

Emlődaganatok prognosztikai faktorai

Csuka Orsolya, Péley Gábor, Dubecz Sándor, Hargitai Árpád, Tóth Krisztina, Kámory Enikő, Köves István, Doleschall Zoltán, Péter Ilona, Tóth József
Országos Onkológiai Intézet, Budapest

A vizsgálat célkitűzése: Az emlőtumороk jellemzése olyan prognosztikai faktorokkal, amelyek elősegítik a fokozottan veszélyeztetett emlőtumoros betegek azonosítását. A metasztázisképzés és recidivahajlam jellemzése prognosztikai faktorokkal. *Alkalmazott módszerek:* Citokeratin 20-expresszió kimutatását a csontvelő és őrszem nyirokcsomó mintákban (n=45) RT-PCR segítségével végeztük. A HER2, Cadherin E, Cyclin D, Bcl2, Bax expressziójának mértékét Western analízis segítségével határoztuk meg (744 invazív ductalis carcinoma, 117 invazív lobularis carcinoma, 124 tumorrecidíva). A p53, APC és catenin β génmutációkat PCR-SSCP módszerrel azonosítottuk. *Eredmények:* A csontvelőminták 30%-ában kimutatott citokeratin 20-expresszió mikrometasztázisok jelenlétét valószínűsíti. Az emlőtumor-recidívákban a ciklin D, HER2 és Bcl2 szintje négyszer magasabb, mint a recidívát nem adó tumorokban. A metasztázist adó invazív ductalis carcinomákban (IDC) a p53 mutáció gyakorisága 24%, az APC mutáció gyakorisága 18%. Az invazív lobularis carcinomák (ILC) alacsony p53 mutációs rátával (3%), alacsony Cadherin E- és magas catenin β -szinttel jellemezhetőek. *Következtetések:* A mikrometasztázisok azonosítása elősegítheti a terápiás stratégia kialakítását. A HER2-szint meghatározása és a p53 mutációk azonosítása hozzájárul a fokozottan veszélyeztetett betegcsoport elkülönítéséhez. Eredményeink arra utalnak, hogy az invazív ductalis carcinomák progressziója APC mutáción keresztül, míg az invazív lobularis carcinomák áttétképzése β catenin mutáció közreműködésével manifesztálódik. *Magyar Onkológia 44:53–60, 2000.*

Objectives: Characterization of breast cancers by various tumour markers which are appropriate for the identification of high risk groups. Markers related to the metastasis cascade and tumour recurrence have been investigated. *Materials and Methods:* RT-PCR was used to determine the expression of cytokeratin 20 in the bone marrow and sentinel lymph node of breast cancer patients (n=45). The expression of HER2, Cadherin E, Cyclin D, Bcl2 and Bax has been evaluated by Western blot (n=744 invasive ductal carcinomas and 117 invasive lobular carcinomas, 124 recurrent breast cancers). Mutations of p53, APC and β Catenin genes were detected by PCR-SSCP method. *Results:* Expression of cytokeratin 20 was found in 30% of the bone marrow samples indicating the presence of micrometastasis. The level of Cyclin D, HER2 and Bcl2 is elevated four-fold in the recurrent breast cancers. The metastasis of invasive ductal carcinomas is accompanied by high frequency of p53 mutations (24%) and APC mutations (18%). The invasive lobular carcinomas could be characterized with low frequency of p53 mutation (3%), low level of Cadherin E and high level of catenin β . *Conclusions:* Identification of micrometastasis can promote the development of therapeutic strategy. Evaluation of HER2 level and determination of p53 mutations contribute to the identification of high risk patients. Our results suggest that the progression of invasive ductal carcinomas depends on the APC mutations, while metastasis of invasive lobular carcinomas depends on β catenin mutations. *Csuka O, Péley G, Dubecz S, Hargitai Á, Tóth K, Kámory E, Köves I, Doleschall Z, Péter I, Tóth J. Prognostic factors of breast cancer. Hungarian Oncology 44:53–60, 2000.*



Közlésre érkezett: 2000. január 30.
Elfogadva: 2000. március 15.

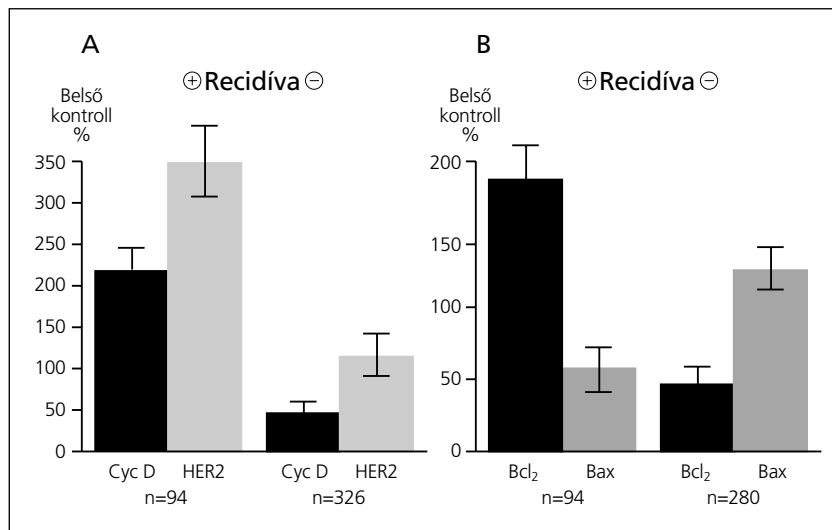
Levelezési cím: Dr. Csuka Orsolya
Országos Onkológiai Intézet, 1122 Budapest, Ráth Gy. u. 7-9.

Bevezetés

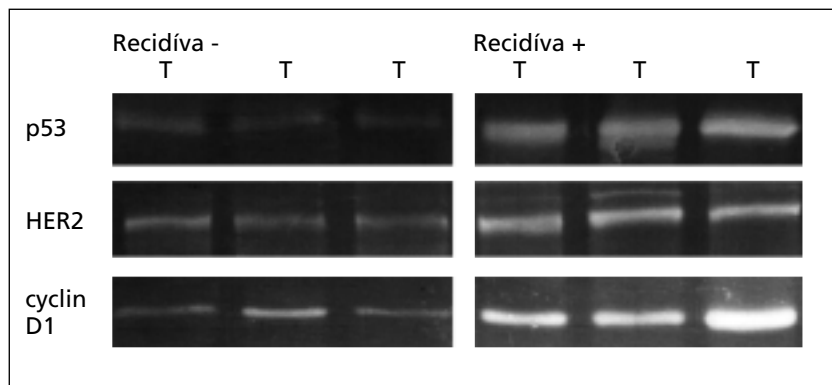
Az emlődaganatok várható kórlefordulásának becslése, a legmegfelelőbb kezelési séma megválasztása különböző klinikai, patológiai és biológiai prognosztikai faktorok együttes alkalmazásával optimalizálható.

A klinikai prognosztikai faktorok a TNM stádium megállapításával a beteg operálhatóságát döntik el. A morfológiai, patológiai és biológiai prognosztikai faktorok ismerete és alkalmazása elősegíti a terápia megválasztását, a recidívák és távoli metasztázisok predikcióját.

