

Czynniki immunohistochemiczne u chorych na śluzowatego raka piersi

Piotr Skotnicki¹, Mituś Jerzy¹, Janusz Ryś²,
Elżbieta Łuczyńska³, Joanna Anioł³, Andrzej Stelmach¹

Celem pracy jest analiza czynników immunohistochemicznych w grupie chorych na raka śluzowatego piersi (RSS) oraz ocena czynników prognostycznych u chorych na RSS, ze szczególnym uwzględnieniem wskaźnika proliferacji MIB-1 oraz ekspresji białka p53 i c-erbB2.

Materiał i metoda. Przeprowadzono analizę czynników immunohistochemicznych w grupie 81 chorych na raka śluzowatego sutka (RSS). Chore były leczone pierwotnie chirurgicznie w Centrum Onkologii w Krakowie. W oparciu o badanie histochemiczne wyróżniono dwie grupy chorych: 50 chorych z czystą postacią RSS i 31 chorych z mieszaną postacią RSS. U wszystkich chorych oznaczono obecność receptorów estrogenowych i progesteronowych w tkance nowotworowej oraz ekspresję białka p53, c-erb B-2 i indeks MIB-1. Otrzymane wyniki porównano w obu postaciach RSS: czystej i mieszanej.

Wyniki i wnioski. Przeprowadzone badania wykazały: stosunkowo niski wskaźnik proliferacji MIB-1 (u ponad połowy chorych nie przekraczał 14) u ponad 90% chorych obecność receptora estrogenowego i u ponad 60% progesteronowego; niski odsetek guzów wykazujących ekspresję białka p53 i c-erbB2 (odpowiednio 12,3% i 9,9%). Niekorzystny wpływ na 10-letnie przeżycie bezobjawowe w całej badanej grupie chorych oraz w grupie chorych na czystą postać RSS miała obecność ekspresji białka p53.

Immunohistochemical factors in patients with the mucinous variant of the breast cancer

Aim. To analyse the immunohistochemical factors and the prognostic indices assessment, and especially the proliferation rate of MIB-1 and p53 and c-Erb-B2 expression in a group of patients with mucinous breast carcinoma treated at the Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology in Cracow.

Material and methods. Immunohistochemical factors analysis was performed in a group of 81 patients suffering from a mucinous variant of breast cancer. Primary treatment consisted of surgery performed at the Institute of Oncology in Cracow. According to the results of histochemical examination the patients were subdivided into two groups: group 1 consisting of 50 patients with a pure form of mucinous carcinoma (PMC) and group 2 consisting of 31 patients with a mixed form of mucinous carcinoma (MMC). The presence of estrogen and progesterone receptors in the cancerous tissue as well as the expression of p53 protein, c-Erb-B2 and MIB-1 index was determined in all patients. The results were compared in both forms of mucinous carcinoma – pure and mixed.

Results and conclusions. The performed investigations provided the following results: a relatively low proliferation rate of MIB-1, not higher than 14 in more than a half of patients; the presence of the estrogen receptor in over 90% of patients and the presence of the progesterone receptor in over 60% of patients; a low ratio of tumors showing p53 and c-Erb-B2 expression (respectively 12.3% and 9.9%); the adverse influence of p53 expression on 10-year relapse-free survival in all the investigated subjects as well as in the group of patients with the pure form of mucinous carcinoma.

Słowa kluczowe: rak śluzowaty, pierś, postać czysta, postać mieszana, czynniki immunohistochemiczne, receptor estrogenowy, receptor progesteronowy

Key words: breast cancer, mucinous carcinoma, immunohistochemical factors, estrogen factor, progesterone factor

¹ Klinika Chirurgii Onkologicznej

² Zakład Patologii

³ Zakład Radiologii i Diagnostyki Obrazowej

Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
Oddział w Krakowie

Cel pracy

Rak śluzowaty sutka (RSS) stanowi około 1-5% wszystkich złośliwych nowotworów piersi [1-6]. Przeważa opinia, że RSS występuje u kobiet w starszym wieku, w porównaniu z innymi mikroskopowymi postaciami raka piersi [7-10]. Częstość występowania RSS wzrasta gwałtownie po 60 roku życia. Zgodnie z definicją Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) RSS jest rakiem zawierającym dużą ilość widocznego mikroskopowo, pozakomórkowego śluzu, a także śluzu zgromadzonego wewnątrz komórek nowotworowych [11].

