne, P. D., McQuaid, S., Gray, R. T., Murray, L. J., Coleman, H. G., James, J. A., Salto-Tellez, M., and Hamilton, P. W. (2017) QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* **7**, 16878
 115. Carpenter, A. E., Jones, T. R., Lamprecht, M. R., Clarke, C., Kang, I. H., Friman, O., Guertin, D. A., Chang, J. H., Lindquist, R. A., Moffat, J., Golland, P., and Sabatini, D. M. (2006) CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome biology* **7**, R100
 116. Landis, J. R., and Koch, G. G. (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **33**, 159-174
 117. Micsik T, K. G., Szabó D, Krecsák L, Krenács T, Molnár B. (2013) Is HER2 amplification predictable by digital immunohistochemistry? . *Diagnostic Pathology* **8(Suppl 1)**, S14.
 118. Micsik T, K. T., Sági Z, Turányi E, Krecsák L, Kiszler G, Molnár B. (2014) PatternQuant supported Image Analysis for IHC quantification. In *12th European Congress on Digital Pathology*, Paris, France
 119. T, M. (2015) The role of digital pathology in the evaluation of immunohistochemical results. In *Technology Transfer in Diagnostic Pathology, 8th Central European Regional Meeting*, Budapest, Hungary
 120. T, M. (2015) Prediktív és prognosztikai markerek digitális értékelése/validálása. In *72. MPT konferencia*, Hajdúszoboszló, Hungary
 121. Veta, M., van Diest, P. J., Jiwa, M., Al-Janabi, S., and Pluim, J. P. (2016) Mitosis Counting in Breast Cancer: Object-Level Interobserver Agreement and Comparison to an Automatic Method. *PLoS One* **11**, e0161286

122. Gnant, M., Thomssen, C., and Harbeck, N. (2015) St. Gallen/Vienna 2015: A Brief Summary of the Consensus Discussion. *Breast care (Basel, Switzerland)* **10**, 124-130
123. Wilbur, D. C., Brachtel, E. F., Gilbertson, J. R., Jones, N. C., Vallone, J. G., and Krishnamurthy, S. (2015) Whole slide imaging for human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemistry interpretation: Accuracy, Precision, and reproducibility studies for digital manual and paired glass slide manual interpretation. *Journal of pathology informatics* **6**, 22
124. Nassar, A., Cohen, C., Albitar, M., Agersborg, S. S., Zhou, W., Lynch, K. A., Heyman, E. R., Lange, H., and Siddiqui, M. T. (2011) Reading immunohistochemical slides on a computer monitor--a multisite performance study using 180 HER2-stained breast carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **19**, 212-217
125. Al-Janabi, S., Huisman, A., Nap, M., Clarijs, R., and van Diest, P. J. (2012) Whole slide images as a platform for initial diagnostics in histopathology in a medium-sized routine laboratory. *J Clin Pathol* **65**, 1107-1111
126. Jones, N. C., Nazarian, R. M., Duncan, L. M., Kamionek, M., Lauwers, G. Y., Tambouret, R. H., Wu, C. L., Nielsen, G. P., Brachtel, E. F., Mark, E. J., Sadow, P. M., Grabbe, J. P., and Wilbur, D. C. (2015) Interinstitutional whole slide imaging teleconsultation service development: assessment using internal training and clinical consultation cases. *Arch Pathol Lab Med* **139**, 627-635
127. Nassar, A., Cohen, C., Agersborg, S. S., Zhou, W., Lynch, K. A., Barker, E. A., Vanderbilt, B. L., Thompson, J., Heyman, E. R., Olson, A., Lange, H., and Siddiqui, M. T. (2011) A multisite performance study comparing the reading of immunohistochemical slides on a computer monitor with conventional manual microscopy for estrogen and progesterone receptor analysis. *Am J Clin Pathol* **135**, 461-467
128. Varga, Z., Noske, A., Ramach, C., Padberg, B., and Moch, H. (2013) Assessment of HER2 status in breast cancer: overall positivity rate and accuracy by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry in a single institution over 12 years: a quality control study. *BMC Cancer* **13**, 615