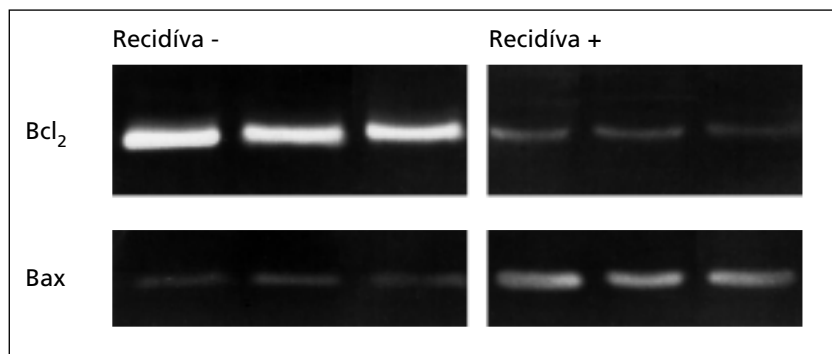
1. ábra. (A) Cyclin D és HER2 expressziója emlőtumor-recidívákban. A Cyclin D és HER 2-szint recidívát adó emlőtumorkban szignifikánsan magasabb ($p < 0,05$) (B) A Bcl₂-szint kiújuló emlőtumorkban megemelkedik.



2. ábra. P53, HER2, Cyclin D expressziójának Western analízise emlőtumor-recidívákban. A tumorrecidívák HER2- és Cyclin D-overexpresszióval jellemezhetők.



3. ábra. Bcl₂ és Bax gének expressziója emlőtumorkban. Emlőtumor-recidívákban a Bcl₂-szint megemelkedik.



A korszerű prognosztikai faktoroktól elvárható a tumorrecidíva valószínűsítése, a metasztázishajlam megítélése, szövet specifikus metasztázis predikciója, mikrometasztázisok azonosítása, reziduális tumorsejtek kimutatása, átlagos túlélés (OS) és betegségmentes túlélés (DFS) megbecsülése, adjuváns kezelés helyes megválasztása, az emlőtumork kialakulását kísérő patobiológiai mechanizmusok megismerése. Az emlőtumork prognózisának megítélésére számos markert alkalmaznak azzal a céllal, hogy a tumor agresszivitása pontosabban megítélhető legyen és ezzel a fokozottan veszélyeztetett betegcsoportokat el tudjuk különíteni. A klinikai prognosztikai faktorok közül a leglényegesebbnek az emlőtumork nyirokcsomó-metasztázisát tekintik, mivel ez a paraméter egyértelműen az emlődaganatok progressziójára utal. Az ún. „node-negatív” emlőtumoros betegeknél adjuváns kezelést általában nem alkalmaznak. A klinikai eredmények azonban azt mutatták, hogy ezen esetek 30–40%-ában a tumor eltávolítása után a daganat kiújul. A prognosztikai faktorok alkalmazásával a node-negatív emlőtumoros betegek különböző rizikócsoportba sorolhatók.

Az emlőtumoros betegek kezelési stratégiájának kialakításához nélkülözhetetlen a mikrometasztázisok azonosítása illetve a metasztázisok kialakulásának valószínűsítése. A betegség kiújulása ugyanis jórészt annak tulajdonítható, hogy mikrometasztázisok jelenléte ellenére a kezelési stratégia lokális terápiára (sebészi, sugárterápia) korlátozódik. Másfelől fennáll annak a veszélye is, hogy olyan node-negatív betegeknél, ahol mikrometasztázis nincs, az indok nélkül alkalmazott adjuváns kemoterápiás kezelés káros mellékhatásai miatt a beteg túlkezelésben részesül. Az emlőtumor-sejtek kimutatására speciális molekuláris marker, például univerzális előforduló génmutáció nem alkalmazható. Ezért az epithelsejtekben általánosan előforduló citokeratint használják a tumorsejtek azonosítására (4). A citokeratinok kimutatására immunhisztokémiai és molekuláris biológiai módszereket (RT-PCR) egyaránt használnak. Az RT-PCR érzékenysége (10⁶ csontvelősejt/tumorsejt) többszörösen felülmúlja az immunhisztokémia módszerét. Az emlőtumork prognosztikai faktorai közül a recidívamarkerek vizsgálata, azonosítása kiemelt jelentőségű. Előzetes vizsgálatok szerint p53 mutáció (16), HER2-overexpresszió (29) az emlőtumork fokozott recidívahajlamával társult. Bebizonyosodott az is, hogy az emlőtumork 50%-ában Cyclin D-overexpresszió mutatható ki (12). Előzetes vizsgálatok szerint a kiújuló vastagbél-tumorkban Cyclin D-overexpresszió detektálható (25). Emlőtumorkban Cyclin D-overexpresszió hormondependenciával és kedvező klinikai kórlefordással társult (12). Más vizsgálatok azonban nem erősítették meg ezen megfigyelést (27). Vizsgálataink arra irányultak, hogy összefüggést keressünk az emlőtumork recidívahajlama valamint a Cyclin D- és HER2-expresszió mértéke között. Irodalmi adatok alapján bebizonyosodott, hogy a Cadherin E fontos szerepet játszik az invazív növekedés megindulásában és a metasztázis-képzésben. A

Cadherin E a catenin β fehérjéken keresztül biztosítja a sejtek közötti kapcsolat fenntartását. A Cadherin E-szint csökkenése a gén hipermetilálásával (13), illetve mutációs megváltozásával magyarázható (20). Felmerült annak a lehetősége is, hogy a HER2-overexpresszió együttjár a Cadherin E downregulációjával (9). Vizsgálatainkban ezért összefüggést kerestünk a catenin β , Cadherin E-expresszió mértéke és az emlő daganatok invazív növekedése, szövettani típusa között. Vizsgálatainkban 985 emlődaganat prognosztikai, prediktív faktorait: a Cadherin E, catenin β , APC, p53, HER2, Cyclin D, Bcl2, Bax és a citokeratin expresszióját, mutációját tanulmányoztuk immunhisztokémiai, PCR-SSCP, RT-PCR, illetve Western analízissel. Összefüggést kerestünk a fenti markerek expressziója és az emlőtumorok hisztológiai típusa, differenciáltsági foka, nyirokcsomó-érintettség és recidívahajlama között. Vizsgálataink hozzájárulnak az emlődaganatok kialakulását kísérő molekuláris szintű változások megismeréséhez, a korrekt prognózis kialakításához és a terápia helyes megválasztásához.

Anyagok és módszerek

1. Beteganyag:

Az Országos Onkológiai Intézet Sebészeti Osztályáról 1992–1999 között 744 ductalis emlőcarcinómát (DIC), 117 lobularis emlőcarcinómát (LIC), 124 emlőtumor recidívát, 45 csontvelő, 26 sentinel nyirokcsomó mintát gyűjtöttünk össze. A mintákat feldolgozásig -180 Celsius fokon tároltuk. A nyirokcsomó-áttétet adó tumorok száma 601, míg a nyirokcsomó-negatív emlődaganatoké 374 volt.

