

PATOMORFOLOGICZNA SELEKCJA CHORYCH DO TERAPII SYSTEMOWEJ

WOJCIECH P. OLSZEWSKI

1. Wstęp

Decyzję o zastosowaniu terapii systemowej w leczeniu naciekającego raka piersi oraz jej rodzaju podejmuje się na podstawie analizy licznych parametrów, w tym zaawansowania klinicznego choroby, wieku, towarzyszących chorób, nastawienia pacjenta do leczenia oraz patomorfologicznych czynników predykcyjnych. Leczenie systemowe w raku piersi można podzielić na hormonoterapię i chemioterapię. Szczególną rolę w chemioterapii, ze względu na praktyczne zastosowanie indywidualizacji leczenia, odgrywa terapia celowana uwzględniająca ocenę parametrów swoistych dla nowotworu. Istotną jest tu ocena patomorfologiczna wspomagana metodami immunopatologicznymi i biologii molekularnej. Zasadnicze znaczenie ma ocena stanu receptorów steroidowych i HER2. Znaczenie w decyzji o tradycyjnej chemioterapii, chociaż fakultatywne, mają również inne parametry oceniane metodami patomorfologicznymi, które wpływają na decyzję o włączeniu lub rezygnacji z chemioterapii. Należą do nich: stan receptorów steroidowych, stopień złośliwości histologicznej, indeks mitotyczny, obecność zatorów nowotworowych wokół guza pierwotnego, wielkość guza i stan węzłów chłonnych.

Dodatkowo, należy wspomnieć o ocenie podpisów genowych, które są dostępne komercyjnie i których wynik również może być brany pod uwagę w podjęciu lub rezygnacji z leczenia systemowego.

2. Immunopatologiczne określanie czynników predykcyjnych w raku piersi

2.1. Ocena receptorów steroidowych

Ocena immunopatologiczna receptorów estrogenowych (ER) i progesteronowych (PgR) należy do rutynowego postępowania przy opracowaniu patomorfologicznym naciekającego raka piersi i ma znaczenie predykcyjne.

2.1.1. Sposoby oceny receptorów steroidowych i ich interpretacja

Określenie stanu receptorów ER i PgR (ujemnego bądź dodatniego) polega na interpretacji wyniku barwienia immunopatologicznego jąder komórek naciekającego raka piersi. Istnieje kilka systemów przedstawiania wyników reakcji barwnej. Dotychczas najczęściej zalecanym systemem była skala wg Allreda, w której oceniano odsetek wybarwionych jąder komórkowych (*proportion score* – PS) oraz ich siłę wybarwienia (*intensity score* – IS). Wynik (*total score* – TS) w tym systemie jest przedstawiany jako suma PS i IS. Szczegółowe progi dla poszczególnych stopni PS i IS w skali Allreda przedstawiono w tabeli II.

Stosowane są również inne systemy (skale) opisujące reakcję barwną w ocenie receptorów steroidowych uwzględniające odsetek wybarwionych komórek i siłę wybarwienia, np. *Histoscore* (pod tą nazwą stosowane były różniące się systemy).

Tabela I. Leczenie systemowe w raku piersi – selekcja na podstawie danych patomorfologicznych

TYPY LECZENIA SYSTEMOWEGO	UZNANE PATOMORFOLOGICZNE CZYNNIKI PREDYKCYJNE WYMAGANE DO PODJĘCIA LECZENIA	PARAMETRY PATOMORFOLOGICZNE UWZGLĘDNIANE W WYBORZE LECZENIA
hormonoterapia	stan receptorów ER i PgR	stan HER2
chemioterapia	–	stopień złośliwości, indeks mitotyczny, L/V1, pTNM, stan receptorów ER i PgR oraz HER2
chemioterapia celowana	leczenie anty-HER2 leczenie antyangiogenne	stan HER2 –
		stopień złośliwości, indeks mitotyczny, L/V1, pTNM, stan receptorów ER i PgR i HER2

Tabela II. Ocena barwienia immunopatologicznego receptorów steroidowych wg Allreda

