

Fiatal- és időskori emlődaganatok morfológiai és molekuláris sajátosságai közötti összefüggések

*Madaras Lilla¹, *Szász A. Marcell¹, Baranyák Zsuzsanna¹, Tőkés Anna-Mária¹, Szittyá Liliána¹, Lotz Gábor¹, Székely Borbála^{1,2}, Szentmártoni Gyöngyvér², Dank Magdolna², Baranyai Zsolt³, Kulka Janina¹

Semmelweis Egyetem, ¹II. sz. Patológiai Intézet, ²Radiológiai és Onkoterápiás Klinika, ³Uzsoki utcai Kórház, Sebészeti és Érsebészeti Osztály, Budapest

A tumorok felépítése nagyfokú heterogenitást mutat a morfológiai megjelenés és immunhisztokémiai profil, azaz a sejtek fehérjeexpressziója alapján. Ismert az a tény is, hogy a fiatal- és időskori daganatok eltérő viselkedést mutatnak. Munkánkban 41 fiatal és 33 idős beteg tumorát vizsgáltuk. Az elemzéshez a tumorok legnagyobb kiterjedését reprezentáló blokkokat használtuk. Hematoxinin-eozin-festés alapján kijelöltük a különböző tulajdonságú területeket, és az ösztrogén-, progesteronreceptor, HER2 és Ki-67 kifejeződése, valamint a HER2-génamplifikáció heterogenitását is megvizsgáltuk. A fiatal korúak között az átlagos tumor régiók száma valamivel több volt az idősekénél (1,82 vs. 1,48 régió/daganat), és több volt a heterogén morfológiát mutató tumor (53,6% vs. 39,4%). Mindazonáltal a fiatalkori daganatok esetében az egyes tumor régiók között nagyobb volt a HER2-expresszió heterogenitása ($p=0,007$). Az összes daganaton belül az eltérő morfológiai és immunhisztokémiai reakciókat mutató területek megegyeztek ($p<0,001$). A kimenetelt legjobban meghatározó tumoros sejtcsoportok eredete továbbra is kérdéses; a teljes tumor átlagos kifejeződési mintázatát vagy az egyes régiók külön vett pontos értékeinek átlagát véve hasonló eredményre jutottunk. Az egyes területek jelentősége a prognózis szempontjából azonban eltérő lehet, amelyet a technika fejlődésével, valamint a kezelési és betegkövetési információk birtokában lehet majd tovább elemezni. Magyar Onkológia 56:75-78, 2012

Kulcsszavak: emlőrák, heterogenitás, immunhisztokémia, morfológia

There is a reasonable heterogeneity in the morphological appearance and the immunohistochemical properties of distinct breast tumors. Furthermore, it is also known that cancer arising in young women have different prognosis than the ones developing in the elderly. We analyzed breast tumors of 41 young (<35 years) and 33 older women (>65 years) regarding histopathological properties and immunohistochemical reactions for ER, PgR, HER2 and Ki-67, as well as HER2 FISH. The longest diameters, thus largest available surface areas of the tumors were included in the evaluation. Different regions were marked for morphology and in all immunohistochemical reactions. The regions in the distinct tumors showing different pathological and immunohistochemical appearance were identical ($p<0.001$). The number of morphologically different tumor regions were more frequent in tumors developing in the young (1.82 vs. 1.48 regions/tumor), and 53.6% of tumors with heterogeneous architecture were in young vs. 39.4% in the elderly. However, regarding HER2 staining, cancers in the young patients have shown greater variability among the different tumor areas ($p=0.007$). The origin of tumor cells predicting prognosis remains undetermined. Whether the analysis of the expression pattern of the whole tumor is conducted or the minute regions are separately examined and averaged, the same results can be achieved. With the development of molecular techniques and accurate prognostic and treatment information rendered to samples the question may be soon answered.