129. Gu, G., Dustin, D., and Fuqua, S. A. (2016) Targeted therapy for breast cancer and molecular mechanisms of resistance to treatment. *Current opinion in pharmacology* **31**, 97-103
130. Roche, P. C., Suman, V. J., Jenkins, R. B., Davidson, N. E., Martino, S., Kaufman, P. A., Addo, F. K., Murphy, B., Ingle, J. N., and Perez, E. A. (2002) Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. *J Natl Cancer Inst* **94**, 855-857
131. Penault-Llorca, F., Bilous, M., Dowsett, M., Hanna, W., Osamura, R. Y., Ruschoff, J., and van de Vijver, M. (2009) Emerging technologies for assessing HER2 amplification. *Am J Clin Pathol* **132**, 539-548
132. Walker, R. A., Bartlett, J. M., Dowsett, M., Ellis, I. O., Hanby, A. M., Jasani, B., Miller, K., and Pinder, S. E. (2008) HER2 testing in the UK: further update to recommendations. *J Clin Pathol* **61**, 818-824
133. Gavrielides, M. A., Gallas, B. D., Lenz, P., Badano, A., and Hewitt, S. M. (2011) Observer variability in the interpretation of HER2/neu immunohistochemical expression with unaided and computer-aided digital microscopy. *Arch Pathol Lab Med* **135**, 233-242
134. Bertelli, G., Nelmes, D. J., and Al-Allak, A. (2013) Biomarkers in the management of breast cancer: great expectations, hard times. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **21**, 481-484
135. Holten-Rossing, H., Moller Talman, M. L., Kristensson, M., and Vainer, B. (2015) Optimizing HER2 assessment in breast cancer: application of automated image analysis. *Breast Cancer Res Treat* **152**, 367-375
136. Choritz, H., Busche, G., and Kreipe, H. (2011) Quality assessment of HER2 testing by monitoring of positivity rates. *Virchows Arch* **459**, 283-289
137. Murphy, C. G., and Modi, S. (2009) HER2 breast cancer therapies: a review. *Biologics* **3**, 289-301
138. Perik, P. J., de Korte, M. A., van Veldhuisen, D. J., Gietema, J. A., Sleijfer, D. T., and de Vries, E. G. (2007) Cardiotoxicity associated with the use of trastuzumab in breast cancer patients. *Expert review of anticancer therapy* **7**, 1763-1771
139. Marcuzzo, T., Giudici, F., Ober, E., Rizzardi, C., Bottin, C., and Zanconati, F. (2016) Her2 immunohistochemical evaluation by traditional microscopy and by

- digital analysis, and the consequences for FISH testing. *Pathology, research and practice* **212**, 911-918
140. Helin, H. O., Tuominen, V. J., Ylinen, O., Helin, H. J., and Isola, J. (2016) Free digital image analysis software helps to resolve equivocal scores in HER2 immunohistochemistry. *Virchows Arch* **468**, 191-198
 141. Koopman, T., de Bock, G. H., Buikema, H. J., Smits, M. M., Louwen, M., Hage, M., Imholz, A. L. T., and van der Vegt, B. (2018) Digital image analysis of HER2 immunohistochemistry in gastric- and oesophageal adenocarcinoma: a validation study on biopsies and surgical specimens. *Histopathology* **72**, 191-200
 142. Tuominen, V. J., Tolonen, T. T., and Isola, J. (2012) ImmunoMembrane: a publicly available web application for digital image analysis of HER2 immunohistochemistry. *Histopathology* **60**, 758-767
 143. Laurinaviciene, A., Dasevicius, D., Ostapenko, V., Jarmalaite, S., Lazutka, J., and Laurinavicius, A. (2011) Membrane connectivity estimated by digital image analysis of HER2 immunohistochemistry is concordant with visual scoring and fluorescence in situ hybridization results: algorithm evaluation on breast cancer tissue microarrays. *Diagn Pathol* **6**, 87
 144. Brüggmann, A., Eld, M., Lelkaitis, G., Nielsen, S., Grunkin, M., Hansen, J. D., Foged, N. T., and Vyberg, M. (2012) Digital image analysis of membrane connectivity is a robust measure of HER2 immunostains. *Breast Cancer Research and Treatment* **132**, 41-49
 145. Dobson, L., Conway, C., Hanley, A., Johnson, A., Costello, S., O'Grady, A., Connolly, Y., Magee, H., O'Shea, D., Jeffers, M., and Kay, E. (2010) Image analysis as an adjunct to manual HER-2 immunohistochemical review: a diagnostic tool to standardize interpretation. *Histopathology* **57**, 27-38
 146. Qaiser, T., Mukherjee, A., Reddy Pb, C., Munugoti, S. D., Tallam, V., Pitkaaho, T., Lehtimäki, T., Naughton, T., Berseth, M., Pedraza, A., Mukundan, R., Smith, M., Bhalerao, A., Rodner, E., Simon, M., Denzler, J., Huang, C. H., Bueno, G., Snead, D., Ellis, I. O., Ilyas, M., and Rajpoot, N. (2018) HER2 challenge contest: a detailed assessment of automated HER2 scoring algorithms in whole slide images of breast cancer tissues. *Histopathology* **72**, 227-238

