

# HISTOLOŠKA DIAGNOSTIKA RAKA DOJK

Barbara Gazič, Onkološki inštitut Ljubljana, Oddelek za patologijo

## Povzetek

Diagnozo raka dojk postavi patolog na osnovi mikroskopskega pregleda vzorca tkiva. Patolog na podlagi histološkega pregleda tkiva določa oz. meri tudi klasične prognozične dejavnike in prediktivne dejavnike in jih poda v standardiziranem histološkem izvidu. Na podlagi histološkega izvida načrtujemo zdravljenje bolnic oz. bolnikov z rakom dojk. Patolog določi histološki tip tumorja, stopnjo malignosti tumorja, velikost tumorja, prizadetost pazdušnih bezgavk, prisotnost invazije v limfne in/ali krvne žile, estrogenske in progesteronske receptorje, status HER2 in proliferacijski indeks MIB1. Za bolnice z majhnim tveganjem za ponovitev bolezni, na zahtevo onkologa, pripravi vzorec tumorskega tkiva za molekularno preiskavo 'Mammaprint' ali 'Oncotype DX' in ga pošlje v tujino, kjer preiskave opravljajo. Bolnicam oz. bolnikom s trojno negativnim tumorjem in razširjeno boleznijo določi delež PD-L1 pozitivnih tumorskih in/ali imunskih celicah, v primeru klinične indikacije pa pripravi tudi vzorec tumorskega tkiva za določitev prisotnosti mutacij v genu *PIK3CA* z molekularnimi preiskavami. Poleg prognozičnih in prediktivnih dejavnikov, ki odločilno vplivajo na sistemsko zdravljenje, patolog izmeri oddaljenosti tumorja od kirurških robov in v izvidu poroča o prisotnosti zasevkov v odstranjenih pazdušnih bezgavkah, da lahko načrtujemo dodatno kirurško zdravljenje, če je potrebno. Če je bila bolnica zdravljena z neoadjuvantno kemoterapijo, patolog oceni, ali je v vzorcu dojke ali bezgavk ostanek invazivnega tumorja oz. kakšna je stopnja regresije tumorja po zdravljenju.

## Predoperativna diagnostika

Vzorec tkiva za histološko preiskavo lahko odvezamo z debeloigelno biopsijo ali ekscizijsko biopsijo. Z debeloigelno biopsijo odvezamo kratek stebriček tkiva, običajno pod rentgenskim nadzorom radiologa. Debeloigelna biopsija je najpogostejši način odvzema tkivnega vzorca za primarno histološko opredelitev tumorja ali radiološko vidnih patoloških sprememb v dojki. Na podlagi tkivnega vzorca debeloigelne biopsije patolog opredeli spremembe oz. določi tip tumorja. Spremembe na osnovi »B« klasifikacije« (angl. »*Biopsy classification*«) uvrsti v ustrezno »B« kategorijo. »B« klasifikacija vključuje kategorije od 1 do 5, pri čemer normalno tkivo ali nediagnostično biopsijo označujemo z B1, lezije v dojki pa delimo na benigne (B2), na lezije nejasnega malignega potenciala (B3), lezije, ki so sumljive za karcinom (B4) in na maligne lezije (B5). Predoperativna

diagnostika s pomočjo debele igle omogoča načrtovanje obsega terapevtskega kirurškega posega ali pa načrtovanje sistemskega zdravljenja raka dojke še pred kirurškim posegom (neoadjuvantno sistemsko zdravljenje) in s tem posredno tudi na vrsto in izid operacije po neoadjuvantnem zdravljenju.

