



Ekspresija citokeratina 5/6 i citokeratina 17 u invazivnom karcinomu dojke

Expression of cytokeratins 5/6 and cytokeratin 17 in invasive breast carcinoma

Tatjana Ivković-Kapic^{*}, Milana Panjković[†], Ivan Nikolić[‡], Dragana Djilas-Ivanović[§], Slavica Knežević-Ušaj^{*}

^{*}Zavod za patologiju i citodijagnostiku, [†]Klinika za internu onkologiju, [§]Imidžing centar, Institut za onkologiju Vojvodine, Sremska Kamenica, Srbija; [‡]Centar za patologiju, Institut za plućne bolesti Vojvodine, Sremska Kamenica, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Citokeratini (CK) 5/6 i 17 predstavljaju markere koji se ekspresiraju u bazalnim/mioepitelnim ćelijama dojke, kao i u pojedinim karcinomima dojke. U više studija dokazano je da je ekspresija ovih „bazalnih“ markera povezana sa specifičnim histomorfološkim i imunobiološkim karakteristikama tumora, lošom prognozom i karakterističnim genskim zapisom. Cilj našeg rada bio je da se odredi učestalost ekspresije bazalnih citokeratina CK5/6 i CK17 u ispitivanom uzorku duktalnih invazivnih karcinoma dojke, kao i da se ispita postojanje povezanosti između tumorske ekspresije bazalnih citokeratina i kliničko-patoloških prognostičkih faktora: životnog doba, histološkog stepena diferentovanosti, hormonskog receptornog statusa, kao i HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) proteinske ekspresije i HER2 genske amplifikacije u tumorskom tkivu. **Metode.** Istraživanje je bilo sprovedeno na uzorku od 121 karcinoma dojke duktalnog, nespecifičnog tipa. Tumorska ekspresija CK5/6 i CK17 utvrđivana je imunohistohemijskom metodom. U radu je ispitivana učestalost pozitivne imunohistohemijske ekspresije CK5/6 i CK17 u karcinomu dojke, kao i povezanost ekspresije bazalnih citokeratina (*basal-like* fenotipa) sa kliničkopatološkim parametrima. **Rezultati.** Pozitivna ekspresija CK5/6 ustanovljena je kod 22%, a CK17 kod 30% ispitivanih uzoraka karcinoma dojke. Tumori sa pozitivnom ekspresijom CK5/6, kao i CK17, karakterisali su se negativnim nalazom receptora za estrogene i progesteron i negativnim HER2 statusom (triple negativnim fenotipom). Ekspresija bazalnih citokeratina bila je statistički značajno povezana sa lošim stepenom histološke diferencijacije ispitivanih tumora. **Zaključak.** Određivanje ekspresije citokeratina 5/6 i 17 u tumorskom tkivu, samih ili u kombinaciji sa drugim markerima bazalne diferencijacije, može imati klinički značaj u selekciji bolesnica sa agresivnim tipom karcinoma dojke koje zahtevaju primenu posebnih terapijskih modaliteta.

Ključne reči:

dojka, neoplazme; keratin; receptori, estrogenski; receptori, progesteronski; geni, ekspresija; imunohistohemija; prognoza.

Abstract

Background/Aim. Cytokeratins (CK) 5/6 and 17, myoepithelial markers, are also expressed in a proportion of breast carcinomas. Breast carcinomas expressing basal epithelium cytokeratins constitute a tumor subgroup that shows common but heterogeneous morphological, genetical, and immunophenotypical features and is associated with poor clinical outcome. The aim of this study was to determine the incidence of basal expression of cytokines CK5/6 and CK17 in the tested samples of ductal invasive breast cancers, as well as to test the presence of a correlation of tumor expression of basal cytokines and clinicopathological prognostic factors: age, the level of histological differentiation, hormone receptor status, HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) protein expression and HER2 gene amplification in tumorous tissue. **Methods.** Immunohistochemistry (IHC) was used to evaluate the CK5/6 and CK17 status of 121 ductal invasive breast cancers. The results thus obtained were compared with clinicopathological characteristics. **Results.** From the 117 analyzed tumor specimens, 22% and 30% were immunohistochemically positive for CK5/6 and CK17, respectively. Basal cytokeratins showed significant inverse relationship with estrogen and progesterone receptor status and HER2 protein expression. CK5/6 and CK17 immunoreactivities were directly associated with triple-negative phenotype and higher histological grade. **Conclusion.** Our findings are similar to reports that tumours expression of basal cytokeratins are correlated with adverse pathological parameters. Given the limited number of emerging therapeutic targets in these tumors, routine IHC identification of basal-like subtype as a poor prognostic group of breast cancer could be based on the expression of basal CKs.

Key words:

breast neoplasms; keratins; receptors, estrogen; receptors, progesterone; gene expression; immunohistochemistry; prognosis.

Uvod

Citokeratini (CK) su proteini koji oslikavaju tip epitelnih ćelija, tkivni rast i diferencijaciju, kao i funkcionalno stanje tkiva. Do sada je opisano dvadesetak različitih keratinskih gena, lokalizovanih na hromozomima 12 ili 17. Svaki od ovih gena enkodira specifičnu keratinsku podjedinicu na osnovu koje se može izvršiti klasifikacija na nisko- i visokomolekularne citokeratine, kao i kisele, odnosno bazne oblike na osnovu njihovih izoelektričnih tačaka¹.