147. Martin, V., Camponovo, A., Ghisletta, M., Bongiovanni, M., and Mazzucchelli, L. (2012) Internal Quality Assurance Program for ERBB2 (HER2) Testing Improves the Selection of Breast Cancer Patients for Treatment with Trastuzumab. *Patholog Res Int* **2012**, 261857
148. Dowsett, M., Hanna, W. M., Kockx, M., Penault-Llorca, F., Ruschoff, J., Gutjahr, T., Habben, K., and van de Vijver, M. J. (2007) Standardization of HER2 testing: results of an international proficiency-testing ring study. *Mod Pathol* **20**, 584-591
149. Bartlett, J. M., Starczynski, J., Atkey, N., Kay, E., O'Grady, A., Gandy, M., Ibrahim, M., Jasani, B., Ellis, I. O., Pinder, S. E., and Walker, R. A. (2011) HER2 testing in the UK: recommendations for breast and gastric in-situ hybridisation methods. *J Clin Pathol* **64**, 649-653
150. Ayad, E., Mansy, M., Elwi, D., Salem, M., Salama, M., and Kayser, K. (2015) Comparative study between quantitative digital image analysis and fluorescence in situ hybridization of breast cancer equivocal human epidermal growth factor receptors 2 score 2(+) cases. *Journal of pathology informatics* **6**, 31
151. van der Logt, E. M., Kuperus, D. A., van Setten, J. W., van den Heuvel, M. C., Boers, J. E., Schuurung, E., and Kibbelaar, R. E. (2015) Fully automated fluorescent in situ hybridization (FISH) staining and digital analysis of HER2 in breast cancer: a validation study. *PLoS One* **10**, e0123201
152. Skaland, I., Ovestad, I., Janssen, E. A., Klos, J., Kjellevoid, K. H., Helliesen, T., and Baak, J. P. (2008) Comparing subjective and digital image analysis HER2/neu expression scores with conventional and modified FISH scores in breast cancer. *J Clin Pathol* **61**, 68-71
153. Ho, J., Ahlers, S. M., Stratman, C., Aridor, O., Pantanowitz, L., Fine, J. L., Kuzmishin, J. A., Montalto, M. C., and Parwani, A. V. (2014) Can digital pathology result in cost savings? A financial projection for digital pathology implementation at a large integrated health care organization. *Journal of pathology informatics* **5**, 33
154. Christgen, M., von Ahsen, S., Christgen, H., Langer, F., and Kreipe, H. (2015) The region-of-interest size impacts on Ki67 quantification by computer-assisted image analysis in breast cancer. *Human pathology* **46**, 1341-1349

155. Racoceanu, D., and Capron, F. (2016) Semantic Integrative Digital Pathology: Insights into Microsemiological Semantics and Image Analysis Scalability. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* **83**, 148-155
156. Dai, X., Xiang, L., Li, T., and Bai, Z. (2016) Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *Journal of Cancer* **7**, 1281-1294
157. Bolton, K. L., Garcia-Closas, M., Pfeiffer, R. M., Duggan, M. A., Howat, W. J., Hewitt, S. M., Yang, X. R., Cornelison, R., Anzick, S. L., Meltzer, P., Davis, S., Lenz, P., Figueroa, J. D., Pharoah, P. D., and Sherman, M. E. (2010) Assessment of automated image analysis of breast cancer tissue microarrays for epidemiologic studies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **19**, 992-999
158. Faratian, D., Kay, C., Robson, T., Campbell, F. M., Grant, M., Rea, D., and Bartlett, J. M. (2009) Automated image analysis for high-throughput quantitative detection of ER and PR expression levels in large-scale clinical studies: the TEAM Trial Experience. *Histopathology* **55**, 587-593
159. Holmstrom, O., Linder, N., Lundin, M., Moilanen, H., Suutala, A., Turkki, R., Joensuu, H., Isola, J., Diwan, V., and Lundin, J. (2015) Quantification of Estrogen Receptor-Alpha Expression in Human Breast Carcinomas With a Miniaturized, Low-Cost Digital Microscope: A Comparison with a High-End Whole Slide-Scanner. *PLoS One* **10**, e0144688
160. Tuominen, V. J., Ruotoistenmaki, S., Viitanen, A., Jumppanen, M., and Isola, J. (2010) ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Res* **12**, R56
161. Rugo, H. S., Rumble, R. B., Macrae, E., Barton, D. L., Connolly, H. K., Dickler, M. N., Fallowfield, L., Fowble, B., Ingle, J. N., Jahanzeb, M., Johnston, S. R., Korde, L. A., Khatcheressian, J. L., Mehta, R. S., Muss, H. B., and Burstein, H. J. (2016) Endocrine Therapy for Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Guideline. *J Clin Oncol* **34**, 3069-3103

162. Ma, C. X., Bose, R., and Ellis, M. J. (2016) Prognostic and Predictive Biomarkers of Endocrine Responsiveness for Estrogen Receptor Positive Breast Cancer. *Advances in experimental medicine and biology* **882**, 125-154
163. Acs, B., Kulka, J., Kovacs, K. A., Teleki, I., Tokes, A. M., Meczker, A., Gyorffy, B., Madaras, L., Krenacs, T., and Szasz, A. M. (2017) Comparison of 5 Ki-67 antibodies regarding reproducibility and capacity to predict prognosis in breast cancer: does the antibody matter? *Human pathology* **65**, 31-40
164. Cserni, G., Voros, A., Liepniece-Karele, I., Bianchi, S., Vezzosi, V., Grabau, D., Sapino, A., Castellano, I., Regitnig, P., Foschini, M. P., Zolota, V., Varga, Z., Figueiredo, P., Decker, T., Focke, C., Kulka, J., Kaya, H., Reiner-Concin, A., Amendoeira, I., Callagy, G., Caffrey, E., Wesseling, J., and Wells, C. (2014) Distribution pattern of the Ki67 labelling index in breast cancer and its implications for choosing cut-off values. *Breast* **23**, 259-263
165. Voros, A., Csorgo, E., Kovari, B., Lazar, P., Kelemen, G., and Cserni, G. (2014) The use of digital images improves reproducibility of the ki-67 labeling index as a proliferation marker in breast cancer. *Pathology oncology research : POR* **20**, 391-397
166. Voros, A., Csorgo, E., Kovari, B., Lazar, P., Kelemen, G., Rusz, O., Nyari, T., and Cserni, G. (2015) Different methods of pretreatment Ki-67 labeling index evaluation in core biopsies of breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy and their relation to response to therapy. *Pathology oncology research : POR* **21**, 147-155
167. Voros, A., Csorgo, E., Nyari, T., and Cserni, G. (2013) An intra- and interobserver reproducibility analysis of the Ki-67 proliferation marker assessment on core biopsies of breast cancer patients and its potential clinical implications. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* **80**, 111-118
168. Stalhammar, G., Fuentes Martinez, N., Lippert, M., Tobin, N. P., Molholm, I., Kis, L., Rosin, G., Rantalainen, M., Pedersen, L., Bergh, J., Grunkin, M., and Hartman, J. (2016) Digital image analysis outperforms manual biomarker assessment in breast cancer. *Mod Pathol* **29**, 318-329

