

Fiatal korban előforduló emlőcarcinomák patológiai és molekuláris patológiai sajátosságai és ezek összefüggése a prognózissal

Doktori tézisek

Dr. Madaras Lilla

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Kulka Janina, Ph.D., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Ács Nándor, Ph.D., egyetemi tanár

Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sótonyi Péter, MTA tagja, professor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lászik András, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Pápai Zsuzsanna, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest

2015

BEVEZETÉS

Az emlőrák a nők körében a leggyakrabban diagnosztizált rosszindulatú daganat a világon, évente egymillió új nőbeteget érint. Bár az emlőrák a posztmenopauzális nők betegsége elsősorban, a betegek mintegy 5,5%-a 40 évesnél, 2%-a 35 évesnél fiatalabb a diagnózis idején. Az EUSOMA (European Society of Breast Cancer Specialists) ajánlásában fiatalkori emlőrákként a 40 éves vagy annál fiatalabb nők emlőrákját, míg nagyon fiatalkori emlőrákként a ≤ 35 éves nők emlőrákját definiálja.

Az emlő rosszindulatú daganatai döntő többségükben hám eredetűek, leggyakoribb formájuk az invazív (ductális) carcinoma, kevésbé gyakoriak a lobularis carcinomák (mindkét formához társulhat, de önállóan is jelentkezhethet in situ formájuk is) és egyéb speciális formák (pl. tubuláris-, micropapilláris carcinoma).

Genomikai vizsgálatok alapján az emlőrák 6 fő csoportra osztható: Luminalis A, Luminalis B, Her2-enriched, bazális, molekuláris apocrin és caludin-low, melyek jelentősen különböznek előfordulásukat és prognózisukat, valamint a kezelésre adott válaszukat tekintve. A genetikai szubtípusokhoz hasonlóan immunhisztokémiailag is tovább karakterizálhatóak az ER+ és ER-tumorok, melynek a további kezelés szempontjából van prediktív szerepe. Az ER+ csoporton belül a Luminális A és Luminális B proliferáló (HER2-) szubtípust a proliferációs aktivitás (Ki67 index), illetve a PgR kifejeződése különíti el, míg a Luminalis B másik alcsoportjában az ER pozitivitás mellett, a HER2 is amplifikált, illetve a fehérje expressziója fokozott. Az ER negatív csoportban megkülönböztetjük a Her2 pozitív (vagy újabban Her2-enriched) szubtípust, illetve a tripla negatív (ER-, PgR-, Her2-) szubtípust.

A fiatal nők emlőrákjának biológiája kedvezőtlen: gyakoribb, hogy a tumor hormon receptor negatív, HER2 overexpressziót mutat, magas grádusú (grade 3), és kifejezett proliferációs aktivitás jellemzi. Számos tanulmány igazolta, hogy a fiatal nők emlőrákjának prognózisa rossz, idősebbekkel összehasonlítva sokkal gyakoribb a locoregionális és szisztémás relapszus, és a betegség miatt elhalálozott fiatal nők aránya is magasabb. A fiatalkori emlőrák általában előrehaladottabb stádiumban kerül felfedezésre, amelyben szerepe lehet annak is, hogy e korcsoport (≤ 45 év) a nem szűrt populációba tartozik. A fiatal betegek emlőrákra vonatkozó családi anamnézise gyakran pozitív, a genetikai predispozíció lehetősége (elsősorban a BRCA tumorszupresszor gének csírasejtes mutációja) mindig felmerül.

A fiatal emlőrákos nők néhány egyedi problémával is találkozhatnak, mely életkori sajátosságaikból következnek; szembesülniük kell azzal a ténnyel is, hogy a kezelés hatására terméketlenné válhatnak, így még nem szült, vagy további gyermekvállalást tervező nők esetében a fertilitás megőrzése fontos kérdés. A fiatal nők (és partnerük) pszichés vezetésének - a rák diagnózis feldolgozása mellett- a szexualitás, a testkép kérdéskörét is érintenie kell. A fiatal életkor a családalapítás ideje, az emlőrák esetek 0,6%-a terhességhez köthető: a betegség tényére a terhesség vagy a szoptatás ideje alatt, illetve a posztpartum időszakban derül fény.

A terhességnek kettős hatása van az emlőrák kialakulását tekintve: bár hosszú távon protektív, epidemiológiai vizsgálatok alapján az is ismert, hogy a szülést követő időszakban átmenetileg fokozza az emlőrák kialakulásának kockázatát. Ez az emelkedett rizikójú időszak 2-15 év lehet, sőt, idős primipara nők esetében akár ennél is hosszabb.

A terhességi emlőrák incidenciája a fejlett országokban 1/10000-1/3000 terhesség. Várhatóan növekvő gyakorisággal találkozunk ezzel a kórképpel, miután a nők első gyermeküket egyre későbbi életkorban vállalják, az életkor emelkedésével pedig a daganatok előfordulási valószínűsége is nő.

CÉLKITŰZÉS

Fiatalkori és idősebb betegeket érintő emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők és kimenetel alapján

E tanulmányunkban azt vizsgáltuk, van-e különbség a grade, a T és N stádium, az IHC-alapú szubtypusainak megoszlásában a nagyon fiatal és az idősebb betegek emlőrákja között? Arra is kerestük a választ; van-e különbség a fiatal emlőrákos nők prognózisában, ha a pozitív emlő- és petefészekrák családi anamnézisű betegek túlélését hasonlítjuk össze a negatív családi anamnézisű betegekével, illetve ha a negatív családi anamnézisű betegek túlélését hasonlítjuk össze azon betegek túlélésével, akiknek a családjában bármilyen malignus betegség már előfordult (nem kizárólag emlő-, vagy petefészek rák)? További kérdés volt, hogy függ-e a túlélés az alkalmazott kezeléstől (neoadjuváns vs adjuváns) és egyáltalán van-e különbség a nagyon fiatal és az idősebb emlőrákos nők túlélésében?