Tokom razvoja i diferencijacije tkiva i organa, ekspiriraju se različite izoforme citokeratina, a različite vrste epitela karakterišu se različitim oblicima citokeratina. Stratifikovani skvamozni epitel pokazuje ekspresiju CK1-6 i 9-17, dok su CK7, 8, i 18–20 identifikovani u jednostavnim, žlezdanim epitelima^{2,3}. Dokazano je da se ekspresija citokeratina tokom onkogeneze ne menja. Većina karcinoma dojke ekspirira CK7, CK8/18 i CK19, diferentovani glandularni fenotip najčešće udružen sa ER pozitivnošću. Nasuprot ovome, značajno manji broj karcinoma dojke ekspirira citokeratine visoke molekularne težine: CK5/6, CK14 i CK17^{2,4}. Na osnovu ekspresije citokeratina, karcinomi dojke mogu se podeliti u četiri grupe: najučestaliji su tumori koji ekspiriraju isključivo luminalne citokeratine, ređi su mešoviti bazalno/luminalni, dok su čisto bazalni i nulti, oni koji ne ekspiriraju citokeratine, retki⁴.

Iako je ispitivanje ekspresije različitih citokeratina u karcinomima dojke predmet intenzivnih istraživanja već četvrt veka, skorašnja supklasifikacija karcinoma dojke zasnovana na DNA *microarray* (mikročip) profilu genske ekspresije (DNA čip, genski čip), u centar interesovanja postavlja bazalne karcinome, tumore koji ekspiriraju bazalne citokeratine. Perou i sar.⁵ prvi su pokazali da se fenotipska raznolikost karcinoma dojke ogleda u odgovarajućim sistemskim varijacijama genske ekspresije, dok su Sorlie i sar.⁶ dokazali da se pet zasebnih tipova karcinoma dojke definisanih tehnologijom *microarray* [luminalni A, luminalni B, sličan normalnoj dojci, HER2 (humani epidermalni growth factor receptor 2) pozitivan i bazaloidni tip], karakterišu različitim prognozom bolesti. Bazalni karcinomi dojke, definisani na osnovu genske ekspresije analizom *microarray*, čine do 15% od svih karcinoma dojke^{5,6}. Ova podgrupa nazvana je tako jer neoplastične ćelije bazalnog karcinoma ekspiriraju gene koji se uobičajeno nalaze u normalnim bazalnim/mioepitelnim ćelijama dojke, uključujući one odgovorne za citokeratine visoke molekularne težine, HMW (*high molecular weight*) ili 'bazalne' citokeratine (CK5/6, CK14 i CK17), kao i neke druge markere bazalne diferencijacije⁷⁻⁹. Iako poreklo i patogeneza bazalnih karcinoma nije u potpunosti jasna, smatra se da ovi tumori verovatno potiču od CK5 pozitivnih epitelnih progenitornih ćelija dojke. U fiziološkim uslovima, ove ćelije su, preko intermedijalne faze, sposobne da se diferenciraju u pravcu luminalnog epitela (CK8, 18+) i mioepitela (ekspirira glatkomišićni aktin)^{2,4}. U više studija dokazano je da su bazalni karcinomi dojke pretežno loše diferentovani tumori, često sa medularnim i metaplastičnim elementima. Imunohistohemijski, oni su pretežno receptori za estrogen – (ER), receptori za progesteron – (PR) i receptori HER2 – (HER2)-negativni. Pozitivna ekspresija bazalnih mar-

kera, dokazano je, povezana je sa lošom prognozom sporadičnih tumora i sa BRCA-1 mutacijama, najverovatnije kao odraz visokog proliferativnog kapaciteta ovih tumora, kao i nepostojanja adekvatne, individualizovane, direktno ciljane terapije^{7,8}.

Cilj našeg rada bio je da se odredi učestalost ekspresije bazalnih citokeratina CK5/6 i CK17 u ispitivanom uzorku duktalnih invazivnih karcinoma dojke, kao i da se ispita postojanje povezanosti između tumorske ekspresije bazalnih citokeratina i kliničko-patoloških prognostičkih faktora: životnog doba, histološkog stepena diferentovanosti, hormonskog receptornog statusa, kao i HER2 proteinske ekspresije i HER2 genske amplifikacije u tumorskom tkivu.

Metode

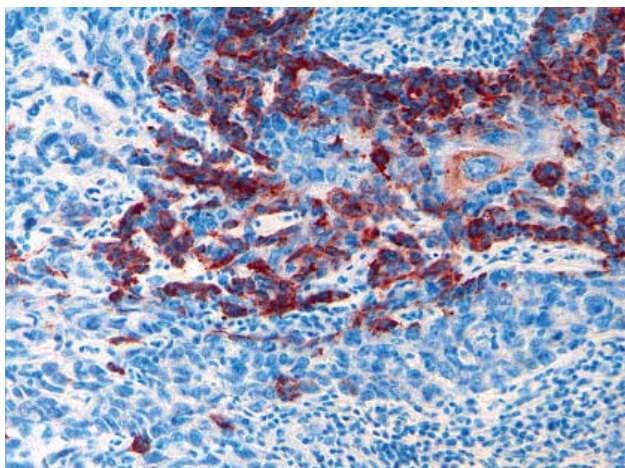
Istraživanje je bilo sprovedeno na uzorku od 121 invazivnog karcinoma dojke nespecifičnog, dukalnog tipa kod bolesnica koje su bile u stadijumu bolesti II A (T1 N1 i T2 N0) (prema Tumor, Nodus, Metastaza – TNM klasifikaciji), operisane u Klinici za operativnu onkologiju Instituta za onkologiju Vojvodine, u periodu od 2000. do 2002. godine. Svi tkivni uzorci bili su fiksirani u 10% formalninu. Stadijum tumorske bolesti bio je određen na osnovu *p* (patološke) TNM klasifikacije karcinoma dojke¹⁰. Za utvrđivanje stepena histološke diferentovanosti korišćen je semikvantitativni Bloom-Richardson sistem gradiranja modifikovan od strane Symmerb i sar.¹¹.

