
ПРЕДИКТИВНИ ПАРАДИГМИ В ПАТОЛОГИЧНОТО СУБТИПИЗИРАНЕ НА КАРЦИНОМ НА ГЪРДА

**доц. д-р Савелина Поповска, дм¹
проф. д-р Светлана Христова, дм²**

¹Отделение по клинична патология, УМБАЛ *Георги Странски* – Плевен

²Клиника по обща и клинична патология, УМБАЛ *Александровска* – София

ПРЕДИКТИВНИ ПАРАДИГМИ В ПАТОЛОГИЧНОТО СУБТИПИЗИРАНЕ НА КАРЦИНОМ НА ГЪРДА

доц. д-р Савелина Поповска, дм¹

проф. д-р Светлана Христова, дм²

¹Отделение по клинична патология, УМБАЛ Георги Странски – Плевен

²Клиника по обща и клинична патология, УМБАЛ Александровска – София

ОБЗОР

Карциномът на гърда (КГ) е комплексна болест, представяща се с разнообразна клинична, морфологична и молекулярно-биологична характеристика. Неговата хетерогенност е трудно обяснена единствено чрез стандартни клинични и морфологични белези, вкл. възраст, туморен размер, хистологично стапенуване (G), експресия на рутинни биомаркери (естроген/прогестерон и HER-2), чрез които понастоящем се определя диагностиката и лечението на пациентите. През последното десетилетие научните изследвания са насочени към търсене и въвеждане на нови морфологични стандарти за определяне на класификационни субтипове в съответствие с изискванията за лечение. Познанията за КГ претърпяват развитие въз основа на молекулярно-биологични, генетични и фармакогенетични проучвания. В резултат на това се натрупват данни, че туморната хетерогенност се дължи на различна морфологична характеристика на първичния тумор, на разнообразие от генетични, епигенетични и транскриптомни аномалитети, както и на разнообразен молекулярен профил и имунофенотип на тумора. Достиженията на молекулярно-аналитичните методи създадоха нова таксономия на КГ и намират приложение като прогностични и предиктивни тестове. Използването на сурогатен имунохистохимичен (ИХХ) панел от маркери, който ефективно замества молекулярното субтилизиране на КГ и е приложим в рутинната практика, е цел, към която се стремят редица автори. В статията се разглеждат имунохистохимични маркери, дефиниращи вътрешните молекуларни типове, морфологичните особености и корелацията им с молекуларните субтипове на КГ.

Увод

Класификацията на карцином на гърда (КГ) по традиция е морфологично-базирана. Въз основа на описанителен

принцип Световната здравна организация (СЗО) обособява около 18 хистологични варианта на инвазивни карциноми. Това разнообразие от типове затруднява избора на прецизно лечение, базирано предимно

на основни биологични характеристики на тумора. Към настоящия момент рецепторният статус за естрогенов рецептор (ER α), прогестеронов рецептор (PgR) и HER-2 са рутинно използвани за стратификация на пациенти, които се очаква да имат полза от приложение на таргетна терапия, но могат да се приемат за показатели с относително ниско прогностично значение. Като такива, те могат също да се вземат предвид при определяне на пациенти, подходящи за приложение на адювантна химиотерапия, в комбинация с други характеристики на пациента, параметри на тумора и състояние на регионални лимфни възли, използвайки прогностичния индекс *Nottingham* или други прогностични и/или предиктивни характеристики.

Молекулярно-базирана таксономия на карцином на гърда

С навлизането на високотехнологични експресионни генетични анализи, даващи възможност за изследване на множество гени, се направиха опити за създаване на нова, молекулярно-базирана таксономия на КГ, която да преодолее недостатъците на морфологично-базираната и да е клинично значима и полезна в прогностичен и най-вече – в предиктивен аспект. В резултат на все по-значимо доближаване на морфологията до молекулярната патология и генетика и в резултат на концепцията, че различни гени са алтерирани при различни субгрупи, стана възможно извършване на генотипно-фенотипни корелации.

В предложената молекулярна таксономия на КГ, създадена на базата на транскриптомен анализ, се описва корелация между молекулярни и морфологични характеристики на първичния тумор, което е съотнесено и към т. нар. „специални” хистологични

типове. Независимо че морфологичната находка се асоциира с характерна молекулярна алтерация, в повечето случаи едни и същи хистологични видове КГ показват значимо различно биологично поведение и различен отговор към проведено лечение в неoadювантен или адювантен план. Обичайно се касае за инвазивни дуктални карциноми, класифицирани като обикновени, „неспециални” типове (*No Special Type - NST, NOS*), срещащи се в до 70 % от спорадичния КГ.^{1,2}