169. Joshi, S., Watkins, J., Gazinska, P., Brown, J. P., Gillett, C. E., Grigoriadis, A., and Pinder, S. E. (2015) Digital imaging in the immunohistochemical evaluation of the proliferation markers Ki67, MCM2 and Geminin, in early breast cancer, and their putative prognostic value. *BMC Cancer* **15**, 546
170. Gudlaugsson, E., Skaland, I., Janssen, E. A., Smaaland, R., Shao, Z., Malpica, A., Voorhorst, F., and Baak, J. P. (2012) Comparison of the effect of different techniques for measurement of Ki67 proliferation on reproducibility and prognosis prediction accuracy in breast cancer. *Histopathology* **61**, 1134-1144
171. Jing, N., Fang, C., and Williams, D. S. (2017) Validity and reliability of Ki-67 assessment in oestrogen receptor positive breast cancer. *Pathology* **49**, 371-378
172. Fulawka, L., and Halon, A. (2016) Proliferation Index Evaluation in Breast Cancer Using ImageJ and ImmunoRatio Applications. *Anticancer research* **36**, 3965-3972
173. Acs, B., Zambo, V., Vizkeleti, L., Szasz, A. M., Madaras, L., Szentmartoni, G., Tokes, T., Molnar, B. A., Molnar, I. A., Vari-Kakas, S., Kulka, J., and Tokes, A. M. (2017) Ki-67 as a controversial predictive and prognostic marker in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Diagn Pathol* **12**, 20
174. Mikami, Y., Ueno, T., Yoshimura, K., Tsuda, H., Kurosumi, M., Masuda, S., Horii, R., Toi, M., and Sasano, H. (2013) Interobserver concordance of Ki67 labeling index in breast cancer: Japan Breast Cancer Research Group Ki67 Ring Study. *Cancer Science* **104**, 1539-1543
175. Varga, Z., Diebold, J., Dommann-Scherrer, C., Frick, H., Kaup, D., Noske, A., Obermann, E., Ohlschlegel, C., Padberg, B., Rakozy, C., Sancho Oliver, S., Schobinger-Clement, S., Schreiber-Facklam, H., Singer, G., Tapia, C., Wagner, U., Mastropasqua, M. G., Viale, G., and Lehr, H.-A. (2012) How Reliable Is Ki-67 Immunohistochemistry in Grade 2 Breast Carcinomas? A QA Study of the Swiss Working Group of Breast- and Gynecopathologists. *PLOS ONE* **7**, e37379
176. Harvey, J., Thomas, C., Wood, B., Hardie, M., Dessauvague, B., Combrinck, M., Frost, F. A., and Sterrett, G. (2015) Practical issues concerning the implementation of Ki-67 proliferative index measurement in breast cancer reporting. *Pathology* **47**, 13-20

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. Disszertációhoz tartozó teljes közlemények

(MTMT alapján, „peer reviewed”)

1. **Micsik T**, Kiszler G, Szabó D, Krecsák L, Hegedűs C, Tibor K, Molnár B.: Computer Aided Semi-Automated Evaluation of HER2 Immunodetection-A Robust Solution for Supporting the Accuracy of Anti HER2 Therapy PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 21:(4) pp. 1005-1011. (2015) Független idéző: 4 Összesen: 4; doi: 10.1007/s12253-015-9927-6. PMID: 25788005 IF: 1,94
2. **Micsik T**, Elmberger G, Bergquist AM, Fonyad L: Experiences with an International Digital Slide Based Telepathology System for Routine Sign-out between Sweden and Hungary AIMS Medical Science 2:(2) pp. 79-89. (2015) doi: 10.3934/medsci.2015.2.79
3. Paulik R, **Micsik T**, Kiszler G, Kaszál P, Székely J, Paulik N, Várhalmi E, Prémusz V, Krenács T, Molnár B: An optimized image analysis algorithm for detecting nuclear signals in digital whole slides for histopathology. CYTOMETRY PART A 91:(6) pp. 596-608. (2017) Független idéző: 1 Összesen: 1; doi: 10.1002/cyto.a.23124. PMID: 28472544 IF: 3.222
4. Krecsák L, **Micsik T**, Kiszler G, Krenács T, Szabó D, Jónás V, Császár G, Czuni L, Gurzó P, Ficsor L, Molnár B: Technical note on the validation of a semi-automated image analysis software application for estrogen and progesterone receptor detection in breast cancer DIAGNOSTIC PATHOLOGY 6: Paper 6. 6 p. (2011) Független idéző: 17 Független idéző: 7 Összesen: 24; doi: 10.1186/1746-1596-6-6. PMID: 21244664 IF: 1,638
5. Krenács T, Zsakovics I, **Micsik T**, Fonyad L, Varga VS, Ficsor L, Kiszler G, Molnár B: Digital microscopy - the upcoming revolution in histopathology teaching, diagnostics, reserach and quality assurance In: Méndez-Vilas A, Diaz J (szerk.) Microscopy: Science, Technology, Applications and Educations. Vol.2. Badajoz: Formatex Research Center, 2010. pp. 965-977. (ISBN:978-84-614-6190-5) Független idéző: 8 Független idéző: 1 Összesen: 9