2. Western blot analízis

A -180°C -ra fagyasztott tumoros és normál szövetmintákat golyós malommal porítottuk és RIPA pufferben homogenizáltuk. A citoszol előállítására a homogenizátumot 15,000 g-n 20 percen át 4°C -on centrifugáltuk. A sejtlyúzatum fehérjetartalmát Lowry módszerrel határoztuk meg. 5–20 μg fehérjét 7,5–12,5% SDS tartalmú polyacrylamid gélen elektroforetizáltunk. A gélen szétválasztott fehérjéket elektromos úton Immobilon P membránra vittük át. A fehérjéket (p53, Cyclin D, HER2, Cadherin E, catenin β , Bcl-2, Bax) a megfelelő ellenanyag segítségével (Santa Cruz) azonosítottuk és alkalikus foszfatázzal konjugált másodlagos ellenanyagokkal és ezt követően NBT reakcióval vizualizáltuk. A Western blot kvantitatív kiértékelését denzitometrállással végeztük el.

3. PCR, RT-PCR, PCR-SSCP analízis

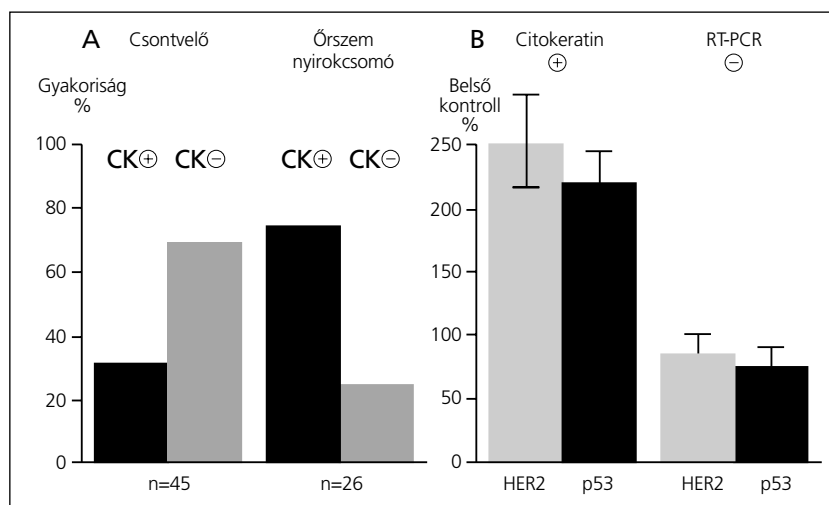
A DNS- és RNS-izolálás Tri reagenssel (Sigma), a gyártó cég által megadott protokoll szerint történt. RT-PCR vizsgálatokhoz a CDNS-szintézist (Promega) követően a DNS felszaporítását HER2 primerrel (2) és citokeratin primerrel végeztük (4). A p53 mutációkat az 5., 7. és 8. exonokban vizsgáltuk PCR-SSCP analízis segítségével (48). Az APC és catenin β mutációk kimutatása (14) szintén PCR-SSCP analízis segítségével történt.

Eredmények

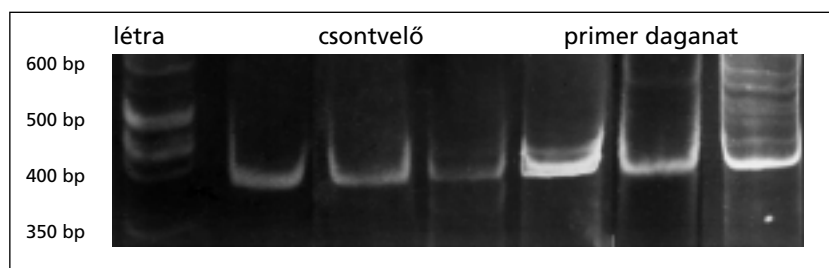
Emlőtumor-recidíva markerek

985 emlőtumoros betegcsoportban 117 kiújuló emlődaganatot vizsgáltunk. A recidívák az első műtétet követő 10 éven belül fordultak elő. A betegek posztoperatív sugárkezelésben részesültek. A vizsgálat célkitűzése a recidívára hajlamosító prognosztikai faktorok azonosítása volt. 117 emlő recidívában Western analízis segítségével a Cyclin D, HER2 és Bcl2, Bax expressziójának mértékét határoztuk meg. Belső kontrollként MCF-7 emlőcarcinoma sejteket alkalmaztunk. Valamennyi blot értékeit 20 μg MCF-7 protein O.D. értékére normalizáltuk. Megállapítottuk, hogy a Cyclin D és HER2 proteinek expressziója a recidívát adó tumorokban szignifikánsan ($p < 0,05$) négyszer magasabb, mint

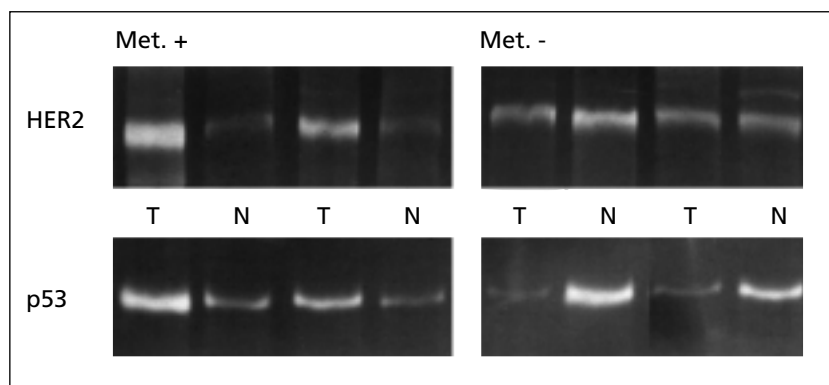
4. ábra. Mikrometasztázisok azonosítása Citokeratin RT-PCR módszerrel. (A) Az emlőtumorok 30%-ában csontvelő-metasztázisok azonosíthatók citokeratin-pozitivitás (CK+) alapján. Az őrszem nyirokcsomók 70%-a CK+. (B) A mikrometasztázist adó primer tumorokban a HER 2 és p53 szintje megemelkedik.



5. ábra: Citokeratin RT-PCR vizsgálata emlőtumoros betegekben. Citokeratin 20 mRNS kimutatható mind a primer daganatokban, mind a csontvelőmintákban.



6. ábra: HER 2 és p53 expressziója csontvelőáttétet adó emlőtumorokban. A csontvelő-metasztázist adó emlőtumorokban (Met+) a HER 2 és p53 szintje megemelkedik.



a recidívát nem adó tumorokban (1.a ábra). A Bcl2-szint is szignifikánsan ($p < 0,05$) magasabb a kiújuló emlődaganatokban (1.b ábra). A 2. ábra a p53, HER2 és Cyclin D fehérjék Western analizisét mutatja be. Emlő recidívákban a p53 fehérjék szintje megemelkedik, amely mutáns p53 jelenlétére utal. A recurrens emlőtumorokban a HER2 és Cyclin D fehérjék szintje meghaladja a recidívát nem adó tumorokét (2. ábra). A Bcl2-szint magasabb, míg a Bax-expresszió mértéke alacsonyabb emlőtumor recidívákban (3. ábra).