Svi tkivni uzorci fiksirani su u formalinu i ukalupljeni u parafin i sečeni su na rezove debljine 5 mikrometara, a zatim nanošeni na pločice i sušeni. Primenjena su sledeća primarna monoklonska antitela u optimalnim ili komercijalnim koncentracijama: ER alfa (1D5 M7047 DAKO), PR (1A6 M3529 DAKO), HER2 /c-erbB-2 protein (A0485 DAKO), citokeratin 5/6 (M7237 DAKO), citokeratin 17 (M7046 DAKO). Imunohistohemijska identifikacija ispitivanih antigena vršena je primenom tehnike streptavidin-biotin-peroksidaza¹². U negativnim kontrolama nije vršena inkubacija primarnim antitelom. Kao pozitivna kontrola služilo je tumorski neizmenjeno tkivo dojke kao i odgovarajući, unapred izabrani tkivni uzorci.

Kompletno ispitivanje sprovedeno je na uzorku koji je činilo 117 slučajeva.

Ekspresija ER i PR procenjena je semikvantitativno prema procentu tumorskih ćelija čija su jedra bila jasno ili intenzivno obojena crvenkastomede, pri čemu su kao pozitivni slučajevi vrednovani tumori sa najmanje 10% pozitivnih ćelija¹³. U proceni ekspresije HER2 proteina korišćen je scoring sistem sa četiri kategorije (0–3), na osnovu kog su tumori svrstavani u negativnu (skorovi 0 i 1+), nedefinisani kategoriju (skor 2+) i pozitivnu (skor 3+), sa kompletnom membranskom imunoreaktivnošću jakog intenziteta u najmanje 30% tumorskih ćelija^{13,14}. Svi slučajevi sa skorom 2+ retestirani su metodom hromogene *in situ* hibridizacije (CISH) u cilju utvrđivanja postojanja genske amplifikacije korišćenjem sistema Zymed Spot-Light®HER2 CISH™Kit. Uzorci su analizirani svetlosnim mikroskopom na ×40 uvećanju i interpretirani prema priloženim preporukama proizvođača (Zymed® HER2 CISH™ Test Interpretation Guide)¹⁵.

Kao pozitivni citokeratin 5/6 i 17 slučajevi definisani su oni u kojima je ustanovljena makar jedna jasno pozitivna tumorska ćelija. Kao pozitivna unutrašnja kontrola korišćene su obojene bazalne/mioepitelne ćelije duktusa u tumorski neizmenjenom tkivu dojke (Slika 1).



Sl. 1 – Citokeratin 5/6-pozitivna imunohistochemijska reakcija u tumorskim ćelijama (×400)

Povezanost između ekspresije CK5/6, CK17 u tumoru i različitih kliničkopatoloških parametara utvrđivana je χ^2 testom. Razlika na nivou $p < 0.05$ smatrana je statistički značajnom.

Rezultati

Kliničkopatološke karakteristike u ispitivanom uzorku prikazane su u tabeli 1.

Tabela 1
Kliničkopatološke karakteristike ispitivanog uzorka karcinoma dojke

Parametri	n (%)
Životno doba	
< 50 godina	35 (29,91)
≥ 50 godina	82 (70,09)
Histološki gradus	
HG 1	21 (17,95)
HG 2	71 (60,68)
HG3	25 (21,37)
Receptori za estrogen (ER)	
ER negativni	29 (24,79)
ER pozitivni	88 (75,21)
Receptori za progesteron (PR)	
PR negativni	26 (22,22)
PR pozitivni	91 (77,88)
HER2	
negativan	103 (88,04)
pozitivan	14 (11,96)

HER2 – human epidermal growth factor receptor 2

Posmatrajući kombinovano vrednosti ekspresije hormonskih receptora i HER2, najviše je bilo nalaza sa pozitivnim hormonskim receptorima uz negativan HER2 status (HR+ HER2-, 88%–75,21%). Negativan hormonski receptorni status uz negativan HER2 (HR- HER2-) ustanovljen je

kod 16 (13,68%) slučajeva, negativan hormonski receptorni status uz pozitivan HER2 (HR- HER2+) kod 7 (5,98%), a nalaz pozitivnih hormonskih receptora uz istovremeno pozitivan HER2 (HR+ HER2+) kod 6 (5,13%) slučajeva.

U ispitivanom uzorku ustanovljeno je 26 (22,22%) CK5/6 pozitivnih i 35 (29,91%) CK17 pozitivnih tumora.

Tumori pozitivni na CK5/6 karakteristično su pokazivali koekspresiju CK17. Analizirajući povezanost tumorske ekspresije CK5/6 i CK17 ustanovljena je umereno značajna povezanost ($p = 0,000$ χ^2 -testa, a $\chi^2 = 0,564$, sa intervalom poverenja 0,484; 0,645 koji ne sadrži nulu).

Tumori pozitivni na CK5/6 bili su karakteristično ER i PR negativni (tabela 2). Kako je $p = 0,001$ χ^2 -testa, a $\chi^2 = 0,298$ sa intervalom poverenja 0,127; 0,469, koji ne sadrži nulu, može se reći da je ustanovljena niska povezanost između ekspresije citokeratina 5/6 i ekspresije ER. Analizirajući povezanost tumorske ekspresije CK5/6 i ekspresije PR ustanovljena je, takođe, značajna povezanost niskog stepena ($p = 0,005$ χ^2 -testa, a $\chi^2 = 0,250$ sa intervalom poverenja 0,068; 0,433 koji ne sadrži nulu). χ^2 -testom nije utvrđena povezanost između tumorske ekspresije citokeratina 5/6 i HER2 statusa.