Fiatal- és időskori emlődaganatok morfológiai és molekuláris sajátosságainak összehasonlítása

Arra kerestük a választ, hogy a daganatok morfológiai és immunhisztokémiai sajátosságai mennyire térnek el a rosszabb prognózisú fiatalkori és az általában kedvezőbbnek vélt, idősebb nőket érintő tumorokban? Milyen mértékű az intratumorális heterogenitás a két vizsgált csoportban?

A BRCA mutáció státusz előrejelzése a BRCAPRO algoritmussal

Előrejelezhető-e a BRCA mutáció státusz az általunk kiválasztott fiatalkori emlőrákos kohortban a részletes családi anamnézis és a fiatalkori emlőrák esetek immunhisztokémiai tulajdonságainak ismeretében?

BRCA mutáns és claudin-low emlőtumorok: közös leszármazottak?

Kimutatható-e a claudin-low fenotípus halmozódása BRCA mutáció asszociált emlőrákban?

A terhességi emlőrák klinikopatológiája és kimenetele

E munkánkban azt vizsgáltuk, van-e különbség terhességi emlőrák eseteink és a hozzájuk párosított kontroll - nem terhességi - emlőrák esetek között a klinikopatológiai jellemzőkben? A tumorok immunhisztokémiai sajátosságai, IHC-alapú szubtípusa eltérnek-e a két csoportban? Van-e különbség az alkalmazott kezelés tekintetében a terhességi és nem terhességi emlőrák esetekben? Van-e különbség a két csoport prognózisában?

MÓDSZER

Fiatalkori és idősebb betegeket érintő emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők és kimenetel alapján

Betegek. 1999. január 1 és 2009. december 31. között a Semmelweis Egyetem II.sz Patológiai Intézetének archivumában fellelt százhet, 35 éves vagy annál fiatalabb emlőrákos nő esetét elemeztük. Ezen esetek klinikopatológiai adatait összevetettük 55 nő (36-45 év) -2. csoport, 214 nő (46-65 év) -3. csoport, 110 nő (66-75 év) -4. csoport és 58 nő (idősebb, mint 75 éves) -5. csoport adataival. *Patológiai jellemzők, immunhisztokémia.* A tumor kórszövettani típusát, mag grade-jét, ösztrogén receptor (ER), progesteron receptor (PgR) expresszióját, Ki67

proliferációs indexét és Her2 expresszióját vizsgáltuk. Ahol a Her2 IHC vizsgálat és a HER2 FISH eredménye nem egyezett az expresszió tekintetében, ott az érvényben lévő ajánlásoknak megfelelően a HER2 FISH vizsgálat eredményét tekintettük mérvadónak. *IHC szubtypusok.* Az immunhisztokémiai reakciók eredménye alapján meghatároztuk a szubtypusokat: Luminalis A-nak (LumA) tekintettük azon ER+ és PgR+/- tumorokat, amelyek Ki67 proliferációs indexe 20% alattinak bizonyult, Luminalis B-nek (LumB) az ER+ és PgR+/- tumorokat, amelyek Ki67 proliferációs indexe 20% felett volt, vagy ugyanakkor Her2 expressziót is mutattak. Az ER-, PgR- és Her2- tumorokat a tripla negatív (TNBC), míg az ER-, PgR- de Her2+ tumorokat a Her2+ szubtypusba soroltuk. *Anamnézis.* A ≤35 éves betegeknek és családjuknak részletes kérdőívet küldtünk, amelyben egyéni és családi anamnézisükre vonatkozó kérdések szerepeltek. *Statisztika.* A különböző életkori csoportok klinikopatológiai és prognosztikai adatait χ^2 teszttel és Kruskal-Wallis teszttel hasonlítottuk össze. A relapsus mentes túlélést Kaplan-Meier módszerrel vizsgáltuk. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0.05$ -t tekintettük. A statisztikai elemzés a Statistica 9.0 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA) és az SPSS 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) segítségével történt. Vizsgálatunkat a Semmelweis Egyetem Regionális Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta (TUKEB 17/2006.)

Fiatal- és időskori emlődaganatok morfológiai és molekuláris sajátosságainak összehasonlítása

Betegek. Negyvenegy fiatal (≤ 35 év) és 33 idős (>65 év) emlődaganatos beteg tumorát vizsgáltuk (TUKEB 17/2006, 141/2009). *Hisztomorfológia.* A daganatszövetet -reprezentatív blokkjaiból lemetszés után készített HE-festett metszeteken- a morfológiai megjelenés alapján területekre osztottuk. Az egyes területeket a metszetek digitalizálása után (Mirax MIDI, 3DHistech Kft, Budapest) annotáltuk. *Immunhisztokémia (IHC) és fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH).* Az IHC reakciókat intenzitás (0-3) és eloszlás (0-100) szerint értékeltük, majd a kapott intenzitás és eloszlás értékeket összeszoroztuk, 0-300 értéket kapva (Histoscore). FISH vizsgálat esetében a 2.2 feletti Her2/CE17 arányt tekintettük amplifikáltnak. Nem amplifikáltnak értékeltük a 2.2 alatti, és poliszómiásnak a 3 feletti centromer kópiát hordozó tumorsejteket. *Statisztika.* Az értékelést SPSS 15.0 Family Pack szoftverrel végeztük (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A területek értékelésekor kapott eredmények összehasonlítására chi-négyzet tesztet alkalmaztunk, a statisztikai tesztek kétoldalúak voltak.

