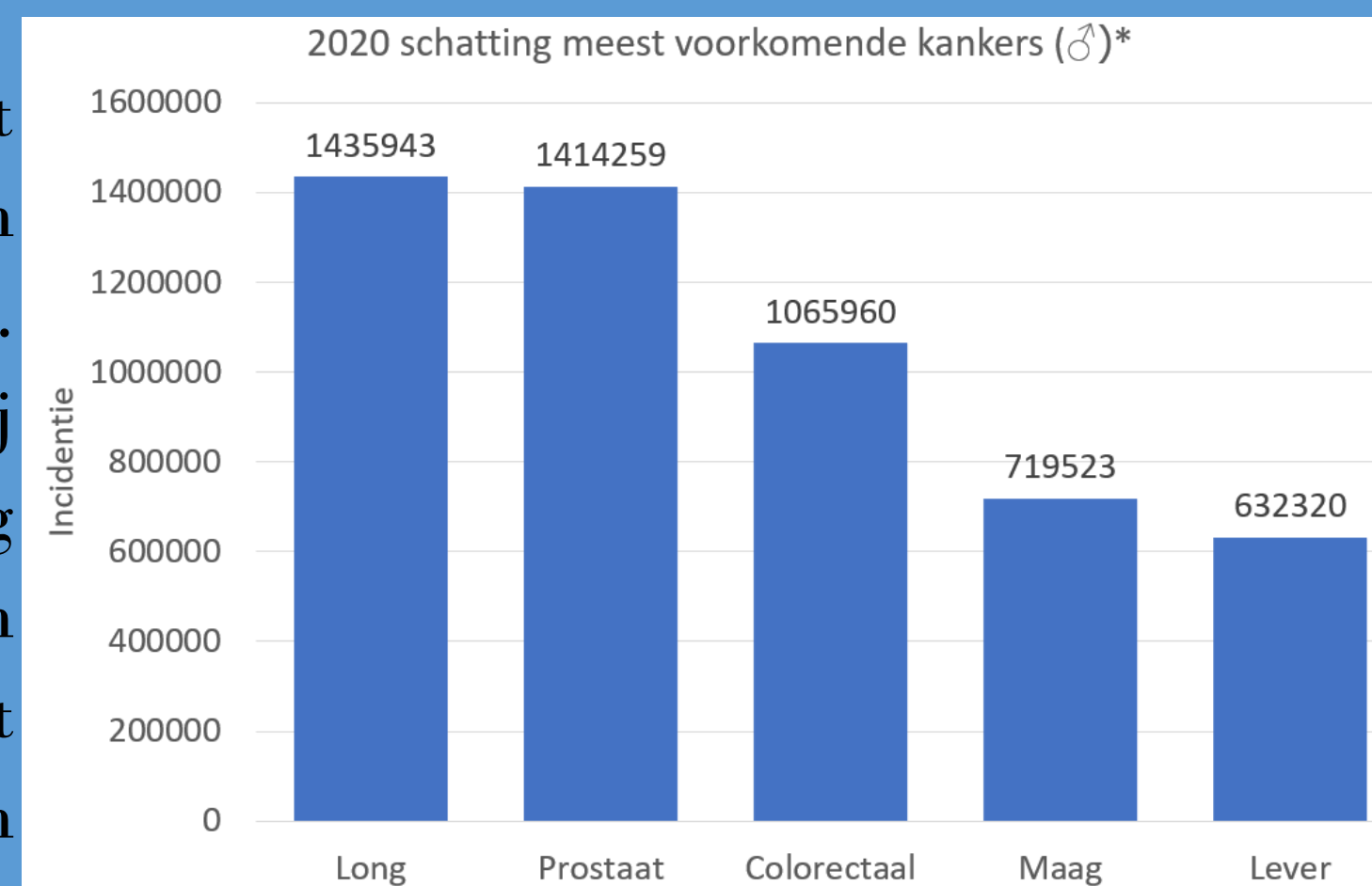


Validatie α -NKX3.1 voor detectie prostaatadenocarcinomen

Yannick De Mal, Labo Pathologische Anatomie, AZ Sint-Maarten

Inleiding

Prostaatkanker is wereldwijd één van de meest voorkomende kankers bij mannen, met >1,4 miljoen geschatte gevallen en meer dan 300.000 overlijdens. Dit is ondanks een 97% overlevingskans bij pre-metastatische behandeling. Daarom zijn screening en vroege detectie belangrijk voor het verzekeren van een goede prognose. Wanneer screening en een PSA-test een vermoeden van prostaatkanker geven, kan een biopsie afgenomen worden voor histologisch onderzoek.