Mikrometasztázisok azonosítása csontvelőben és őrszem nyirokcsomókban

Vizsgálatainkban 45 emlőtumoros betegből nyert csontvelőmintában és 26 őrszem nyirokcsomóban a daganatsejtek jelenlétét citokeratin 20 RT-PCR segítségével vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a csontvelőminták 30%-ában (13/42) mikrometasztázisok jelenléte valószínűsíthető. Az őrszem nyirokcsomó minták 70%-ában citokeratin 20-pozitivitás volt kimutatható (4.a ábra). A csontmetasztázis és a primer tumorok HER2- és p53-overexpressziója pozitív korrelációt mutatott. A csontmetasztázist adó primer tumorokban a HER2- és p53-szint háromszorosára emelkedik (4.b ábra). A citokeratin 20 mRNS-t RT-PCR-rel poliakrilamid gélválasztással, ezüstoffestéssel azonosítottuk. A citokeratin 20 jelenlétét a meg-

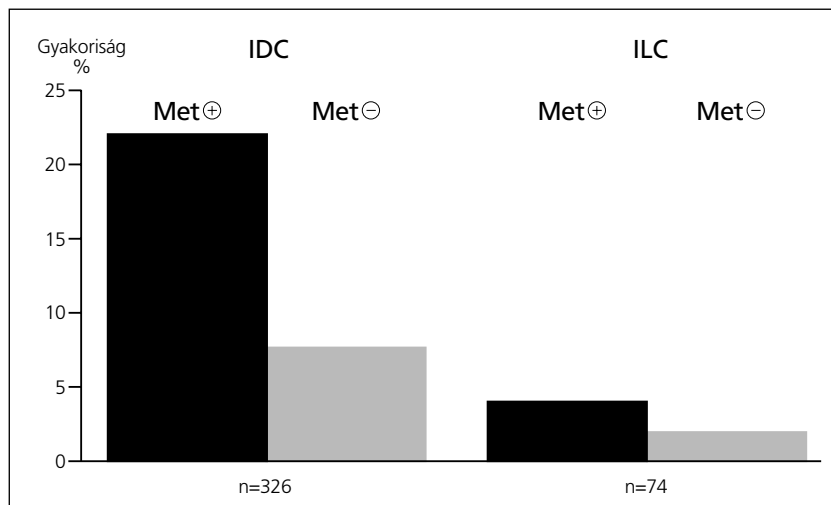
felelő primer tumorban is kimutattuk (5. ábra). Csontmetasztázist adó tumorokban mind a HER2, mind a p53-szint Western analizis alapján megemelkedik (6. ábra).

Metasztázist adó emlőtumorok jellemzése prognosztikai faktorokkal

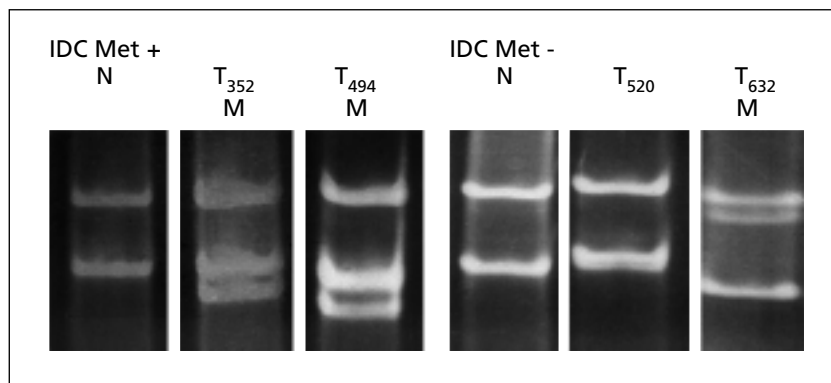
A vizsgálatsorozat alapvető célkitűzése a metasztatizáló emlőtumorok jellemzése p53, APC mutációk, HER2-, Cadherin E-, catenin β -expresszió alapján. Vizsgálatainkban 326 invazív ductalis (IDC) és 74 invazív lobularis carcinomát (ILC) jellemeztünk a fenti markerek vizsgálatával.

Megállapítottuk, hogy a metasztatizáló invazív ductalis emlőcarcinomák (IDC) 24%-ában p53 mutáció detektálható PCR-SSCP analizissel. A metasztázist nem adó IDC tumorokban a p53 mutációk gyakorisága 8% (7. ábra). A p53 mutációk az invazív lobularis carcinomák 3%-ában mutatathatók ki (7. ábra). PCR-SSCP analizis alapján p53 mutáció figyelhető meg a T352 és T494 jelzésű metasztatizáló emlőtumorokban (8. ábra). Vizsgálatainkban a sejtek Cadherin E, catenin β és HER2 fehérjészintje és áttétképző hajlama közötti összefüggést is tanulmányoztuk. Bebizonyosodott ugyanis, hogy a Cadherin E-catenin β rendszer a sejtadhézió fenntartásáért felelős. Megállapítottuk, hogy az áttétet adó invazív ductalis emlőcarcinomákban (IDC) a Cadherin E szint kétszer magasabb, mint az invazív lobularis emlőcarcinomákban (ILC) (9. ábra). A Cadherin E-szint és a HER2-expresszió mértéke között negatív korreláció figyelhető meg. Magas Cadherin E-szint alacsony catenin β - és alacsony HER2-szinttel társult (9. ábra). A HER2, Cadherin E és catenin β expressziójának Western analizisét a 10. ábra szemlélteti. HER2-overexpresszió Cadherin E-downregulációt eredményez, míg a catenin β szintje ezekben az esetekben megemelkedik. Mivel a catenin β szintjét az APC fehérje szabályozza, az APC és catenin β mutációk gyakoriságát 184 invazív ductalis carcinomában (IDC) és 76 invazív lobularis emlőcarcinomában (ILC) határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy az invazív ductalis carcinomák (IDC) 18%-ában detektálható APC mutáció. Ezzel szemben az APC mutáció gyakorisága az invazív lobularis carcinomák (ILC) 5%-ában detektálható (11. ábra). Az APC és catenin β mutációk gyakorisága között negatív korreláció mutatható ki. Az APC mutációk jelenlétét PCR-SSCP analizissel mutattuk ki. Ezen vizsgálatok reprezentatív mintáit mutatja be a 12. ábra. A ductalis in situ carcinomákban (DCIS) APC mutáció jelenlétét nem észleltük. Ezzel szemben az invazív ductalis carcinomákban az APC mutációk kimutathatók voltak (12. ábra).

7. ábra. P53 mutáció gyakorisága emlőtumorokban. A metasztázist adó (Met+) invazív ductalis emlőcarcinomákban (IDC Met+) a PCR-SSCP módszerrel azonosított p53 mutációk gyakorisága 24%. Az invazív lobularis emlőcarcinomákban (ILC) a p53 mutáció gyakorisága 3%.



8. ábra: P53 mutációk PCR-SSCP analizise ductalis emlőtumorokban. A metasztázist adó (Met+) invazív ductalis emlőcarcinomákban (IDC) a p53 mutációk (T352, T494) gyakoribbak, mint a nem metasztatizáló tumorokban.