## Histološki tip

Zadnja klasifikacija tumorjev dojke Svetovne zdravstvene organizacije (angl. WHO) deli invazivne rake v invazivni karcinom brez drugih specifičnih lastnosti, ki ga v praksi še vedno imenujemo invazivni duktalni karcinom (80 % vseh karcinomov dojke), in dvajset specialnih tipov, med katerimi je najpogostejši invazivni lobularni karcinom (10-15 % vseh karcinomov dojke). Invazivni duktalni karcinom in invazivni lobularni karcinom se po svoji morfologiji v večini primerov precej razlikujeta. Lobularni karcinom raste običajno izrazito disociativno in multifokalno, od duktalnega karcinoma pa se razlikuje tudi po svojih imunohistokemičnih in molekularnih lastnostih. Drugi specialni tipi, kot so mucinozni karcinom, tubularni karcinom, karcinom z medularnimi značilnostmi in metaplastični karcinom, imajo značilno histološko sliko in prognozo, različno pa je tudi njihovo zdravljenje.

## Histološki gradus

S histološkim gradusom opredelimo stopnjo malignosti (diferenciranosti) tumorja. Tumorji nizkega gradusa so bolj diferencirani in v splošnem manj agresivni od tumorjev visokega gradusa, ki so slabo diferencirani in imajo agresivnejši potek. Gradus določamo vsem invazivnim karcinomom dojke, tudi na vzorcih debeloigelnih biopsij, kadar je v vzorcu dovolj tumorskega tkiva. Gradus je pomemben napovedni dejavnik, ki močno korelira s preživetjem bolnic z rakom dojke in napoveduje tudi odgovor na sistemsko zdravljenje, zato je ključnega pomena pri načrtovanju zdravljenja.

Poznamo več različnih sistemov gradiranja raka dojke. Na Oddelku za patologijo Onkološkega inštituta Ljubljana (OI) patologi uporabljamo Elston-Ellisovo modifikacijo določanja stopnje diferenciacije po Bloom-Richardson-Elstonu (t. i. 'Nottingham Histologic Score System'), pri katerem patolog upošteva delež žleznih formacij, jedrne značilnosti oz. jedrni 'pleomorfizem' in število mitoz. Vsako izmed naštetih lastnosti patolog oceni s točkami 1-3, točke sešteje in na podlagi vsote točk uvrsti tumor v eno izmed treh kategorij: Gradus 1 (3-5 točk), Gradus 2 (6-7 točk) ali Gradus 3 (8-9 točk).

## Velikost tumorja

Velikost tumorja določimo na podlagi makroskopskega in mikroskopskega pregleda kirurškega vzorca ekscizije ali resekcije dojke. Kot velikost tumorja upoštevamo velikost invazivnega karcinoma. Pri multiplih invazivnih tumorjih upoštevamo velikost največjega tumorja. Večkrat moramo za določitev pravilne velikosti tumorja korelirati rezultate makroskopske, mikroskopske in slikovne preiskave.

## Prizadetost pazdušnih bezgavk

Prizadetost pazdušnih bezgavk je najpomembnejši samostojni prognostični dejavnik za večino karcinomov dojke. Prisotnost zasevkov v pazdušnih bezgavkah močno korelira z velikostjo tumorja. Preživetje se niža z vsako prizadeto pazdušno bezgavko. Prizadetost pazdušnih bezgavk je hkrati znak večje verjetnosti za razsoj bolezni. Za pravilno določitev prizadetosti bezgavk moramo vzorčiti vse bezgavke na način, ki nam omogoča identifikacijo vseh zasevkov, večjih od 0,2 cm. Vse varovalne bezgavke po vzdolžni osi prerežemo na 2 mm debele rezine in vzorčimo na rezno ploskev v celoti. Iz vsake kasete z mikrotomom odrežemo 2 histološki rezini, prvo obarvamo po hematoksilin eozinu (HE), drugo pa imunohistokemično s širokospektralnim citokeratinom, ki omogoča identifikacijo mikrozaspekov in izoliranih tumorskih celic v bezgavki. Patolog oceni tudi, ali zasevek prerašča kapsulo bezgavke in vrašča v maščevje ob bezgavki.