LICZBA WYBARWIONYCH JĄDER KOMÓRKOWYCH		INTENSYWNOŚĆ REAKCJI IMMUNOHISTOCHEMICZNEJ	
SKALA PUNKTOWA (<i>PROPORTION</i> <i>SCORE – PS</i>)	ODSETEK WYBARWIONYCH JĄDER KOMÓRKOWYCH (W %)	SKALA PUNKTOWA (<i>INTENSITY</i> <i>SCORE – IS</i>)	INTENSYWNOŚĆ WYBARWIENIA JĄDER KOMÓRKOWYCH
PS0	0	IS0	brak
PS1	< 1	IS1	słaba
PS2	1–10	IS2	średnia
PS3	11–33	IS3	silna
PS4	34–66	interpretacja wyniku – <i>total score</i> TS = PS + IS	
PS5	> 67	status ujemny TS = 0, 2 status dodatni TS = 3, 4, 5, 6, 7, 8	

W praktyce klinicznej w interpretacji wyniku oceny receptorów steroidowych uwzględnia się odsetek wybarwionych komórek. Nasilenie odczynu nie jest brane pod uwagę. Dotychczas najczęściej stosowanym progiem dodatniego stanu było ponad 10% wybarwionych jąder komórek raka naciekającego.

Zgodnie z zaleceniami zawartymi w konsensusie z St Gallen 2009 r. każda swoista reakcja barwna, interpretowana jest jako dodatni stan receptorów steroidowych.

2.1.2. Raport oceny receptorów steroidowych

Wynik oceny receptorów steroidowych powinien zawierać odsetek wybarwionych jąder komórek naciekającego raka piersi dla badania immunopatologicznego receptorów ER i PgR. Przedstawienie w postaci jednej ze stosowanych skal oceny ma jedynie znaczenie dodatkowe i nie jest konieczne.

Tabela III. Ocena receptorów steroidowych

TYP METODY	SPOSÓB OCENY	INTERPRETACJA WYNIKU
<i>Histoscore</i> wg McCarty 1985 (immunopatologicznie)	$E(i + 1) \times P_i$ i – intensywność wybarwienia (0–4) P _i – procent wybarwionych komórek	100 pkt lub więcej – status dodatni
<i>Histoscore</i> wg Jonat 1986 (immunopatologicznie)	HS = P _i (słabo) + 2 × P _i (średnio) + + 3 × P _i (silne)	0–100 – status ujemny 101–200 – status słabo dodatni 201–250 – status średnio dodatni 251–300 – status silnie dodatni stosowane są również inne interpretacje
skala wg Remelle	$score = IS \times PS$ IS (intensywność) (0, 1, 2, 3) PS (0% – 0; 1–9% – 1; 10–49% – 2, 50–79% – 3, 80–100% – 4)	wartości iloczynu 0–12; różna interpretacja
<i>Immunoassay</i>	ocena poziomu ER i PgR w fmol/mg	ER > 30 fmol/mg PgR > 27 fmol/mg

Tabela IV. Interpretacja statusu receptorów steroidowych (ER i PgR) zgodnie z zaleceniami z St Gallen z 2009 r.

brak wybarwionych jąder komórek raka naciekającego	stan ujemny
mikroskopowo widoczne wybarwienie jąder komórek raka naciekającego (niezależnie od siły wybarwienia) w każdym odsetku (w praktyce ≥ 1% komórek)	stan dodatni

Tabela V. Raport oceny receptorów steroidowych

receptor estrogenowy (ER)	ER: ...% wybarwionych jąder komórek raka
receptor progesteronowy (PgR)	PgR: ...% wybarwionych jąder komórek raka
jeżeli ocena receptorów steroidowych jest niemożliwa ze względów technicznych	ze względów technicznych, materiał niediagnostyczny po wykonaniu badania metodą immunopatologiczną
jeżeli ocena receptorów steroidowych jest niemożliwa ze względu na niewystarczającą liczbę komórek raka naciekającego	ze względu na zbyt małą liczbę komórek raka odstąpiono od badania metodą immunopatologiczną

2.2. Ocena receptora HER2

Ocena immunopatologiczna receptora HER2 należy do rutynowego postępowania przy opracowaniu patomorfologicznym naciekającego raka piersi i ma znaczenie predykcyjne, podobnie jak receptory steroidowe.

Powszechnie stosowana jest czterostopniowa skala oceny reakcji barwnej przedstawiona w tabeli VI.

Raport oceny immunopatologicznej receptora HER2

Raport oceny receptora steroidowych powinien zawierać wynik (*score*) zgodnie kryteriami AJCC z 2007 r. oraz określenie statusu (tab. VII).