Wyróżnia się dwie postacie RSS: czystą i mieszaną. Do postaci czystej zalicza się guzy w całości zbudowane z izolowanych wysepek komórek raka, „zatopionych” w obfitym pozakomórkowym śluzie. Guzy mieszane zawierają dodatkowo obszary raka naciekającego, pozbawionego pozakomórkowego śluzu [4, 7]. Jest on zaliczany do grupy tzw. „lepiej rokujących” raków piersi, gdyż 10-letnie przeżycia bezobjawowe uzyskuje się u prawie 60% chorych [2]. Szczególnie dobre rokowanie cechuje chorych na postać czystą RSS [12, 13], a przeżycia wieloletnie sięgają, a nawet przekraczają 90% [14].

Przeprowadzono analizę czynników immunohistochemicznych w grupie chorych na raka śluzowatego piersi, leczonych w Instytucie Onkologii w Krakowie, oraz ocenę czynników prognostycznych u chorych na RSS, ze szczególnym uwzględnieniem wskaźnika proliferacji MIB-1 oraz ekspresji białka p53 i c-erbB2.

Materiał i metody

Przedstawiona retrospektywna analiza materiału klinicznego obejmuje 81 chorych na RSS. Średni wiek chorych wyniósł 62 lata, najmłodsza chora była w wieku 30 lat, a najstarsza 84 lat. Wszystkie pacjentki były leczone pierwotnie chirurgicznie w Centrum Onkologii w Krakowie, w latach 1952-1993.

Na podstawie histopatologicznego badania materiału operacyjnego wyróżniono dwie postacie RSS: czystą i mieszaną. W guzach wszystkich chorych oznaczono immunohistochemicznie obecność receptorów estrogenowych i progesteronowych oraz ekspresję białka p53, c-erb B-2 i indeks MIB-1. Z blozków parafinowych przechowywanych w archiwum Zakładu Patologii Nowotworów sporządzono skrawki, które po rutynowym zabarwieniu hematoksyliną-eozyną posłużyły do analizy histologicznej guzów nowotworowych. Każdy przypadek rozpoznanego mikroskopowo raka śluzowatego oceniano pod kątem obecności dodatkowego utkania histologicznego.

Z tych samych blozków parafinowych, z których przygotowywano preparaty histologiczne, sporządzono preparaty do barwień immunohistochemicznych.

Z wycinków krojono cienkie skrawki (4 µm), umieszczano je na szkiełkach typu SuperFrost plus, po czym zgrzewano je w cieplarni o temp. 60°C przez 1 dobę. Preparaty odparafinowywano w ksylenie 2 x po 30 min., przeprowadzano kolejno przez alkohol absolutny – 5 min., alkohol 96% – 5 min., po czym płukano w wodzie bieżącej. Tak uwodnione skrawki inkubowano w 3% roztworze nadtlenu wodoru w celu zablokowania endogennej peroksydazy. Preparaty, na których oznaczano antygen proliferacji komórkowej Ki-67 (MIB-1), poddano wstępnemu trawieniu roztworem trypsyny (Sigma T7168) przez 5 min., w temp. pokojowej. Preparaty do oceny ER, PgR, p53BP, oraz Ki-67 (MIB-1) umieszczono w buforze cytrynianowym i poddano gotowaniu w kuchence mikrofalowej: ER, PgR, p53 dwu-

krotnie przez 10 min., a Ki-67 (MIB-1) dwukrotnie przez 7 min. W przerwach uzupełniano ubytek buforu. Następnie preparaty wystudzano do temperatury pokojowej.