Tabela 2
Brojčana (n) i procentualna (%) zastupljenost vrednosti tumorske ekspresije ER, PR i HER2 u odnosu na ekspresiju citokeratina 5/6

Ekspresija citokeratina (CK)	Tumorska ekspresija			
	n	%	n	%
CK5/6 negativni	ER negativni		ER pozitivni	
	16	17,6	75	82,4*
CK5/6 pozitivni	PR negativni		PR pozitivni	
	13	50,0*	13	50,0
CK5/6 negativni	HER2 negativni		HER2 pozitivni	
	15	16,5	76	83,5*
CK5/6 pozitivni	HER2 negativni		HER2 pozitivni	
	11	42,3*	15	57,7
CK5/6 negativni	HER2 negativni		HER2 pozitivni	
	78	85,7	13	14,3
CK5/6 pozitivni	HER2 negativni		HER2 pozitivni	
	24	92,3	2	7,7

* $p = 0,005$ (χ^2 -test); ER – receptori za estrogen; PR – receptori za progesteron; HER2 – human epidermal growth factor receptor 2

Slični nalazi dobijeni su i analizom povezanosti ekspresije CK17 sa ER, odnosno PR i HER2 ekspresijom (tabela 3). Tumori pozitivni na CK17 karakteristično su bili ER negativni i PR negativni. U ispitivanom uzorku ustanovljena je značajna povezanost niskog stepena između pozitivne ekspresije CK17 i negativnog nalaza ER, kao i PR ($p = 0,000$ χ^2 -testa; a $\chi^2 = 0,339$ sa intervalom poverenja 0,184; 0,494; $p = 0,000$ χ^2 -testa; a $\chi^2 = 0,383$ sa intervalom poverenja 0,238; 0,527 koji ne sadrži nulu). Analizirajući povezanost između tumorske ekspresije citokeratina 17 i HER2 statusa, nije utvrđena statistički značajna povezanost ($p = 0,369$).

Tumori pozitivni na CK5/6 i CK17 karakteristično su bili ER, PR i HER2 negativni (triple negativnog fenotipa). Između tumorske ekspresije citokeratina 5/6 i kombinovane ekspresije hormonskih receptora i HER2 ustanovljena je umerena povezanost ($p = 0,000$ χ^2 -testa, $\chi^2 = 0,413$ sa intervalom poverenja 0,265; 0,561 koji ne sadrži nulu). Slični su nalazi dobijeni analizom povezanosti ekspresije CK17 i

Tabela 3

Brojčana (n) i procentualna (%) zastupljenost vrednosti tumorske ekspresije ER, PR i HER2 u odnosu na ekspresiju citokeratina 17

Ekspresija citokeratina (CK)	Tumorska ekspresija			
	n	%	n	%
CK17 negativni	12	14,6	70	85,4*
CK17 pozitivni	17	48,6*	18	51,4
CK17 negativni	9	11,0	73	89,0*
CK17 pozitivni	17	48,6*	18	51,4
CK17 negativni	70	85,4	12	14,6
CK17 pozitivni	32	91,4	3	8,6

* $p = 0,000$; (χ^2 -test); ER – receptori za estrogen; PR – receptori za progesteron
HER2 – human epidermal growth factor receptor 2

kombinovanog nalaza hormonskih receptora i HER2 ($p = 0,000$ χ^2 -testa; a $\chi^2 = 0,456$ sa intervalom poverenja 0,347; 0,566), pri čemu je utvrđena umerena povezanost između ispitivanih obeležja (tabela 4).

Tumori sa pozitivnom ekspresijom bazalnih citokeratina 5/6 i 17 karakteristično su bili lošeg stepena diferencijacije (tabela 5). Analizirajući povezanost ekspresije CK5/6, kao i CK17 sa histološkim gradusom tumora ustanovljena je statistički značajna povezanost niskog stepena ($p = 0,034$ χ^2 -testa, a $\chi^2 = 0,234$ sa intervalom poverenja 0,062; 0,406; $p = 0,000$ χ^2 -testa, a $\chi^2 = 0,381$ sa intervalom poverenja 0,270; 0,492 koji ne sadrži nulu).

Diskusija

Razlike u toku i ishodu bolesti kod bolesnica sa karcinomom dojke u istom stadijumu inicirale su traganje za novim, pouzdanijim prognostičkim parametrima, koji bi, pored standardnih, bili značajni u identifikaciji bolesnica sa nepovoljnim tokom i ishodom bolesti. Pretpostavka da su razlike u toku i ishodu bolesti kod žena sa karcinomom dojke istih histomorfoloških karakteristika rezultat molekularnih razlika među tumorima rezultirao je višedecenijskim istraživanjima, u kojima je ispitivano na hiljade pojedinačnih gena, kao i većeg broja gena istovremeno. Ipak, tek je molekularna analiza karcinoma dojke metodom analize globalne genske ekspresije (DNA mikročip) donela revolucionaran napredak na ovom polju. Kao visokosofisticirana metoda, ona polako počinje da nalazi svoju praktičnu primenu u razvijenim zemljama sveta¹⁶⁻¹⁹.

Bazalni karcinomi dojke identifikovani u studijama profilisanja globalne genske ekspresije definisani su na osnovu setova ekspresije nekoliko gena. Međutim, većina ovih gena nema dijagnostička antitela koja mogu da se koriste na uzorcima tkiva ukalupljenim u parafin, što čini kliničku identifikaciju ovih tumora svojevrsnim izazovom. Iz tog razloga, različiti autori koriste različite panele biomarkera kako bi stvorili klinički model za identifikaciju bazalnih karcinoma, primenjiv u svakodnevnom radu. Međutim, optimalni imunohistohemijski profil bazalnih karcinoma još je uvek u fazi istraživanja. Predloženo je više imunohistohemijskih kombinacija, ali postoji malo podataka o njihovoj specifičnosti i

Tabela 4

Brojčana (n) i procentualna (%) zastupljenost kombinovane vrednosti ekspresije hormonskih receptora (HR) i HER2 u odnosu na tumorsku ekspresiju citokeratina 5/6 i citkeratina 17