## Invazija limfnih in krvnih žil

Invazija limfnih in/ali krvnih žil pomeni prisotnost skupkov tumorskih celic v manjših žilah parenhima dojke izven tumorja, največkrat na obodu tumorja. Povezana je z večjo verjetnostjo zasevkov v bezgavkah in je napovedni dejavnik ponovitve bolezni, zato vpliva na odločitev o zdravljenju. Bolnice z invazijo limfnih/krvnih žil in zasevkov v bezgavkah imajo slabšo napoved poteka bolezni v primerjavi z bolnicami, pri katerih so prisotni zgolj zasevki ali samo invazija limfnih/krvnih žil. Invazijo limfnih/krvnih žil potrdi patolog z mikroskopskim pregledom HE preparatov tumorja in tkiva ob tumorju. V posameznih primerih si mora pomagati tudi z imunohistokemičnimi preiskavami, s katerimi si prikaže žilne prostore, ker je razlikovanje med žilami in različnimi artefakti včasih težavno.

## Molekularni označevalci

V rutinski obravnavi bolnic z invazivnim rakom dojke imajo trije molekularni označevalci, estrogenski receptorji (ER), progesteronski receptorji (PR) in humani receptor epidermalnega ravnega faktorja 2 (Human EGF Receptor 2 oz. HER2), ključno vlogo in jih določamo na vseh invazivnih karcinomih. Vsi trije so prognostični in prediktivni dejavniki. Določanje statusa ER, PR in HER2 je ključnega pomena za uspešno zdravljenje bolnic z rakom dojke in naloga oddelka za patologijo je, da zagotavlja pravilne rezultate dodatnih preiskav za določanje molekularnih označevalcev. Številni dejavniki vplivajo na določanje ER, PR in HER2. Pomemben pred-analitični faktor je fiksacija. Tumorje moramo fiksirati takoj po odvzemu in zagotoviti ustrezen čas fiksacije, ki ne sme biti prekratek ali predolg. Analitična faza zahteva uporabo standardiziranih postopkov in izurjeno osebje v laboratoriju, post-analitična faza pa izkušene patologe in standardiziran izvid.

## Hormonski receptorji

ER določamo imunohistokemično. Metoda je enostavna, senzitivna in specifična. Patolog s pomočjo mikroskopskega pregleda oceni delež pozitivnih jeder tumorskih celic. Približno 80 % invazivnih karcinomov dojk izraža ER, delež pa variira od 1 % do 100 %. Status ER je močan prediktivni dejavnik odgovora na hormonsko zdravljenje in ga določamo na vseh invazivnih karcinomih. Tudi PR določamo imunohistokemično. PR izraža 60–70 % vseh invazivnih karcinomov dojke, delež pozitivnih jeder pa, prav tako kot pri ER, variira od 1 % do 100 %. Obstaja neposredna korelacija med deležem tumorskih celic, ki izražajo hormonske receptorje, in odgovorom na hormonsko zdravljenje.

V 16-letnem obdobju (2006–2021) smo na OI identificirali 15.029 zaporednih invazivnih karcinomov dojke (IKD) z rezultati določanja HR. ER pozitivnih IKD je bilo 87,1 %, PR pozitivnih pa 74,8 %. Oba HR (ER+/PR+) je izražalo 74,2 % IKD, le ER (ER+/PR-) 12,9 %, PR v odsotnosti ER (ER-/PR+) pa 0,6 %. HR ni izražalo (ER-/PR-) 12,4 % IKD. Deleži posameznih kategorij so se v tem obdobju spreminjali minimalno. V analiziranem obdobju je le 83 tumorjev izražalo PR v odsotnosti ER, kar predstavlja 0,6 % vseh IKD. Delež PR pozitivnih celic pri ER negativnih tumorjih je bil praviloma zelo nizek (1–9 %).