За пръв път изследователи от Университета Станфорд идентифицират пет различни субтипове КГ, произходящи от два различни клетъчни вида – луминален и базален. Perou *et al.* изследват генна експресионна характеристика на КГ и демонстрират хетерогенност на тази неоплазма, поставяйки основи на нова молекулярна класификация.³ По метода на йерархично струпване на селектирани гени и сравняване с нормална експресия на контролни гени са обособени два основни субтипа, съответно наречени *подобен на луминален и естроген-рецептор (ER)-негативен*. Според авторите първият се характеризира с експресия на групата на ER и други гени, свързани с луминалния фенотип на нормалния жлезен епител и се характеризира с най-благоприятна обща преживяемост и най-дълъг период без рецидив. Естроген-рецептор-негативният субтип е разделен на три групи, базирани на струпване на гени в значими категории: (i) сходен с базални клетки (*basal-like*, базалоиден), (ii) характеризиращ се с негативност за хормонални рецептори и позитивност за базални цитокератини и (iii) други гени (CK 5 и 17, интегрин-4, ламинин, c-KIT, α_β-интегрин, металотионеин IX, протеин, свързващ мастни киселини-7, Р-кадхерин, EGFR и NF-κB). Подобно на базалния тип, който показва тенденция за негативност за ER, HER-2-позитивният тип се асоциира със свръхекспресия на ERBB-2+ ампликон (17q11), с ак-

ПАТОЛОГИЧНО СУБТИПИЗИРАНЕ НА КАРЦИНОМ НА ГЪРДА

тивация на гени като *HER-2*, *GRB7*, *GATA4* и високи нива на NF-кБ. Последният описан вид, сходен с нормален тип на КГ, е асоцииран с ниски нива на експресия на ER и на гени за луминален фенотип и високи нива за базални цитокератини. В последващи проучвания авторите потвърждават гореописаните молекулярни субкласове и разделят луминалния субтип на няколко подтипа: луминален A, B и C.⁴ Най-важното заключение е, че определените групи имат различна преживяемост и прогноза, като най-благоприятна е прогнозата при тип луминален A, а най-неблагоприятна – при базалоиден и HER-2+ групите.

Класификацията на КГ в микроарейс формат с генетичен експресионен анализ се приема за стандарт. Високата цена и изискването към материала (нефиксирани) за повечето платформи прави приложението на този метод до голяма степен ограничено извън рамките на експериментални лаборатории.⁵⁻⁷

Репродуцируемост на молекулярната класификация на карцином на гърда

Независимо че тази класификация първоначално е базирана на ограничен набор от гени и случаи и показва разминаване в дефиницията и наименованието на вътрешните субтипове, тя привлича вниманието на онкологи, патологи, генетици и молекуларни биологи. Повторяме във всички транскриптомни проучвания са две големи молекулярни субтипове на КГ – ER-позитивни и ER-негативни. Допълнителни проучвания, анализиращи по-обширни данни, доведоха до идентификация и на нови молекуларни видове от група на ER-негативни вътрешни субтипове, като например: (i) подтип, обогатен с гени, показващ свръхекспресия за

интерферон, (ii) подтип с ниска експресия на клаудини с молекулярна характеристика, типична за мезенхимни и стволови клетки, демонстрираща хистологичен фенотип на метапластичен карцином.^{8,9} Вътрешният подтип, характеризиращ се с ниски нива на експресия на клаудин е имунохистохимично тройнонегативен, с ниски нива на експресия на адхезионни молекули, като е-кадхерин¹⁰ и е богат на стромална лимфоцитна инфильтрация.¹¹

Друг важен подтип, описан напоследък, е т. нар. *апокринен молекулярен тип*, който се дефинира като ER/PgR-негативен, но експресиращ андрогенов рецептор (AR), HER-2 и ген за GCDFP-15. В повечето случаи се асоциира с апокринна мофология – еозинофилна цитоплазма с апикални протрузии, грануларност и големи ядра с проминентни нуклеоли.¹²⁻¹⁴ Позитивност за AR-рецептор, установен с методи на имунохистохимия (ИХХ), се доказва в 58%, независимо от високи нива на генна експресия. Самостоятелната AR-експресия, обаче (като ИХХ-позитивен маркер), заедно с HER-2, не би могла да определи апокринен подтип (в съчетание с негативност за ER, PgR) и да го разграничава от базалоиден подтип, характеризиращ се с негативност за AR.¹⁴ Негативната ИХХ-реакция би могла да се обясни с ниска чувствителност на антитялото или с деградация на белтъка поради неговата активация.¹⁴

Имунохистохимична позитивност за GCDFP-15 е високоспецифична, но маркерът е с ниска чувствителност за дефиниране на този субтип. Niemeier *et al.*¹⁵ приемат, че тумори с имунен профил ER (-) HER2 (3+) AR(+) или ER(-) HER2(-) AR(+) би могло да бъдат от апокринен молекулярен тип, но само на базата на този имунофенотип е вероятно да се пропуснат други тумори (ако дефиницията се фокусира единствено върху AR-експресия). Това налага използване

на комплексни подходи в дефиниране на тези тумори, т.е. ИХХ-определение трябва да се допълва от молекулярни изследвания за генна експресия във фамилията на андрогенни рецептори с цел точна идентификация на таргет за терапия.