A BRCA mutáció státusz előrejelzése a BRCAPRO algoritmussal

Betegek. 2000. január 1. és 2007. december 31. között diagnosztizált 35 éves vagy fiatalabb emlőrákos nőbeteg esetét elemeztük (TUKEB 17/2006). Azért a 35 éves vagy fiatalabb emlőrákos nők eseteit vizsgáltuk, mert az érvényben levő ajánlások szerint e betegek BRCA genetikai vizsgálata indokolt. *Anamnézis.* A családi érintettség felmérésére egy általunk összeállított, 18 kérdésből álló kérdőívet használtunk. *Patológiai jellemzők, immunhisztokémia, fluoreszcens in situ hybridizáció.* A fiatal nők invazív emlőrákjának szövettani típusát, differenciáltságát, ösztrogén receptor (ER)-, progeszteron receptor (PgR) expresszióját, Her2 státuszát és cytokeratin 5/6 (CK5/6) kifejeződését vizsgáltuk. *BRCAPRO algoritmus.* A BRCA mutáció hordozási valószínűségének előrejelzéséhez komputerezált statisztikai modellt- BRCAPRO (CancerGene, BayesMendel, Dallas, TX, USA) alkalmaztunk. Ha a beteg BRCAPRO által értékelt, BRCA mutáció státuszra vonatkozó hordozási valószínűsége eléri a 10%-ot, genetikai vizsgálat indokolt. *Genetikai vizsgálat.* A BRCA1/2 gének vizsgálatának eredményeihez az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris Genetikai Osztályának jóvoltából jutottunk.

BRCA mutáció asszociált és claudin-low emlőrák: közös leszármazottak?

In silico betegcsoport. Tizenhat BRCA mutáció hordozó (BRCAmut) (12 GSE50567, 2 GSE18864 és 2 GSE 3744), és 17 BRCA vad típusú tumor (BRCAwt) -mint kontroll- (10 GSE18864 és 7 GSE50567) génexpressziós adatait használtuk fel három korábban publikált, nyilvánosan elérhető adatbázisból. Esetkontroll vizsgálatot végeztünk, amelyben az ER státusz és a betegek életkora is ismert volt. Mintavétel előtt egyik beteg sem részesült (neoadjuváns) kezelésben. A kiválasztott és letöltött nyers .CEL file-okat MAS5 algoritmus szerint R statisztikai környezetben normalizáltuk Affymetrix Bioconductor könyvtár alkalmazásával (R, version 2.10.1, Vienna, Austria) *Az immunhisztokémiai vizsgálatba bevont betegek.* A Chaim Sheba Medical Center (CSMC), Tel Hashomer, Izrael betegeiből összeállított vizsgálati csoportba 22 BRCA mutációt hordozó nő került, akiknek hozzáférhető formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) emlőtumor szövetük volt. BRCA mutációjukat korábban Sanger szekvenálás igazolta, ismert volt a mutáció anyai vagy apai eredete is. A kontroll csoportba 19 emlőrákos nő került, akiknek műtéti anyaga a Semmelweis Egyetem II.Sz. Patológiai Intézetében került feldolgozásra, míg BRCA mutáció analízisük a Semmelweis Egyetem I.Sz Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében történt. (A CSMC és a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága a kutatást 0144-13-SMC és IKEB-17/2006,

139/2009, 141/2009 szám alatt hagyta jóvá.) *Szöveti multiblokk technika.* Az FFPE blokkokat és metszeteiket két patológus értékelte (Madaras Lilla, Nóra Bálint Lahat) és szöveti multiblokk (tissue microarray, TMA) készült az egyes tumorokból (2-3 henger 2 mm átmérőjű szövet az invazív tumorból esetenként, összesen 2 blokkba ágyazva) az MTA-1 TMA készítő eszközzel (Beecher Instruments, Inc., Sun Prairie, WI, USA). *Immunhisztokémia, fluoreszcens in situ hybridizáció.* A standard eljárásoknak megfelelően a következő antitestekkel végeztünk immunhisztokémiai reakciókat: AR, CD24, CD44, CK5/6, claudin-1, claudin-3, claudin-4, claudin-7, E-Cadherin, EGFR, ER, EZH2, HER2, Ki67, P53, PgR, vimentin. A metszeteket Panoramic 250beta metszetszkennel (3DHistech Ltd., Budapest, Hungary) digitalizáltuk. Az immunhisztokémiai reakciók értékelésénél a reakció intenzitását (0-3) és kiterjedését (0-5) vettük figyelembe, egy az Allred score-hoz hasonló kombinált értéket hozva létre (0, 2-8). A Ki67 immunhisztokémiai reakció értékelése 0-100% skálán történt. Az ER és PgR expressziójának kvantifikálása az Allred rendszer szerint történt. A Her2 expresszió értékelése a standard 0-3+ skálán történt, FISH vizsgálatot a score 2+ esetekben végeztünk. Egyéb immunhisztokémiai reakciók esetében, a <3 értéket negatívnak, a 3-4 -et alacsony, és a 4< értéket magas expressziójúnak értékeltük. *Genetikai szubtipusok.* A nyilvános microarray adatbázisból származó betegek daganatai esetében rendelkezésre álltak azon gének kifejeződését jellemző számok is, amelyek segítségével a PAM50 emlődaganat altípus predictor által megadott szubtypust is meg tudtuk határozni az R statisztikai program alkalmazásával. *Statisztika.* Chi-négyzet próba értékeit vettük figyelembe ordinális változók statisztikai összefüggéseinek elemzése során. Parametrikus változók esetében kétmintás t-próbát alkalmaztunk SPSS 15.0 program segítségével (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A szignifikancia szintet .05 értéknél fogadtuk el.

A terhességi emlőrák klinikopatológiája és kimenetele

Betegek. Etikai engedély (TUKEB 17/2006, 3/2013) birtokában áttekintettük intézetünk adatbázisát és rögzítettük az 1998. január 1. és 2012. november 1. között diagnosztizált, 45 éves vagy fiatalabb nők emlőrák eseteit. *Patológiai jellemzők, immunhisztokémia, fluoreszcens in situ hybridizáció.* A hisztopatológiai adatokat: a tumor típusa, a grade, multifocalitás, az esetlegesen társult in situ léziók jellemzői, az invazív tumor mérete, a regionalis nyirokcsomó státusz, TNM státusz, a Nottingham Prognosztikai Index (NPI), lymphovascularis invázió jelenléte és az immunhisztokémiai jellemzőket: ER, PgR és Her2

