

# Naděje a úskalí molekulární klasifikace karcinomu prsu

Aleš Ryška, Eva Hovorková, Folakemi Sobande, Tomáš Rozkoš, Jan Laco, Helena Hornychová

Fingerlandův ústav patologie LF UK a FN, Hradec Králové

## SOUHRN

Tradiční histopatologická diagnostika karcinomu prsu se v posledních letech rozšířila o výsledky dalších metod doplňujících morfologické zhodnocení nádoru. Nedílnou součástí histopatologické diagnózy jsou tak dnes výsledky vyšetření exprese hormonálních receptorů, proteinu HER-2/neu a proliferčního antigenu Ki67. Kritickým momentem pro korektní využití těchto vyšetření je dodržení podmínek preanalytické fáze - tj. optimální způsob fixace a dále zohlednění heterogenního charakteru nádorové populace.

Kromě této dnes již rutinní praxe se v posledních letech rozšiřují snahy o zohlednění molekulárních charakteristik nádorů a jejich využití v klasifikaci nádorů a v predikci úspěšnosti protinádorové léčby. Většina prací se opírá o stanovení tzv. genových expresních profilů. Na základě průkazu zvýšené či snížené exprese velkého počtu genů je možné najít sadu několika genů, která nejlépe koreluje s biologickými vlastnostmi nádoru. Takto bylo možné identifikovat 4 základní skupiny karcinomů - lumenální, bazální (basal-like), HER-2 pozitivní (HER-2 enriched) a podobné normální prsní žláze (normal-like). Počet kategorií se následně rozšířil - původně jednotná skupina lumenálních karcinomů se rozpadla na lumenální A a B, případně i lumenální C. Také v rámci bazálních karcinomů byly nalezeny další podskupiny. Výsledky studií zabývajících se analýzou genových expresních profilů nádorů ale ukazují, že naše porozumění biologii karcinomu prsu je teprve na začátku. V různých publikacích jsou jednotlivé kategorie různě definovány, a proto je srovnávání jejich výsledků velmi problematické. Další možností molekulární klasifikace karcinomů prsu je imunohistochemická analýza exprese jednotlivých proteinů, používaných jako náhradní parametr (surrogate marker) místo detekce mRNA jednotlivých genů. Výhodou je možnost využití archivního parafinového materiálu a řádově nižší cena. Limitací je naopak nemožnost paralelní detekce tisíců markerů, jak je tomu u genomického profilování. Výsledky molekulárně klasifikačních studií však nejsou zcela zásadně překvapivé, již z minulosti je známo, že nádorová kmenová buňka u karcinomu prsu se může diferencovat směrem myoepiteliálním (neboli bazálním) a lumenálním. Oba směry se liší mj. rozdílnou expresí cytoskeletálních proteinů a dalších molekul. Molekulární klasifikace karcinomů prsu - ať opírající se o různé sady genových expresních profilů nebo o extenzivní imunohistochemické vyšetření řady markerů - výsledky těchto prvních morfologických studií potvrdily. Výsledky výzkumu v oblasti genových expresních profilů se nicméně poměrně rychle promítly do klinické praxe. V současné době je komerčně dostupných několik certifikovaných testů sloužících jako doplňková informace při klinickém rozhodování o léčbě.

**Klíčová slova:** karcinom prsu – lumenální – bazální – triple negativní – prediktivní a prognostické markery – molekulární klasifikace – genové expresní profily

## Hopes and pitfalls of the molecular classification of breast cancer

### SUMMARY

Traditional histopathological diagnosis of breast cancer has been extended in recent years through the results of additional methods. Today, the results of the detection of hormone receptors, HER-2/neu, and Ki67 antigen are thus an integral part of the histopathological diagnosis. A critical factor for the success of these tests is the fulfillment of pre-analytical phase conditions - i.e. optimal fixation, as well as taking into account the heterogeneous nature of the neoplastic population.