Po odsłonięciu epitopów badanych antygenów skrawki inkubowano w odpowiednio sporządzonych roztworach pierwotnych przeciwciał.

Po przeprowadzeniu wszystkich inkubacji na preparaty nakrapiano roztwór chromogenu (DAB) – DAKO nr kat. S3000. Reakcję przerywano, płuczając preparaty w wodzie. Po dokładnym wypłukaniu preparaty podbarwiano hematoksyliną Harrisa, odwadniano, prześwietlano w ksylenie i zamykano w balsamie kanadyjskim.

Przy ocenie badań immunohistochemicznych na obecność receptorów hormonalnych, białka p53 oraz antygenu Ki-67 (MIB-1) za pozytywną uważano reakcję w jądrach komórkowych.

W reakcji na obecność antygenu komórek proliferujących Ki-67 (MIB-1) ustalano indeks, licząc procent dodatnio zabarwionych jąder w 500 liczonych komórkach, wybierając przy tym miejsca o największej proliferacji.

W przypadku reakcji na obecność produktu białkowego onkogenu *c-erb B2* jako pozytywną brano pod uwagę reakcję linearną, zlokalizowaną na błonie komórkowej. Otrzymane wyniki porównano w obu postaciach RSS: czystej i mieszanej.

Przeprowadzono analizę wyników leczenia, oceniając 10-letnie przeżycia przy użyciu metod statystycznych (metoda Kaplana-Meiera, test *long-rank*, model Coxa), za poziom znaczącości statystycznej przyjmując $p \leq 0,05$.

Wyniki

Wyniki immunohistochemicznych badań postaci czystej i mieszanej (indeksu MIB-1, ekspresji białka p53 i c-erb B2, receptorów hormonalnych) przedstawia Tabela I.

U 43 chorych (53,1%) wskaźnik MIB-1 był niższy lub równy 14, a u pozostałych 38 chorych (46,9%) wyższy od 14.

Ekspresja białka p53 i c-erb B2 występowała rzadko, stwierdzono ją jedynie odpowiednio u 12,3% i 9,9% chorych.

Obecność receptora estrogenowego stwierdzono u 74 chorych (91,4%), a progesteronowego u 51 osób, tj. 63,0% chorych.

Porównując dwie grupy chorych na czystą i mieszaną postać RSS stwierdzono, że obecność receptora progesteronowego była nieco częstsza, choć statystycznie nieznamienne, u chorych na czystą postać RSS. Spośród 31 chorych na mieszaną postać obecność receptora estrogenowego wykazało 25 guzów (80,6%), a spośród 50 chorych na czystą postać 49 guzów (98%). Różnica ta jest znamienna statystycznie (*log-rank-test*, $p < 0,01$).

Indeks proliferacji MIB1 powyżej 14% stwierdzono w 19 spośród 31 raków RSS o utkaniu mieszanym (61,3%), natomiast w grupie raków o czystej postaci jedynie w 38% (19/50) guzów. Różnica ta jest znamienna statystycznie (*log-rank-test* $p < 0,05$). Ustalono także, że w obu grupach równie rzadko występowały guzy wykazujące ekspresję białka p53 i c-erb B2.

W badanej grupie 81 chorych prognozowane 10-letnie przeżycie całkowite i bezobjawowe wyniosło 60,5% (w czystej postaci RSS – 74%, a w mieszanej – 39%). Wyniki leczenia w zależności od wyników badań immunohistochemicznych przedstawia Tabela II.