Megbeszélés

Az emlőtumor-recidívák predikciója jelentős mértékben megnövelheti a beteg túlélési esélyét. Ennek értelmében a recidívára hajlamosító tényezők és körülmények ismerete az emlődaganatos betegek kezelési stratégiájában kiemelkedő fontossággal bír (7, 26).

Recidívára hajlamosító tényezők: a szervmegtartó műtét, pozitív sebészeti ép szél, comedo típusú DCIS, reziduális tumorsejtek sugárrezisztenciája (mutáns p53), reziduális tumorsejtek magas proliferációs aktivitása (HER 2-ampifikáció, Cyclin D-overexpresszió) (25, 29).

A posztoperatív sugárterápiás kezelés jelentős mértékben csökkentette a recidíva gyakoriságát az emlőmegtartó műtétek esetében (7). Negatív sebészeti ép szél elérése érdekében ismételt korrigáló műtét javasolható. A sebészeti ép szél statusa azonban nem befolyásolta a távoli metasztázisok megjelenését. Ha nincs irradiáció és axillaris nyirokcsomó-eltávolítás, akkor megközelítőleg 20% loco-regionalis recidívával kell számolni (11). A loco-regionalis recidíva rendszerint a rossz prognózisú csoportban alakul ki, ezekben az esetekben az adjuváns sugárkezelés szignifikáns mértékben csökkenti a recidívák kialakulását (23). A primer tumorok magas proliferációs aktivitása a reziduális tumorsejtek gyors repopulációját eredményezheti. A Cyclin D-, HER2-overexpresszió a daganatok magas proliferációs aktivitásával társult (39, 46). A Comedo típusú DCIS léziók 75-100%-ában HER 2-overexpressziót mutattak ki, amely magyarázatul szolgálhat ezen tumortípus magas recidívahajlamára (29). Saját vizsgálataink is azt igazolják, hogy az emlőtumor recidívákban mind a Cyclin D, mind a HER2 szintje szignifikánsan magasabb, mint a recidívát nem adó tumorokban. Ezzel egyidejűleg a proliferációt gátló p16 szintje recidívát adó tumorokban alacsony. Korábbi vizsgálatok szerint a Cyclin D-overexpresszió a hormondependens tumorokban rossz prognózissal társult (21, 46). Saját adataink is arra utalnak, hogy a Cyclin D-overexpressziót mutató tumorok a magasan veszélyeztetett csoportba sorolandók a tumorok fokozott recidíva hajlama miatt. Adataink szerint a Bcl2-szint emlőtumor-recidívákban megemelkedik. Irodalmi adatok szerint a primer tumorok magas Bcl2-szintje hormondependens tumorokban jó prognózissal társul, távoli metasztázisok nem alakulnak ki (22, 37, 44). A kiújuló emlőtumorokban észlelt magas Bcl2-szint a tumorsejtek csökkent apoptózis-képességére utalhat, amely a recidívaképzést eddig ismeretlen mechanizmus útján elősegítheti.

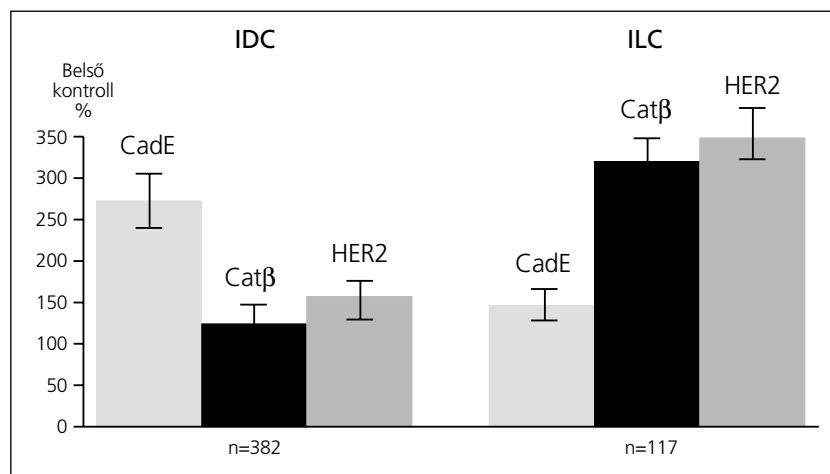
Az emlőtumorok prognosztizálásában a metasztázishajlam megítélése döntő jelentőségű. A metasztázis kaszkád több lépcsős folyamat, amely magába foglalja a sejtheadhézió megszűnését, az extracelluláris matrix lebontását, a tumorsejtek áthatolását a basalis membránon, a keringésen keresztül a metasztázis helyén való megtelepedést és a kialakult áttét vaszkularizációját (angiogenezis).

Ennek értelmében a metasztázis predikciójára az alábbi markerek lehetnek alkalmasak:

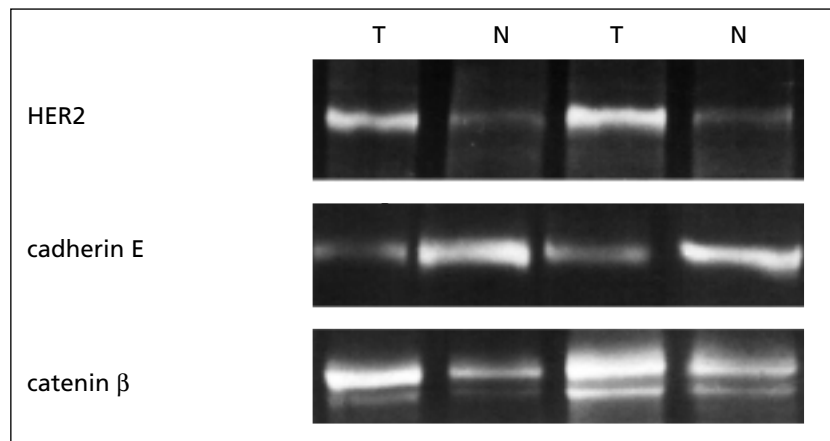
Sejtheadhéziós molekulák (pl. CD44, Cadherin E); proteázok (pl. Cathepsin D, L), plazminogén-aktivátor (uPA), plazminogén-aktivátor-gátlók (PAI1, PAI2), metalloproteázok (MMP), metalloproteáz-gátlók (TIMP1, TIMP2); tumorszuppresszor gének (pl. nm23, p53), növekedési fak-

torok, receptorok; epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) HER2; fibroblaszt növekedési faktor (FGF). Az epithelialis architectura fenntartásában a Cadherin E fontos szerepet játszik. Bebizonyosodott, hogy a Cadherin E a tumorok invazív növekedését megakadályozza. A Cadherin E citoplazmatikus része az ún. catenin fehérjéken keresztül a cytoskeletonhoz kapcsolódik. A Cadherin E vagy a catenin β mutációs megváltozása, csökkent expressziója a sejtek közötti kapcsolatok fellazulásához, az invazív növekedés megindulásához vezet (20). Ismertté vált az is, hogy a Cadherin E gén inaktíválása sokkal gyakoribb a lobularis, mint a ductalis emlőcarcinomákban (45). Saját vizsgálataink is megerősítik ezt a megfigyelést. A Cadherin E-expresszió mértékét 286 emlőtumorban Western analízis segítségével határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy a ductalis in situ carcinomákban (DCIS) a Cadherin E (Cad E) szint magas. Ugyanakkor az invazív ductalis carcinomákban (IDC) a Cadherin E-szint csökken. A legalacsonyabb Cad E-szint az invazív lobularis carcinomákban észlelhető. Bebizonyosodott, hogy a catenin fehérjék turnoverét az APC fehérje regulálja. Az APC gén mutációja a catenin β -Cadherin E funkcionális egység megomlását, a sejtheadhézió fellazulását, az invazív növekedés megindulását eredményezheti. Vizsgálatainkban azonosítottuk és összehasonlítottuk

9. ábra: Cadherin E, Catenin β és HER2-expressziója metasztatizáló emlőtumorokban. Az invazív ductalis emlőcarcinomákban (IDC) a cadherin E és HER2 szintje szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,05$), mint az invazív lobularis carcinomákban (ILC).