Madaras L, Szász AM, Baranyák Z, Tőkés AM, Szittyá L, Lotz G, Székely B, Szentmártoni G, Dank M, Baranyai Z, Kulka J. Morphological and immunophenotypical heterogeneity in breast cancers of young and elderly women. Hungarian Oncology 56:75-78, 2012

Keywords: breast, heterogeneity, immunohistochemistry, morphology

Levelezési cím: Dr. Kulka Janina, Semmelweis Egyetem, II. sz. Patológiai Intézet, 1091 Budapest, Üllői út 93. Telefon: (06-1) 215-7300, fax: (06-1) 215-6921, e-mail: kj@korb2.sote.hu

*egyenlő mértékben járultak hozzá a közleményhez

A vizsgálatot finanszírozó adatai: MKOT-GSK-2008, ETT-088/2009 és TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0013 pályázat

Közlésre érkezett: 2010. december 7. • Elfogadva: 2012. január 17.

BEVEZETÉS

Az emlőrákot az utóbbi időben nem egyetlen homogén daganattípusnak, hanem inkább az azonos lokalizációban kialakuló tumorok heterogén csoportjának tekintik. Az is ismert tény, hogy egy-egy tumor megjelenése régióról régióra változik: egy adott megbetegedés is heterogén sejtcsoportok halmozásából áll. Így a betegség lefolyására a prediktív és prognosztikus faktorok pontosabb mérésével következtethetünk.

Az emlődaganatok prognosztikájának megítélésében a klasszikus szövettani típusok mellett a mitózisok száma, a daganatsejtek atípiájának mértéke és tubulusformáló képessége (grade) (8), az érbetörés és nekrotikus területek jelenléte, a proliferációs index (a Ki-67 fehérje expressziójának mértéke), a p53-mutáció megléte és a betegség stádiuma lehet segítségünkre.

A prediktív faktorok arra utalnak, hogy az adott tumorsejtek milyen mértékben reagálnak majd az alkalmazandó terápiára. Ezek alatt napjainkban a rutinszerű ösztrogén- (ER) és progeszteron- (PgR), valamint az epidermális növekedési faktor receptor 2 (HER2) státusz, illetve génamplifikáció meghatározását értjük (5, 12).

Az utóbbi évtizedben forradalmi változásokon ment át az emlődaganatok osztályozása és viselkedésének előrejelzése (15, 21) számos diagnosztikus eszköz párhuzamos kifejlesztése mellett (14, 22). De még mindig vannak olyan betegcsoportok, akik daganatos betegségének kimenetelére nehéz előrejelzést adni (pl. receptorheterogenitást mutató daganatok (6, 7), grade 2 kategóriába tartozó tumorok (13), egyidejű ER- és HER2-expressziót mutató emlőrákok), mert mind klinikai, mind molekuláris szinten igen heterogén betegséggel van dolgunk (15, 18). Vizsgálatunkban azt mértük fel, hogy a daganatok morfológiai és immunhisztokémiai sajátosságai mennyire térnek el a köztudottan rossz prognózisú fiatalkori és az általában kedvezőbbnek vélt idősebb nőkben kialakuló tumorokban (2, 3, 19).

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Betegek és mintáik. 41 fiatal (<35 év) és 33 idős (>65 év) emlődaganatos beteg tumorát vizsgáltuk, amelyek patológiai feldolgozása a Semmelweis Egyetem II. sz. Patológiai Intézetében történt. A klinikopatológiai adatokat az 1. táblázat tartalmazza. A vizsgálatot az illetékes kutatás- és bizottság jóváhagyta (TUKEB 17/2006, 139/2009, 141/2009).

Hisztomorfológia. A daganatok reprezentatív blokkjaiból lemetzés után HE-festett metszeteket a morfológiai megjelenés alapján területekre osztottuk. Az egyes területeket a metszetek digitalizálása után (Mirax MIDI, 3DHitech Kft., Budapest) annotáltuk (1. ábra).