Имунохистохимични маркери, дефиниращи вътрешни молекулярни подтипове и корелация с молекулярни подтипове

Имунохистохимичният метод се прилага успешно от 25 години и е основен стандарт при определяне на два типа КГ – ER-позитивни и ER-негативни – и е с предиктивна стойност за отговор към терапия – 30-60%. *In situ* хибридиционните методи (CISH, SISH, FISH) се прилагат рутинно от 15 години за определяне на HER-2-статуса. От практическа гледна точка, приблизително разграничаване на молекулярните подтипове на КГ може да се получи като се използват и някои клиникопатологични характеристики на първичния тумор, вместо данни от генното профилиране. В литературата преобладават данни за използване на различни сурогатни имунохистохимични маркери (базални цитокератини и EGFR) за дефиниране на луминален, базален и другите молекулярни подтипове. Използването на сурогатен ИХХ-панел от маркери, който ефективно да замести молекулярното субтипизиране на КГ, е цел, към която се стремят редица научни колективи.

В зависимост от използвания ИХХ-панел, съществуват различни дефиниции на молекулярни подтипове. A. Onitilo *et al.* разделят КГ на базата на използване на ER, PgR и HER-2 в следните групи: луминален A и B, HER-2-свръхекспресиращ и тройнонегативен.¹⁶ Според концепцията, предложена от A. Spitali *et al.*, съществува идентичност

между тройнонегативния карцином и базалоидния тип, дефиниран само по негативни хормонални рецептори и HER-2. Авторите отбелязват, че молекулярната класификация на КГ е от полза за клиничната практика и превъзхожда класификацията на СЗО по отношение на краткосрочната прогноза.¹⁸ Използвайки панел от пет ИХХ-макера (ER, PgR, HER-2, цитокератин 5/6 и EGFR), Carey *et al.* обособяват молекулярен подтип *базалоиден* на база на негативни хормонални рецептори и HER-2 и позитивност за цитокератин (CK) 5/6 и/или EGFR; тумори, негативни за всички пет използвани маркери, приемат за „некласифицирани“.¹⁹ Според O. Torsten *et al.* фенотипът при използване на панел от ИХХ-маркери за идентифициране на базалоиден подтип трябва да включва: ER-негативен, HER-2-0/1+ и CK 5/6+ и/или EGFR; установено е, че повечето тумори с базалноклетъчен фенотип експресират EGFR.²⁰ M. Cleang *et al.* определят базалоидния тип като „тройнонегативен“; авторите използват и ИХХ-панел за субклассификация, базиран на пет маркера: според констелацията тумори, идентифицирани като тройнонегативни (случаи с имунофенотип ER/PgR- и HER-2-негативен, които експресират EGFR и/или CK5/6), се определят като същински базални (*corebasal*), а тумори, негативни за всички пет изследвани маркера, са с петорно негативен фенотип. Разширеният панел от сурогатни маркери, идентифициращ базалоидни карциноми, позволява определяне на преживяемостта при тройнонегативен КГ.²¹ Подобна дефиниция за тройнонегативен и базалоиден карцином приемат M. Tischkowitz *et al.*²² Панелите от маркери и дефиницията на посочените автори с систематизирана на Табл. 1.

M. Laakso *et al.* предлагат ИХХ-классификация на тумори на гърда, базирана на интратуморната хетерогенност на експресия на базални цитокератини. Съгласно

ПАТОЛОГИЧНО СУБТИПИЗИРАНЕ НА КАРЦИНОМ НА ГЪРДА

Таблица 1. Панели от маркери и дефиниция на вътрешни молекулярни подтипове при карцином на гърда.

Маркери	Подгрупи, обособени според използван панел	Литературен източник
ER, PgR и HER-2	Луминален А (ER и/или PgR+, HER-2-) Луминален В (ER и/или PgR+, HER-2+) HER-2 тип (ER и PgR-, HER-2+) Тройнонегативни (ER и PgR-, HER-2-)	Onitilo AA, et al. Clin Med Res 2009; 7(1-2):4-13
ER, PgR и HER-2	Луминален А (силно ER+, HER-2 -) Луминален В (слабо до умерено ER/PgR+, HER-2-) HER-2 тип (ER/PgR -, HER-2+) Тройнонегативен (ER/PgR -, HER-2-) Луминален А-HER-2 хибриден (силно ER+, HER-2+) Луминален В-HER-2 хибриден (слабо до умерено ER/PgR+, HER2+)	Bhargava R, et al. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2010; 18(2):113-118
ER, PgR и HER-2	Луминален А (ER+ и/или PgR+, HER-2-) Луминален В (ER+ и/или PgR+, HER2+) HER-2 тип (ER-, PgR-, HER2+) Базалоиден тип (ER-, PgR-, HER-2-)	Spitale, et al. Ann Oncol 2009; 20 (4): 628-635
ER, PgR, HER-2, CK 5/6 и EGFR	Луминален А (ER и/или PgR +, HER2-) Луминален В (ER и /или PgR +, HER2+) HER-2 тип/ER-негативен подтип (HER-2+, ER-, PgR-) Базалоиден (ER-, PgR-, HER-2-, CK5/6 и/или HER-1+)	Carey LA, et al. JAMA 2006; 295(21):2492-2502
ER, PgR, HER-2, CK 5/6 и EGFR	Луминален А (ER+ и/или PgR+ и HER-2-) Луминален В (ER+ и/или PgR+ и HER-2+) HER-2-свръхекспресиращ (ER-, PgR- и HER-2+) Базалоиден (ER-, PgR-, HER-2-, CK5/6+ и/или HER-1+ „Normal like“, (негативен за всички маркери)	Torsten O, et al. Clin Cancer Res 2004; 10: 5367-537.
ER, PgR, HER2, CK 5/6 и EGFR	Луминален (ER+ и/или PgR+ и HER-2-) Луминален, експресиращ HER-2 (ER+ и/или PgR+ и HER-2+) HER-2 свръхекспресиращ (ER-, PgR- и HER-2+) Тройнонегативен (ER-, PgR-, HER-2-) Базалоиден тип „core basal“ (ER-, PgR-, HER-2-, CK5/6+, и/или EGFR+) Петорно негативни тумори (негативен за всички маркери)	Cheang M, et al. Clin Cancer Res 2008; 14: 1368
ER-/PR-/HER-2 CK 5/6 и EGFR	Тройнонегативен (ER-, PgR-, HER-2-) „Core Basal“ (ER-, PgR-, HER-2-, CK5/6+ и/или EGFR+)	Tischkowitz M. BMC Cancer 2007; 7:134