Ekspresija citokeratina (CK)	Ekspresija hormonskih receptora							
	HR+ HER2-		HR+ HER2+		HR- HER2+		HR- HER2-	
	n	%	n	%	n	%	n	%
CK5/6 negativni	74	81,3*	6	6,6	6	6,6	5	5,5
CK5/6 pozitivni	14	53,8	0	0	1	3,8	11	42,3*
CK17 negativni	69	84,1*	6	7,3	5	6,1	2	2,4
CK17 pozitivni	19	54,3	0	0	2	5,7	14	40,0*

* $p = 0,000$ (χ^2 -test); HER2 – human epidermal growth factor receptor 2

Tabela 5

Brojčana (n) i procentualna (%) zastupljenost vrednosti histološkog gradusa (HG) u odnosu na tumorsku ekspresiju citokeratina 5/6 i citokeratina 17

Ekspresija citokeratina (CK)	Histološki gradus					
	HG1		HG2		HG3	
	n	%	n	%	n	%
CK5/6 negativni	19	20,9	57	62,6	15	16,5
CK5/6 pozitivni	2	7,7	14	53,8	10	38,5*
CK17 negativni	21	25,6*	51	62,2	10	12,2
CK17 pozitivni	0	0	20	57,1	15	42,9†

* $p = 0,034$; † $p = 0,000$ (χ^2 -test)

Iako su kod žena mlađih od 50 godina bili učestaliji tumori sa pozitivnom ekspresijom citokeratina 5/6 i 17 u odnosu na grupu žena starijih od 50 godina, nije dokazana statistički značajna povezanost između životnog doba bolesnica i ekspresije bazalnih citokeratina ($p = 0,280$ i $p = 0,265$).

senzitivnosti u identifikaciji bazalnog podtipa karcinoma definisanog tehnologijom *microarray*⁹. Nielsen i sar.¹⁶, u studiji na University British Columbia, predložili su panel na osnovu kog se bazalni karcinomi dojke definišu kao ER i HER2 negativni i CK5/6 i EGFR pozitivni. Većina autora

dan danas smatra da se ovi tumori mogu identifikovati samo na osnovu ekspresije HMW citokeratina⁹. Ovo stanovište Rakha i sar.²⁰⁻²² potkrepljuju činjenicom da je prevalenca tumora sa ekspresijom bazalnih CK usaglašena sa učestalošću bazalnih karcinoma definisanih *microarray* studijama, kao i da je jasna povezanost ekspresije bazalnih CK i loše prognoze, dok istovremeno mnogi markeri povezani sa ekspresijom bazalnih CK nemaju dokazan prognostički značaj. Međutim, definicija bazalnih karcinoma na osnovu ekspresije bazalnih citokeratina sigurno nije kompletna s obzirom na to da određen broj karcinoma koji ekspresiraju bazalne CK istovremeno ekspresiraju hormonske receptore ili HER2, kao i da određen broj bazalnih karcinoma definisanih metodom *microarray* ne pokazuje ekspresiju bazalnih CK. Pored toga, postoji i značajan stepen varijabilnosti u određivanju ekspresije bazalnih citokeratina, vezanih prvenstveno za odabir (pojedinačni ili više markera) i vrstu, kao i veličinu uzorka koji se pregleda s obzirom na varijabilnost i heterogenost bojenja^{9,22,23}.

U literaturi se navodi da učestalost ekspresije bazalnih citokeratina CK5/6, CK14 i CK17 iznosi od 4% do 38%^{2,4,16,24-28}. Gusterson i sar.⁷, detaljno su analizirali ekspresiju citokeratina u benignim i malignim bolestima dojke. Korišćenjem tri antitela koja prepoznaju CK14 (LLO02, KA1 i EKH4) ovi istraživači su sa malim varijacijama dokazali da se svi karcinomi dojke mogu svrstati u dve osnovne grupe: 38% karcinoma ekspresiralo je citokeratine stratifikovanog epitela (CK5, 14 i/ili 17), a ostatak je ekspresirao samo jednostavne epitelne keratine. Ekspresija bazalnih citokeratina u karcinomima dojke bila je udružena sa lošom prognozom. Slični su i nalazi Abd El-Rehim-a i sar.⁴. U ovoj studiji izvedenoj na uzorku od 1 944 slučaja karcinoma dojke, zastupljenost čisto luminalnog fenotipa iznosila je 71%, dok je istovremeno učestalost čisto bazalnog fenotipa bila 1%. U istraživanju Ribeiro-Silva i sar.²⁷, mešoviti luminalnobazalni fenotip (CK5+, CK8/18+) ustanovljen je kod 14% ispitivanih karcinoma dojke, dok je čist bazalni fenotip (CK5) ustanovljen kod 5%. Karcinomi koji nisu ekspresirali ni jedan od citokeratina bili su najređi, sa učestalošću manjom od 3%²⁹. U našem ispitivanju ekspresija CK5/6 i CK17 utvrđena je kod 22% i 30% slučajeva, što je u skladu sa podacima iz literature, iako na gornjoj granici spektra navedenih učestalosti. Varijacije u nalazima pozitivne ekspresije markera bazalne diferencijacije koje postoje u literaturi predstavljaju rezultat postojećih razlika u ispitivanim uzorcima, kao i različitog vrednovanja pozitivnih slučajeva, s obzirom na to da nivo graničnih vrednosti za njihovu selekciju u različitim studijama varira i kreće se od fokalne pozitivnosti, preko 1%, 5%, 10% do 20%. Pored navedenog, razlike u učestalosti ekspresije pojedinih markera mogu biti rezultat korišćenja različitih komercijalnih antitela i/ili metoda bojenja. S obzirom na to da je dokazano kako nalazi bojenja bazalnih citokeratina mogu biti veoma heterogeni i varijabilni, dodatne razlike i kontradiktornosti u određivanju ekspresije bazalnih citokeratina mogle bi biti i rezultat sve češće upotrebe metode tkivnih mikronizova, kojom se ne može steći uvid u celokupan uzorak tkiva^{9,22}. Poredeći vrednosti ekspresije bazalnih citokeratina u studijama izvedenim posled-

njih nekoliko godina i onim izvedenim ranije, možda se upravo iz tog razloga zapaža tendencija smanjenja učestalosti tumora sa pozitivnom ekspresijom bazalnih citokeratina.