3. Dalsze postępowanie diagnostyczne w przypadkach statusu granicznego HER2

W przypadkach o stanie granicznym receptora HER2 (2+) zalecana jest ocena metodą hybrydyzacji *in situ* (np. FISH, CISH) w celu rozstrzygnięcia stanu receptora. Około 15–20% przypadków naciekającego raka piersi wykazuje stan graniczny HER2 w ocenie metodą immunohistochemiczną. Z tej grupy w badaniu metodą hybrydyzacji *in situ* ok. 10–15% przypadków wykazuje amplifikację, co jest interpretowane jako stan pozytywny receptora HER2. Pozostałe 85–90% przypadków nie wykazuje amplifikacji genu *HER2*, co

Tabela VI. Czterostopniowa skala oceny reakcji barwnej

SKALA OCENY BARWIENIA IMMUNOPATOLOGICZNEGO RECEPTORA HER2 I KRYTERIA OCENY WG AJCC Z 2007 R.	
WYNIK (SCORE)	KRYTERIA OCENY
0	brak odczynu lub reakcja barwna co najwyżej w 10% komórek raka naciekającego
1+	<ul style="list-style-type: none"> wybarwienie o charakterze nieciągłym (punktowe i odcinkowe) całkowite wybarwienie błonowe co najwyżej w 10% komórek raka naciekającego
2+	słabe lub średnie całkowite wybarwienie błonowe w ponad 10% komórek raka naciekającego lub silne całkowite wybarwienie błonowe w $\leq 30\%$ komórek raka naciekającego
3+	silne całkowite wybarwienie błonowe w ponad 30% komórek raka naciekającego
INTERPRETACJA WYNIKU (SCORE) OCENY RECEPTORA HER2 ZGODNIE Z ZALECENIAMI Z ST GALLEN Z 2009 R. I AJCC Z 2007 R.	
WYNIK (SCORE)	INTERPRETACJA
0	stan negatywny
1+	
2+	stan graniczny (wymaga dalszego postępowania diagnostycznego)
3+	stan pozytywny

Tabela VII. Raport oceny receptora HER2 po ocenie immunopatologicznej

receptor HER2 oceniony immunopatologicznie	HER2: (0) status ujemny HER2: (1+) status ujemny HER2: (2+) status graniczny HER2: (3+) status dodatni
jeżeli ocena receptora HER2 jest niemożliwa ze względów technicznych	ze względów technicznych, materiał niediagnostyczny po wykonaniu badania metodą immunopatologiczną
jeżeli ocena receptora HER2 jest niemożliwa ze względu na niewystarczającą liczbę komórek raka naciekającego	ze względu na zbyt małą liczbę komórek raka odstąpiono od badania metodą immunopatologiczną

jest interpretowane jako stan negatywny receptora HER2.

Istotą oceny amplifikacji jest policzenie kopii genu *HER2* i – w przypadku metody FISH – liczby centromerów chromosomu 17, na którym gen *HER2* jest położony. Proporcja pomiędzy tymi liczbami, tzw. wskaźnik (*ratio*), decyduje o wykazaniu obecności amplifikacji genu *HER2* lub jej braku. Sposób interpretacji przedstawiono w tabeli VIII.

W metodzie CISH (chromogenicznej hybrydyzacji *in situ*) możliwa jest tylko liczba kopii genu bez centromerów. W tej metodzie średnia liczba kopii genu *HER2* powyżej 6 oznacza dodatni status HER2.

Raport oceny amplifikacji genu *HER2*

Raport oceny amplifikacji genu *HER2* metodą FISH powinien zawierać wynik wskaźnika (*ratio*), interpretację wskaźnika – obecność lub brak amplifikacji oraz określenie stanu HER2 (tab. IX). Dodatkowo można umieścić informację o ewentualnej aneuploidii.

4. Inne parametry w kontekście selekcji do leczenia systemowego

Przedstawione poniżej parametry stanowią względne kryteria do wdrożenia chemioterapii i hormonoterapii lub samej hormonoterapii u chorych z rakami steroidododatnimi i HER2-ujemnymi. Wartości pośrednie w stosunku do wymienionych nie są brane pod uwagę (tab. X).

4.1. Stopień złośliwości histologicznej

Stopień 3. złośliwości histologicznej stanowi względne wskazanie do włączenia chemioterapii z hormonoterapią.

Stopień 1. złośliwości histologicznej stanowi względne przeciwwskazanie do włączenia chemioterapii (sama hormonoterapia).