expresszió, Ki67 proliferációs index és p53 expresszió értékeltük. Az immunhisztokémiai reakciók értékelése a vizsgálat idején érvényben lévő guideline-ok útmutatása alapján történt. Ahol a Her2 IHC vizsgálat és a HER2 FISH eredménye nem egyezett az expresszió tekintetében, ott az érvényben lévő ajánlásoknak megfelelően a HER2 FISH vizsgálat eredményét tekintettük mérvadónak. Az invazív tumort ER és/vagy PgR pozitívnak akkor tekintettük, ha a tumorsejtek legalább 10%-a mutatott intranuclearis pozitív reakciót. A Ki67 proliferációs marker esetében az ajánlásoknak megfelelően a legalább 14%-os labeling indexet tekintettük magasnak. *IHC szubtípus.* Az invazív tumor immunhisztokémiai jellemzői alapján megállapítottuk az IHC-alapú szubtípusát: ER (és esetlegesen PgR) pozitív tumorokat, amelyek Ki67 proliferációs indexe alacsony volt a Luminalis A (LumA) szubtípusba, ER (és esetlegesen PgR) pozitív tumorokat, amelyek Ki67 proliferációs indexe magas volt, vagy ugyanakkor Her2 expressziót is mutattak a Luminalis B (LumBprol vagy LumBHer2+) szubtípusba soroltuk, míg a hormon receptor negatív és Her2 expressziót mutató tumorok a Her2+ szubtípusba, valamint a hormon receptor negatív és Her2 expressziót sem mutató tumorok a tripla negatív szubtípusba kerültek. *Kezelési adatok, anamnézis, relapsus.* Áttekintettük a kiválasztott emlőrákos betegek Medsol adatait és rögzítettük a locoregionalis illetve szisztémás kezelésre vonatkozó információkat, a személyes és családi anamnesztikus adatokat, a szülésekre vonatkozó adatokat, valamint a betegség esetleges locoregionalis és/vagy szisztémás relapsusára vonatkozó információkat is. *Terhességi emlőrákos betegek.* A fentiek alapján kiválasztottuk a terhességi emlőrákos eseteket: azokat a betegeket, akinek emlőrákja a terhessége alatt jelentkezett, vagy a szülést követő 1 éven belül alakult ki. *Kontroll betegcsoport.* A fentebb említett két adatbázis alapján minden terhességi emlőrákos beteghez hozzá rendeltünk egy kontroll –nem terhességi emlőrákos- beteget életkora (± 1 év) és emlőrák diagnózisának éve (± 1 év) alapján. *Statisztika.* Nem egyenletes eloszlású folyamatos változó esetén a párosított Wilcoxon tesztet használtuk. Ordinális változók esetében a chi-négyzet és a Fischer-féle exact tesztet alkalmaztuk. A túlélési adatokat Kaplan-Meier módszerrel értékeltük. Összehasonlítást a túlélést tekintve log-rank statisztikával végeztünk. A prognosztikus faktorok multivariáns analízise a Cox-féle regressziós modell segítségével történt. A különbségeket szignifikánsnak tekintettük, ha $p \leq 0.05$ volt. A statisztikai értékelést a Statistica 9.0 szoftverrel (StatSoft Inc. Tulsa, OK) végeztük.

EREDMÉNYEK

Fiatalkori és idősebb betegeket érintő emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők és kimenetel alapján

A fiatalkori emlőrákos betegek medián életkora 31,64 év volt (tartomány: 22-35 év). Az esetek 67,96%-ában (70 beteg) a tumor alacsonyan differenciált (grade III) volt és csak 4 esetben (3,73%) volt a tumor magasan differenciált (grade I). Kilencvenkilenc esetben tudtuk meghatározni az immunhisztokémiai paramétereken alapuló szubttípust: LumA volt az esetek 22.22%-a, LumB 35.35%-a, Her2+ 9.09%-a, míg TNBC 33.33%-a. A kontroll csoportok medián életkora: 2. csoport (36-45 év): 41.95, 3. csoport (46-65 év): 54.53, 4. csoport (66-75 év): 70.09, 5. csoport (76 évnél idősebbek): 80.66.

Szignifikáns különbség volt a nagyon fiatal nők és az egyéb életkori csoportok között az IHC-alapú szubttípus, a grade, a T és az N stádium tekintetében, azonban a mm-ben mért tumor méret nem mutatott számottevő eltérést.

A családi és egyéni anamnézissel kapcsolatos kérdőívre ebben a vizsgálatban válaszoló 49 fiatal beteg (45.79%) közül 25 esetben (51.02%) fordult elő a betegek első-, vagy másodfokú rokonai között emlő- vagy petefészekrák. Tizenhárom esetben (26.53%) volt a betegek családi anamnézise negatív, míg 11 esetben (22.44%) egyéb rosszindulatú daganatos betegség jelentkezett a családban. Összehasonlítva a pozitív családi anamnézisű fiatal emlőrákos eseteket a negatív anamnézisűekkel, az előbbi esetek 52%-a TNBC volt, míg az utóbbi csoportban a LumA szubttípusú daganat volt a leggyakoribb (46.15%).

A különböző életkori csoportok túlélési adatait vizsgálva a nagyon fiatal betegek csoportja mutatta a legrosszabb prognózist. A vizsgálati periódus végéig a 35 éves vagy fiatalabb 107 nőbeteg közül 25 halt meg (23.36%). Nem volt szignifikáns különbség a pozitív emlő- vagy petefészekrák családi anamnézisű betegek és a negatív családi anamnézisű betegek túlélése között (az ismert családi anamnézisű esetek száma alacsony). Ötvenhat esetben állt rendelkezésünkre a fiatal nőbetegek pontos kezelésével kapcsolatos információ. Huszonnégy beteg (22.42%) részesült neoadjuváns, míg 32 beteg (29.9%) adjuváns kezelésben. Ötvenegy esetben (47.66%) a kezelésekkal kapcsolatban nem volt információnk. Nem volt szignifikáns különbség a túlélésben az alkalmazott kemoterápia (neoadjuváns vs adjuváns) függvényében, bár a neoadjuváns kezelés terápiai előnyre utaló tendenciát mutatott.

