Współczesna Onkologia (2002) vol. 6; 1 (5–8)

Cel: Celem pracy było wykrycie ekspresji białka HER2 u chorych na raka gruczołu piersiowego bez przerzutów do węzłów chłonnych w stadium G2, pT1-2, pN0, leczonych na Oddziale Chirurgii Katedry Onkologii Akademii Medycznej w Poznaniu.
Materiał i metody: Badaniami objęto 36 pacjentek w wieku 36–82 lat. W analizie uwzględniono wiek pacjentek, postać histologiczną nowotworu, wielkość guza, stopień złośliwości histologicznej, stan węzłów chłonnych, obecność receptora dla estrogenów i progesteronu oraz ekspresję białka p53 i katepsyny D w komórkach nowotworowych. Ekspresję białka HER2 badano przy użyciu testu immunohistochemicznego firmy DAKO – „DAKO HercepTest for Immunoenzymatic Staining (Code No. 5204)".
Wyniki i wnioski: Nadekspresję białka HER2 stwierdzono u 11 pacjentek (30,6 proc.). U kobiet w wieku przedmenopauzalnym stwierdzono większą ekspresję HER2 (42,9 proc.). Nie zaobserwowano zależności między wielkością guza a ekspresją HER2. Nadprodukcja białka HER2 u pacjentów z obecnością receptorów dla estrogenów wynosiła 33,3 proc. Oznacza to bardziej agresywną postać choroby i sprzyja oporności na terapię hormonalną. W przypadku obecności białka p53 jak i jego braku nadekspresja wynosiła 30 proc.
Konkluzja: Nadekspresję białka HER2 wykryto u 30,6 proc. badanych chorych, co pozwala na wyodrębnienie grupy pacjentek o niekorzystnym rokowaniu.

Słowa kluczowe: HER2, rak gruczołu piersiowego.

Ekspresja białka HER2 u chorych na raka gruczołu piersiowego bez przerzutów do węzłów chłonnych

Overexpression of HER2 protein in lymph node-negative breast cancer patients

Anna Kłosowska, Joanna Skręt, Karolina Chmaj

Studenckie Koło Naukowe przy Oddziale Chirurgii Onkologicznej Katedry Onkologii Akademii Medycznej w Poznaniu

WSTĘP

Nowotwory gruczołu piersiowego charakteryzują się wysokim stopniem wytwarzania czynników wzrostu i ich receptorów. Gen dla receptora typu 2 dla ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2, HER2/neu, c-erbB-2) jest protoonkogenem zlokalizowanym na chromosomie 17q21. Koduje glikoproteinę transbłonową nazywaną białkiem lub receptorem HER2. Związanie ligandu z powierzchniowym kompleksem receptorowym zawierającym białko HER2 uaktywnia kinazę tyrozynową i zachodzi autofosforylacja tyrozyny. Inicjuje to kaskadę zjawisk, które prowadzą do przekazania sygnału dla wzrostu i podziału komórek [1].

Amplifikacja genu i nadekspresja receptora HER2 odgrywa znaczącą rolę w transformacji nowotworowej i w procesie rozrostu wielu nowotworów, a szczególnie w raku gruczołu piersiowego, gdzie wynosi 15-30 proc. [2]. Jednak struktura białka HER2 w komórkach rakowych nie ulega zmianie w porównaniu do komórek prawidłowych.

Stwierdzenie nadekspresji HER2 u chorych na raka piersi wskazuje na bardziej agresywną postać choroby [2]. Wiąże się to również z opornością na terapię hormonalną, mimo obecności receptorów dla estrogenów i progesteronu [3].

Rokowanie u chorych na raka gruczołu piersiowego bez przerzutów do węzłów chłonnych jest korzystniejsze niż u pacjentek ze stwierdzonymi przerzutami do węzłów pachowych. Tym niemniej u chorych w stopniu G2, pT1-2, pN0 wpływ na pogorszenie rokowania ma stopień złośliwości histologicznej oraz wielkość guza powyżej 2 cm. Postępowaniem z wyboru u tych osób jest leczenie operacyjne, uzupełnione terapią cytostatykami lub hormonami (antyestrogeny, inhibitory aromatazy, analogi LH-RH). Wykrycie u tych chorych nadmiernej ekspresji HER2 umożliwia wyodrębnienie spośród nich grupy o znacznie gorszej prognozie, dla których stosowanie nowego leku – Herceptyny – może stanie się postępowaniem z wyboru [4, 5].