Immunhisztokémia (IHC) és fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH). A receptorok kimutatását automatizált rend-

1. táblázat. A vizsgált tumoros betegek klinikopatológiai jellemzői

Csoport		Fiatal	Idős
Életkor (átlag, szórás)		28,4 ± 5,9	69,8 ± 4,4
Szövettani típus (arány, %)	IDC	37/41 (90,24%)	26/33 (78,79%)
	ILC	2/41 (4,88%)	3/33 (9,09%)
	Egyéb	2/41 (4,88%)	4/33 (12,12%)
Grade (arány, %)	1	2/41 (4,88%)	8/33 (24,24%)
	2	11/41 (26,83%)	16/33 (48,48%)
	3	28/41 (68,29%)	9/33 (27,27%)
Nekrózis (arány, %)		26/41 (63,41%)	9/33 (27,27%)
Gyulladás (arány, %)		18/41 (43,90%)	7/33 (21,21%)
Vérérinvázió (arány, %)		18/41 (43,90%)	12/33 (36,36%)
Nyirokér-invázió (arány, %)		17/41 (41,46%)	10/33 (30,30%)
Altípus (arány, %)	Luminalis A	10/41 (24,39%)	17/33 (51,52%)
	Luminalis B (HER2-)	7/41 (17,07%)	7/33 (21,21%)
	Luminalis B (HER2+)	8/41 (19,51%)	1/33 (3,03%)
	HER2+	8/41 (19,51%)	2/33 (6,06%)
	Tripla-negatív	8/41 (19,51%)	6/33 (18,18%)

szerben végeztük (Ventana Benchmark, Roche Diagnostics, Mannheim, Németország). A felhasznált antitestek ösztrogén-, progeszteronreceptor, Ki-67 és HER2 IHC reakciókhoz: Novocastra NCL-ER-6F11, Novocastra NCL-PGR-312, DAKO M7240, Novocastra NCL-CB11 (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország).

A fluoreszcens in situ hibridizációt Kreatech KBI-10735 HER2, TOP2A és 17-es centroszómát (CE17) tartalmazó Poseidon próbákkal végeztük (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Hollandia).

Az IHC-reakciókat intenzitás (0–3) és eloszlás (0–100) szerint értékeltük (ML, SzAM), majd a kapott intenzitás- és eloszlás-értékeket összeszoroztuk 0–300 értéket kapva (histoscore) (10). FISH-vizsgálat esetében a 2,2 feletti HER2/CE17, illetve TOP2A/CE17 arányt tekintettük amplifikáltként. Nem amplifikált volt a 2,2 alatti, és poliszómiás a 3 feletti centromerkópiát hordozó tumorsejt.

Statisztika. Az értékelést SPSS 15.0 Family Pack szoftverrel végeztük (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A területek számának összehasonlítására chi-négyzet tesztet alkalmaztunk, a statisztikai tesztek kétoldalúak voltak.

EREDMÉNYEK

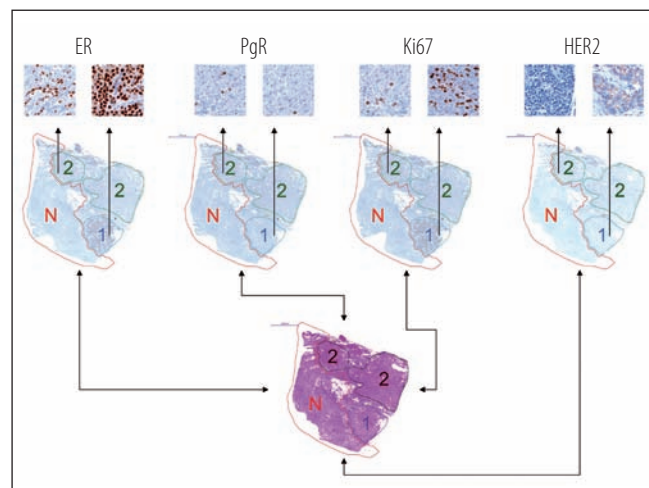
A morfológiai felosztás szerint a 41 fiatalkori tumorból 19 esetben (46,3%) viszonylag homogénnek mondható területek

voltak láthatóak: a daganatok egykomponensűek voltak. Tizenhét (41,5%) tumor esetében két területet különböztettünk meg. Két daganat rendelkezett 4 régióval (4,8%). Egy-egy tumor (2,4–2,4–2,4%) volt három, öt, illetve hat területre osztható. Az időskorúak közül 20 (60,6%) volt egy-, 10 (30,3%) két-, és 3 (9,1%) háromkomponensű daganat. A fiatalok között az átlagos tumor régiók száma valamivel több volt, mint az idősekénél (1,82 vs. 1,48 régió/tumor), és kismértékben nagyobb volt a heterogén morfológia aránya (53,6% vs. 39,4%, $p=0,353$).