тази концепция, базалните карциноми демонстрират фенотип, подобен на незрели прогениторни клетки, докато луминалните тумори – имунофенотип, близък с този на диференцирани епителни клетки на нормални канали на гърда. Авторите описват т.нар. базолуминални карциноми, които

представляват тумори с междуинни характеристики, с хетерогенна експресия на базални цитокератини и честа експресия на c-kit и виментин. Базолуминалните и базалоидните подтипове притежават значими разлики в нивата на пролиферативна активност, експресия на биомаркери, онкогенен профил и

преживяемост.²³ Според *M. Jittrapan, et al.* имунопозитивността за базални цитокератини може да предсказва възникване на ранни рецидиви. Имунопозитивните за базални цитокератини КГ почти винаги демонстрират базалоидна генна експресия.²⁴ Както става ясно от разгледаните панели, използвани като ИХХ-сурогат за определяне на молекулярни подгрупи, се използва широк набор от различни маркери и липсва консенсус или ясна дефиниция за всеки от тях.

Обект на сериозни дискусии е дефинирането на категориите *тройногативен и базалоиден тумор на гърда*.

Пролиферативен статус (Ki-67). Ядреният Ki-67 антиген е ДНК-свързан нехистонен протеин, откриващ се през всички фази на клетъчния цикъл, с изключение на фазата G0; той е с доказани регулаторни функции по отношение на клетъчната пролиферация.³⁸ Максимални нива на експресия антигенът достига по време на митоза.^{41, 42} В зависимост от броя на Ki-67-позитивни клетки се определя количествено Ki-67-пролиферативен индекс (Ki-67-ПИ). Процентът на оцветени ядра се използва за измерване на пролиферация и като прогностичен фактор за различни тумори в много проучвания.^{41, 42} Ki-67 е независим фактор с предiktivno и прогностично значение при пациенти с КГ.^{43, 44} Високи стойности на Ki-67 (> 10% или 20%) имат неблагоприятно прогностично значение за общата преживяемост. Повечето проучвания намират обратна корелация между високи нива на експресия на Ki-67 и тази – на ER и PgR.⁴⁵⁻⁴⁷ Връзката между HER-2/neu-статус и Ki-67 е противоречива, с преобладаващи данни за позитивна корелация.⁴⁸⁻⁵⁰

За количествено имунохистохимично определяне на Ki-67 съществуват различни гранични стойности, като най-честа стойност, позволяваща дихотомно разделяне,

е 10% или 20%, т.е. за ниска пролиферативна активност се приема под 10% или 20%.⁵¹ Според консенсуса от St. Gallen, за гранична стойност към момента е приета 15%, т.е. 14% и под тази стойност пролиферативна активност се определя като слаба.⁵² Ki-67 е стратегически маркер за разграничаване на подтип *луминален A* от *луминален B*. Освен това, Ki-67 е независим предiktivен фактор при пациенти с предстояща неоадювантна химиотерапия: високи нива на експресия предсказват добър отговор. Ki-67 е и значим фармакодинамичен маркер за ефикасност на проведено краткосрочно предоперативно ендокринно лечение. Ролята му като предiktivен маркер за отговор към неоадювантна ендокринна и химиотерапия е доказана в проучвания, в които се установява, че намаляването на нивото на експресия корелира с благоприятен клиничен изход. Високи нива на пролиферация след лечение са доказан неблагоприятен фактор.⁵³⁻⁵⁶ Освен прогностично значение, определянето на промяна в нивата на експресия на Ki-67 след проведено ендокринно лечение може да се използва и за предсказване на безрецидивен период.⁵⁷ Тези проучвания показват, че молекулярният профил на един тумор е по-показателен, ако се изследва след лечение. Независимо от краткия терапевтичен период, в първичния тумор настъпват посттранснационални промени, които променят редица биомаркери и експресията на много гени. Поради тези причини се препоръчва ретестуване на биомаркери след проведена терапия. Интерпретация на ИХХ за Ki-67 следва да се извършва съгласно препоръките на Работната група за карцином на гърда.⁵⁸ Изискванията за фиксиране на материалите и преаналитичната фаза са идентични на тези за стероидни хормони и HER-2. През аналитичната фаза за цялостни срези се подбират най-малко три полета на голямо увеличение ($\times 40$ обектив) с минимум 500 и оптимум 1000 клетки.