CEL PRACY

Celem pracy było wykrycie ekspresji białka HER2 u chorych na raka gruczołu piersiowego bez przerzutów do węzłów chłonnych w stadium G2, pT1-2, pN0.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły kostki parafinowe, wykonane z materiału operacyjnego pochodzącego od 36 pacjentek w wieku 36–82 lat, leczonych z powodu pierwotnie operacyjnego raka gruczołu piersiowego w stadium G2, pT1-2, pN0 w latach 1999–2000 na Oddziale Chirurgii Kliniki Onkologii Akademii Medycznej w Poznaniu. Badania histopatologiczne i immunohistochemiczne wykonano w Zakładzie Patologii Nowotworów Katedry Onkologii Akademii Medycznej w Poznaniu. Charakterystykę badanej grupy przedstawia tab. 1.

Najczęstszą postacią histologiczną nowotworu w badanej grupie był rak przewodowy – 72,2 proc.; rak zrazikowy stanowił 5,6 proc.; przewodowo-zrazikowy – 19,4 proc.; inne – 2,8 proc. 72,2 proc. guzów miało wielkość do 2 cm i 27,8 proc. rozmiary od 2 do 5 cm. W badaniu histopatologicznym we wszystkich przypadkach stwierdzono II° złośliwości. U żadnej pacjentki nie wykryto przerzutów do węzłów chłonnych pachowych. U 27 (75 proc.) chorych wykazano obecność receptora dla estrogenów, a u 29 (80,6 proc.) receptora dla progesteronu.

Aim: The aim of this study was to analyse the expression of the human epidermal growth factor receptor - 2 (HER2) in patients with no detected lymph node metastases, tumor size below 5 cm and in G2 stage. HER2 is a product of an HER2 proto-oncogen. It plays an important role in regulating cell growth. HER2 overexpression is generally associated with a more aggressive disease and a worse prognosis.The cases were those of patients treated by the Surgical Ward of Oncology Department of Karol Marcinkowski University of Medical Sciences in years 1999 and 2000. Materials and methods: We identified 36 cases suitable for inclusion in the study. Variables taken into consideration included the age of patients, histological type, size of tumor, grading, status of lymph nodes, the presence of estrogen and progesterone receptors, p53 and catepsin D in breast cancer cells. The patients were aged between 36 and 82 years. 72.2% of cases were ductal breast cancer. 72.2% of tumors had below 2 cm in diameter. Estrogen receptors were found in 75% of cases and progesterone receptors in 80.6%. Expression of 53 was detected in 52.8% of women. Expression of HER2 was detected using the „DAKO HercepTest for Immunoenzymatic Staining (DAKO-Code No. 5204)". Results and Conclusions: Overexpression of HER2 protein was detected in 11 patients (36%). Premenopausal women showed higher expression of HER2 (42.9%). Only two cases of lobular cancer did not provide adequate data for estimation of a relationship between histological type and expression of HER2. The size of the tumor did not appear to influence HER2 expression. Overexpressionof HER2 was detected in 33,3% of cases which were also tested positive for estrogen receptors. The presence of HER2 in these cases is indicative of a more aggressive form of disease which, in turn, is suggestive of resistance to hormonal therapy normally used in cases where estrogen receptors are detected. Presence or absence of p53 protein does not appear to have any bearing on HER2 expression.
Conclusion: Overexpression of protein HER2 was detected in 30.6% patients, which allows the selection of those patients with a worse prognosis.

Key words: HER2, breast cancer.

Tab. 1. Charakterystyka badanej grupy

Liczba pacjentek	36 (100 proc.)
Wiek (w latach)	36–82 (średnio 59,5 lat)
Postać histologiczna	
rak przewodowy	26 (72,2 proc.)
rak zrazikowy	2 (5,6 proc.)
rak przewodowo-zrazikowy	7 (19,4 proc.)
inne	1 (2,8 proc.)
Wielkość guza	
pT1	26 (72,2 proc.)
pT2	10 (27,8 proc.)
pT3	0 (0 proc.)
Grading	
G2	36 (100 proc.)
Stan węzłów chłonnych	36 (100 proc.)
pN0	
Receptor dla estrogenów	
ER +	27 (75 proc.)
ER –	9 (25 proc.)
Receptor dla progesteronu	
PgR +	29 (80,6 proc.)
PgR –	7 (19,4 proc.)
Białko p53	
p53 +	19 (52,8 proc.)
p53 –	17 (47,2 proc.)
C-erbB-2 w komórkach nowotworowych	
C-erbB-2 +	24 (66,7 proc.)
C-erbB-2 –	12 (47,3 proc.)
Katepsyna D	
CD +	32 (88,9 proc.)
CD –	4 (11,1 proc.)