10. ábra: HER2-, Cadherin E- és Catenin β -expresszió Western analízise ductalis emlőtumorokban. A HER2-overexpresszió Cadherin E-downregulációt eredményez.



az APC mutációk gyakoriságát ductalis és lobularis carcinomákban. Eddigi irodalmi adatok szerint az emlőtumorok 38-40%-ában APC génben allélvesztést (LOH) és csökkent fehérjeszintet detektáltak (17).

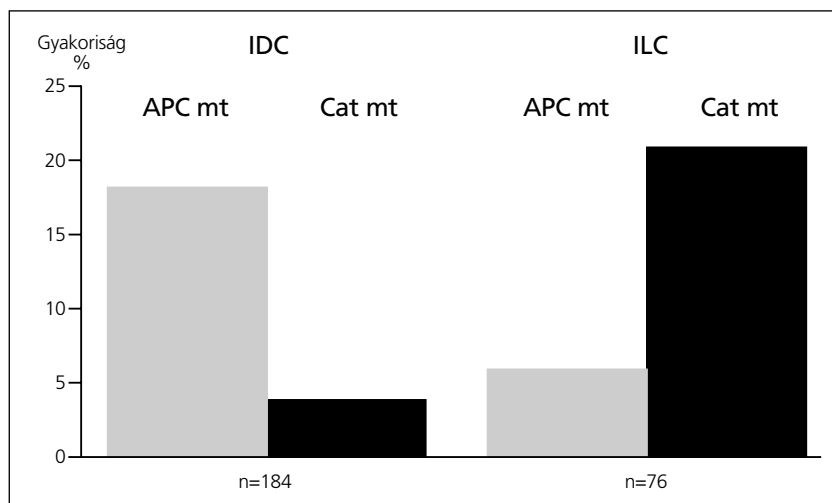
Vizsgálatainkban az invazív ductalis carcinomák 18%-ában, míg az invazív lobularis carcinomák 5%-ában észleltünk APC mutációt. Ezzel szemben a catenin β mutációk gyakorisága az invazív lobularis carcinomákban 22%, míg ductalis carcinomákban 5% volt. Eredményeink arra utalnak, hogy az invazív ductalis carcinomák progressziója APC mutáción keresztül, míg az invazív lobularis carcinomák áttétképzése catenin β mutáció közreműködésével manifesztálódik. Mikrometasztázisok kialakulhatnak a csontvelőben, axilláris nyirokcsomóban és az őrszem (sentinel) nyirokcsomóban. Kialakulási helytől függetlenül közös jellemzőjük az, hogy műszeres analízissel (csont scan) vagy morfológiai módszerekkel nem azonosíthatók. A csontvelő aspiratumból az emlőtumorsejtek kimutatását citokeratin RT-PCR módszerrel végezzük. Ezen prospektív vizsgálatok célja a citokeratin marker prediktív értékének, klinikai alkalmazhatóságának meghatározása. A mikrometasztázisok azonosítására a citokeratin markert széles körben alkalmazzák. Újabb vizsgálatok szerint a citokeratin

19 specificitása megkérdőjelezhető (4). Vizsgálatainkban a tumorsejteket mind a csontvelőben, mind a nyirokcsomóban citokeratin 20 próbával azonosítottuk, amely a citokeratin 19-nél nagyobb specificitással rendelkezik.

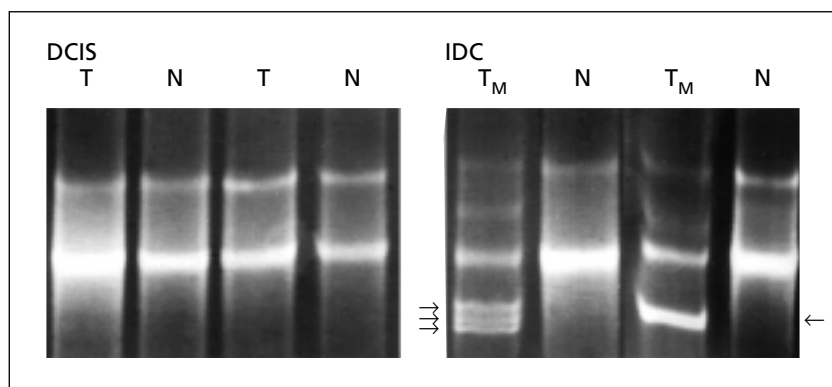
Vizsgálataink szerint a primer tumorok magas HER2-szintje és mutáns p53 jelenléte csontvelő-metasztázisra hajlamosít. A HER2-overexpresszió a Cadherin E down regulációjával járt együtt vizsgálatainkban. A HER-2 fehérje tirozinkináz-aktivitással rendelkezik, amely a catenin β -Cadherin E fehérjék foszforilálásával a fehérjék közötti kölcsönhatás megszűnéséhez, az invazív növekedés megindulásához vezethet. Feltehetően tehát, hogy a HER2-overexpresszió metasztázisképződést fokozó hatása a catenin β -Cadherin E komplex inaktiválásán keresztül érvényesül.