11.2. Disszertációhoz tartozó egyéb publikációk

(MTMT alapján; absztraktok, konferencia kiadványok)

6. **Micsik T**, Paulik R, Kiszler G, Kaszal P, Szekely J, Paulik N, Krenacs T, Molnar B: A robust algorithm for nucleus detection on whole slide images VIRCHOWS ARCHIV 469:(1) p. S27. (2016)
7. **Micsik T**, Kiszler G, Szabó D, Krecsák L, Molnár B: Is HER2 amplification predictable by digital immunohistochemistry? DIAGNOSTIC PATHOLOGY 8:(Suppl 1) Paper S 14. (2013) IF:1,85
8. **Micsik T**, Turanyi E, Sapi Z, Krecsak L, Kiszler G, Krenacs T, Molnar B, Matolcsy A: Validation of digital immunohistochemical evaluation of hormone-receptors in breast cancer VIRCHOWS ARCHIV 463:(2) p. 228. (2013)
9. **Micsik T**, Turanyi E, Sapi Z, Krecsak L, Kiszler G, Krenacs T, Molnar B: Digital HER2 IHC-evaluation is equal to the semi-quantitative method VIRCHOWS ARCHIV 463:(2) p. 228. (2013)
10. **Micsik T**, Krecsak L, Kiszler G, Szabo D, Krenacs T, Ficsor L, Molnar B: Automated image analysis for diagnostic and predictive histopathology VIRCHOWS ARCHIV 459:(Suppl. 1) p. S311. (2011)

11.3. Disszertációhoz tartozó felkért előadások

11. **Micsik T**, Kiszler G, Szabó D, Krecsák L, Krenács T, Levente F, Molnár B: Automated image analysis for diagnostic and predictive histopathology; Invited speaker and poster at 23th European Congress of Pathology, Helsinki, Finland 27. August to 1 September 2011.
12. **Micsik T**: Digital evaluation of immunohistological and FISH slides. Oral Presentation at Technology Transfer in Diagnostic Pathology 7th Central European Regional Meeting, Siófok, Hungary, 2012 május 14-16.
13. **Micsik T**, Krenács T, Sági Z, Turányi E, Krecsák L, Kiszler G, Molnár B: PatternQuant supported Image Analysis for IHC quantification. Oral Presentation at 12th European Congress on Digital Pathology, Paris, France, 2014.06.18-21.
14. **Micsik T**: The role of digital pathology in the evaluation of immunohistochemical results, Oral presentation on the Technology Transfer in Diagnostic Pathology, 8th Central European Regional Meeting, June 18-19, 2015, Budapest, Hungary

15. **Micsik T**: Prediktív és prognosztikai markerek digitális értékelése/validálása, Felkért előadás 72. MPT konferencia, 2015. 09.24-26. Hajdúszoboszló, Magyarország

11.4. Nem a disszertációhoz tartozó teljes publikációk

(MTMT alapján, „peer reviewed”)

1. Ács B, Madaras L, Kovács KA, **Micsik T**, Tőkes AM, Györffy B, Kulka J, Szász AM: Reproducibility and Prognostic Potential of Ki-67 Proliferation Index when Comparing Digital-Image Analysis with Standard Semi-Quantitative Evaluation in Breast Cancer. *PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH* 24:(1) pp. 115-127. (2018) doi: 10.1007/s12253-017-0220-8. PMID: 28401450 IF: 1,736
2. Károly D, Asztalos L, **Micsik T**, Szabó PJ: Non-Destructive Analysis of Explanted Coronary Artery Stents *ACTA POLYTECHNICA HUNGARICA* 14:(2) pp. 171-181. (2017)
3. Patai AV, Bartak BK, Peterfia B, **Micsik T**, Horvath R, Sumanszki C, Peter Z, Patai A, Valcz G, Kalmar A, Toth K, Krenacs T, Tulassay Z, Molnar B: Comprehensive DNA Methylation and Mutation Analyses Reveal a Methylation Signature in Colorectal Sessile Serrated Adenomas *PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH* 23:(3) pp. 589-594. (2017); PMID: 27896617
4. Péterfia B, Kalmár A, Patai ÁV, Csabai I, Bodor A, **Micsik T**, Wichmann B, Egedi K, Hollósi P, Kovalszky I, Tulassay Z, Molnár B: Construction of a multiplex mutation hot spot PCR panel: The first step towards colorectal cancer genotyping on the GS Junior platform *JOURNAL OF CANCER* 8:(2) pp. 162-173. (2017) Függő idéző:1 Összesen:1; PMID: 28243320
5. Sticz T, Molnar A, Mark A, Hajdu M, Nagy N, Vegso G, **Micsik T**, Kopper L, Sebestyen A: mTOR activity and its prognostic significance in human colorectal carcinoma depending on C1 and C2 complex-related protein expression. *JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY* 70:(5) pp. 410-416. (2017) Független idéző: 2 Függő idéző: 1 Összesen: 3; PMID: 27729429
6. Agoston EI, **Micsik T**, Acs B, Fekete K, Hahn O, Baranyai Z, Dede K, Bodoky G, Bursics A, Kulka J, Krenacs T, Györffy B, Harsanyi L, Szasz AM: In depth evaluation of the prognostic and predictive utility of PTEN immunohistochemistry in colorectal carcinomas: performance of three antibodies