W badanej grupie odnotowano w 52,8 proc. ekspresję białka p53, w 88,9 proc. – katepsyny D, a w 66,7 proc. – receptora c-erbB-2 z zastosowaniem innych niż *DAKO HercepTest for Immunoenzymatic Staining (Code No. 5204)* testów immunohistochemicznych.

Ekspresję białka HER2 badano przy użyciu testu immunohistochemicznego firmy DAKO *DAKO HercepTest for Immunoenzymatic Staining (Code No. 5204).* Test ten umożliwia wykrycie ekspresji HER2 przy użyciu przeciwciała poliklonalnego przeciwko temu białku.

Wszystkie wykorzystane odczynniki pochodziły z ww. testu, a zastosowane procedury były zgodne z zaleceniami producenta. Badanie przeprowadzono w następujący sposób:

- inkubowano skrawki w cieplarce w temp. 60°C przez noc,
- odparafinowano preparaty,
- odsłonięto epitop podgrzewając preparaty w buforze przez 40 min,
- pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 20 min,
- płukano w buforze,
- blokowano endogenną peroksydazę w 3 proc. H_2O_2 przez 10 min,
- inkubowano preparaty z przeciwciałem Rb A-Hu HER2 (*Rabbit Anti-Human HER2 Protein*) przez 30 min,
- płukano w buforze przez 10 min,
- inkubowano z reagentem (*Visualization Reagent*) przez 30 min,
- płukano w TBS (sól fizjologiczna buforowana TRIS pH 7,6) przez 10 min,
- inkubowano preparaty z użyciem DAB (3,3-diaminobenzidine) przez 10 min w celu uwidocznienia reakcji barwnej (kolor brązowy),
- podbarwiano skrawki hematoksyliną,
- zatopiono preparaty w balsamie kanadyjskim.

Następnie oceniano reakcje barwne błonowe zgodnie z kryteriami wymienionymi w tab. 2.

Interpretacja powyższych reakcji umożliwiła stwierdzenie nadekspresji białka HER2 u chorych na raka gruczołu piersiowego bez przerzutów do węzłów chłonnych.

Przykłady reakcji barwnych przedstawia fot.

WYNIKI I OMÓWIENIE

W grupie 36 chorych na raka gruczołu piersiowego bez przerzutów do węzłów chłonnych nadekspresję białka HER2 stwierdzono u 11 pacjentek, co stanowi 30,6 proc. Wyniki przedstawia tab. 3. Jest to zgodne z danymi z literatury, gdzie amplifikację genu c-erbB-2 i nadmierną ekspresję jego białkowego produktu stwierdza się

Tab. 2. Kryteria oceny reakcji barwnej błonowej*

Reakcja barwna w komórkach nowotworowych	Wynik	Nadekspresja HER2
brak lub występuje w mniej niż 10 proc. komórek	0	negatywna
słaba w więcej niż 10 proc. komórek, ale dotyczy części błony komórkowej	1+	negatywna
słaba w więcej niż 10 proc. komórek, ale dotyczy całej błony komórkowej	2+	słabo pozytywna
silna w więcej niż 10 proc. komórek, dotyczy całej błony komórkowej	3+	pozytywna

* Tab. pochodzi z *Atlas for Interpretation of HerceptTest Staining* firmy DAKO

Tab. 3. Ekspresja HER2 w badanej grupie

Ekspresja HER2	Liczba chorych (proc.)
HER2+	11 (30,6 proc.)
HER2–	25 (69,4 proc.)

w ok. 15–30 proc. przypadków raków gruczołu piersiowego [2, 6, 7].

W analizowanej grupie 19,4 proc. stanowiły kobiety w wieku 36–50 lat, u których nadekspresję HER2 stwierdzono w 42,9 proc. Pacjentek w wieku 51–82 lat, a więc w wieku postmenopauzalnym było 80,6 proc., a nadmierną ekspresję ww. białka wykryto u 27,6 proc. badanych. Z literatury wiadomo, że u kobiet w wieku przedmenopauzalnym rak sutka rokuje gorzej. Nie można wykluczyć, że gorszy przebieg choroby w tej grupie jest związany z nadekspresją HER2, gdyż białko to wskazuje na bardziej agresywną postać nowotworu [4, 6]. Omówioną zależność przedstawia tab. 4.