ПАТОЛОГИЧНО СУБТИПИЗИРАНЕ НА КАРЦИНОМ НА ГЪРДА

При намиране на "горещи" зони (hot spots) те влизат в общия сбор за изчисляване на Ki-67-пролиферативен индекс.

Дефиниция на вътрешни молекуларни подтипове

С практическа цел на XII Международна конференция в St.Gallen, 2011, експерти от работната група за стратифициране и определяне на подходяща терапия дефинират различни подтипове, базирани на различни биологични характеристики на първичния тумор (Табл.2).²⁷

Подтип луминален A. Установява се в 50-60% от подтиповете. По-чест е при лобуларните неоплазии – всички *in situ* и повечето от инвазивните лобуларни карциноми. Включва и високо диференцирани инвазивни дуктални карциноми от тубуларен и крибриформен хистологичен тип. Прогнозата е добра с 27.8% честота на рецидиви, две трети от които са представени от костни метастази (Фиг.1).^{28,29}

Подтип луминален B. Той е с честота между 10% и 20%, притежава по-агресивен клиничен ход и по-лоша прогноза, сравнен с луминален A, за него са характерни по-чести рецидиви с костни и чернодробни метастази. Хистологично се представя с по-ниска степен на туморна диференциация (G2, 3) и висок пролиферативен индекс (Ki-67 над 14%). Разликата между двата подти-

па не е напълно дефинирана и е обект на проучвания. Подтип луминален B може да се прояви и със свръхекспресия на HER-2 и EGFR (хибриден подтип B), а до 6% от случаите може да има ER/HER-2-негативен фенотип.²⁹ Разграничаването на двата молекуларни подтипа не е напълно дефинирано, особено ако се има предвид липсата на точен стандарт за ИХХ-отчитане на експресията на Ki-67 (Фиг. 2).³⁰

Подтип HER-2-позитивен. Хистологично са предимно умерено/нискодиференцирани инвазивни дуктални карциноми (G2, G3) с фокални туморни некрози и свръхекспресия на HER-2 (ИХХ 3+ и/или доказана амплификация на HER-2-ген чрез *in situ* хибридизация) при негативни хормонални рецептори (Фиг.3).

Подтип базалоиден (basal-like). Представени са с честота 10-20%. Тази класификационна група е определена въз основа на генетични и ИХХ-характеристики, сходни с тези на нормални миоепителни клетки в гърда. Развиват се в по-ранна възраст като бързо нарастващи тумори и при диагностициране се представят с голям туморен обем и висока честота на регионални лимфни метастази. Имат много по-лоша прогноза и агресивен биологичен потенциал, независимо от първоначално добър отговор към химиотерапия. Метастазите са висцерални и ангажират множество органи, основно бял дроб и централна нервна система (ЦНС).

Таблица 2. Подтипове карциноми, дефинирани по имунофенотип на първичен тумор.

Подтипове	Клиникопатологична дефиниция
Луминален А	ER+ и/или PgR+, HER-2-, нисък Ki-67 (<14%)
Луминален B1 (HER-2-негативен)	ER+ и/или PgR+, HER-2-, висок Ki-67 (>14%)
Луминален B2 (HER-2-хибриден/позитивен)	ER+ и/или PgR+, всяка възможност Ki-67, HER-2+ (ИХХ 3+ или амплифициран HER-2)
HER-2-позитивен (нелуминален)	HER-2+ (ИХХ 3+ или амплифициран HER-2), ER- и PgR-
Базалноклетъчен фенотип (basal-like, базалоиден), тройногативен карцином	ER/PgR/HER-2-

Установява се ИХХ-експресия на високомолекулни цитокератини (CK 5/6), Р-кадхерин, кавеолин 1/2, нестин, CD44 и EGFR. Групата се определя въз основа на имунофенотипен профил и се идентифицира чрез шест основни маркера: ER, PgR, HER-2, EGFR и/или CK 5/6. Тези маркери класифицират този подтип със специфичност 100% и чувствителност 76%.³¹⁻³² Една от основните характеристики е ER/PgR/HER-2-негативност при имунохистохимично изследване. Морфологично те са предимно инвазивни дуктални карциноми с висок митотичен индекс, ниска степен на диференциация (G3), солиден хистологичен строеж, липса на тубуларни структури и минимален или липсващ *in situ* карциномен компонент, „географски“ тип зони на некрози и добре представена лимфоцитарна стромна реакция (Фиг. 4).^{29,33}

Терапия според вътрешни молекулярни подтипове

Препоръките за вида на последващата системна терапия следват класификацията за молекулярно субтиปизиране. Според участниците в експертния панел на St. Gallen, 2011 е препоръчително да се извърши определяне на статуса на ER, PgR и HER-2, както и на пролиферативна активност на базата на Ki-67-индекс за определени групи тумори. За целите на клиничната практика авторите не подкрепят изследване на експресия на цитокератин 5/6 или онкоген EGFR при дефиниране и определяне на базалоидния подтип. Според експертите използването на мултигенни сигнатури за туморно субтипизиране не е необходимо и се ограничава до отделни случаи.