Az immunhisztokémiai reakciókat a hisztopatológiai megjelenéstől függetlenül értékeltük, és az egyes területeket az elektronikus metszeteken annotáltuk (1. ábra). Ezt követően a morfológiai és IHC területeket digitálisan egymásra vetítettük. A tumorok megjelenése és immunfenotípusa egy fiatalkori daganat kivételével megegyezett ($p<0,001$). Utóbbi esetében az azonos megjelenésű tumorsejtcsoportok között kétféle intenzitású festődést láttunk az ösztrogénreceptor kifejeződését tekintve: egy negatív, illetve egy histoscore szerinti 60 pontos területet.

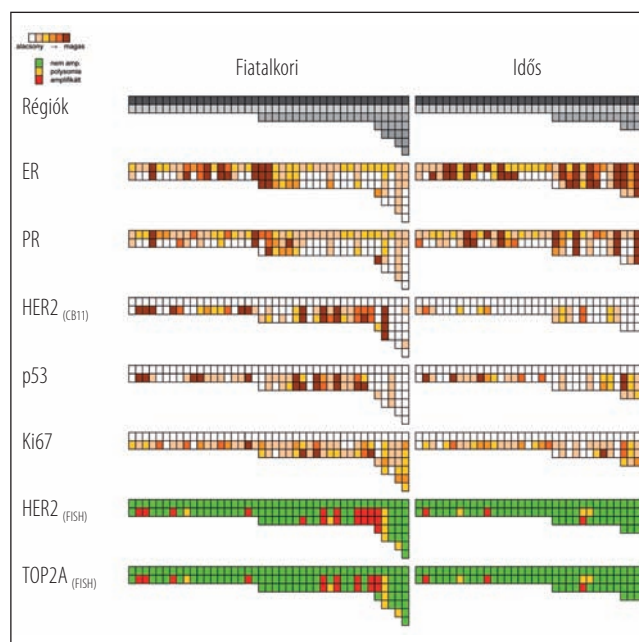
Az immunhisztokémiai reakciók értékelésekor a fiatalkori daganatok esetében az ösztrogénreceptor kifejeződését tekintve 6 esetben (14,6%), a progeszteronreceptornál ugyancsak 6 (14,6%), a HER2-festődésnél 8 (19,5%), a Ki-67 kifejeződésénél 14 esetben (34,1%) figyeltünk meg különböző területeket. HER2-FISH esetében két tumornál láttunk az egyik régióban poliszómiát. A TOP2A gén kópiaszáma két esettől eltekintve követte a HER2 gén kópiaszámát. Az időskori daganatokban az ösztrogénreceptornál 6 (18,2%), a progeszteronreceptornál 3 (9,1%), a HER2 immunhisztokémia során 0, a Ki-67-festődésnél 7 esetben (21,2%) láttunk egy daganaton belül egymástól eltérő terü-

1. ábra. A HE-festés alapján meghatározott tumor régiók és az immunhisztokémiai reakciók értékelése során meghatározott területek



teket. Az egyik HER2-amplifikált esetben a tumor másik régiója nem mutatott génszorzódást (2. ábra). Ugyanebben az esetben figyeltük meg azt a jelenséget, ahol a TOP2A gén normális kópiaszáma mellett izolált HER2-génamplifikáció volt detektálható. A fiatal- és időskori daganatok esetében az egyes tumor régiók között a HER2 immunhisztokémiai heterogenitása tekintetében találtunk szignifikáns különbséget

2. ábra. Az egyes morfológiai régiók (felső sor), és az immunhisztokémiai vizsgálattal meghatározott területek festődési intenzitása (másodiktól az ötödik sorig), valamint a FISH értékelésének eredményei (alsó két sor). Az egyes betegekhez tartozó normális szövetek és tumor régiók függőlegesen egymás alatt helyezkednek el



($p=0,007$). Az ösztrogén- ($p=0,681$), progeszteronreceptor ($p=0,468$), p53 ($p=0,552$) és Ki67 ($p=0,220$) esetében csak tendenciák voltak megfigyelhetőek.