In addition to the above-mentioned markers - which have become a routine practice in recent years, there are many efforts to include the molecular characteristics of tumors both in tumor classification as well as in the prediction of results of cancer treatment. Most of the work is based on the use of gene expression profiles. On the basis of the detection of increased or decreased expression of a large number of genes, it is possible to find a set of multiple genes correlating with the biological behavior of the tumor. Using this approach, four basic subgroups of breast cancer have been identified - luminal, basal-like, HER-2 enriched and normal gland-like. Over the course of time, the number of molecular categories has expanded - originally a homogenous group of luminal cancers has been subclassified into the luminal A, B and C. Also within basal-like carcinomas additional subgroups have been identified. However, the results of studies dealing with the analysis of gene expression profiles suggest that our understanding of the biology of breast cancer is far from being complete. The individual categories are defined differently in various publications and thus the comparison of the results of these studies is very difficult. Another approach for the molecular classification of breast cancer is the immunohistochemical detection of various proteins used as a surrogate marker instead of the detection of the mRNA of individual genes. The advantage of this approach is the possibility to use even archive material, as well as much lower costs. On the other hand, its main limitation is the inability of parallel detection of thousands of markers, unlike in genomic profiling.

The results of molecular classification are, however, not fundamentally surprising. The fact that breast cancer tumor stem cells can differentiate towards myoepithelial (or basal) and luminal cells has been known for a long time. These two lines of differentiation are - among others - characterized by differential expression of cytoskeletal proteins as well as of other molecules. These findings have been confirmed by the results of molecular studies - either those based on gene expression profiling or immunohistochemical ones. Research results in gene expression profiling have relatively quickly translated into clinical practice. At present, several commercially available certified tests serve as a complementary source of information for decisions about clinical treatment.

**Keywords:** breast cancer – luminal – basal-like – triple negative – predictive and prognostic markers – molecular classification – gene expression profiles

*Cesk Patol 2015; 51(1): 26-32*

Diagnostika a nové léčebné metody u některých solidních nádorů velmi názorně ilustrují, jak obrovský skok udělala medicína v posledních 15 letech. Pro kvalifikované rozhodování o volbě optimální onkologické léčby je na patologa kladeno stále více požadavků. Doby, kdy postačovalo stanovení vlastní diagnózy, grade a TNM stádia jsou nenávratnou minulostí a součástí vyšetření mnoha různých nádorů je dnes stanovení řady dalších parametrů - morfoloických, imunohistochemických i molekulárně-genetických, které slouží onkologovi jako prognostické a zejména prediktivní markery pro volbu optimální systémové léčby.

Kromě toho nové poznatky zejména z oblasti molekulární patologie umožnily získat lepší představu o etiopatogenezi nádorů, příčinách rozdílů v jejich biologickém chování a odpovědi na různé druhy terapie, a pomáhají v rozhodování, který typ systémové léčby je pro daného pacienta optimální, tedy s nejlepší nadějí na pozitivní efekt a současně s minimalizací rizika vzniku nežádoucích účinků. Na příkladu karcinomu prsu lze velmi dobře ilustrovat výhody i rizika současných postupů zahrnujících vedle tradičního morfoloického hodnocení nádorů také vyšetřování pomocí imunohistochemie, in situ hybridizace či molekulárně-genetických postupů.

## KLASICKÁ HISTOPATOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA – VÝHODY A LIMITACE

Tradiční histopatologická diagnostika karcinomu prsu využívala - a stále využívá - posouzení vzhledu a charakteru růstu nádorových buněk a v histopatologickém závěru na základě zhodnocení těchto parametrů figuruje histologický typ nádoru (duktální, lobulární, mucinózní, tubulární, atd.), charakter růstu nádoru (in situ, invazivní), histopatologický stupeň diferenciacce (grade 1 – 3), vztah nádoru k cévám (lymfangioinvasze, invaze krevních cév) a k okolním strukturám (kůže, pectorální svaly). Na základě syntézy těchto údajů je vytvořena „tradiční“ histopatologická diagnóza.

Nicméně, pouhé morfoloické zhodnocení není schopno poskytnout všechny relevantní informace, které jsou nutné pro volbu optimální léčebné strategie. Z morfologie není možné předpovědět předpokládanou odpověď na některé (zejména cílené) typy léčby, jako jsou blokáda hormonální osy či HER-2/neu signální dráhy. Z tohoto důvodu jsou dnes nedílnou součástí histopatologické diagnózy rovněž výsledky vyšetření exprese některých prognostických a prediktivních markerů rozhodujících o biologickém chování nádoru a odpovědi na léčbu - jmenovitě hormonálních receptorů (estrogenových - ER a progesteronových - PR), proteinu HER-2/neu a proliferčního antigenu Ki67.

## HORMONÁLNÍ RECEPTORY

„Nejstarším“ prediktivním markerem u karcinomu prsu (ale i v patologii solidních nádorů obecně) je průkaz exprese estrogenových a později i progesteronových receptorů. Přítomnost

### ✉ Adresa pro korespondenci:

Prof. MUDr. Aleš Ryska, Ph.D.