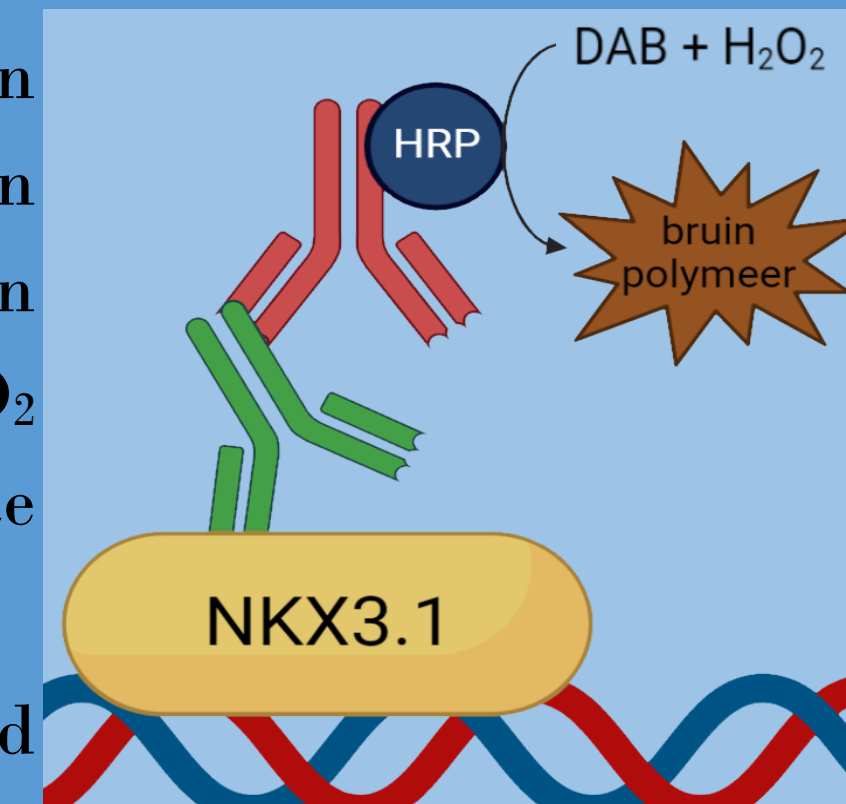


Figuur 1: Geschatte incidentie van de 5 meest voorkomende kankers bij mannen (*exclusief niet-melanome huidkankers), data van GCO

Voor prostaatweefsel bestaan verschillende biomerkers. Eén hiervan is NKX3.1, een tumor suppressor proteïne dat in de lumenale epitheelcellen wordt aangemaakt en een grote rol speelt bij de ontwikkeling van de prostaat en testes. Dit proteïne dient als transcriptiefactor en neemt deel in de regulering van proliferatie, differentiatie en celdood. Verlaagde expressie van NKX3.1 is een gekende oorzaak van prostaatadenocarcinomen, wat hiervan een goede merker maakt voor diagnose hiervan.

Materiaal & methode

Bij de detectie van NKX3.1 wordt gebruik gemaakt van een immunohistochemische (IHC) kleuring. Hierbij wordt met behulp van antilichamen het te detecteren proteïne gekleurd. Voor de bepaling van NKX3.1 wordt gebruik gemaakt van horseradish peroxidase (HRP), H_2O_2 en diaminobenzidine (DAB) om een bruin-kleurend polymeer aan te maken dat in de nucleus neerslaat.



Figuur 2: Werking IHC-kleuring van NKX3.1. Gemaakt met BioRender

De kleuring wordt uitgevoerd met FFPE-coupees van 3-4 μ m en gekleurd met α -NKX3.1 van Cell Marque. Deze kleuring werd uitgevoerd met de Ventana Benchmark Ultra van Roche, met hematoxyline als tegenkleuring.

Voor de optimalisatie werden vanuit officiële referenties 3 protocollen gekozen om te testen op normaal prostaatweefsel. Deze werden beoordeeld op 5 kleurcriteria: uniformiteit, specificiteit, intensiteit, tegenkleuring en afwezigheid achtergrond. Wanneer minstens één hiervan een optimale score (≥ 7 op 8) krijgt, wordt met dit protocol de validatie uitgevoerd.