Подтип *луминален A* е подходящ за лечение само с ендокринна терапия, с изключение на случаи с позитивни аксиларни лимфни възви.

Подтип *луминален B*, негативен за

HER-2 експресия/амплификация и по-слабо позитивен за ER и/или PgR, е с висока пролиферативна активност и предполага лечение, освен с ендокринна терапия, и с химиотерапия, в зависимост от характеристиките на пациента.^{13, 25, 26}

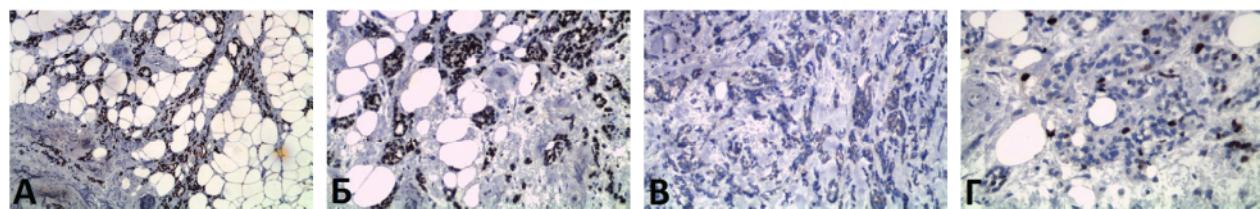
Подтип *луминален B*, позитивен за HER-2-експресия/амплификация и позитивен за ER и/или PR, без значение от стойности на Ki-67-индекс, налага лечение, освен с ендокринна терапия, и с химиотерапия плюс анти-HER-2-агент.

Подтип *нелуминален*, показващ HER-2-експресия/амплификация, е подходящ за лечение със системна химио- и анти-HER-2-терапия поради негативност за хормонални рецептори, независимо от пролиферативен индекс.

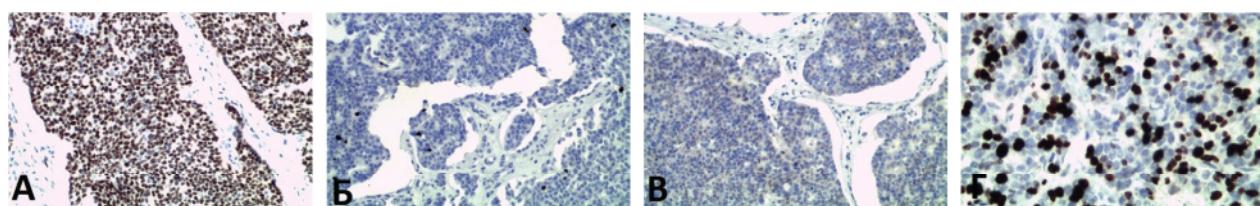
Съгласно препоръките, според дефинираните клиникопатологични показатели и субтипове е възможен избор на терапевтичен подход. Особено внимание се обръща на т. нар. специални видове КГ, които се разделят на естроген-зависими (ендокринно отговарящи) и естроген-независими (ендокринно неотговарящи). От втората група без последваща химиотерапия могат да бъдат третирани аденоиднокистичният и нискостепенният аденосквамозен карцином, нискостепенните тройногативни тумори, подобни на слюнчена жлеза, типичният медуларен карцином при пациенти с негативен нодален статус.²⁷

L. Harris *et al.*, използвайки 50-генен предиктивен вътрешен класификаторен набор от селектирани гени за идентифициране на прогнозни и предиктивни параметри (PAM 50), установяват, че не всички тройногативни карциноми са базалоидни и обратно – не всички базалоидни тумори, определени с методите на генно профилиране, са с тройногативен имунофенотип. Авторите намират също, че 6% от клинично HER-2-позитивните групи са класифи-

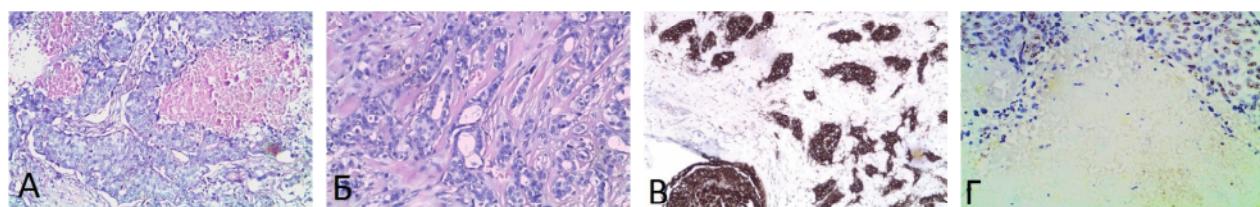
ПАТОЛОГИЧНО СУБТИПИЗИРАНЕ НА КАРЦИНОМ НА ГЪРДА