Fingerlandův ústav patologie LF UK a FN

Fakultní nemocnice

500 05 Hradec Králové

tel.: 495833748, fax: 495832004

e-mail: ryskaale@fnhk.cz

ER byla v karcinomu prsu poprvé prokázána již v 50. letech minulého století, od 70. let pak byla přítomnost ER využívána pro predikci odpovědi na hormonální léčbu (1). ER byly v minulosti detekovány pomocí biochemických metod z homogenizované nativní tkáně, ale s nástupem imunohistochemie se zlatým standardem jejich stanovení stalo právě imunohistochemické vyšetření z parafinového materiálu. Jeho výhodou je možnost rutinního provádění (je využita stejná tkáň, jako pro běžné histologické vyšetření), nízké náklady, relativně snadné provedení umožňující vyšetřování v široké síti běžných laboratoří patologie a v neposlední řadě také možnost korelace mikroskopického nálezu s výsledkem průkazu exprese receptorů. Na rozdíl od biochemického vyšetření, které bylo závislé na relativním zastoupení nádorových buněk ve tkáni a v případě hypocelulárních nádorů tak mohlo podávat falešně negativní výsledek (a v případě hormonálně negativního karcinomu prorůstajícího do okolní normální žlázy s expresí ER i PR naopak výsledek falešně pozitivní), umožňuje imunohistochemie mikroskopickou verifikaci typu buněk, které hormonální receptory exprimují. Druhou stranou mince imunohistochemického stanovení exprese ER a PR (toto ale platí i pro všechny další markery) je velká citlivost metody na dodržení podmínek tzv. preanalytické fáze vyšetření - tj. na způsob zacházení s nádorovou tkání před vlastním vyšetřením. Kritickým momentem je zejména optimální způsob fixace. Platí, že tkáň musí být fixována okamžitě po odběru, množství fixativa (takřka ve 100 % případech formalín) musí být dostatečné, aby byla umožněna rychlá difúze až do centra vzorku, délka doby fixace by se neměla být kratší než 6 hodin a nepřesáhnout výrazně 24 hodin. Nedodržení těchto vcelku jednoduchých podmínek může mít za následek znehodnocení tkáně, kdy vyšetření je následně výrazně omezeno nebo v některých případech dokonce zcela znemožněno (2).

Expresi ER lze prokázat u zhruba 80 % invazivních karcinomů prsu, u více než poloviny z nich jsou exprimovány rovněž PR (3,4). Přítomnost PR je přitom závislá na funkční signální dráze regulované ER, nádory s ER+/PR- fenotypem proto hůře odpovídají na antihormonální terapii.

Vzhledem k výše řečenému také není překvapivé, že v praxi se prakticky nevyskytují nádory, které by vykazovaly expresi PR, přitom však byly ER negativní (ER-/PR+). V případě takového nálezu je vždy třeba v první řadě pátrat po tom, zda bylo vyšetření receptorů provedeno správně, zda je ve tkáni pozitivní vnitřní kontrola, případně vyšetření zopakovat z jiného bloku. Při rigorózním dodržení všech podmínek jsou nádory ER-/PR+ absolutní raritou (5).

Pro spolehlivé hodnocení ER a PR proto musí mít laboratoř své metody správně a trvale validovány tak, aby se zabránilo falešně negativním či pozitivním výsledkům (6).

## HER2

Protein HER-2/neu (dále jen HER2), který byl poprvé popsán v roce 1982, je produktem přepisu onkogenu *c-erbB-2* lokalizovaného na dlouhém raménku 17. chromozomu (17q21). Tento protein o molekulové hmotnosti 185kd je zástupcem rodiny receptorů pro epidermální růstový faktor (EGFR). Kromě HER2 patří do této skupiny také receptory HER1 (EGFR), HER3 a HER4. Tyto 4 molekuly jsou si do velké míry podobné – všechny obsahují extracelulární doménu, na kterou se váže ligand daný receptor aktivující, transmembránovou doménu a intracelulární doménu, která se vyznačuje tyrozinkinázovou aktivitou, díky které je nastartována signální kaskáda vedoucí ke konečnému biologickému efektu (7). Na samém počátku signální dráhy je moment aktivace receptoru ligandem, který vede k procesu dimerizace - homodimerizace, či v případě vazby na jiný receptor z rodiny