4.2. Indeks mitotyczny

Wysoki indeks mitotyczny (> 30% po ocenie MIB1 lub 3 pkt wg Nottingham) stanowi względne wskazanie do włączenia chemioterapii i hormonoterapii.

Tabela VIII. Ocena amplifikacji genu *HER2* i jej interpretacja

WSKAŹNIK	OBECNOŚĆ AMPLIFIKACJI	INTERPRETACJA
< 1,8	brak amplifikacji genu <i>HER2</i>	stan negatywny
1,8–2,2	amplifikacja wątpliwa	status graniczny (wymaga powtórzenia oceny amplifikacji)
> 2,2	amplifikacja genu <i>HER2</i>	stan pozytywny
w badaniu powtórnym metodą FISH 2,0 lub więcej	amplifikacja genu <i>HER2</i>	stan pozytywny

Tabela IX. Raport oceny receptora HER2 po ocenie metodą FISH

HER2 (FISH)	w ocenionym materiale nie stwierdzono amplifikacji genu <i>HER2</i> wskaźnik (<i>ratio</i>) stan <i>HER2</i> ujemny
	w ocenionym materiale stwierdzono amplifikację genu <i>HER2</i> wskaźnik (<i>ratio</i>) stan <i>HER2</i> dodatni
	w ocenionym materiale nie stwierdzono amplifikacji genu <i>HER2</i> po wcześniejszym wyniku granicznym wskaźnik (<i>ratio</i>) stan <i>HER2</i> ujemny
	w ocenionym materiale nie stwierdzono amplifikacji genu <i>HER2</i> po wcześniejszym wyniku granicznym wskaźnik (<i>ratio</i>) stan <i>HER2</i> dodatni
jeżeli ocena amplifikacji genu <i>HER2</i> jest niemożliwa ze względów technicznych	ze względów technicznych, materiał niediagnostyczny po wykonaniu badania metodą FISH
jeżeli ocena amplifikacji genu <i>HER2</i> jest niemożliwa ze względu na zbyt małą liczbę komórek raka	ze względu na zbyt małą liczbę komórek raka odstąpiono od badania metodą FISH

Niski indeks mitotyczny ($\leq 15\%$ po ocenie MIB1 lub 1 pkt wg Nottingham) stanowi względne przeciwwskazanie do włączenia chemioterapii (sama hormonoterapia).

Stopień 3. złośliwości histologicznej nie jest jednoznaczny z wysokim indeksem mitotycznym. Raportując stopień złośliwości histologicznej, wskazane jest podanie składowych punktowych oceny, w tym indeksu mitotycznego.

4.3. Obecność zatorów nowotworowych wokół guza pierwotnego

Obecność zatorów nowotworowych wokół guza pierwotnego stanowi względne wskazanie do włączenia chemioterapii. Powinno być raportowane w każdym przypadku. Można zastosować skrótową formę raportowania zaproponowaną przez AJCC: L/V 0 dla braku zatorów, L/V 1 dla obecności zatorów.

4.4. Wielkość guza

Największy wymiar guza powyżej 5 cm stanowi względne wskazanie do wdrożenia chemioterapii z hormonoterapią.

Największy wymiar guza 2 cm lub mniejszy stanowi względne przeciwwskazanie do włączenia chemioterapii (sama hormonoterapia).

4.5. Stan przerzutów do węzłów chłonnych

Cztery lub więcej węzłów przerzutowych dołu pachowego (pN2a) stanowią względne wskazanie do włączenia chemioterapii.

Nieobecność węzłów przerzutowych (pN0) stanowi względne przeciwwskazanie do włączenia chemioterapii (sama hormonoterapia).

5. Złożone (wielogenowe) czynniki rokownicze

Złożoność szlaków sygnałowych występujących w komórkach, w tym nowotworowych, powoduje, że ocena pojedynczych czynników rokowniczych, nawet takich jak ER, PgR czy HER2, nie zawsze daje wgląd w funkcjonalną aktywność badanych receptorów. Inne szlaki sygnałowe mogą wpływać na funkcjonowanie komórek nowotworowych i na skuteczność stosowanych terapii. Jednym z proponowanych rozwiązań jest jednoczesna ocena wielu parametrów (przede wszystkim genów) i na jej podstawie ustalenie ryzyka wystąpienia wznovy i korzyści ze stosowania odpowiednich typów terapii. Dotychczasowe ograniczenie stosowania metod wielogenowych wynika z trudności w doborze odpowiedniego panelu genów, które w sposób wiarygodny spełniałyby pokładane nadzieje, kosztów (ok. 4 tys. dolarów za pojedyncze badanie) i ograniczeń technicznych (łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR, techniki mikromacierzowe).