Fiatal- és időskori emlődaganatok morfológiai és molekuláris sajátosságainak összehasonlítása

A morfológiai heterogenitás alapján a 41 fiatalkori tumorból 19 esetben (46,3%) viszonylag homogénnek mondható területek voltak láthatóak: a daganat egykomponensű volt. Tizenhét (41,5%) tumor esetében két területet különböztettünk meg. Két daganat bírt 4 régióval (4,8%). Egy-egy tumor (2,4-2,4-2,4%) volt három, öt, illetve hat területre osztható a szöveti kép alapján. Az időskorúak közül 20 (60,6%) volt egy-, 10 (30,3%) két-, és 3 (9,1%) háromkomponensű daganat. A fiatalkorúak között a tumorrégiók átlagos száma 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. 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 tumorrégiók között kétféle intenzitású reakciót láttunk az ösztrogén-receptor kifejeződést tekintve: egy negatív, illetve egy Histoscore szerinti 60 pontos területet.

Az immunhisztokémiai reakciók értékelésekor a fiatalkori daganatok esetében az ösztrogén-receptor kifejeződését tekintve 6 esetben (14,6%), a progeszteron-receptornál ugyancsak 6 (14,6%), a Her2 festődésnél 8 (19,5%), a Ki67 kifejeződésnél 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 ösztrogén-receptor ellenes IHC reakcióban 6 (18,2%), a progeszteron-receptor ellenes IHC reakcióban 3 (9,1%), a Her2 immunhisztokémiai metszeteket áttekintve nulla, a Ki67-festődésnél 7 esetben (21,2%) láttunk egy daganaton belül egymástól eltérő területeket. Az egyik, 2 morfológiai komponensű, összességében HER2 amplifikált esetben a tumor egyik régiója nem mutatott génszokszorozódást. Ugyanebben az esetben figyeltük meg azt a jelenséget, hogy a TOP2A gén normális kópiaszáma mellett izolált HER2 génamplifikáció volt detektálható. A fiatal- és időskori daganatok esetében az egyes tumorrégiók között a HER2 immunhisztokémiai heterogenitása tekintetében találtunk szignifikáns különbséget ($p = 0,007$). Az ösztrogén- ($p = 0,681$), progeszteronreceptor ($p = 0,468$), p53 ($p = 0,552$) és Ki67 (0,220) esetében csak tendenciák voltak megfigyelhetőek.

A BRCA mutáció státusz előrejelzése a BRCAPRO algoritmussal

A Központi Adatfeldolgozó, Nyilvántartó és Választási Hivataltól megkaptuk a fellelhető betegek elérhetőségeit. Az általuk nyilvántartottak szerint vizsgálatunk idején (2008. február) a 73 beteg közül 60 nő élt. A kérdőívünkre válaszoló 32 beteg családjában összesen 73 rosszindulatú daganatos megbetegedés fordult elő (átlag 2.28 malignus tumor/család. A legtöbb családban 1-1 tumor jelentkezett, azonban 3 családnál családonként 5-5 rosszindulatú daganatos betegséget regisztráltunk.

A 32 vizsgált betegből tizenegyen 10% feletti valószínűséggel hordoznak BRCA1 mutációt. A mutációt nagy valószínűséggel hordozók csoportjában három beteg tumora TNBC, hét betegé bazális fenotípusú, egy fiatal nőé pedig FISH vizsgálattal Her2 pozitív. BRCA2 esetében 2 beteg eredménye haladja meg a 10%-ot. Az ő daganataik immunfenotípusa hormonreceptor negatív (ER- és PgR-). Az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris Genetikai Osztályának nyilvántartása szerint az általunk intézetünk adatbázisában fellelt 73 beteg közül mindössze 11 fiatal nő esetében végeztek genetikai vizsgálatot. A részletes vizsgálatunkban szereplő 32 beteg közül 5 fiatal nő BRCA tesztjét végezték el. Hármójuknál BRCA1 mutáció jelenléte igazolódott, két beteg vizsgálata negatív eredményt adott. BRCA2 mutáció nem fordult elő.

BRCA mutáció asszociált és claudin-low emlőrák: közös leszármazottak?

In silico betegcsoport vizsgálata. A közölt génexpressziós adatok alapján meghatároztuk azokat a géneket (BRCA100), amik leginkább megkülönböztetik a BRCAmut és BRCAwt mintákat. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a claudinok ebben az elkülönítésben alkalmazhatóak-e. A CLDN1 (ROC=0.785, p=0.00026), CDH1 (ROC=0.785, p=0.00022), CLDN7 (ROC=0.723, p=0.0088), CLDN3 (ROC=0.696, p=0.020) és CLDN4 (ROC=0.685, p=0.027) fellelhető volt, de számos egyéb gén (BRCA100) alkalmasabbnak bizonyult a BRCAmut vs. BRCAwt csoportok elkülönítésében.

Összehasonlítva a claudinok expresszióját a két csoport között, CLDN 1, 3, 4, 7, 10 expressziója magasabb mRNS szinttel járt BRCAmut tumorokban, mint a BRCAwt esetekben (p=0.339, p=0.062, p=0.126, p=0.082 és p=0.784). Az ESR1, ERBB2 expressziója alacsonyabb volt BRCAmut vs. BRCAwt tumorokban (p=0.770 és p=0.477), ugyanakkor

EGFR, TP53, VIM és MKI67 magasabb expresszió felé mutató tendenciával járt a mutáns tumorokban ($p=0.179$, $p=0.064$, $p=0.002$ és $p=0.347$).

A PAM50 predictor klasszifikálta a tumorokat a különböző génexpressziós mintázaton alapuló-intrinsic szubtypus szerint, ami nem minden esetben felelt meg, a mintához korábban hozzárendelt IHC alapú szubtypusnak: 4 BRCAmut Basal-like eset Luminal B, míg 1 BRCAwt Basal-like eset Her2-E és 1 BRCAwt Luminalis eset Basal-like reklassifikációt kapott.