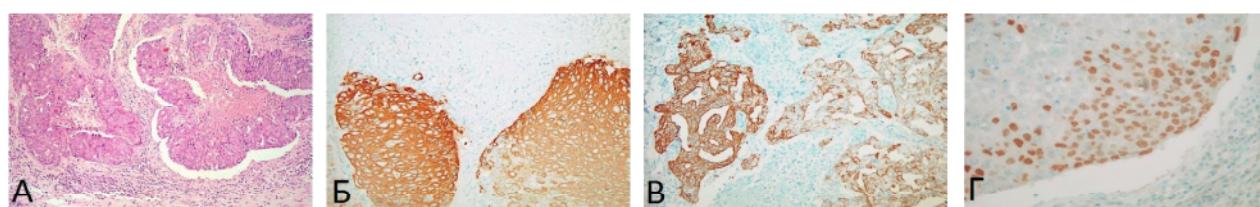
Фигура 1. Подтип луминален А: (A) инвазивен дуктален карцином, NST, G1, ER позитивен; (B) PgR-позитивен; (C) HER-2-негативен; (D) ниска пролиферативна активност, определена с Ki-67 (под 10%).



Фигура 2. Подтип луминален В: (A) инвазивен дуктален карцином, NST, ER-позитивен; (B) PgR-позитивен в 10% от туморните ядра; (C) HER-2-негативен; (D) висока пролиферативна активност с Ki-67 50%.



Фигура 3. Подтип HER-2-позитивен/амплифициран: (A, Б) инвазивен дуктален карцином, NST, G3, зони на комедонекрози; (В) имунофенотип с IXX-3+(силно и пълно мембрano оцветяване на туморни клетки); (Г) амплификация на HER-2-ген, установена с CISH.



Фигура 4. Подтип тройненегативен: (A) инвазивен G3 карцином с обширни зони на "географски" некрози; (Б) позитивно имунооцветяване за CK 5/6; (В) позитивно имунооцветяване за EGFR; (Г) позитивно имунооцветяване за p53 в ядрата на туморни клетки.

цирани като базалоидни с методите на генетичен анализ и по литературни данни тази група е с лош отговор при лечение с *trastuzumab* и *vinorelbine*.³⁴ Според Parker *et al.* базалоидни тумори, определени от една страна с ИХХ-методи и *in situ* хибридизация, и от друга страна – с методи на генно профилиране, не са синоними и се припо-

криват само в 70-80%.³⁵ Някои бавно растящи базалоидни тумори, които не показват експресия на пролиферативни гени, могат да бъдат причислени към субтип с нисък клаудин.³⁶ Преобладаваща група от клинично HER-2-негативни тумори са дефинирани с методите на генетично профилиране като луминални (56%), 9% са класифицирани като

HER-2-”обогатени” и 24% – като базалоиден тип. Използвайки двата метода (генетичен анализ за субтизиране и ИХХ), в групите, определени като ER-позитивна, ER-негативна, HER-2-позитивна и HER-2-негативна, се установява, че разпределението на молекулярните подтипове в ИХХ-категории е вариабилно. Налага се изводът, че само хормоналният и HER-2 статусът, определени самостоятелно с ИХХ и/или с метод на *in situ* хибридизация, не могат еквивалентно да заместват молекулярните субтипове и не са точен сурогат по отношение на молекулярната таксономия на КГ.

Заключение

Използваната настояща класификация на КГ е описателна и по-скоро притежава прогностично значение. В бъдеще ще се развиват предиктивни класификационни модели с цел стратификация на пациенти и формиране на клинично значими групи. Молекулярната класификация в настоящия момент не е готова за приложение в клиничната практика поради икономически, технически и други проблеми, свързани със стандартизация и липса на унифицирани дефиниции на отделни субтипове, на брой и набор от използвани гени.

Първото поколение прогностични сигнатури допълват хистологията и са детерминирани от определяне на пролиферация, с по-голямо значение за групата на естроген-позитивните тумори. Групата на естроген-негативни тумори е хетерогенна, с лоша прогноза и е необходимо да се използва второ поколение сигнатури, с определяне на гени, свързани с имунния отговор, които към настоящия момент са с предимно прогностично клинично значение и не могат да бъдат решаващи за избор на лечение.

Молекулярните подтипове могат да бъдат приблизително определени, използвайки имунохистохимични сурогати. С по-

мощта на новите технологии независимо от постигнатия напредък в разбирането на КГ като хетерогенна болест, липса при покриване между вътрешни молекуларни подтипове и тези – определени с методите на ИХХ.³⁷ Препоръчва се използване на съставни молекуларни и имунохистохимични сигнатури с цел по-точно установяване на туморния подвид и съвместно използване на двата метода, които да се допълват в процеса на вземане на решение за подходящо лечение.