Analizirajući međusobni odnos ekspresije CK5/6 i 17 naši rezultati pokazuju da je nalaz pozitivne tumorske ekspresije bazalnog markera CK5/6 povezan sa koekspresijom bazalnog citokeratina CK17 i obrnuto. Međutim, u grupi CK17 pozitivnih tumora bilo je 12 (13%) slučajeva sa negativnim CK5/6 nalazom, dok su istovremeno tri (11,5%) slučaja sa pozitivnom CK5/6 ekspresijom bila CK17 negativna. Još od kada je utvrđeno da pojedini karcinomi dojke mogu ekspresirati HMW citokeratine, dokazana je značajna koekspresija citokeratina ove grupe: CK5/6, 14 i 17. Sasa i sar.²⁸ ispitujući ekspresiju bazalnih citokeratina 5/6, 14 i 17 u tripl-negativnim karcinomima dojke, ustanovili su značajnu pozitivnu povezanost u ekspresiji ovih markera, sa međusobnom podudarnošću nalaza od 80%. Iako se ekspresija CK5 i CK14 nalazi u paru u normalnim tkivima, koekspresija oba markera postoji u manje od 30% tumora, što ukazuje da korišćenje jednog bazalnog citokeratina nije dovoljno u identifikaciji bazalnih karcinoma ili tumora agresivnog kliničkog ponašanja, što je potvrđeno i u našoj studiji²⁹.

Prosečna starost bolesnica sa bazalnim karcinomom u različitim studijama varira od 47 do 55 godina. One su obično mlađe i premenopauzalne u odnosu na nebazalne tumore^{9,30}. Analizirajući povezanost starosti bolesnica sa ekspresijom bazalnih i luminalnih markera u karcinomu dojke, u istraživanju Abd El-Rehim-a i sar.⁴ ustanovljena je pozitivna korelacija između ekspresije luminalnih markera i starosti bolesnica i, istovremeno, inverzna korelacija bazalnih markera i godina života. Slični su i rezultati Foulkesa i sar.³¹ koji su ustanovili povezanost između ekspresije CK5/6 i mlađeg životnog doba. Rakha i sar.²² nisu u svom istraživanju utvrdili udruženost ekspresije bazalnih, niti mioepitelnih markera i životnog doba bolesnica. Slični su rezultati istraživanja Potemski i sar.²⁵, kao i Laakso i sar.³² koji su ispitivali kliničnopatološke karakteristike CK5/6 ili CK17 i CK14 negativnih i pozitivnih tumora. Iako je u našem uzorku kod bolesnica mlađih od 50 godina bio češće zastupljen pozitivan nalaz tumorske ekspresije citokeratina CK5/6 i CK17 u odnosu na grupu starijih bolesnica, ova razlika nije statistički značajna.

Tumori pozitivni na CK5/6, CK14 i CK-17 detektuju su pretežno među ER i PR negativnim tumorima, lošeg stepena diferencijacije^{9,22}. Rezultati nekoliko studija pokazali su značajnu korelaciju ekspresije bazalnih citokeratina i negativnog ER statusa^{2,4,22}. Eerola i sar.³³ ustanovili su povezanost ekspresije bazalnih citokeratina (CK5/6, 14 i 17) sa negativnim ER i PR statusom i mlađim životnim dobom. Chen i sar.³⁴ dokazali su inverznu povezanost između ekspresije bazalnih citokeratina (CK5/6 i 14) i ER u ispitivanom uzorku karcinoma dojke kod žena mlađih od 35 godina. Naši rezultati su u skladu sa podacima iz literature.

Postoje kontroverzni nalazi o povezanosti tumorske ekspresije bazalnih citokeratina i HER2 statusa. Iako je u pojedinim studijama utvrđena povezanost između ekspresije bazalnih markera i HER2 negativnosti, objavljeni su i nalazi povezanosti između bazalnih citokeratina i HER2 povećane ekspresije^{22,24,32,34}. Istovremeno, rezultati studija *microar-*

ray dokazali su da su bazalni karcinomi dojke predominantno HER2 negativni. Naši rezultati u skladu su sa navedenim podacima iz literature. Kao i u većini drugih studija, ni u našoj nije nađena povezanost između ovih parametara. Još uvek nema dostupnih podataka o prognozi i predikciji terapijskog odgovora za bolesnice sa HER2 amplifikovanim tumorima pozitivnim na bazalne CK^{24, 32, 34}.