Voor de validatie werden 5 positieve en 5 negatieve weefsels gekleurd. Niet enkel werden de kleuringen beoordeeld op dezelfde kleurcriteria als bij de optimalisatie. Ook weefsel-specifieke aankleuringscriteria werden opgesteld. Deze criteria zeggen hoe elk weefsel aangekleurd moet zijn. Pas wanneer minstens 95% van de stalen aan alle criteria voldoen, kan de kleuring gevalideerd worden.

Weefseltype	Intensiteit kernkleuring
Normale prostaat	Sterke kleuring in lumenale epitheel
Prostaatadenocarcinoom	Variabel (sterk of zwak/matig)
Testis	Zwak (enkel sertoli cellen)
Coloncarcinoom/appendix	Negatief

Figuur 3: Geteste weefseltypes met corresponderende aankleuringscriteria

Resultaten

Van de drie protocollen die getest werden kreeg enkel een protocol opgesteld door NordiQC (run 58) een optimale score. Deze verloor enkel een punt op het criterium 'Afwezigheid achtergrond'. De twee andere protocollen hebben hier echter twee punten verloren, en dus maar een 6/8 haalde. Daarom werd met het NordiQC protocol gewerkt bij de validatie.

Na kleuring van de coupes, werden deze onder de microscoop bekeken om te beoordelen of voldaan werd aan alle criteria. Net zoals bij de optimalisatie, kregen de coupes een maximale score op alle kleurcriteria, buiten 'Afwezigheid achtergrond', waar één punt verloren werd.

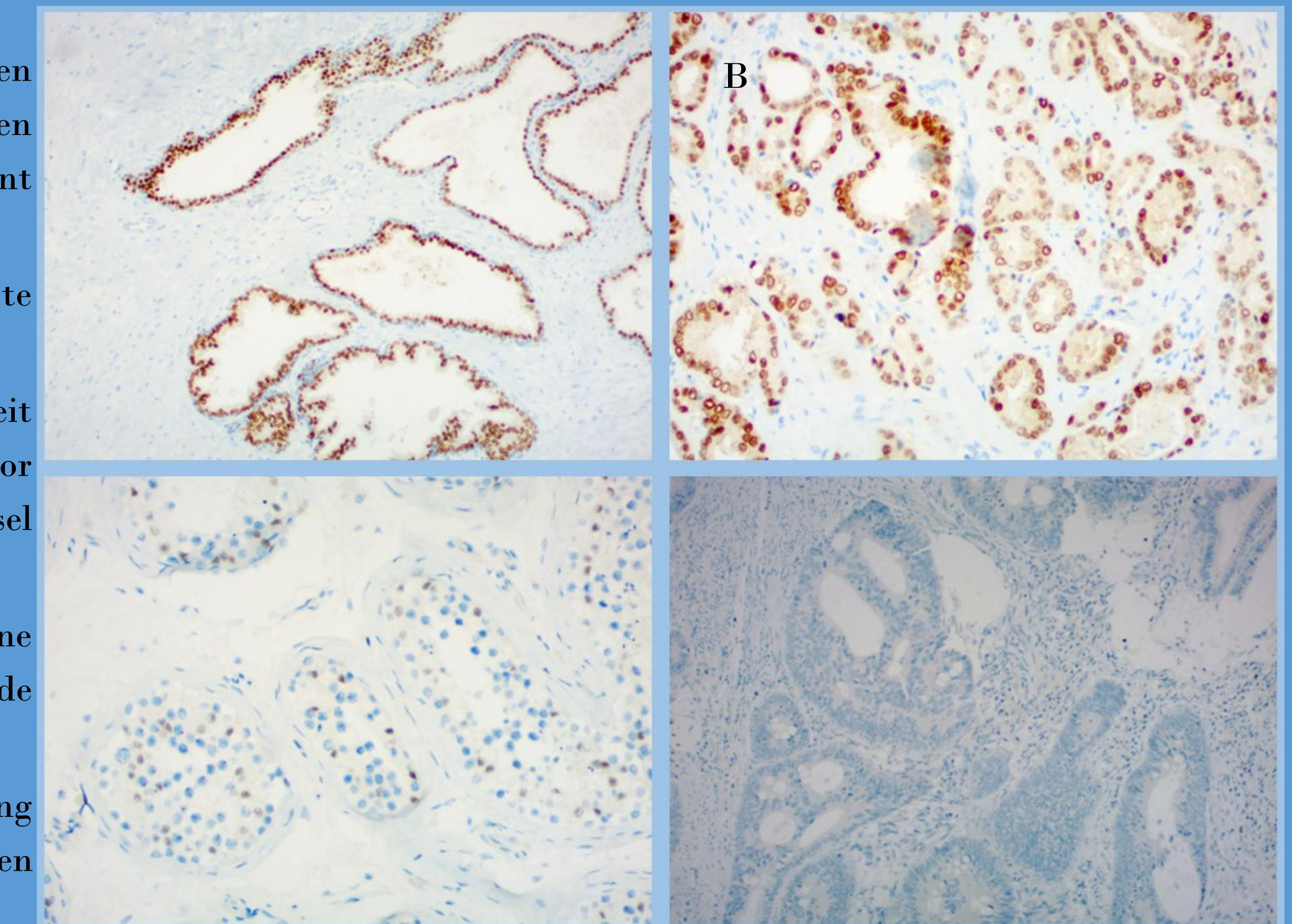
Bij het normaal prostaatweefsel (zie figuur 4, A) is een sterke nucleaire aankleuring te zien in de lumenale epitheelcellen, terwijl de rest enkel tegenkleuring bevat.