Tab. I. Podsumowanie wyników badań immunohistochemicznych

Wskaźniki	Czysta postać RSS		Mieszana postać RSS		Razem	
	L. ch.	%	L. ch.	%	L. ch.	%
Indeks MIB-1						
≤ 14	31	62,0	12	38,7	43	53,1
> 14	19	38,0	19	61,3	38	46,9
Ekspresja białka p53						
tak	6	12,0	4	12,9	10	12,3
nie	44	88,0	27	87,1	71	87,7
Ekspresja białka c-erb B2						
tak	4	8,0	4	12,9	8	9,9
nie	46	92,0	27	87,1	73	90,1
Receptor estrogenowy						
obecny	49	98,0	25	80,6	74	91,4
nieobecny	1	2,0	6	19,4	7	9,6
Receptor progesteronowy						
obecny	34	68,0	17	54,8	51	63,0
nieobecny	16	32,0	14	45,2	30	37,0
Razem	50	100,0	31	100,0	81	100,0

L. ch. – liczba chorych

Tab II. Efekty leczenia w zależności od wyników badań immunohistochemicznych

Wskaźniki	Liczba chorych leczonych	Prawdopodobieństwo 10-letniego przeżycia bezobjawowego	P (log-rank test)
Indeks MIB-1			
≤14	43	69,8	
>14	38	60,5	0,0692
*Ekspresja białka p53			
tak	10	20,0	
nie	71	70,2	0,0067
Ekspresja białka c-erb B2			
tak	8	60,0	
nie	73	59,3	0,5471
Receptor estrogenowy			
obecny	74	60,4	
nieobecny	7	45,7	0,5047
Receptor progesteronowy			
obecny	51	55,8	
nieobecny	30	60,2	0,4945

* różnica znamionna statystycznie

W analizie jednocechowej oceniając wyniki leczenia 81 chorych na RSS stwierdzono, że statystycznie znacznie wyższą szansę bezobjawowego 10-letniego przeżycia miały chore, u których guz nie wykazywał ekspresji genu *p53*. Pozostałe czynniki immunohistochemiczne nie wykazały istotnych różnic statystycznych w ocenie 10-letnich przeżyć.

Również oceniając wyniki leczenia w samej grupie chorych na czystą postać RSS stwierdzono, że statystycznie znacznie większą szansę bezobjawowego 10-letniego przeżycia miały chore, u których guz nie wykazywał ekspresji białka *p53*. Przedstawia to Tabela III.

Natomiast analizując grupę 31 chorych na mieszaną postać RSS nie wykazano statystycznie istotnego wpływu

na bezobjawowe przeżycia żadnego z badanych immunohistochemicznie wskaźników. Przedstawia to Tabela IV.

Dyskusja

Przeprowadzone w omawianej grupie chorych badania immunohistochemiczne wykazały następujące charakterystyczne cechy RSS:

- stosunkowo niski wskaźnik MIB-1, u ponad połowy chorych nie przekraczający 14 (2-46);
- niewielki odsetek guzów wykazujących ekspresję genu *p53* i *c-erb B2*, odpowiednio 12,3% i 9,9%;
- u ponad 90% chorych obecność receptora estrogenowego i ponad 60% receptora progesteronowego.

Tab. III. Prawdopodobieństwo 10-letniego przeżycia bezobjawowego

Wskaźnik	Liczba chorych leczonych	Prawdopodobieństwo 10-letniego przeżycia bezobjawowego	P (log-rank test)
Indeks MIB-1			
≤14	31	77,4	
>14	19	68,4	0,6542
*Ekspresja białka p53			
tak	6	33,3	
nie	44	78,9	0,0257
Ekspresja białka c-erb B2			
tak	4	75,0	
nie	46	71,0	0,9393
Receptor estrogenowy			
obecny	49	70,2	
nieobecny	1	-	0,2758
Receptor progesteronowy			
obecny	34	68,7	
nieobecny	16	67,0	0,7915

* różnica znamiennej statystycznie

Tab. IV. Prawdopodobieństwo 10-letniego przeżycia bezobjawowego

Wskaźnik	Liczba chorych leczonych	Prawdopodobieństwo 10-letniego przeżycia bezobjawowego w %	P (log-rank test)
Indeks MIB-1			
≤14	12	50,0	
>14	19	31,6	0,2784
Ekspresja białka p53			
tak	4	25,0	
nie	27	65,8	0,1442
Ekspresja białka c-erb B2			
tak	4	37,5	
nie	27	35,6	0,5922
Receptor estrogenowy			
obecny	25	34,5	
nieobecny	6	31,3	0,7857
Receptor progesteronowy			
obecny	17	32,4	
nieobecny	14	55,6	0,5494