- with emphasis on intracellular and intratumoral heterogeneity *DIAGNOSTIC PATHOLOGY* 11:(1) Paper 61. 12 p. (2016); PMID: 27392434
7. Grolmusz VK, Karászi K, **Micsik T**, Tóth EA, Mészáros K, Karvaly G, Barna G, Szabó PM, Baghy K, Matkó J, Kovalszky I, Tóth M, Rác K, Igaz P, Patócs A: Cell cycle dependent RRM2 may serve as proliferation marker and pharmaceutical target in adrenocortical cancer *AMERICAN JOURNAL OF CANCER RESEARCH* 6:(9) pp. 2041-2053. (2016) Független idéző: 1 Független idéző: 1 Összesen: 2; PMID: 27725909
 8. Patai ÁV, Molnár Cs, Csóka C, **Micsik T**, Hajdu-Andersson I, Farkas P, Hersényi L, Tulassay Zt: Gyomorrák genetikája és molekuláris altípusainak jelentősége *MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM* 69:(1) pp. 5-8. (2016)
 9. Gaál D, Garami M, **Micsik T**, Zalutnai A, Kovács M: Amikor a hasmenés oka a mellkasban van *GYERMEKGYÓGYÁSZAT* 66:(2) pp. 91-92. (2015)
 10. **Micsik T**, Lorincz A, Gal J, Schwab R, Petak I: MDR-1 and MRP-1 activity in peripheral blood leukocytes of rheumatoid arthritis patients. *DIAGNOSTIC PATHOLOGY* 10: p. 216. (2015) Független idéző: 3 Összesen: 3; PMID: 26715450
 11. Nagy Z, Baghy K, Hunyadi-Gulyás E, **Micsik T**, Nyirő G, Rác G, Butz H, Perge P, Kovalszky I, Medzihradzsky KF, Rác K, Patócs A, Igaz P: Evaluation of 9-cis retinoic acid and mitotane as antitumoral agents in an adrenocortical xenograft model *AMERICAN JOURNAL OF CANCER RESEARCH* 5:(12) pp. 3645-3658. (2015) Független idéző: 3 Független idéző: 2 Összesen: 5; PMID: 26885453
 12. Patai ÁV, Csóka C, **Micsik T**, Miheller P, Csontos AA, Müllner K, Hersényi L, Tulassay Z: Melanoma malignum a vastagbélben *MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM* 68:(5) pp. 303-306. (2015)
 13. **Micsik T**, Lőrincz A, Mersich T, Baranyai Z, Besznyak I Jr, Dede K, Zarand A, Jakab F, Krecsak L, Keri G, Schwab R, Petak I: Decreased functional activity of multidrug resistance protein in primary colorectal cancer *DIAGNOSTIC PATHOLOGY* 10: Paper 26. 7 p. (2015) Független idéző: 3 Összesen: 3; PMID: 25885226