In het prostaatadenocarcinoom (B) is op te merken dat de intensiteit en uniformiteit van de kleuring sterk verschillen. Dit komt door variërende expressie van NKX3.1 door mutaties in het NKX3.1-gen, of volledige deletie. Verder is de structuur van het weefsel abnormaal, met groepen van cellen zonder vorming van klierbuizen.

In de testis (C) zijn de meeste cellen van de seminifere tubuli enkel met hematoxyline gekleurd. Een klein deel van de cellen zijn echter zwak gekleurd. Dit zijn namelijk de sertoli cellen, die de ontwikkeling van zaadcellen ondersteunen.

Als laatste is er het coloncarcinoom (D). Hierin is te zien dat er geen bruine aankleuring is. Dit betekent dat in alle aanwezige celtypes geen transcriptie van het NKX3.1-gen plaatsvindt.

Ook bij de appendix werd geen aankleuring met α -NKX3.1 vernomen, al is hier geen foto van.



Figuur 4: Microscopisch beeld van NKX3.1-kleuring op verschillende weefsels

A: Normale prostaat (10x) B: Prostaatadenocarcinoom (20x)
C: Testis (20x) D: Coloncarcinoom (10x)

Conclusie

Uit de optimalisatie kan besloten worden dat het NordiQC protocol (run 58) voldoet aan de opgestelde kleurcriteria. Indien gewenst, kan gewerkt worden aan het verminderen van achtergrond bij de kleuring, al is dit niet noodzakelijk.

Ook bij de validatie werd voldaan aan de kleurcriteria. Dit geeft aan dat de kleuring dezelfde kwaliteit heeft bij al deze weefsels.

Wanneer de resultaten vergeleken worden met de aankleuringscriteria, kan gezien worden dat deze volledig overeen komen. Bij de positieve weefsels werden enkel de gespecificeerde cellen gekleurd, en dit met de verwachte intensiteit. De negatieve weefsels vertoonden geen teken van aankleuring.

Dit betekent dat het protocol voor de IHC-kleuring van NKX3.1 aan alle verwachtingen voldoet en dus gevalideerd is.

Vanaf de voltooiing van het methodevalidatiedossier kan deze kleuring door de pathologen aangevraagd worden.

Referenties

- O. Bergengren e.a., '2022 Update on Prostate Cancer Epidemiology and Risk Factors—A Systematic Review', European Urology, p. S0302283823027860, mei 2023, doi: 10.1016/j.eururo.2023.04.021.
- 'Cancer today'. <http://gco.iarc.fr/today/home>
- S. Magaki, S. A. Hojat, B. Wei, A. So, en W. H. Yong, 'An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry', Methods Mol Biol, vol. 1897, pp. 289-298, 2019, doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_25.
- A. M. Antao, S. Ramakrishna, en K.-S. Kim, 'The Role of Nkx3.1 in Cancers and Stemness', Int J Stem Cells, vol. 14, nr. 2, pp. 168-179, feb. 2021, doi: 10.15283/ijsc20121.
- K. Dewachter, Methodevalidatiedossier NKX3.1 (EP356, Roche) op BM Ultra, AZ Sint-Maarten, 2023, v1.0

Dankwoord

Tot slot wil ik alle medewerkers van het labo Pathologische Anatomie in AZ Sint-Maarten bedanken. Doorheen de stage zijn ze zeer behulpzaam geweest en hebben ze een comfortabele sfeer gecreëerd. In het bijzonder wil ik de kwaliteitsverantwoordelijken Dr. V. Schelfhout en K. Dewachter bedanken voor alle informatie en hulp die ze hebben geboden bij het schrijven van het artikel.

