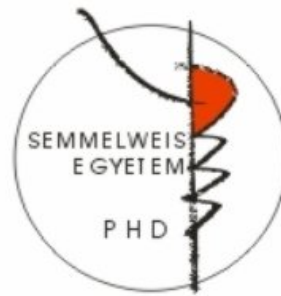


Fiatal korban előforduló emlőcarcinomák patológiai és molekuláris patológiai sajátosságai és ezek összefüggése a prognózissal

Doktori értekezés

Dr. Madaras Lilla

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Kulka Janina, Ph.D., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Ács Nándor, Ph.D., egyetemi tanár
Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sótonyi Péter, MTA tagja, prof. emeritus

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lászik András, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Pápai Zsuzsanna Ph.D., med.habil.,
osztályvezető főorvos

Budapest
2015

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
1. BEVEZETÉS.....	7
1.1 Fiatalkori emlőrák, nagyon fiatal nők emlőrákja-definíció.....	7
1.2 Epidemiológia.....	7
1.3 Szűrés, diagnózis, staging fiatal életkorban.....	8
1.4 A fiatal nők kezelése.....	8
1.4.1 Sebészi kezelés.....	9
1.4.2 Sugárterápia.....	9
1.4.3 Szisztémás kezelés.....	9
1.4.3.1 (Neo)adjuváns kemoterápia.....	9
1.4.3.2 (Neo)adjuváns endokrin kezelés.....	10
1.4.3.3 Adjuváns anti-Her2 kezelés.....	10
1.5 Az emlőrák biológiája, prognosztikai és prediktív faktorok.....	11
1.5.1 Az emlőrák genomikai felosztása.....	15
1.5.2 Fiatal nők emlőrákjának klinikai és biológiai jellegzetességei.....	16
1.6 Öröklött prediszpozíció, családi halmozódás.....	16
1.6.1 Magas penetranciájú gének.....	18
1.6.1.1 BRCA1.....	18
1.6.1.2 BRCA2.....	19
1.6.1.3 TP53.....	20
1.6.1.4 Egyéb, potenciálisan magas kockázatú gének.....	21
1.6.2 Közepes penetranciájú gének.....	21
1.6.2.1 ATM.....	21
1.6.2.2 CHEK2.....	21
1.6.2.3 BRIP1.....	22
1.6.2.4 PALB2.....	22
1.6.3 Alacsony penetranciájú gének.....	24
1.7 A fiatalkori emlőrák speciális kérdései.....	25
1.7.1 Emlőrák és terhesség.....	25
1.7.1.1 A terhességi emlőrák.....	26
1.7.1.2 Terhesség emlőrák után.....	27
1.7.1.2.1 A termékenység megőrzése.....	27
1.7.1.2.2 Az emlőrák utáni terhesség hatása a prognózisra.....	28
1.7.2 A szexualitás és pozitív testkép.....	28
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	29
2.1 Fiatalkori és idősebb betegeket érintő emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők és kimenetel alapján.....	29

2.2	Fiatal- és időskori emlődaganatok morfológiai és molekuláris sajátosságainak összehasonlítása.....	30
2.3	A BRCA mutáció státusz előrejelzése a BRCAPRO algoritmussal.....	30
2.4	BRCAmut és claudin-low emlőtumorok: közös leszármazottak?.....	30
2.5	A terhességi emlőrák (PABC) klinikopatológiája és kimenetele	31
3.	MÓDSZEREK.....	32
3.1	Fiatalkori és idősebb betegeket érintő emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők és kimenetel alapján.....	32
3.2	Fiatal- és időskori emlődaganatok morfológiai és molekuláris sajátosságainak összehasonlítása.....	33
3.3	A BRCA mutáció státusz előrejelzése a BRCAPRO algoritmussal.....	35
3.4	BRCA mutáció asszociált és claudin-low emlőrák: közös leszármazottak?	35
3.5	A terhességi emlőrák (PABC) klinikopatológiája és kimenetele	37
4.	EREDMÉNYEK.....	40
4.1	Fiatalkori és idősebb betegeket érintő emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők és kimenetel alapján.....	40
4.2	Fiatal- és időskori emlődaganatok morfológiai és molekuláris sajátosságainak összehasonlítása.....	46
4.3	A BRCA mutáció státusz előrejelzése a BRCAPRO algoritmussal.....	50
4.4	BRCA mutáció asszociált és claudin-low emlőrák: közös leszármazottak?	53
4.5	A terhességi emlőrák (PABC) klinikopatológiája és kimenetele	66
5.	MEGBESZÉLÉS	76
5.1	Fiatalkori és idősebb betegeket érintő emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők és kimenetel alapján.....	76
5.2	Fiatal- és időskori emlődaganatok morfológiai és molekuláris sajátosságai közötti összefüggések vizsgálata	77
5.3	A BRCA mutáció státusz előrejelzése a BRCAPRO algoritmussal.....	79
5.4	BRCA mutáció asszociált és claudin-low emlőrák: közös leszármazottak?	82
5.5	A terhességi emlőrák (PABC) klinikopatológiája és kimenetele	88
6.	KÖVETKEZTETÉSEK.....	92
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	93
8.	SUMMARY	94