W dostępnym piśmiennictwie nie napotkano się na doniesienia analizujące rolę wskaźnika MIB-1 wybiórczo u chorych na RSS. Oczywiście istnieją doniesienia na ten temat dla całej grupy chorych na raka piersi [15-18]. Meyer i wsp. analizując inny wskaźnik proliferacji komórkowej raka, a mianowicie odsetek komórek w fazie S, stwierdzili, że w RSS jest on niski [19, 20].

Nie napotkano się również w piśmiennictwie na doniesienia analizujące, wybiórczo u chorych na RSS, częstość ekspresji genu *p53* i *c-erb B2*. Oczywiście istnieją liczne doniesienia na ten temat dla całej grupy chorych na raka piersi [15, 21-23].

Dane piśmiennictwa potwierdzają własną obserwację, iż u zdecydowanej większości chorych na RSS stwierdza się obecność receptorów hormonalnych [21, 24].

W badanym materiale przeprowadzono porównanie wyników badań immunohistochemicznych w dwóch grupach chorych na czystą i mieszaną postać RSS. Porównanie to wykazało, że w grupie chorych na mieszaną postać RSS statystycznie znamienne:

- więcej chorych wykazywało indeks MIB-1 powyżej 14 (61,3% vs 38%),
- mniej chorych wykazywało obecność receptora estrogenowego (80,6% vs 98%).

W badanej grupie chorych nie wykonano badań cytofluorometrycznych; dane piśmiennictwa są w tym zakresie stosunkowo liczne i nie budzą większych wątpliwości. Zdecydowanie przyjmuje się, że tylko niewielki procent RSS, szczególnie w czystej postaci, jest aneuploidalny [2]. Podkreśla się, że raki aneuploidalne występują głównie u chorych na mieszaną postać RSS i że aneuploidi-

dia koreluje dodatnio z przerzutami do węzłów chłonnych pachowych i brakiem receptora estrogenowego [2].

Wnioski

Charakterystyczne cechy RSS w wykonanych badaniach immunohistochemicznych to:

1. Stosunkowo niski wskaźnik proliferacji MIB-1, u ponad połowy chorych nie przekraczał 14 (2-46).
2. U ponad 90% chorych obecność receptora estrogenowego i u ponad 60% progesteronowego.
3. Niski odsetek guzów wykazujących ekspresję białka p53 i c-erbB2, odpowiednio 12,3% i 9,9%.
4. Niekorzystny wpływ na 10-letnie przeżycie bezobjawowe w całej badanej grupie chorych oraz w grupie chorych na czystą postać miała obecność ekspresji białka p53.

Dr med. Piotr Skotnicki

Klinika Chirurgii Onkologicznej
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
Oddział w Krakowie
ul. Garncarska 11, 31-115 Kraków
e-mail: pskotnicki@wp.pl

breast carcinoma: its relationship with vimentin and p53 protein. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 147-54.