A p53 tumorszuppresszor gén a sejtek genetikai stabilitását biztosítja. Mutáció következtében funkciója kiesik és a genetikai hibák halmozódása a daganatok kialakulásához vezet. Az emlőtumorok 10-40%-ában mutatták ki a p53 mutáció jelenlétét (38). Összefüggést kerestek a nyirokcsomó status, és a hormonreceptor status között. Megállapították, hogy a p53 mutáció a hormonindependens tumorokban magasabb (40). Ugyanakkor a p53 mutáció nem volt alkalmas a nodepozitív betegek rizikócsoportjainak elkülönítésére. A p53 mutáció ugyanakkor alkalmasnak bizonyult a tünetmentes túlélés (DSF) megbecslésére (10). Saját vizsgálataink szerint az invazív ductalis emlőcarcinomákban p53 mutáció, illetve magas p53-szint nagyobb gyakorisággal mutatható ki, mint az invazív lobularis carcinomák esetében. Vizsgálataink szerint a p53 mutáció gyakorisága emlőtumor-recidívákban megemelkedik, amely előzetes vizsgálati adatokkal megegyezik (31). Számos vizsgálat irányult annak tisztázására, hogy a HER2 milyen szerepet játszik az elődaganatok progressziójában. Bebizonyosodott, hogy az elődaganatok 30%-ában a HER2 overexpressziója rossz prognózissal, illetve megváltozott terápiás érzékenységgel társul (39). Előzetes vizsgálatok szerint úgy tűnik, hogy a HER2-expresszió vizsgálata alkalmas az emlőcarcinomák terápiás érzékenységének predikciójára (28). ER-pozitív korai emlőrákokban a magas HER2-szint hormonrezisztenciával társult (18). A Tamoxifenrezisztencia kialakulásának mechanizmusát úgy képzelték el, hogy a HER2 (tirozin foszforilálással) az ösztrogénreceptort nem a hormonkötő helyen stimulálja, és ezáltal az antiösztrógen gátló hatása nem érvényesül. A HER2-overexpresszió a „second line” hormonterápiás (megestrol acetat, fadrozole) kezeléssel szemben is rezisztenciát eredményezett. Bebizonyosodott az is, hogy a HER2-overexpressziót mutató tumorok Ciklofoszfamid, Methotrexat, Fluorouracil (CMF) terápiás kezeléssel szemben rezisztensek (28). Újabb adatok szerint a HER2-overexpresszió Taxol rezisztenciával is társult (47). A HER2-overexpresszió és az antracyclin-kezeléssel szembeni kemoszenzitivitásra vonatkozó adatok ellentmondásosak. Számos közlemény arról tudósít,

11. ábra: APC és Catenin β mutációk (mt) gyakorisága emlőtumorokban. Invazív ductalis emlőtumorokban (IDC) az APC mutációk gyakorisága 18%, az invazív lobularis emlőcarcinomákban 5%.



12. ábra: APC mutációk azonosítása ductalis emlőtumorokban PCR-SSCP analízissel. A ductalis in situ emlőcarcinomákban (DCIS) APC mutáció nem detektálható. Az invazív ductalis emlőcarcinomákban (IDC) az APC mutációk (TM) azonosíthatók.



hogy a HER2-overexpresszió az antracyclinekkel szembeni érzékenységet növeli (41), más vizsgálatok szerint azonban a HER2 status prediktív értéke nem igazolható (35).

A fentiek alapján a HER2-expresszió kimutása alkalmas lehet arra, hogy az emlődaganatos betegeket az alacsony és magas rizikójú csoportba soroljuk. Ezért a HER2-expresszió rutinszerű kimutatása node-negatív és node-pozitív emlőtumoros betegekben egyaránt indokolt. A node-negatív emlőtumoros betegek közül a gyorsan proliferáló, p53- és HER2-overexpressziót mutató tumorkok a magas kockázati csoportba, míg a lassan növekvő (Ki 67 negatív) p53- és HER2-negatív tumorkok az alacsony kockázati csoportba sorolhatók. A HER2-pozitív emlődaganatok terápiás tervének kialakításában figyelembe kell venni a CMF, valamint a Tamoxifen kezeléssel szemben fellépő rezisztenciát.

Ennek értelmében a HER2 protein inaktiválása kedvezőbb körlefordáshoz, fokozott terápiás érzékenység kialakulásához vezethet. Ezen megfontolás alapján a HER2 receptort közömbösítő, humanizált monoklonális ellenanyagot fejlesztettek ki. A Herceptin Trastuzumab néven forgalmazott ellenanyag hatékonyságát mono-, illetve kombinációs terápiában tesztelték. A monoterápiában alkalmazott Herceptin 17%-os teljes remissziót eredményezett (1). A Paclitaxel és Herceptin együttes adagolása után 44%-os klinikai választ, míg antracyclin, Herceptin kombinációs terápia mellett 53%-os választ észleltek (34). A Herceptin kezelés az első példa arra, hogy az onkogén fehérjék immunterápiás inaktiválása sikeresen alkalmazható a daganatok gyógyításában. Bemutatott eredményeink az irodalmi adatok tükrében jelzik, hogy a prognosztikus faktorok gondos kiválasztása emlőrákok esetében is hasznos diagnosztikai információt szolgáltat a terápiát tervező „onkológiai team” számára.

Irodalomjegyzék

- Baselga J, Tripathy D, Mendelson J, et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 14:737-744, 1996
- Bieche I, Onody P, Laurendeau I, et al. Real time reverse transcription - PCR assay for future management of erbB2 - based clinical applications. *Clinical Chem* 45:1148-1156, 1999
- Blaszkyk H, Hartmann A, Cunningham JM, et al. A prospective trial of midwest breast cancer patients: A p53 gene mutation is the most important predictor of adverse outcome. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 89:32-38, 2000
- Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, et al. Limitation of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph node and blood of breast cancer patients. *J Clin Oncol* 16:2632-2640, 1998
- Bucht E, Rong H, Pernow Y, et al. Parathyroid hormone-related protein in patients with primary breast cancer and eucalcemia. *Cancer Res* 58:4113-4116, 1998
- Bukholm IK, Nesland JM, Karesen R, et al. E-cadherin and α , β , γ catenin protein expression in relation to metastasis in human breast carcinoma. *J Pathol* 185:262-266, 1988
- Dalberg K, Eriksson E, Kanter L, et al. Biomarkers for local recurrence after breast-conservation - a nested case-control study. *Breast Cancer Res Treat* 57:245-259, 1999
- Dalberg K, Mattsson A, Rutqvist LE, et al. Breast conserving surgery for invasive breast cancer: Risk factors for ipsilateral breast tumor recurrences. *Breast Cancer Res Treat* 43:73-86, 1997
- D' Souza B and Taylor-Papadimitriou J. Overexpression of ErbB2 in human mammary epithelial cells signals inhibition of transcription of the E-cadherin gene. *Cell Biol* 91:7202-7206, 1994
- Elledge RM, Gray R, Masour E, et al. Accumulation of p53 protein as a possible predictor of response to adjuvant combination chemotherapy with cyclophosphamide, methotrexate, Fluorouracil and Prednisone for breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 87:1254-1256, 1995
- Forrest P, Stewart H, Everington D, et al. Randomised controlled trial of conservation therapy for breast cancer: 6-year analysis of the Scottish trial. *Lancet* 348:708-713, 1996
- Gillett C, Smith P, Gregory W, et al. Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 69:92-99, 1996
- Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, et al. E-Cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 55:5195-5199, 1995
- Groden J, Thiveris A, Samowitz W, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66:589-600, 1991
- Grooteclaes M, Vernimmen D, Plaza S, et al. A new cis element is involved in the HER2 gene overexpression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 59:2527-2531, 1999
- Han S, Yun IJ, Noh DY, et al. Abnormal expression of four novel molecular markers represents a highly aggressive phenotype in breast cancer. Immunohistochemical assay of p53, nm23, erbB-2, and Cathepsin D protein. *J Surg Oncol* 65:22-27, 1997
- Ho KYK, Kalle WHJ, Lo THS, et al. Reduced expression of APC and DCC gene protein in breast cancer. *Histopathology* 35:249-256, 1999
- Houston SJ, Plunkett TA, Barnes DM, et al. Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 79:1220-1226, 1999
- Ilyas M.: Adhesion molecule expression in breast cancer: the phoenix in tumour metastasis? *J Pathol* 190:3-5, 2000
- Ilyas M, and Tomlinson PM. The interactions of APC, E-cadherin and β -catenin in tumour development and progression. *J Pathol* 182:128-137, 1997
- Kenny SF, Hui R, Musgrove EA, et al. Overexpression of Cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clinical Cancer Res* 5:2069-2076, 1999
- Le MG, Mathieu MC, Douc-Rasy S, et al. C-myc, p53 and Bcl2, apoptosis-related genes in infiltrating breast carcinomas: evidence of a link between Bcl2 protein over-expression and a lower risk of metastasis and death in operable patients. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 84:562-567, 1999
- Liljgren G, Lindgren A, Bergh J, et al. Risk factors for local recurrence after conservative treatment in stage I cancer. Definition of a subgroup not requiring radiotherapy. *Ann Oncol* 8:235-241, 1997
- Linderholm P, Lindh B, Tavelin B, et al. p53 and Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF) expression predicts outcome in 833 patients with primary breast carcinoma. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 89:51-62, 2000
- Maeda K, Chung Y-S, Kang S-M, et al. Cyclin D1 overexpression and prognosis in colorectal adenocarcinoma. *Oncology* 55:145-151, 1998
- Meijer-van Gelder ME, Look MP, Bolt-de Vries J, et al. Breast-conserving therapy: proteases as risk factors in relation to survival after local relapse. *J Clin Oncol* 17:1449-1457, 1999
- Michalides R, Hageman P, van Tinteren H, et al. A clinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and of p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer. *Br J Cancer* 73:728-734, 1996