9. IRODALOMJEGYZÉK	95
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	115
A disszertációhoz kapcsolódó közlemények	115
A disszertációtól független közlemények	116
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	118
FÜGGELÉK	120
FÜGGELÉK 1- ALKALMAZOTT ANTITESTEK, IMMUNHISZTOKÉMIAI ÉS FISH MÓDSZEREK	120
FÜGGELÉK 2- KÉRDŐÍV	121
FÜGGELÉK 3- ALKALMAZOTT IMMUNHISZTOKÉMIAI ANTITESTEK .	123
FÜGGELÉK 4- A BRCA100 GÉN, MELY A BRCA VAD ÉS MUTÁNS TÍPUSÚ EMLŐRÁK MINTÁKAT ELKÜLÖNÍTI	124
FÜGGELÉK 5- A CLAUDIN LOW EXPRESSZIÓS MINTÁZAT 151 POZITÍV PREDIKTOR GÉNJE	127
FÜGGELÉK 6- A CLAUDIN LOW EXPRESSZIÓS MINTÁZAT 354 NEGATÍV PREDIKTOR GÉNJE	128

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AD	autoszomális domináns öröklésmenet
ALND	(axillary lymph node dissection) axilláris nyirokcsomó blokk disszekció
BCS	(breast conserving surgery) emlőmegtartásos műtét
BRCAmut	BRCA mutáció asszociált (emlőrák)
BRCAwf	BRCA vad típusú (emlőrák)
CI	confidence interval
CK	citokeratin
DCIS	in situ ductalis carcinoma
EMT	epithelialis-mesenchymalis transitio
ER	ösztrogén receptor
FFPE	(formalin-fixed paraffin-embedded) formalinban fixált paraffinba ágyazott (szövetteni blokk)
FISH	fluoreszcens in situ hibridizáció
HE-festés	hematoxilin-eosin festés
HER2/Her2	human epidermal growth factor receptor 2 gén/ és fehérje terméke
IDC	invazív ductalis carcinoma
IHC	immunhisztokémia
LFS	Li-Fraumeni szindróma
LumA	Luminalis A
LumB Her2+	Luminalis B Her2 pozitív
LumB prol	Luminalis B proliferáló
MaSC	(Mammary Stem Cell) emlő őssejt
mRNS	messenger RNS
mtsai	munkatársai
NPI	Nottingham Prognosztikai Index
PABC	(Pregnancy Associated Breast Cancer) terhességi emlőrák
PCR	polymerase chain reaction
PgR	progeszteron receptor

RR	relatív kockázat
SLNB	(sentinel lymph node biopsy) őrszem nyirokcsomó biopszia
TAM	tumor asszociált makrofágok
TDLU	terminális ductalis-lobularis egység
TIC	Tumor Initiating Cell
TJ	tight junction
TN	tripla negatív
TNBC	tripla negatív fenotípusú emlőrák

1. BEVEZETÉS

1.1 Fiatalkori emlőrák, nagyon fiatal nők emlőrákja-definíció

A nemzetközi szakirodalom nem egységes a meghatározást illetően: egyes tanulmányok 45 éves vagy annál fiatalabb, míg mások 40 éves vagy annál fiatalabb nők emlőrákját tekintik fiatalkorinak. Az EUSOMA (European Society of Breast Cancer Specialists) ajánlásában fiatalkori emlőrákként a 40 éves vagy annál fiatalabb nők emlőrákját, míg nagyon fiatalkori emlőrákként a ≤ 35 éves nők emlőrákját definiálja [1]. A disszertációban a nagyon fiatalkori emlőrák fogalma a 35 éves vagy annál fiatalabb nők emlőrákjára vonatkozik.

1.2 Epidemiológia

Az emlőrák a nők körében a leggyakrabban diagnosztizált rosszindulatú daganat a világon, Magyarországot is beleértve. Évente körülbelül egymillió nő betegszik meg emlőrákban világszerte, Magyarországon évente 7000 feletti az emlőrákban szenvedő új nőbetegek száma, a Nemzeti Rákregiszter adatai szerint 2008-ban 7313, [2] 2012-ben 7720 új emlőrákos eset volt.