17. Ellis PA, Makris A, Burton SA i wsp. Comparison of MIB-1 proliferation index with S-phase fraction in human breast carcinomas. *Br J Cancer* 1996; 73: 640-3.
18. Markiewski M, Domagała W. Immunohistochemical assessment of proliferation rate of breast carcinoma cells using Ki-67, MIB-1 and anti-PCNA monoclonal antibodies. *Pol J Pathol* 1996; 47: 189-94.
19. Meyer JS, Prey MV, Babeock DS i wsp. Breast carcinoma cell kinetics, morphology, stage, and host characteristics. *Lab Invest* 1986; 54: 41-51.
20. Meyer JS, Koehm SL, Hughes JM i wsp. Bromodeoxyuridine labeling for S-phase measurement in breast carcinoma. *Cancer* 1993, 71, 3531-40.
21. Domagała W, Harezga B, Szadowska A i wsp. Nuclear p53 protein accumulates preferentially in medullary and high-grade ductal but rarely in lobular breast carcinomas. *Am J Pathol* 1993; 142: 669-74.
22. Domagała W, Striker G, Szadowska A i wsp. p53 protein and vimentin in invasive ductal NOS breast carcinoma relationship with survival and sites of metastases. *Eur J Cancer* 1994; 30: 1527-34.
23. Leslie KO, Howard P. Oncogenes and antioncogenes in human breast carcinoma. *Pathol Annual* 1992; 1: 321-42.
24. Lesser ML, Rosen PP, Senie RT i wsp. Estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma: correlations with epidemiology and pathology. *Cancer* 1981; 48: 299-309.
25. Ariel JM. Results of treating 1178 patients with breast cancer by radical mastectomy and postoperative irradiation where metastases to axillary lymph nodes occurred. *J Surg Oncol* 1989; 12: 137-53.

Otrzymano: 4 grudnia 2007 r.

Przyjęto do druku: 12 stycznia 2008 r.

Piśmiennictwo

1. Andre S, Cunha F, Bernardo M i wsp. Mucinous carcinoma of the breast: a pathologic study of 82 cases. *J Surg Oncol* 1995; 58: 162-7.
2. Avisar E, Khan MA, Axelrod D i wsp. Pure mucinous carcinoma of the breast: a clinicopathologic correlation study. *Ann Surg Oncol* 1998; 5: 447-51.
3. Wood WC, Muss HB, Solin LJ i wsp. Malignant tumors of the breast. In: DeVita Vincent T, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 7th Edition. Philadelphia: 2005, 1415-77.
4. Capella C, Eusebi V, Mann B i wsp. Endocrine differentiation in mucoid carcinoma of the breast. *Histopathology* 1980; 4: 613-30.
5. Chinyama CN, Davies JD. Mammary mucinous lesions: congeners, prevalence and important pathological associations. *Histopathology* 1996; 29: 533-9.
6. Fentiman IS, Millis RR, Smith P i wsp. Mucoid breast carcinomas: histology and prognosis. *Br J Cancer* 1997; 75: 1061-5.
7. Adeyinka A, Mertens F, Idvall I i wsp. Cytogenetic findings in invasive breast carcinomas with prognostically favourable histology: a less complex karyotypic pattern? *Int J Cancer* 1998; 79: 361-4.
8. Allen C, Cox EB, Manton KG i wsp. Breast cancer in the elderly. Current patterns of care. *J Am Geriatr Soc* 1986; 34: 637-42.
9. Rosen PP, Lesser ML, Kinne DW. Breast carcinoma at the extremes of age: a comparison of patients younger than 35 years and older than 75 years. *J Surg Oncol* 1985; 28: 90-6.
10. Scopsi L, Andreola S, Pilotti S i wsp. Mucinous carcinoma of the breast. A clinicopathologic, histochemical, and immunocytochemical study with special reference to neuroendocrine differentiation. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 702-11.
11. WHO. Histological typing of breast tumors. *Tumori* 1982; 68: 181-98.
12. Tabar L, Fagerberg G, Chen HH i wsp. Tumor development, histology and grade of breast cancers: prognosis and progression. *Int J Cancer* 1996; 66: 413-9.
13. Toikkanen S, Kujari H. Pure and mixed mucinous carcinomas of the breast: a clinicopathologic analysis of 61 cases with long – term follow-up. *Hum Pathol* 1989; 20, 758-64.
14. Cutler SJ, Black MM, Mork T i wsp. Further observations on prognostic factors in cancer of the female breast. *Cancer* 1969; 24: 653-67.
15. Domagała W. Klasyczne i nowe czynniki prognostyczne i predykcyjne w raku sutka u kobiet. *Nowotwory* 1996; 46: 669-90.
16. Domagała W, Markiewski M, Harezga B i wsp. Prognostic significance of tumor cell proliferation rate as determined by the MIB-1 antibody in