U literaturi se nalazi dosta zbunjujućih podataka o međusobnoj podudarnosti bazalnih karcinoma, tumora koji ekspresiraju bazalne citokeratine i triplnegativnih karcinoma. S obzirom na to da su bazalni tumori uglavnom ER i PR negativni i ne pokazuju HER2 ekspresiju, pojedini autori izjednačavaju kategoriju bazalnih karcinoma dojke i triplnegativnih tumora. Međutim, iako bazalni i triplnegativni karcinomi (ER, PR i HER2 negativni tumori) umnogome dele zajedničke karakteristike, uključujući činjenicu da se oba tipa pojavljuju češće kod mlađih bolesnica (< 50 godina), da se često javljaju prema tipu interval karcinoma u zemljama sa populacionom skrining mamografijom, kao i da su značajno agresivniji od tumora drugih molekularnih podgrupa, a da je jedini terapijski modalitet sistemske terapije hemioterapija, smatra se da triplnegativni karcinomi dojke, ipak, ne predstavljaju zaseban entitet, odnosno da čine šaroliku grupu, te da se iz tog razloga bazalni i triplnegativni karcinomi ne mogu posmatrati kao istovrsna kategorija^{9, 30}. U prilog ovim tvrdnjama idu podaci dobijeni analizama *microarray* kojima je dokazano da u bazalnoj grupi tumora 15–54% njih ekspresira ER, PR ili HER2. Ispitujući ekspresiju bazalnih CK i EGFR u triplnegativnim tumorima ustanovljena je njihova ekspresija kod svega 56–84% tumora³⁰. Istovremeno, iako je očigledno da su triplnegativni karcinomi dojke većinom bazalnog fenotipa, pažljiva analiza tehnologijom *microarray* profilisane ekspresije pokazala je da triplnegativni karcinomi mogu pripadati i drugim molekularnim podgrupama tumora, kao što je podtip sličan normalnoj dojci. Od značaja je činjenica da podtip karcinoma dojke sličan normalnoj dojci ima nešto bolju prognozu od bazalnih karcinoma dojke, ali ne pokazuje odgovor na neoadjuvantnu hemoterapiju na isti način kao što čine bazalni karcinomi. Triplnegativni karcinomi čine 10–17% od svih karcinoma dojke, zavisno od sistema korišćenog za definisanje ER i PR pozitivnosti, kao i metode određivanja HER2 statusa, i naši nalazi su u skladu sa vrednostima učestalosti ovih tumora koje se navode u literaturi. Rakha i sar.²⁹ su u uzorku koji je činila serija od 1 944 karcinoma ustanovili triplnegativan fenotip kod 16,3% slučajeva, pri čemu je većina njih predstavljala loše diferencijovane duktalne karcinome nespecifičnog tipa. U ovom radu dokazana je pozitivna povezanost triplnegativnog statusa sa većim dimenzijama tumora, potiskujućom tumorskom marginom, razvojem recidiva, udaljenih metastaza i lošim ishodom bolesti. Povezanost je, takođe, ustanovljena i sa gubitkom ekspresije androgenih receptora i E-cadherina, i pozitivnom

ekspresijom bazalnih citokeratina, P-cadherina, p53 i EGFR. Bolesnici sa triplnegativnim karcinomom koji istovremeno ekspresiraju bazalni fenotip imaju značajno kraće preživljavanje u odnosu na triplnegativne karcinome koji ne pokazuju ekspresiju bazalnih markera. Ovi autori preporučuju da se svi triplnegativni karcinomi dojke boje bazalnim CK i androgenima.

U našoj studiji ustanovljeno je da je ekspresija bazalnih citokeratina CK5/6 i 17 značajno povezana sa lošim stepenom histološke diferencijacije što je u skladu sa podacima iz literature, u kojima se navodi da su tumori sa pozitivnim nalazom ekspresije bazalnih citokeratina, ili bazalni karcinomi definisani *microarray* genskom ekspresijom pretežno gradusa^{2–4, 20, 22, 25, 35–37}.

U literaturi se navodi da se u bazalnim karcinomima broj mitotičke kreće od 25/10HPF do čak 40/HPF^{38, 39}. Ovi tumori su pretežno oskudne strome, potiskujuće invazivne margine, sa centralnom komedo ili geografskom nekrozom i limfocitnim infiltratom u stromi. Pored toga, mogu se karakterisati prisustvom metaplastičnih elemenata, centralnim ožiljkom i glomeruloidnom mikrovaskularnom proliferacijom^{25, 38}. Iako postoji snažna veza između svih navedenih karakteristika i bazalnog tipa karcinoma dojke, što može olakšavati njihovu identifikaciju, njihove morfološke odlike generalno nisu specifične, i pojedine od navedenih karakteristika mogu se videti i u drugim loše diferencijovanim tumorima nezavisno od njihovog fenotipa. Iz tog razloga, ističe se značaj imunohistohemijske detekcije specifičnih (bazalnih) markera, kao realne i jednostavne metode kojom bi se ovi tumori (invazivni karcinomi dojke nespecifičnog tipa sa bazalnim fenotipom) mogli identifikovati u svakodnevnoj praksi²⁹. Istovremeno, nameće se zaključak da se bazalni tumori, medularni karcinomi i karcinomi dojke nastali kod nosioca BRCA1 mutacija (ili BRCA1 disfunkcionalnim putem) u značajnoj meri poklapaju po svojim morfološkim karakteristikama, kao što dele i sličan imunohistohemijski profil. Bazalne karcinome i tumore nastale kod nosioca germinativnih BRCA1 mutacija, dokazano je, karakteriše loša prognoza^{6, 24, 31, 33, 40–45}. Genskim klaster analizama tehnologijom *microarray*, Sorlie i sar.⁴⁴ dokazali su da familijarni BRCA1 mutirani tumori pripadaju pretežno grupi bazalnih karcinoma.

Zaključak

Određivanje ekspresije bazalnih citokeratina (CK5/6, CK14, CK17) u karcinomima dojke, samih ili u kombinaciji sa drugim markerima bazalne diferencijacije, nalazi svoje mesto u svakodnevnom radu patologa. Na ovaj način omogućava se selekcija bolesnica sa agresivnim tipom karcinoma koje zahtevaju primenu posebnih terapijskih modaliteta. Istovremeno, postavlja se sumnja u postojanje BRCA1 germinativnih mutacija, naročito kada se radi o tumorima negativnog hormonskog receptornog statusa.