Az ún. „9-Cell Line Claudin-low Predictorban” szereplő pozitív és negatív prediktor géneket kerestük a publikált adatbázisból származó esetekben. Az Agilent array-ben megtalálható 437 pozitív predictor és 370 negatív predictor gén közül, 161 és 354 lelhető fel az Affymetrix array paneljében. Megvizsgáltuk, vajon a BRCAmut minták magasabb szinten expresszálják-e a pozitív predictor géneket, illetve alacsonyabb szinten expresszálják-e a negatív predictor géneket, mint a BRCAwt tumorok. A pozitív predictorok centroid \pm SD-je magasabb expressziós szintet mutatott a BRCAwt tumorok eseteiben (2258.73 \pm 716.39) mint a BRCAmut tumorokban (1904.40 \pm 544.27), $p=0.114$; míg a negatív gének expressziója alacsonyabb volt a BRCAwt tumorokban (1553.60 \pm 490.40) mint a BRCAmut esetekben (1621.82 \pm 360.62), $p=0.647$. Ezért e vizsgálataink alapján a BRCAmut tumorokra nem jellemző a claudin-low fenotípus, valamint a pozitív és negatív predictor gének alapján a BRCAmut tumorok nem alkotnak homogén csoportot.

Az immunhisztokémiai vizsgálatba bevont betegek. A FFPE mintával bíró betegcsoportban immunhisztokémiai tipizálást végeztünk. Egy-egy Her2 pozitív tumor fordult elő a BRCA1 és a BRCA2 mutáció hordozók között. A többi BRCA2 mutáns tumor Luminalis, míg a legtöbb BRCA1 mutáns tumor TNBC immunfenotípusú volt.

A claudin 1, -3 and -7 expressziója alig volt kimutatható a BRCAmut tumorokban, azonban a claudin 4 expressziója 45.5%-ukban volt megfigyelhető (10/22), az E-cadherin-t 68.5%-uk (15/22) expresszálta. Nem volt jelentős különbség ezen markerek expressziójában a BRCA1 és BRCA2 mutációt hordozó betegek tumorai között ($p=1.000$, $p=1.000$, $p=0.344$, $p=0.200$, $p=0.501$).

A minták többsége nem fejezte ki a CD24-et (81.8%, 18/22) de kifejezett pozitivitást mutatott CD44-gyel (77.3%, 17/22). EZH2 negatív volt 5 (22.7%), alacsony expressziójú 8 (36.4%) és pozitív 9 (40.9%) eset. A vimentin immunhisztokémiai reakció többnyire negatív volt (10,

45.5%) vagy alacsony expressziót mutatott (5, 22.7%), míg pozitívnak 7 esetben mutatkozott (31.8%). Az EGFR IHC reakció negatív volt 8 (36.4%), alacsony expressziójú 5 (22.7%), míg pozitív 7 (31.8%) esetben. Nuclearis p53 pozitivitás volt megfigyelhető az esetek 76.2%-ában (16/21).

Vizsgálataink alapján az apától örökölt BRCA mutációkhoz kapcsolódó tumorok esetében mind az ER, mind a PgR expressziója alacsonyabb volt, mint az anyától örökölt mutációhoz kapcsolódó tumorok eseteiben ($p=0.038$, $p=0.050$).

Összehasonlítva a BRCAmut és BRCAwt mintákat azt találtuk, hogy a BRCAmut tumorok kevésbé fejezik ki az ER-t és PgR-t, míg az EGFR, Her2 és p53 expressziója magasabb, mint a BRCAwt tumoroké. A CD24 és CD44 expressziója alacsonyabb, míg az EZH2 és vimentin kifejeződése magasabb volt a BRCAmut esetekben, a CD24/CD44 arány alacsony/magas volt e tumorokban, míg magas/magas a BRCAwt tumorokban. A tight junction molekulák és adhézis molekulák tekintetében a claudin-1, -4, 7 és E-cadherin expressziója volt alacsonyabb és a claudin-3-é magasabb a BRCAmut mintákban. A claudin 3-t kivéve, valamennyi marker kimutatható volt mind a BRCAmut, mind a BRCAwt esetekben: claudin3 expresszió azonban nem volt detektálható a BRCAwt tumorokban.

Szignifikáns pozitív és negatív korreláció volt kimutatható: legerősebb volt a pozitív korreláció a CD24 és CD44, valamint a claudin-1 között, a claudin-1 és claudin-4 valamint a Ki67 között; míg negatívnak bizonyult az E-cadherin és vimentin; illetve az EGFR és ER korrelációja.

A terhességi emlőrák klinikopatológiája és kimenetele

Klinikai adatok vizsgálata. Az áttekintett időszakban (1998.01.01-2012.11.01) harmincegy terhességi emlőrákos esetet találtunk, melyek közül 10 a terhesség alatt, 21 a szoptatás ideje alatt, illetve a szülést követő 1 éven belül manifesztálódott. Mindkét csoportban az életkor mediánja 34 év volt az emlőrák diagnózisakor. *A terhesség ideje alatt alkalmazott kezelések.* A terhesség ideje alatt felfedezett esetek között 3 beteg emlőrákja az első-, 6 betegé a második-, míg egy betegé a harmadik trimeszterben manifesztálódott. Hat beteg kapott sebészi kezelést (4 emlőmegtartásos műtét /BCS/, 2 mastectomia, mind a 6 esetben axillaris blokk disszekcióval/ALND/) még a terhessége alatt, amit a szülés után adjuváns kezelés követett 4 esetben. Egy beteg kapott neoadjuváns kemoterápiát, amit mastectomia követett

ALND-vel még a terhesség ideje alatt, majd a szülés után adjuváns kezelés. Egy betegnél történt a terhesség ideje alatt emlőmegtartásos műtét és adjuváns kemoterápia (6xFEC).

A terhesség kimenetele. Egy beteg terhességét a 23. gesztációs héten megszakították, 5 betegnél történt elektív császármetszés (29-34 gesztációs hét között), míg 4 beteg spontán szült (közülük 1 koraszülés).