MEGBESZÉLÉS

Az emlőrákos megbetegedés még mindig az egyik vezető daganatos halálok (11, 20). A rohamos fejlődés ellenére a diagnosztika és kezelés egyes kérdései még válaszra várnak (prevenció, szenzitívebb diagnosztikus markerek, progresszió predikciója, személyre szabott kezelés, rezisztencia elleni küzdelem). Ezek megértéséhez az emlődaganatokról alkotott „modern” képünk közelebb vitt, de új kérdések sorát is felvetette (15). A daganatok heterogenitása klinikai és molekuláris szinten is rendkívül nagy (4,18).

Vizsgálatunkban fiatalokban és idősekben kialakuló tumorkok különböző megjelenésű régióit elemeztük az immunfenotípust meghatározó immunpanel és FISH-reakciók eloszlása szempontjából. Hasonló felmérések már készültek, de korcsoportok összevetése kétdimenziós feltérképezéssel még nem történt (16). A fiatalokban található szélsőségesebb morfológiai heterogenitást mutató tumorkok magyarázhatják az időskori tumorkokban észleltnél valamivel nagyobb HER2-expressziós diverzitást is, aminek diagnosztikus és terápiás következményei is lehetnek (pl. core-biopszia-vétel, neoadjuváns terápia). Vastagbélrákban ugyancsak nagy valószínűséggel HE-festéssel vizualizálható az eltérő prognosztikus tulajdonságú (microsatellita-instabilitást mutató) genetikai háttér (9, 17).

Az egyes területek közötti kifejeződésbeli különbség lehet a metodikai eljárás következménye is (patológiai feldolgozás), ezért az értékelési eljárások ezt kompenzálni igyekeznek a pozitívítási küszöb pontosabb beállításával (1). Felmérésünkben ennek pontosabb meghatározását kíséreltük meg az egyes területek külön értékelésével és a histoscore használatával (10). A HER2-kifejeződés és -génamplifikáció heterogenitása az egyik legnagyobb varianciát mutató és terápiás szempontból messzemenő következményekkel járó kérdés (23). A fiatalkori tumorkok között két esetben láttunk részleges HER2-poliszómiát, míg az egyik időskori esetben egy területre kiterjedő poliszómiát.

A két leginkább elfogadott tumorprogressziós (öszejt-hipotézis és klonális evolúciós/ szelekciós) modell verseng egymással, amelyek azonban nem zárják ki egymást; sőt legvalószínűbb, hogy együttműködnek (ugyanúgy egy sejtben bekövetkezett zavaroknak tulajdonítják a tumoros megbetegedést). A heterogenitást azonban eltérő módon közelítik meg: aberráns differenciációs program megvalósulásaként vagy különböző fenotípusú sejtek versengéseként látják azt. Az idősebb betegekben az ösztrogénreceptor kifejeződésében észlelhető nagyobb heterogenitás intenzitásbeli különbségekből adódik, és tulajdonképpen nem a receptor jelenléte vagy nem léte adta a különbségeket, míg a fiatalok daganatokban ez utóbbi is előfordult. A proliferációs marker tekintetében fordított a helyzet: egy időskori tumorban látható nem osztódó régió, míg a fiatalok esetében inkább intenzitásbeli különbségek vannak, és a tumorkok mindenképpen jobban proliferálnak, rosszabb prognózist sejtetve. Az egyes daganatok dinamikus képére, feldolgozáskor „pillanatfelvételt” látva, teljes biztonsággal nem következtethetünk.