U chorych z postacią raka przewodowego nadekspresję badanego białka stwierdzono w 30,8 proc. przypadków. Ekspresji tej nie wykryto u żadnej z 2 pacjentek ze stwierdzonym rakiem zrazikowym. Można by uznać za istotny fakt braku nadprodukcji HER2 w lepiej rokującej postaci nowotworu, jednak zbyt mała liczba przypadków raka zrazikowego nie pozwala na wyciągnięcie takich wniosków. Omówioną zależność obrazuje tab. 5.

Nie zaobserwowano związku między wielkością guza, a ekspresją badanego receptora. Zgodnie z danymi z tab. 6. białko HER2 pozytywne występowało w 30,8 proc. guzów nie przekraczających 2 cm wielkości i w 30 proc. nowotworów o rozmiarach 2–5 cm.

Wykrycie w komórkach nowotworowych obecności receptorów dla estrogenów umożliwia zastosowanie preparatów antyestrogenowych, takich jak tamoxifen, co znacznie poprawia rokowanie. Wielu badaczy potwierdza fakt, że obecność nadekspresji HER2 wskazuje na bardziej agresywną postać choroby i sprzyja oporności na terapię hormonalną. Stosowanie terapii endokrynnej u chorych ze stwierdzoną nadprodukcją wymienionego białka jest dyskusyjne i stwarza problem w wyborze właściwego leczenia uzupełniającego [2, 6, 7].

W badanym materiale nadprodukcję białka HER2 wśród pacjentek z dodatnimi receptorami dla estrogenów stwierdzono u 33,3 proc., a z dodatnimi receptorami dla progesteronu u 27,6 proc. chorych. Wymienioną zależność obrazuje tab. 7.

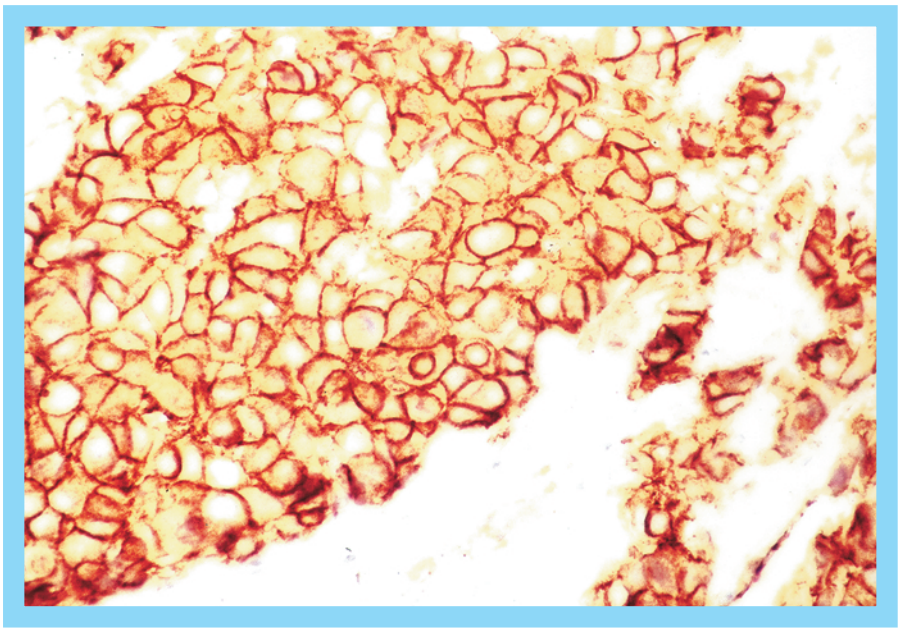
Oznaczaną immunohistochemicznie nadmierną akumulację białka p53, która jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym, stwierdzono u 52,8 proc. chorych w badanej grupie. Jest to zgodne z danymi z literatury, gdyż wymienioną ekspresję szacuje się na ok. 22–55 proc. [6]. Wśród pacjentek z dodatnim p53 pozytywne HER2 obserwowano w 31,6 proc. Podobnie zależność ta kształtowała się w przypadku negatywnego p53 – 29,4 proc. Przytoczone wartości obrazuje tab. 8.

Otrzymane wyniki nieco różnią się od danych z piśmiennictwa, wg których nadekspresja c-erbB-2 występuje w 50 proc. przypadków nadekspresji p53 [6].