14. Mihaly E, **Micsik T**, Juhasz M, Herszenyi L, Tulassay Z: Gastritisek es gastropathiak. ORVOSI HETILAP 155:(2) pp. 43-61. (2014) Független idéző: 2 Fügő idéző: 2 Összesen: 4
15. Mihály E, **Micsik T**, Herszényi L, Tulassay Z: A vakbél lipomája MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 67:(3) pp. 170-174. (2014)
16. Arvai K, Nagy K, Barti-Juhasz H, Petak I, Krenacs T, **Micsik T**, Vegso G, Perner F, Szende B: Molecular Profiling of Parathyroid Hyperplasia, Adenoma and Carcinoma. PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 18:(3) pp. 607-614. (2012) Független idéző: 17 Összesen: 17; PMID: 22198862
17. Changchien YC, Haltrich I, **Micsik T**, Kiss E, Fonyad L, Papp G, Sapi Z: Gonadoblastoma: Case report of two young patients with isochromosome 12p found in the dysgerminoma overgrowth component in one case PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE 208:(10) pp. 628-632. (2012) Független idéző: 6 Fügő idéző: 1 Összesen: 7; PMID: 22906432
18. Gelley F, Doros A, **Micsik T**, Fazakas J, Fehérvári I, Zádori G, Müller Z, Gelley A, Nemes B: Acute liver transplantation in a 41-year-old male patient presenting symptoms of adult-onset Still's disease INTERVENTIONAL MEDICINE AND APPLIED SCIENCE 3:(1) pp. 9-13. (2011)
19. Schwab R, **Micsik T**, Szokoloczi O, Schafer E, Tihanyi B, Tihanyi T, Kupcsulik P, Diofalvi K, Mersich T, Besznyak I, Zarand A, Mihalik R, Sarkadi B, Keri G, Pap A, Jakab F, Kopper L, Petak I: Functional evaluation of multidrug resistance transporter activity in surgical samples of solid tumors ASSAY AND DRUG DEVELOPMENT TECHNOLOGIES 5:(4) pp. 541-550. (2007) Független idéző: 3 Fügő idéző: 2 Összesen: 5; PMID: 17767422
20. Biro JC, Benyó B, Sansom C, Szlávecz Á, Fördős G, **Micsik T**, Benyó Z: A common periodic table of codons and amino acids BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 306:(2) pp. 408-415. (2003) Független idéző: 28 Fügő idéző: 24 Összesen: 52; PMID: 12804578
21. Furak J, Trojan I, Tizlavicz L, **Micsik T**, Puskas LG: Development of brain metastasis 5 years before the appearance of the primary lung cancer: "Messenger metachronous metastasis" ANNALS OF THORACIC SURGERY 75:(3) pp.

- 1016-1017. (2003) Független idéző: 2 Fügő idéző: 1 Összesen: 3; PMID: 12645740
22. Puskás LG, Hackler L, Kovács G, Kupihár Z, Zvara Á, **Micsik T**, van Hummelen P: Recovery of cyanine-dye nucleotide triphosphates ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 305:(2) pp. 279-281. (2002) Fügő idéző: 15 Összesen: 15 PMID: 12054458
23. Várady P, **Micsik T**, Benedek S, Benyó Z: A novel method for the detection of apnea and hypopnea events in respiration signals IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING 49:(9) pp. 936-942. (2002) Független idéző: 116 Fügő idéző: 4 Összesen: 120; PMID: 12214883
24. Zvara A, Hackler L Jr, Nagy ZB, **Micsik T**, Puskas LG: New molecular methods for classification, diagnosis and therapy prediction of hematological malignancies. PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 8:(4) pp. 231-240. (2002) Független idéző: 2 Fügő idéző: 6 Összesen: 8; PMID: 12579208
25. Várady P, Benyó Z, **Micsik T**, Moser Gy: A hybrid on-line ECG segmenting system for long-term monitoring ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA 87:(3) pp. 217-240. (2000); PMID: 11428748

11.5. Nem a disszertációhoz tartozó egyéb publikációk

(MTMT alapján; absztraktok, konferencia kiadványok)

26. Csóka C, Patai Á, Miheller P, **Micsik T**, Müllner K, Tulassay Z, Hersényi L: Gastrointestinal manifestations of Malignant Melanoma: Observations from a single center study ZEITSCHRIFT FÜR GASTROENTEROLOGIE 53:(5) Paper A6. 1 p. (2015) 57th Annual Meeting of the Hungarian Society of Gastroenterology. Siófok, Magyarország: 2015.05.30 -2015.06.02.
27. Patai AV, Csoka C, Csontos AA, **Micsik T**, Juhász M, Mullner K, Mihály E, Hersényi L, Tulassay Z, Miheller P: The epidemiology of microscopic colitis from 1997-2014-a single centre study JOURNAL OF CROHNS & COLITIS 9:(1) p. S406. 1 p. (2015)
28. Patai VÁ, Csóka C, Csontos Á, **Micsik T**, Juhász M, Müllner K, Mihály E, Hersényi L, Tulassay Z, Miheller P: Clinical characteristics of microscopic Colitis in a single tertiary referral center ZEITSCHRIFT FÜR GASTROENTEROLOGIE 53:(5) Paper A41. 1 p. (2015) 57th Annual Meeting