KÖVETKEZTETÉS

Akárhogyan is fogjuk fel a kimenetelt legjobban meghatározó sejtszoportok eredetét, a kép mindig árnyalt marad: a teljes tumor átlagos kifejeződési mintázatát vagy az egyes régiók külön vett pontos értékeinek átlagát véve nagyjából ugyan-

oda jutunk. Azonban az egyes területek prognosztikus jelentősége nagyon is eltérő lehet, amelyet a technika fejlődésével, valamint a kezelési adatok és követési információ birtokában lehet tovább vizsgálni, elemezni.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Azumah Erzsébet, Pekár Magdolna és Samodai Erika segítségét köszönjük a feldolgozásban.

IRODALOM

- Allred DC, Bustamante MA, Daniel CO, et al. Immunocytochemical analysis of estrogen receptors in human breast carcinomas. Evaluation of 130 cases and review of the literature regarding concordance with biochemical assay and clinical relevance. *Arch Surg* 125:107–113, 1990
- Anders CK, Acharya CR, Hsu DS, et al. Age-specific differences in oncogenic pathway deregulation seen in human breast tumors. *PLoS ONE* 3:e1373, 2008
- Anders CK, Fan C, Parker JS, et al. Breast carcinomas arising at a young age: unique biology or a surrogate for aggressive intrinsic subtypes? *J Clin Oncol* 29:e18–e20, 2011
- Aubele M, Mattis A, Zitzelsberger H, et al. Intratumoral heterogeneity in breast carcinoma revealed by laser-microdissection and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 110:94–102, 1999
- Colley M, Kommoss F, Bibbo M, et al. Assessment of hormone receptors in breast carcinoma by immunocytochemistry and image analysis. II. Estrogen receptors. *Anal Quant Cytol Histol* 11:307–314, 1989
- Cottu PH, Asselah J, Lae M, et al. Intratumoral heterogeneity of HER2/neu expression and its consequences for the management of advanced breast cancer. *Ann Oncol* 19:595–597, 2008
- Davis BW, Zava DT, Locher GW, et al. Receptor heterogeneity of human breast cancer as measured by multiple intratumoral assays of estrogen and progesterone receptor. *Eur J Cancer Clin Oncol* 20:375–382, 1984
- Elston EW, Ellis IO. Method for grading breast cancer. *J Clin Pathol* 46:189–190, 1993
- Hyde A, Fontaine D, Stuckless S, et al. A histology-based model for predicting microsatellite instability in colorectal cancers. *Am J Surg Pathol* 34:1820–1829, 2010
- Jonat W, Maass H, Stegner HE. Immunohistochemical measurement of estrogen receptors in breast cancer tissue samples. *Cancer Res* 46:4296s–4298s, 1986
- Kamangar F, Dores GaM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 24:2137–2150, 2006
- Kommoss F, Bibbo M, Colley M, et al. Assessment of hormone receptors in breast carcinoma by immunocytochemistry and image analysis. I. Progesterone receptors. *Anal Quant Cytol Histol* 11:298–306, 1989
- Nottage M, Kopciuk K, Tzontcheva A, et al. Analysis of incidence and prognostic factors for ipsilateral breast tumour recurrence and its impact on disease-specific survival of women with node-negative breast cancer: a prospective cohort study. *Breast Cancer Res* 8:R44, 2006
- Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 351:2817–2826, 2004
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747–752, 2000
- Sharifi-Salamatian V, de Roquancourt A, Rigaut JP. Breast carcinoma, intratumour heterogeneity and histological grading, using geostatistics. *Anal Cell Pathol* 20:83–91, 2000
- Shia J, Ellis NA, Paty PB, et al. Value of histopathology in predicting microsatellite instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 27:1407–1417, 2003
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10869–10874, 2001
- Székely B, Madaras L, Szentmártoni G, et al. A fiatal- és időskori emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők alapján. *Magyar Onkológia* 54:19–26, 2010
- Tusnády G, Gaudi I, Rejtő L, et al. A magyar daganatos betegek túlélési esélye a Nemzeti Rákregiszter adatai alapján. *Magyar Onkológia* 52:339–349, 2008
- van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530–536, 2002
- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347:1999–2009, 2002
- Wu JM, Halushka MK, Argani P. Intratumoral heterogeneity of HER-2 gene amplification and protein overexpression in breast cancer. *Hum Pathol* 41:914–917, 2010