Stosując *DAKO HercepTest for Immunoenzymatic Staining* oceniano reakcję błonową, gdyż białko HER2 jest receptorem czynnika wzrostu, znajdującym się na powierzchni. Pozytywną reakcję obserwowano w 30,6 proc. przypadków. W stosowanych w przeszłości testach immunohistochemicznych obecność nadmiernej ekspresji cerbB2 stwierdzano, obserwując zarówno reakcję barwną błonową, jak i cytoplazmatyczną. Z tego powodu wyniki otrzymane z użyciem *DAKO Hercep Test for Immunoenzymatic Staining* różnią się od tych, które uzyskano w innych testach. Obrazuje to tab. 9.

W badanej grupie zaoberwowano ponadto odwrotną zależność pomiędzy ekspresją białka HER2 i obecnością katepsyny D, znanej jako marker przerzutowania (tab. 10.). Raki HER2 pozytywne wykazywały jednocześnie ekspresję katepsyny D tylko w 25 proc. 75 proc. chorych prezentowało fenotyp HER2+ CD–. Z kolei guzy CD+ były w większości HER2 ujemne. Znaczenie tej obserwacji jest trudne do skomentowania, co związane jest z małą liczebnością analizowanej grupy. Z tego samego powodu nie przeprowadzono oceny statystycznej otrzymanych wyników. Planowana jest jednak kontynuacja badań.

Dla chorych z amplifikacją genu dla receptora typu 2 dla ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu i nadprodukcją białka kodowanego przez ten gen pojawiły się nowe możliwości terapeutyczne w postaci monoklonalnego przeciwciała anty-HER2 – preparat *Herceptin* firmy F. Hoffmann-La Roche. Herceptyna (trastuzumab) jest już stosowana u pacjentów z zaawansowanym rakiem piersi z dodatnim HER2. Tym nie-



Fot. Nadekspresja HER2 w komórkach raka inwazyjnego gruczołu piersiowego – reakcja barwna błonowa silna w więcej niż 10 proc. komórek, dotyczy całej błony komórkowej (3+)

mniej opinie na temat użycia tego preparatu w terapii uzupełniającej są różne, z powodu zbyt małej liczby dużych randomizowanych badań klinicznych. Obecnie dość trudno ocenić, czy Herceptyna znajdzie szerokie zastosowanie w leczeniu chorych na raka gruczołu piersiowego z obecnością nadekspresji HER2, ale bez przerzutów do węzłów chłonnych. Badania są cały czas prowadzone, a koszt kuracji jest nadal bardzo wysoki [2, 9].

WNIOSKI

W grupie 36 chorych na raka gruczołu piersiowego bez przerzutów do węzłów chłonnych nadekspresję białka HER2 stwierdzono w 30,6 proc. przypadków.

Nie można wykluczyć, że gorszy przebieg choroby u kobiet w wieku przedmenopauzalnym jest związany z nadekspresją HER2, którą stwierdzono u 42,9 proc. pacjentek w tej grupie.

Mała liczba przypadków raka zrazikowego nie pozwoliła na ocenę zależności między postacią histologiczną nowotworu a ekspresją HER2.

Nie zauważono związku między nadprodukcją badanego białka a wielkością guza.

Nadmierną ekspresję białka HER2 wykryto u 33,3 proc. pacjentek z obecnością dodatnich receptorów dla estrogenów, co może pogarszać rokowanie w tej grupie chorych.

Nadekspresja HER2 wynosiła ok. 30 proc., zarówno w przypadkach stwierdzenia obecności białka p53, jak i w przypadkach jego braku.

Zastosowania *DAKO HercepTest for Immunoenzymatic Staining*, w którym ocenia się jedynie reakcję błonową powoduje, że stwierdza się różnicę otrzymanych wyników w stosunku do innych testów immunochistochemicznych.

KONKLUZJA

Nadekspresję białka HER2 wykryto u 30,6 proc. badanych chorych, co pozwala na wyodrębnienie grupy pacjentek o niekorzystnym rokowaniu.

Tab. 4. Zależność między wiekiem chorych a ekspresją HER2

Wiek	HER2+ (proc.)	HER2- (proc.)
36–50 lat	3 (42,9 proc.)	4 (57,1 proc.)
51–82 lata	8 (27,6 proc.)	21 (72,4 proc.)