28. Miles DW, Harris WH, Gillett CE, et al. Effect of c-erbB2 and estrogen receptor status on survival of women with primary breast cancer treated with adjuvant cyclophosphamide/methotrexate/fluorouracil. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 84:354-359, 1999
29. Molina R, Jo J, Filella X, et al. C-erbB-2 CEA and CA 15.3 serum levels in the early diagnosis of recurrence in breast cancer patients. *Anticancer Res* 19:2551-2556, 1999
30. Niskanen E, Blomqvist C, Franssila K, et al. Predictive value of c-erbB2, p53, cathepsin-D and histology of the primary tumour in metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 76:917-922, 1997
31. Noguchi S, Koyama H, Kasugai T, et al. A case-control study on risk factors for local recurrences or distant metastases in breast cancer patients treated with breast-conserving surgery. *Oncology* 54:468-474, 1997
32. Nollet F, Bex G. and van Roy F, The role of the E-cadherin/Catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. *Mol Cell Biol Res Commun* 2:77-85, 1999
33. Paradiso A, Tommasi S, Barletta A, et al. Metastatic site and p53 primary tumor expression in previously untreated stage IV breast cancer patients. *Anticancer Res* 19:4523-4528, 1999
34. Perez EA. HER-2 as a prognostic, predictive and therapeutic target in breast cancer. *Cancer Control* 6:233-240, 1999
35. Rozan S, Vincent-Salomon A, Zafrani B, et al. No significant predictive value of c-erbB-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer. *Int J Cancer* 79:27-33, 1998
36. Shiozaki H, Oka H, Inoue M, et al. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer* 77:1605-1613, 1996
37. van Slooten HJ, van de Vijver MJ, van de Velde CHJ, et al. Loss of Bcl2 in invasive breast cancer is associated with high rates of cell death, but also with increased proliferative activity. *Br J Cancer* 77:789-796, 1998
38. van Slooten HJ, van de Vijver MJ, Borresen AL, et al. Mutations in exons 5-8 of the p53 gene, independent of their type and location, are associated with increased apoptosis and mitosis in invasive breast carcinoma. *J Pathol* 189:504-513, 1999
39. Sjörgren S, Inganas M, Lindgren A, et al. Prognostic and predictive value of c-erbB2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic marker. *J Clin Oncol* 16:462-469, 1998
40. Takahashi M, Tonoki H, Tada M, et al. Distinct prognostic values of p53 mutations and loss of estrogen receptor and their cumulative effect in primary breast cancers. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 89:92-99, 2000
41. Thor AD, Berry DA, Budman DR, et al. erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90:1346-1360, 1998
42. Tuck AB, O' Malley FP, Singhal H, et al. Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 79:502-508, 1998
43. Utsumi T, Yoshimura N, Maruta M, et al. Correlation of Cyclin D1 mRNA levels with clinico-pathological parameters and clinical outcome in human breast carcinomas. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 89:39-43, 2000
44. Veronese S, Mauri FA, Caffo O, et al. Bax immunohistochemical expression in breast carcinoma: a study with long term follow-up. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 79:13-18, 1998
45. Vos CBJ, Cleton-Jansen AM, Haar NT, et al. E-cadherin inactivation in lobular carcinoma in situ of the breast and early event in tumorigenesis. *Br J Cancer* 76:1131-1133, 1997
46. Vos CB, Ter Haar NT, Peterse JL, et al. Cyclin D1 gene amplification and overexpression are present in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol* 187:279-284, 1999
47. Yu D, Liu B, Jing T, et al. Overexpression of both b185-c-erbB2 and p170mdr-1 renders breast cancer cells highly resistant to taxol. *Oncogene* 16:2087-2094, 1998
48. Zhang JS, Caplin S, Bosman FT, et al. Genetic diversity at the p53 locus between primary human colorectal adenocarcinomas and their lymph-node metastases. *Int J Cancer* 70:674-678, 1997

Pályázati felhívás



A Fővárosi Szent István Kórház Dr. Papolczy Ferenc kórházi szemész főorvos emlékére pályázatot hirdet.

Pályázni lehet: elsősorban szemészeti tárgyú, másodsorban a rosszindulatú daganatokkal foglalkozó elméleti vagy gyakorlati jellegű, még közzé nem tett, lehetőleg új témájú gyógyítást előbbrevivő tudományos értékű munkával.

Az onkológia körébe tartozó munkák közül először csak azok nyernek díjazást, amelyek szemészeti vonatkozást érintenek.

A pályázat jelíges. A jelíges lezárt borítékban kell a pályázó nevét, munkahelyét, lakását és születési évét elhelyezni.

Pályázhat: magyar állampolgárságú, munkaviszonyban álló szakorvos, vagy szakorvos által vezetett csoport, valamint az onkológia területén dolgozó egyéb diplomások.

Nem vehetnek részt akadémikusok és orvostudományok doktorai.

A pályamunkákat 2000. október 1-ig kell elküldeni 3 példányban, magyar nyelven a Fővárosi Szt. István Kórház Szemészeti osztályára (1096 Budapest, Nagyvárad tér 1.).

Ezen alapítvány lehetőséget ad fiatal szemorvosok külföldi kongresszusi részvételének támogatására, amennyiben az illető a fenti témában e tárgyévben előadást tartott. A kérelmeket a munkahelyi vezető javaslatával az előadás rövid kivonatának mellékelésével 2000. október 1-ig kell a fenti címre eljuttatni. A kongresszusi részvételi támogatás elbírálása a pályázatokkal egyidőben történik.

A pályadíjakat Dr. Papolczy Ferenc születésének évfordulóján (2000. november) adják át.

Dr. Domokos Márta
titkár