Молекуларните сигнатури и ИХХ субтипове позволяват селекция на пациенти, подходящи за индивидуализирана терапия, а задълбочените изследвания в тази област ще позволяят и намиране на нови таргети за лечение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Geyer FC, et al. The role of molecular analysis in breast cancer. *Pathol* 2009; 41(1): 77-88
2. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6(12): 718-730
3. Perou CM, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406(6797): 747-752
4. Sørlie T, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(19): 10869-74.
5. Reid J, al. Limits of predictive models using microarray data for breast cancer clinical treatment outcome. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 927-930
6. Park PJ, et al. Current issues for DNA microarrays: platform comparison, double linear amplification, and universal RNA reference. *J Biotechnol* 2004; 112: 225-245
7. Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet* 2011; 378: 1812-1823
8. Hennessy BT, et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res* 2009; 69(10): 4116-4124
9. Prat A, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010; 12(5): R68. Epub

ПАТОЛОГИЧНО СУБТИПИЗИРАНЕ НА КАРЦИНОМ НА ГЪРДА

10. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *The Oncologist* 2011; 16: 61-70
11. Harrell JC, et al. Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 132 (2): 523-535
12. Farmer P, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 2005; 24(29): 4660-4771
13. Hu Z, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 2006; 7: 96
14. Lehmann JC, et al. Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER2 or GCDFP15. *Breast Cancer Res* 2013; 15: R37
15. Niemeier LA, et al. Androgen receptor in breast cancer: expression in estrogen receptor-positive tumors and in estrogen receptor-negative tumors with apocrine differentiation. *Mod Pathol* 2010; 23: 205-212
16. Onitilo AA, et al. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: Comparison of clinicopathologic features and survival. *Clin Med Res* 2009; 7 (1-2): 4-13
17. Bhargava R, et al. Breast cancer molecular class ERBB2: preponderance of tumors with apocrine differentiation and expression of basal phenotype markers CK5, CK5/6, and EGFR. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010; 18 (2) :113-118
18. Spitale A, et al. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Ann Oncol* 2009; 20 (4): 628-635
19. Carey LA, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 2006; 295 (21): 2492-2502
20. Torsten ON, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5367-5374
21. Cheang M, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1368. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1658
22. Tischkowitz M, et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 2007; 7:134 doi:10.1186/1471-2407-7-134
23. Laakso M, et al. Basoluminal carcinoma: A new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4185-4191
24. Jumppanen M, et al. Basal-like phenotype is not associated with patient survival in estrogen-receptor-negative breast cancers. *Breast Cancer Res* 2007; 9: R16 doi: 10.1186/bcr1649
25. Desmedt C, et al. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5158-5165
26. Rouzier R, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5678-5685
27. Goldhirsch A, et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann Oncol* 2011; 22: 1736-1747
28. Kenneke H, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 2010; 28(20): 3271-3277
29. Eroles P, et al. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev* 2012; 38: 698-707
30. Dowsett M, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst* 2011; doi: 10.1093/jnci/djr393
31. Bosch A, et al. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev* 2010; 36 (3): 206-215
32. Nielsen TO, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (16): 5367-5374
33. Diaz LK, et al. Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: from expression profiling to clinical practice. *Adv Anat Pathol* 2007; 14: 419-430
34. Harris LN, et al. Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive early breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 13: 1198-1207
35. Parker JS, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1160-1167
36. Herschkowitz JI, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* 2007; 8: R76
37. Guiu S, et al. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann Oncol* 2012; 23 (12) :2997-3006. doi: 10.1093/annonc/mds586

38. Gerdes J, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20
39. Kill IR. Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillarin-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci* 1996; 109 (6): 1253-1263
40. Starborg M, et al. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci* 1996; 109 (1): 143-53
41. Urruticoechea A, et al. Proliferation marker Ki-67 in earlybreast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7212-7220
42. de Azambuja E, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12.155 patients. *Br J Cancer* 2007; 96: 1504-1513
43. Viale G, et al. Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 207-212
44. Rudolph P, et al. Correlation between p53, c-erbB-2, and topoisomerase II alpha expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node-negative breast carcinomas: prognostic implications. *J Pathol* 1999; 187: 207-216
45. Spyrats F, et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value. *Cancer* 2002; 94: 2151
46. Brown RW, et al. Prognostic value of Ki-67 compared to S-phase fraction in axillary node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 585-592
47. Liu S, Edgerton SM, et al. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1716-1723
48. Trihia H, et al. Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors – a surrogate marker? *Cancer* 2003; 97: 1321-1331
49. Bottini A, et al. Relationship between tumour shrinkage and reduction in Ki67 expression after primary chemotherapy in human breast cancer. *Br J Cancer* 2001; 85: 1106-1112
50. Nicholson RI, et al. Relationship between EGF-R, c-erbB-2 protein expression and Ki67 immunostaining in breast cancer and hormone sensitivity. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 1018-1023
51. Nielsen TO, et al. International Ki-67 in Breast Cancer Working Group. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103 (22): 1656-64
52. Goldhirsch A, et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 2011; 22 (8): 1736-4177
53. Chieng DC, et al. Assessment of biomarker expression in predicting pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer. *Breast J* 2007; 13: 534-535
54. Keam B, et al. Prognostic impact of clinicopathologic parameters in stage II/III breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel and doxorubicin chemotherapy: paradoxical features of the triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 2007; 7: 203
55. Smith IE, et al. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5108-5116
56. Dowsett M, et al. Prognostic value of Ki 67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 167-170
57. Dowsett M, et al. IMPACT Trialists Group. Prognostic value of Ki 67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99 (2): 167-170
58. Dowsett M, et al. International Ki-67 in Breast Cancer Working Group. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103 (22): 1656-1664