A terhességi emlőrákos nők és a kontroll betegek kezelésének összehasonlítása. Nem volt szignifikáns különbség az esetek és kontrollok sebészi beavatkozását tekintve (BCS vs mastectomia). Mindkét csoportban elsősorban ALND történt az axilla ellátásában. A neoadjuváns, adjuváns kemo- ill. radioterápia gyakoriságának ill. az alkalmazott protokollok tekintetében sem volt a különbség szignifikáns. Adjuváns endokrin terápia kétszer gyakrabban fordult elő a kontroll csoportban. ($p=0.004$)

Relapszus- és túlélésbeli különbségek Terhességi emlőrákban a relapszus szignifikánsan gyakoribb volt, mint a kontroll csoportban ($p=0.003$), 14 nőbetegnél jelentkezett a betegség szisztémás kiújulása a PABC csoportban (45.2%), míg a kontroll csoportban 3 nőbetegnél (9.7%) ($p=0.0003$). A PABC esetekben a szisztémás relapszus a LumBprol alcsoportban volt a leggyakoribb (10-ből 6 betegnél fordult elő), ezt követte gyakoriságban a tripla negatív (TNBC) alcsoport (5 betegnél a 15-ből), ezek a betegek mind a betegségük következtében hunytak el. A betegségmentes és teljes túlélés szignifikánsan rosszabb volt a terhességi emlőrákos nők esetében ($p=0.0004$ és $p=0.0007$). Külön vizsgálva a terhes és posztpartum terhességi emlőrákos betegek túlélését a kontroll betegekhez képest, a posztpartum terhességi emlőrákos betegek betegségmentes ($p=0.001$) és teljes túlélése ($p=0.00008$) szignifikánsan rövidebb volt, mint a kontroll csoportba tartozó nőbetegeké. A terhes betegek betegségmentes túlélése szignifikánsan rosszabb volt, mint a kontroll betegeké ($p=0.007$), azonban teljes túlélésük nem különbözött szignifikánsan. A PABC kimenetele kedvezőtlenebb volt, 13 beteg hunyt el a betegsége következtében (41.9%) a terhességi emlőrákos nők közül, míg a kontroll csoportban 2 beteg (6.5%) halt meg az emlőrák következtében ($p=0.005$).

Anamnézis. A családi anamnézist illetően nem volt különbség a teljes- és az emlőrákra vonatkozó családi anamnézis tekintetében a két csoport között.

Patológiai adatok elemzése. A leggyakoribb szövettani típus mindkét csoportban a magas grádusú invazív ductális carcinoma (IDC) volt. A két csoport között nem volt szignifikáns különbség a tumor T és N stádiumában. Neoadjuváns kemoterápiával kezelt betegek esetében

tumor méretnek a kezelés előtti tumor méretet tekintettük a medián tumor méret számolásánál. Ez utóbbi a PABC esetekben 24 mm (tartomány: 10-100mm) volt, míg a kontroll eseteknél 22 mm (tartomány: 9-85mm) ($p=0.13$). A Nottingham Prognosztikai Index medián értéke PABC esetén 6 volt (tartomány:3.24-8.5) és 4,5 a kontrolloknál (tartomány:3,24-7,2). Ez alapján, összesítve, a PABC csoport a rossz prognózisú, míg a nem terhességi emlőrákos csoport a közepes prognózisú kategóriába sorolódott ($p=0.03$). A vizsgálat e részéből kizárásra kerültek azok a betegek, akik neoadjuváns kezelést követően patológiai komplett vagy parciális választ mutattak. A daganat nyirok- vagy vérerekben történő terjedése a terhességi emlőrákos esetek 61,3%-ban, míg a kontroll esetek 48,4%-ban volt megfigyelhető ($p=0.228$). A PABC esetek 58%-a, míg a kontroll esetek 38,8%-a bizonyult ER negatívnak. A PgR expressziója tekintetében a különbség szignifikáns volt a terhességi emlőrákos és a kontroll esetek között: míg a PABC esetek 87,1% volt PgR negatív, addig a kontroll esetek 61,3%-ban nem láttunk PgR expressziót ($p=0.04$). Nem volt jelentős különbség a két csoport között Her2 státusz és p53 expresszió tekintetében. Valamennyi ($p=0.01$). Az immunhisztokémiai szubttípus tekintetében a PABC esetek között leggyakrabban a TNBC esetek (48%) fordultak elő, ezt követték gyakoriságban a LumB prol esetek (32.3%). Ebben a csoportban nem voltak Lum A esetek. Szignifikáns volt a különbség a két csoport között a társult in situ léziók tekintetében is ($p=0.017$). A terhességi emlőrákos esetek 45.2%-a magas grádusú extenzív in situ ductalis carcinoma (DCIS) komponenssel társult, ugyanez a kontroll esetek csupán 9.7%-ában volt megfigyelhető. A kontroll csoportban a leggyakoribb társult in situ lézió a kis kiterjedésű magas grádusú DCIS volt (22.6%), 45%-ukban nem volt társuló in situ lézió megfigyelhető. Többváltozós Cox proporcionális modell analízissel a terhesség ténye összefüggést mutatott a relapszussal és a túléléssel.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. A nagyon fiatal (35 év alatti) nőket érintő emlőrák prognózisa rossz (a betegek 23,36%-a hunyt el betegsége következtében).
2. A fiatal nők között előforduló emlőrák biológiája kedvezőtlen (gyakori TNBC és LumB szubtípus).
3. A fiatal emlőrákos nők családjában gyakrabban fordul elő emlő- és petefészekrák.
4. A pozitív családi anamnézisű fiatal nőbetegek emlőrákja gyakran TNBC immunfenotípusú.
5. A BRCA mutáció státusz előrejelzésére a részletes családi anamnézist és az emlőrák immunfenotípusának ismeretét igénylő matematikai algoritmus alkalmazható.
6. Az általunk vizsgált magyarországi betegcsoportban az ajánlásokkal ellentétben, nem minden fiatal emlőrákos beteg esetében került sor BRCA genetikai vizsgálatra.
7. A BRCA mutációnak a génexpressziós profilt érintő kifejezett transzkripciós hatása van (TOP 100 gén expressziós profilja alapján a BRCAmut és vad típusú daganatok elkülöníthetőek).
8. A BRCA mutáns tumorok speciális claudin expressziós profillal bírnak.
9. A BRCA mutáns tumorokra nem jellemző a claudin-low fenotípus.
10. Ugyanazon tumor esetében a PAM50 single sample predictor által megállapított szubtípus eltérő lehet az IHC-alapú szubtípustól.
11. A terhességi emlőrák prognózisa kedvezőtlenebb, mint a terhességtől függetlenül kialakuló fiatalkori emlőrák eseteké, különösen, ha a posztpartum periódusban manifesztálódik.
12. A terhességi emlőrák biológiája kedvezőtlen (gyakori a TNBC és LumBprol immunfenotípus).
13. Terhességi emlőrákban gyakrabban fordul elő az invazív tumorhoz asszociált extenzív, magas mag grade-ű, comedo necrosissal is társuló DCIS.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE (A disszertációhoz kapcsolódó közlemények)