- of the Hungarian Society of Gastroenterology. Siófok, Magyarország: 2015.05.30 -2015.06.02.
29. Patai Á, Miheller P, Csóka C, **Micsik T**, Müllner K, Tulassay Z, Herszényi L: Melanoma malignum a tápcsatornában MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 67:(Suppl.) p. 59. (2014) A Magyar Belgyógyász Társaság 45. Nagygyűlése. Budapest, Magyarország: 2014.11.27 -2014.11.29.
 30. **Micsik T**, Agoston E, Fekete K, Bodoky G, Kulka J, Timar J, Harsanyi L, Szasz AM: Parallel immunohistochemical investigation of PTEN-loss in colorectal carcinomas with different antibodies VIRCHOWS ARCHIV 465:(1) pp. S237-S238. (2014)
 31. Mihály E, **Micsik T**, Herszényi L, Tulassay Z: A vakbél lipomája: Esetismertetés MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 67:(Suppl.) p. 53. (2014) A Magyar Belgyógyász Társaság 45. Nagygyűlése. Budapest, Magyarország: 2014.11.27 -2014.11.29.
 32. Deme D, Szekely C, Bishr AM, Szollosi Z, Nizar J, Kovacs L, **Micsik T**, Jori B, Petak I, Telekes A: Multiple primary neoplasia, or a neoplasia with satellites? The role of Molecular Biology in the diagnostic process ANNALS OF ONCOLOGY 23:(Suppl.2.) p. 29. (2012) 4th IMPAKT Breast Cancer Conference. 2012.05.03 -2012.05.05.
 33. **Micsik T**, Kopper L, Krenacs T, Nagy Z, Horvath O: Multiple Immunohistochemical investigation of signaling pathways in colorectal cancer VIRCHOWS ARCHIV 461:(1) p. S184. (2012)
 34. **Micsik T**, Timar B, Fonyad L, Csernus B, Princz G, Csomor J: Pseudomembranous colitis (PMC) epidemic in the autopsy room VIRCHOWS ARCHIV 459:(Suppl. 1) p. S304. (2011)
 35. Molnar B, Fonyad L, Krenacs T, **Micsik T**, Virag T, Varga VS: Are we ready for routine digital sign-out? VIRCHOWS ARCHIV 459:(Suppl. 1) p. S311. (2011)
 36. Timar B, Csomor J, Rajnai H, **Micsik T**, Matolcsy A: A nationwide study of "in situ" follicular lymphoma in Hungary VIRCHOWS ARCHIV 459:(Suppl. 1) p. S34. (2011)

37. **Micsik T**, Krenacs T, Ficsor L, Molnar B: Evaluation of HER2 IHC and FISH in breast cancer with digital pathology platform VIRCHOWS ARCHIV 455: p. 98. (2009)
38. **Micsik T**, Ficsor L, Krenacs T, Diczhazi C, Molnar B: Quantitative immunohistochemistry evaluation method with the digital MIRAX-platform HISTOPATHOLOGY 53:(Suppl. 1) p. 426. (2008)
39. Ficsor L, Varga V, Jonas V, **Micsik T**, Fonyad L, Petak I, Kopper L, Molnar B, Krenacs T: Validation of automated image analysis (histoquant) in colon cancer using digital slides of EGFR, Cox-2, beta-catenin, and cyclin D1 immunostainings VIRCHOWS ARCHIV 451:(2) p. 232. (2007)
40. Benyó Z, Benyó B, Várady P, Szilágyi L, Paláncz B, Szlávecz Á, **Micsik T**, Bongár S, Fördös G, Várallyay G Jr: Biomedical Engineering Education and Research Activity in Hungary In: Feng D, Carson ER (szerk.) Modelling and Control in Biomedical Systems. Proceedings of the 5th IFAC Symposium Melbourne, 2003. Konferencia helye, ideje: Melbourne, Ausztrália, 2003.08.21-2003.08.23. Oxford: Pergamon Press, 2003. pp. 51-55. (IFAC SYMPOSIA SERIES) (ISBN:008 044 159 9)
41. Benyó Z, Várady P, Czinege L, Szilágyi SM, **Micsik T**, Szlávecz Á, Bongár Sz, Fördös G: Latest Research of Patient Monitoring and Processing of Long-Term Recorded Vital Signals A Magyar Tudomány Napja, Budapest (2003)

12. Köszönetnyilvánítás

Szerető és mindent eltűrő Feleségemnek és Gyerekeimnek ezer köszönet munkamániám támogatásáért, az esetlegesen hazavitt feszültségek, frusztrációk elviseléséért, vigasztalásáért és a sok izgalmas kárpótló kalandért, ha éppen valami nem úgy sikerült...

Fölöttébb hálás vagyok Dr. Molnár Bélának, aki elköteleződése és fáradhatatlan lelkesedése a digitális patológia irányában nyitotta meg számomra a lehetőségek azon gazdag tárházát, mely ezirányú érdeklődésem beteljesedéséhez és a fenti munkák és eredmények megszületéséhez vezethetett.

Dr. Krenács Tibor állandó kooperatív, előremutató, de egyidőben kellően kritikus segítsége komoly 'arany-standardként' követte, lebegte be munkásságomat. Örök hála érte!

Nagyon hálás vagyok a sorsnak, hogy találkozhattam Kiszler Gáborral és Krecsák Lászlóval, akikkel csak úgy érdeklődés szintjén kezdtük el a digitális patológiát validációs célokra használni. Gábor és csapata mindig inspiráló segítséget nyújtott és izgalmas interdiszciplináris megbeszéléseket tudtunk folytatni, ahol ugyanazon problémának ők a mérnöki és meg inkább az orvosi oldalát képviseltem. Remélem a további ötleteinket is hasonlóan meg tudjuk valósítani.

Megköszönöm a Dr. Matolcsy Andrásnak és az I.számú Patológia és Kísérleti Rákkutató Intézet vezetőségének és dolgozóinak, hogy lehetővé tették mániákus konferencialátogatásaimat, illetve munkámban és esetleges távollétemben támogattak.

Köszönöm Szüleimnek és Családomnak a támogató nevelésért, a belátó türelemért.

Köszönet az Alma Mater inspiráló közösségéért gimnáziumi éveim alatt.

Nem utolsó sorban köszönet jár Berczik Mária, Bokori Edit és Laczik Cecília áldozatos iránymutatásaiért, ami lehetővé tette az adminisztratív akadályok megugrását.