## Gen HER2

Gen *HER2* je pomnožen (amplificiran) v približno 15 % invazivnih karcinomov dojke. Posledica amplifikacije gena je višja ekspresija proteina HER2, posledica tega pa več receptorjev za rastni faktor in zato hitrejša rast in delitev tumorskih celic (proliferacija). Status HER2 določamo na tumorskih celicah imunohistokemično in/ali s fluorescentno in situ hibridizacijo (FISH). Za določanje statusa HER2 obstajajo natančne smernice, ki jih moramo strogo upoštevati, da bi zagotovili pravi rezultat preiskave in nato uspeh zdravljenja. Povezava med statusom HER2 in izidom bolezni je precej kompleksna. HER2-pozitivni tumorji dobro odgovorijo na zdravljenje s tarčnimi zdravili, ki se vežejo na protein HER2 na površini tumorske celice (npr. trastuzumab). Glavni namen določanja statusa HER2 je iskanje bolnic z invazivnim karcinomom dojk, ki so primerne za zdravljenje s tarčnimi zdravili. HER2-pozitivni tumorji imajo močno pozitivno sklenjeno membransko imunohistokemično reakcijo (IHK 3+) v več kot 30 % celic in/ali HER2 amplifikacijo, ki jo dokažemo s preiskavo fluorescenčne in situ hibridizacije (FISH). Pozitivni so tudi tumorji, ki imajo srednje močno pozitivno sklenjeno membransko imunohistokemično reakcijo (IHK 2+) in amplifikacijo gena *HER2*. HER2- negativni tumorji so imunohistokemično negativni ali imajo šibko membransko imunohistokemično reakcijo (IHK 0 ali 1+) in imajo praviloma normalno število genov *HER2*. V 16-letnem obdobju (2006-2021) smo na OI identificirali 15.184 zaporednih invazivnih karcinomov dojke (IKD) z rezultati določanja HER2. IHK negativnih 0 je bilo 38,4 %, negativnih 1+ 31,3 %, pozitivnih 2+ 19,7 % in pozitivnih 3+ 10,6 %, odstopanja na letni ravni so bila minimalna. Gen HER2 je bil pomnožen pri 11,6% IKD,

nepomnožen pri 86,8 %, rezultat je bil dvomljiv pri 1,6 %, pri čemer so bila odstopanja na letni ravni minimalna. Status HER2 je bil pozitiven pri 12,8 % IKD in se je počasi znižal s 14 % do 16 % na 10 % do 13 % na letni ravni, z minimalnimi odstopanji med posameznimi leti.

## **MIB-1**

Proliferacijski marker MIB-1 (tudi Ki-67) je jedrni protein, ki je prisoten v vseh fazah celičnega cikla, od G1 do M, v mirujočih celicah (G0) pa ni izražen. Dokažemo ga imunohistokemično. Ocenjujemo delež pozitivnih tumorskih celic. Nekatere študije so nedvomno dokazale, da je MIB-1 neodvisen napovedni dejavnik slabšega preživetja bolnic z rakom dojk in negativnimi pazdušnimi bezgavkami. Ker je metoda semikvantitativna in subjektivna, saj ni jasnih protokolov za vrednotenje rezultatov, MIB-1 ni splošno sprejet napovedni dejavnik in po priporočilih ameriških patologov ni obvezni del histološkega izvida. Kljub subjektivnosti metode pa ga številni kliniki uporabljajo pri odločitvi o zdravljenju določenih invazivnih karcinomov dojke in ga zato v mnogih evropskih državah, tudi v Sloveniji, določamo rutinsko in rezultat zapišemo v histološki izvid. Ravno ekspresija proliferacijskih markerjev je ključna pri rezultatu Mammaprint in Oncotype, molekularnih preiskavah, ki jih v Sloveniji ne opravljamo, na zahtevo onkologa pa patolog pripravi vzorec tumorskega tkiva, ki ga pošljemo na preiskavo v tujino. Stroške obeh omenjenih preiskav v celoti krije zavarovalnica.

## **PD-L1**

Bolnicam s trojno negativnim IDK oz. razširjeno boleznijo in izčrpanim sistemskim zdravljenjem patolog oceni tudi izražanje PDL-1. Določamo ga imunohistokemično, glede na to, s katerim zdravilom bodo bolnico zdravili, pa uporabljamo različne klone protiteles in ocenjujemo delež pozitivnih imunskih ali tumorskih celic oz. delež pozitivnih imunskih in tumorskih celic glede na število tumorskih celic (t. i. 'CPS score'). Onkolog se odloči za zdravljenje z imunoterapijo, če na podlagi rezultata PD-L1 lahko pričakuje dober odgovor na zdravljenje. Tudi ocenjevanje izražanja PD-L1 je izrazito subjektivno, zlasti ocenjevanje deleža pozitivnih imunskih celic, kjer so razlike med ocenami posameznega patologa in med ocenami različnih patologov lahko zelo velike.