1. Madaras L; Balint N; Gyorffy B; Tokes AM; Barschack I;Yosepovich A;Friedman E; Paluch-Shimon S; Zippel D; Baghy K; Timar J; Kovalszky I; Kulka J; Szasz AM BRCA Mutation Related and Claudin-low Breast Cancer: Blood Relatives or Stepsisters? PATHOBIOLOGY 2015 Nov 14;83(1):1-12. (2015) (DOI:10.1159/000439135)

2. Madaras L, Baranyák Z, Kulka J, Szász AM, Kovács A, Lan PH, Székely B, Dank M, Nagy T, Kiss O, Harsányi L, Barbai T, Kenessey I, Tőkés AM Retrospective Analysis of Clinicopathological Characteristics and Family History Data of Early-Onset Breast Cancer: A Single-Institutional Study of Hungarian Patients PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 19:(4) pp. 723-729. (2013)

3. Madaras L, Kovacs KA, Szasz AM, Kenessey I, Tokes AM, Szekely B, Baranyak Z, Kiss O, Dank M, Kulka J Clinicopathological Features and Prognosis of Pregnancy Associated Breast Cancer - A Matched Case Control Study. PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 20:(3) pp. 581-590. (2014)

4. Madaras L, Szász MA, Baranyák Z, Tőkés AM, Szittya L, Lotz G, Székely B, Szentmártoni G, Dank M, Baranyai Z, Kulka J Fiatal- és időskori emlődaganatok morfológiai és molekuláris sajátosságai közötti összefüggések [Morphological and immunophenotypical heterogeneity in breast cancers of young and elderly women] MAGYAR ONKOLÓGIA 56:(2) pp. 75-78. (2012))

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE (A disszertációtól független közlemények)

1. Madaras L, Kovacs KA, Szasz AM, Tokes AM, Szekely B, Baranyak Z, Kiss O, Kenessey I, Dank M, Kulka J Clinicopathological features and prognosis of pregnancy associated breast cancer: A matched case control study VIRCHOWS ARCHIV 463:(2) p. 248. (2013)

2. Madaras L, Szirtes I, Bata P, Riesz P, Somoracz A, Szekely E, Romics M, Majoros A, Borka K, Szasz MA, Nyirady P A pozitív sebészi szél jelentősége radikális prosztatektómia esetén. MAGYAR ONKOLÓGIA 58:(3) pp. 204-210. (2014)

3. Szasz A, Gyorffy B, Nemeth Z, Krenacs T, Baranyai Z, Harsanyi L, Dank M, Madaras L, Tokes AM, Kulka J Claudin-4/E-cadherin Index to Predict Prognosis in Breast Cancer EUROPEAN JOURNAL OF CANCER 47:(Suppl. 1) p. S181. (2011)
4. Szasz AM, Tokes AM, Micsinai M, Krenacs T, Jakab C, Lukacs L, Nemeth Z, Baranyai Z, Dede K, Madaras L, Kulka J Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. CLINICAL & EXPERIMENTAL METASTASIS 28:(1) pp. 55-63. (2011)
IF:3.524
5. Szekely B, Madaras L, Szentmartoni G, Szasz AM, Baranyak Z, Szittyá L, Torgyik L, Zergenyi E, Borbenyi E, Kenessey I, Korompay A, Langmar Z, Banhidy F, Kulka J, Dank M A fiatal- és időskori emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők alapján [Comparison of breast cancer in young and old women based on clinicopathological features] MAGYAR ONKOLÓGIA 54:(1) pp. 19-26. (2010)
6. Kulka J, Szász AM, Németh Zs, Madaras L, Schaff Zs, Molnár I, Tőkés AM Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 15: pp. 59-64. (2009)
IF:1.152
7. Kulka J, Tőkés AM, Tóth AI, Szász AM, Farkas A, Borka K, Járay B, Székely E, Istók R, Lotz G, Madaras L, Korompay A, Harsányi L, László Z, Rusz Z, Molnár BA, Molnár IA, Kenessey I, Szentmártoni G, Székely B, Dank M. Az emlődaganatok primer szisztémás kemoterápiára adott válasza az immunhisztokémiai fenotípus tükrében [Immunohistochemical phenotype of breast carcinomas predicts the effectiveness of primary systemic therapy] MAGYAR ONKOLÓGIA 53:(4) pp. 335-343. (2009)
8. Szasz AM, Micsinai M, Tokes AM, Madaras L, Krenacs T, Kulka J Proteomic Profiling of Breast Carcinomas Based on Claudin Expression Pattern. CANCER RESEARCH 69:(24) p. 864S.
9. Székely E, Madaras L, Kulka J, Járay B, Nagy L. Leiomyosarcoma of the female breast PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 7:(2) pp. 151-153. (2001)

10. Székely E, Schaff Z, Madaras L, Kupcsulik P, Zsirka A Trabecular angiomyolipoma mimicking hepatic cell carcinoma PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 6:(3) pp. 224-226. (2000)