Obecnie w praktyce stosowane są dwa wielogenowe testy rokownicze:

- Oncotype DX,
- MammaPrint.

Oncotype DX opracowany przez Genomic Health jest testem wielogenowym określającym prawdopodobieństwo wznovy raka piersi u pacjentek bez przerzutów

Tabela XI. Chemioterapia (CHTH) i hormonoterapia (HTH) u pacjentów steroidopozytywnych i HER2-negatywnych – względne wskazania*

CECHY KLINICZNO-PATOLOGICZNE	WZGLĘDNE WSKAZANIA DO LECZENIA CHTH + HTH	CZYNNIKI NIEPRZYDATNE PRZY PODEJMOWANIU DECYZJI	WZGLĘDNE WSKAZANIA DO LECZENIA HTH BEZ CHTH
stan receptorów steroidowych ER i PgR	niższe poziomy ER i PgR (do 50%)	–	wyższe poziomy ER i PgR (> 50%)
stopień złośliwości histologicznej	stopień 3.	stopień 2.	stopień 1.
proliferaacja komórek raka	wysoka	pośrednia	niska
stan przerzutowy węzłów chłonnych	dotądnie węzły (> 4)	dotądnie węzły (1–3)	ujemne węzły
inwazja naczyń wokół guza (<i>peritumoral vascular invasion</i> – PVI)	obecność PVI	–	nieobecność PVI
wymiar; pT	> 5 cm; pT3	2,1–5 cm; pT2	do 2 cm; pT1
preferencje pacjenta	użycie wszystkich możliwych środków		uniknięcie efektów ubocznych CHTH
podpisy genowe	duży wskaźnik nawrotu (<i>high score</i>)	pośredni wskaźnik nawrotu (<i>intermediate score</i>)	mały wskaźnik nawrotu (<i>low score</i>)

*Źródło: Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, et al. *Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. Ann Oncol 2009; 20: 1319-1329.*

z dodatnim stanem receptora ER. Skuteczność testu została potwierdzona w grupie leczonej hormonalnie tamoksyfenem. Oncotype DX ocenia panel 21 genów komórek rakowych, na podstawie którego określany jest tzw. *recurrence score*. Wartości *recurrence score* zawierające się w przedziale 0–100 odpowiadają prawdopodobieństwu wznowy w ciągu 10 lat od pierwotnego rozpoznania. Oceny dokonuje się w tkance pobranej dla rutynowej oceny histopatologicznej, utrwalonej i zatopionej w parafinie. Materiał genetyczny zawarty w tak przygotowanym materiale tkankowym z utkania raka ocenia się metodą łańcuchowej reakcji polimerazy na matrycy RNA w czasie rzeczywistym (*real time reverse transcriptase – polymerase chain reaction – real time RT-PCR*), przeprowadzając badanie w laboratoriach Genomic Health. Ostateczny wynik jest analizowany wraz z innymi rutynowymi informacjami o nowotworze.

MammaPrint jest testem wielogenowym, pozwalającym ocenić ryzyko wystąpienia przerzutów. Test oparty jest na panelu genów opracowanym w Holandii i opubli-

kowanym w 2002 r. Test ten został w 2007 r. zaaprobowany przez *Food and Drug Administration* (FDA) do stosowania u pacjentek poniżej 61. roku życia z rakiem piersi do 5 cm średnicy bez przerzutów do węzłów chłonnych. MammaPrint jest testem opartym na technice mikromacierzowej, a w wyniku określane jest małe lub duże ryzyko (*low vs. high risk*) nawrotu choroby. MammaPrint wymaga świeżej (nieutrwalonej) tkanki do badania. Tkanka taka pobierana jest za pomocą odpowiedniego zestawu i przesyłana do laboratoriów firmy Agendia, gdzie test jest przeprowadzany.

Opracowane i badane klinicznie są obecnie również inne testy wielogenowe, m.in. 76-genowa sygnatura prognostyczna opracowana przez firmę Veridex. Strategicznym celem badań prowadzonych na tym polu jest stworzenie narzędzi do identyfikacji grup pacjentów niewymagających terapii systemowej, a także wskazanie tych chorych, którzy obecnie nie są kwalifikowani do chemioterapii, a mogliby odnieść dzięki niej korzyść terapeutyczną.