## **Ocena histoloških sprememb po predoperativni kemoterapiji**

V zadnjem letu uporabljamo tudi standardiziran histološki izvid za kirurške vzorce po predoperativni kemoterapiji, oceno regresivnih sprememb oziroma ostanka invazivnega karcinoma pa poročamo s številko (kontinuirano variabla) kot breme rezidualne bolezni -'RCB score'. Izračunamo ga s pomočjo 'RCB' kalkulatorja na spletni strani, na podlagi podatkov o velikosti in celularnosti rezidualnega invazivnega karcinoma v dojki in/ali bezgavkah. Za pravičen izračun bremena rezidualne bolezni mora patolog natančno izmeriti in

nato vzorčiti področje regresivnih sprememb v celoti, pravilno izmeriti premer področja rezidualnega invazivnega karcinoma in oceniti njegovo 'celularnost'. Izmeriti mora tudi premer največjega rezidualnega zasevka v bezgavki in upoštevati število pozitivnih bezgavk.

## Zaključek

Na Oddelku za patologijo OI že več kot 25 let uporabljamo standardiziran histološki izvid za IKD, ki vsebuje podatke o vseh klasičnih napovednih dejavnikih in bioloških označevalcih, ki so potrebni za sodobno, personalizirano zdravljenje raka dojke. Izvid redno posodabljam, v skladu z mednarodnimi in nacionalnimi smernicami zdravljenja. V zadnjih petnajstih letih smo opravili več kot 15.000 patoloških preiskav IKD in prav toliko preiskav za določitev HR, HER2 in MIB-1. Rezultati so kljub menjavam platform za imunohistokemična barvanja, uporabi različnih protiteles in različnim patologom, ki so ocenjevali rezultate preiskav, konstantni, z minimalnimi odstopanji med posameznimi leti. V zadnjem letu uporabljamo tudi standardiziran histološki izvid za kirurške vzorce po predoperativni kemoterapiji, oceno regresivnih sprememb oziroma ostanka invazivnega karcinoma pa poročamo s številko (kontinuirano variabla) kot 'RCB score', ki ga izračunamo na spletni strani, na podlagi podatkov o velikosti in celularnosti rezidualnega tumorja v dojki in/ali bezgavkah. Načrtujemo uvedbo strukturiranega histološkega izvida, ki bo poleg popolne standardizacije omogočal tudi sprotno analizo vseh prognostičnih dejavnikov in rezultatov imunohistokemičnih in FISH preiskav ter s tem zagotavljal zanesljiv nadzor kakovosti dela patologov in laboratorija.

## Literatura

1. Amin MB, Edge SB, Green FL, Byrd DR et al. AJCC cancer staging manual. 8th edition. Springer Nature: New York. 2017.
2. Gazić B. Patohistološka diagnostika raka dojke. In: Borštnar S, Duratović Konjević A, Grašič Kuhar C. Šola raka dojke, zbornik prispevkov. Ljubljana: Združenje za senologijo, SZD. 2016: 37–45.
3. Helwick C. Residual Cancer Burden Is Prognostic of Outcomes Across Breast Cancer Subtypes. <https://ascopost.com/2020>.
4. Provenzano E, Bossuyt V, Viale G, Cameron D et al. Residual Disease Characterization Working Group of the Breast International Group-North American Breast Cancer Group C Standardization of pathologic evaluation and reporting of postneoadjuvant specimens in clinical trials of breast cancer: recommendations from an international working group. *Mod Pathol* 2015;1185–1201.
5. The WHO Classification of Tumours Editorial Board. Breast tumours. 5th Edition IARC: Lyon. 2018.