L I T E R A T U R A

1. Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. Clin Biochem 2004; 37(7): 529–40.
2. Malzahn K, Mitze M, Thoenes M, Moll R. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. Virchows Arch 1998;433(3):119–29

3. Reis-Filho JS, Simpson PT, Martins A, Preto A, Gartner F, Schmitt FC. Distribution of p63, cytokeratins 5/6 and cytokeratin 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray. *Virchows Arch* 2003; 443(2): 122–32.
4. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey RW, Robertson JF, et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol* 2004; 203(2): 661–71.
5. Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(16): 9212–7.
6. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(19): 10869–74.
7. Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005; 7(4): 143–8.
8. Korsching E, Jeffrey SS, Meinerz W, Decker T, Boecker W, Buerger H. Basal carcinoma of the breast revisited: an old entity with new interpretations. *J Clin Pathol* 2008; 61(5): 553–60.
9. Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho J, Ellis IO. Patho-biological aspects of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 113(3): 411–22.
10. Singletary SE, Greene FL. Revision of breast cancer staging: the 6th edition of the TNM Classification. *Semin Surg Oncol* 2003; 21(1): 53–9.
11. Symmers W, Elston C, Ellis I. *Systemic Pathology: The Breast*. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone Co; 1997.
12. Ivković-Kapic T. Značaj angiogeneze u duktalnom infiltrativnom karcinomu dojke. [thesis] Novi Sad: Faculty of Medicine; 2004.
13. Hanna W, O'malley FP, Barnes P, Berendt R, Gaboury L, Magliocco A, et al. Updated recommendations from the Canadian National Consensus Meeting on HER2/neu testing in breast cancer. *Curr Oncol* 2007; 14(4): 149–53.
14. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, et al. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol* 2003; 16(2): 173–82.
15. Ivković-Kapic T, Knežević-Ušaj S. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Med Pregl* 2010; LXIII (1-2): 69–74. (Serbian)
16. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10(16): 5367–74.
17. Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans WF. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *Oncologist* 2006; 11(8): 868–77.
18. Abramowitz M, Leyland-Jones B. A systems approach to clinical oncology: focus on breast cancer. *Proteome Sci* 2006; 4: 5.
19. Nagasaki K, Miki Y. Gene expression profiling of breast cancer. *Breast Cancer* 2006; 13(1): 2–7.
20. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AH, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology* 2007; 50(4): 434–8.
21. Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, Paish C, Green AR, Powe DG, et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J Pathol* 2006; 208(4): 495–506.
22. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol* 2008; 26(15): 2568–81.
23. Ribeiro-Silva A, Ribeiro do Vale F, Zucoloto S. Vascular endothelial growth factor expression in the basal subtype of breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2006; 125(4): 512–8.
24. Laakso M, Loman N, Borg A, Isola J. Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors. *Mod Pathol* 2005; 18(10): 1321–8.
25. Potemski P, Kusinska R, Watala C, Pluciennik E, Bednarek AK, Kordek R. Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer. *Oncology* 2005; 69(6): 478–85.
26. Takei H, Iino Y, Horiguchi J, Maemura M, Oyama T, Yokoe T, et al. Low and high molecular weight cytokeratins in invasive breast carcinoma. *Oncol Rep* 1997; 4(1): 33–8.
27. Ribeiro-Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, Brandão DF, Chabud F, Zucoloto S. p63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer. *Histopathology* 2005; 47(5): 458–66.
28. Sasa M, Bando Y, Takahashi M, Hirose T, Nagao T. Screening for basal marker expression is necessary for decision of therapeutic strategy for triple-negative breast cancer. *J Surg Oncol* 2008; 97(1): 30–4.
29. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 2007; 109(1): 25–32.
30. Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 2008; 52(1): 108–18.
31. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Bégin LR, Goffin JR, Wong N, et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(19): 1482–5.
32. Laakso M, Tanner M, Nilsson J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, et al. Basolateral carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(14 Pt 1): 4185–91.
33. Eerola H, Heinonen M, Heikkilä P, Kihlivaara O, Tamminen A, Aittomäki K, et al. Basal cytokeratins in breast tumours among BRCA1, BRCA2 and mutation-negative breast cancer families. *Breast Cancer Res* 2008; 10(1): R17.
34. Chen MH, Yip GW, Tse GM, Moriya T, Lui PC, Zin ML, et al. Expression of basal keratins and vimentin in breast cancers of young women correlates with adverse pathologic parameters. *Mod Pathol* 2008; 21(10): 1183–91.
35. Kuroda H, Ishida F, Nakai M, Ohnisi K, Itoyama S. Basal cytokeratin expression in relation to biological factors in breast cancer. *Hum Pathol* 2008; 39(12): 1744–50.
36. Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, Eisenacher M, Voss R, Isola J, et al. Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab Invest* 2002; 82(11): 1525–33.
37. Kusinska R, Potemski P, Jesionek-Kupnicka D, Kordek R. Immunohistochemical identification of basal-type cytokeratins in invasive ductal breast carcinoma—relation with grade, stage, estrogen receptor and HER2. *Pol J Pathol* 2005; 56(3): 107–10.
38. Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, Sofronis A, Gillett CE, Lakhani SR, et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology* 2006; 49(1): 22–34.
39. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19(2): 264–71.
40. Turner NC, Reis-Filho JS. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene* 2006; 25(43): 5846–53.
41. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, Penault-Llorca F, van der Vijver M, Parry S, et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res* 2005; 11(14): 5175–80.

42. *Tot T.* The cytokeratin profile of medullary carcinoma of the breast. *Histopathology* 2000; 37(2): 175–81.
43. *Ribeiro-Silva A, Zambelli Ramalho LN, Britto Garcia S, Zucoloto S.* The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127(3): 336–40.
44. *Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(14): 8418–23.
45. *Winter J.* Morphological and immunophenotypic analysis of basal-like carcinoma of the breast. *Bioscience Horizons* 2008; 1(1): 19–27.
- Primljen 30. XII 2010.
Prihvaćen 16. IX 2011.