Tab. 5. Zależność między postacią histologiczną raka a ekspresją HER2

Postać histologiczna raka	HER2+ (proc.)	HER2- (proc.)
przewodowy	8 (30,8 proc.)	18 (69,2 proc.)
zrazikowy	0 (0 proc.)	2 (100 proc.)
przewodowo-zrazikowy	3 (42,9 proc.)	4 (57,1 proc.)
inne	0 (0 proc.)	1 (100 proc.)

Tab. 6. Zależność między wielkością guza a ekspresją HER2

Wielkość guza	HER2+ (proc.)	HER2- (proc.)
pT1	8 (30,8 proc.)	18 (69,2 proc.)
pT2	3 (30 proc.)	7 (70,6 proc.)

Tab. 7. Zależność między obecnością ER i PgR a ekspresją HER2

Stan receptorów	HER2+ (proc.)	HER2- (proc.)
ER+	9 (33,3 proc.)	18 (66,7 proc.)
ER-	2 (22,2 proc.)	7 (77,8 proc.)
PgR+	8 (27,6 proc.)	21 (72,4 proc.)
PgR-	3 (42,9 proc.)	4 (57,1 proc.)

Tab. 8. Zależność między obecnością p53 a ekspresją HER2

Białko p53	HER2+ (proc.)	HER2- (proc.)
p53+	6 (31,6 proc.)	13 (68,4 proc.)
p53-	5 (29,4 proc.)	12 (70,6 proc.)

Tab. 9. Wyniki otrzymane z zastosowaniem *DAKO HercepTest for Immunoenzymatic Staining* a wyniki z innych testów

Ekspresja białka	Liczba przypadków (proc.)
C-erbB-2+	24 (66,7 proc.)
HER+	11 (30,6 proc.)

Tab. 10. Zależność między katepsyną D a ekspresją HER2

Katepsyna D	HER2+ (proc.)	HER2- (proc.)
CD+	8 (25 proc.)	24 (75 proc.)
CD-	3 (75 proc.)	1 (25 proc.)

PIŚMIENNICTWO

1. Pinkas-Kramarski R, et al. *ErbB tyrosine kinases and the two neuroregulin families constitute a ligand-receptor network.* Mol Cell Biol 1998; 18: 6090.
2. Dowsett M, et al. *Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how?* EJC 2000; 36: 170-6.
3. Piccart MJ, et al. *HER2: a „predictive factor" ready to use in the daily management of breast cancer patients?* EJC 2000; 36: 1755-61.
4. Cooke T, et al. *The value of human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) as a prognostic marker.* EJC 2001; 37: 3-10.
5. Kułakowski A. (red). *Zasady rozpoznawania i leczenia nowotworów.* Wydawnictwo PFESO, Warszawa 1997.
6. Jassem J (red). *Rak sutka.* Springer PWN, Warszawa 1998.
7. Klijn JGM, et al. *Prognostic factors and response to therapy in breast cancer.* In: Fentiman IS, Taylor-Papadimitriou J. (eds.). *Cancer surveys.* Vol. 18: *Breast cancer.* CSHL Press 1993; 165.
8. Jarrel BE, Carabasi RA. *Chirurgia.* Urban&Partner, Wrocław 1997.
9. Baselga J. *Clinical trials of Herceptin (trastuzumab).* EJC 2001; 37: 18-24.
10. Vincent-Salamon A, et al. *ERBB2 overexpression in breast carcinomas: no positive correlation with complete pathological response to preoperative high-dose antracycline-based chemotherapy.* EJC 2000; 36: 586-91.
11. Szacikowska E. *Poziom białka p185 kodowanego przez gen HER-2/neu jako kryterium do kwalifikowania chorych na raka piersi do leczenia tamoxifenem/antyestrogenami.* Współczesna Onkologia 1998; 5: 85-7.
12. Steffen J. *Postępy i problemy w badaniach dziedzicznych predyspozycji do rozwoju raka sutka.* Nowotwory 1994; 44: 17.

ADRES DO KORESPONDENCJI
Anna Kłosowska
ul. Trzebawska 12
60-102 Poznań

- *Praca została nagrodzona na Międzynarodowym Kongresie Studentów Medycyny i Młodych Lekarzy, który odbył się w maju 2001 r. w Poznaniu*
- *Autorki pragną podziękować kierownikowi Katedry Onkologii i Zakładu Patologii Nowotworów prof. dr. hab. med. Janowi Bręborowiczowi za udostępnienie dokumentacji i za umożliwienie przeprowadzenia badań oraz dr n. biol. Violetcie Filas za naukę i pomoc podczas wykonania testów immunohistochemicznych i pisania pracy.*