Bár az emlőrák a posztmenopauzális nők betegsége elsősorban, a betegek mintegy 5,5%-a 40 évesnél, 2%-a 35 évesnél fiatalabb a diagnózis idején [1, 3-5]. Ezekben a korcsoportokban ez a leggyakoribb daganatos halálozási ok [6].

A fiatalkori emlőrák incidenciája egyes epidemiológiai felmérések szerint emelkedőben van [7-9], melynek háttere nem tisztázott: szerepet játszhat a fiatal nők szélesebb körű szűrése az egyre inkább köztudatba kerülő családi rizikófaktorok miatt, a modern képalkotó technikák elterjedése a napi gyakorlatban (1995-2001 között az USA-ban a fiatalkori emlőrák esetek 30%-a MR vizsgálattal került felfedezésre, míg 2002-2004 között már 50%-uk), de szerepe lehet az egyre korábbi menarchének, a dohányzásnak, alkohol fogyasztásnak, az egyre gyakoribb obesitásnak, esetleges in utero carcinogen expozíciónak [10].

1.3 Szűrés, diagnózis, staging fiatal életkorban

A 40 évesnél fiatalabb korcsoport a nem szűrt populációba tartozik, miután a sporadikus emlőrák incidenciája ebben az életkorban alacsony. A fiatal nők denz emlője miatt a képalkotó vizsgálatok értékelése nem egyszerű, az ultrahang és MRI vizsgálat hatékonyabb, mint a mammográfia. Bármely kialakuló emlő abnormalitás haladék nélküli, részletes és alapos kivizsgálást követel ebben az életkorban is!

A fiatal nők körében egyre elterjedtebb az emlő augmentációja, ez nem jelent fokozott emlőrák kockázatot, nem indokolja rendszeres ellenőrzésüket, amennyiben egyébként nem emelkedett rizikójú betegek. Az augmentációs sebészi beavatkozás előtt azonban klinikai és képalkotó vizsgálatok (ultrahang, mammográfia) szükségesek.

Az EUSOMA ajánlása szerint éves MRI szűrés lehetőségét kell biztosítani a BRCA1, BRCA2 és TP53 mutációt hordozó betegeknek (25-29 éves kortól), a magas kockázatú (legalább 20% rizikójú) betegeknek, azoknak a nőknek, akik 30 éves koruk előtt mellkas besugárzásban részesültek (pl. Hodgkin kór miatt).

Amennyiben a fiatal nő tapintható elváltozással, esetleg egyéb-emlőrákra gyanús-tünettel jelentkezik, klinikai-képalkotó-cytologiai/hisztológiai vizsgálatok szükségesek. Ha malignus elváltozásra derül fény, az invazív tumor ösztrogén-progeszteron receptor-, Her2 státuszának és proliferációs indexének (Ki 67) megállapítása szükséges a core biopsziából és ideális esetben a sebészi preparátumból is. A lokális staging alapja a kétoldali emlő- és axilla ultrahang vizsgálat. A szisztémás staging vizsgálat nem tér el fiatal és idősebb nők esetében [1].

1.4 A fiatal nők kezelése

Az emlőrák kezelésének alapelvei nem különböznek az idősebb nők kezelési gyakorlatától. A (neo)adjuváns kemoterápiát a tumor biológiája határozza meg elsősorban, a sebészi kezelésben -amennyiben kivitelezhető- az emlő megtartása a cél, őrszem nyirokcsomó biopsziával. A sebészi kezelést sugárkezelés követheti.

1.4.1 Sebészi kezelés

Az emlőrák sebészi kezelése fiatalkorú nők esetében sem különbözik az idősebb nőknél alkalmazott kezelési elvektől. Az emlőmegtartó műtét-melyet besugárzás követ-túlélési eredményei nem különböznek az I. és II. stádiumban alkalmazott módosított radikális mastectomia eredményeitől, így amikor lehetséges, ez az alkalmazandó kezelési mód, különösen fiatal nők esetében, akiknél a megfelelő esztétikai eredmény a fiatal korban oly fontos nőiesség, pozitív testkép és szexualitás érdekében még nagyobb jelentőséggel bír.

Az axilla sebészetében az elsőként választandó eljárás az őrszem nyirokcsomó biopsziája, melynek indikációja fiatal nők esetében sem különbözik idősebb nők esetében alkalmazott kezelési elvektől. Az axilláris blokk eltávolításának indikációja is megegyezik az idősebbekre vonatkozó irányelvekkel [11].

1.4.2 Sugárterápia

Adjuváns sugárkezelés indokolt fiatal nők esetében is, amennyiben emlőmegtartó műtét történt. Mastectomia esetén sugárkezelés indokolt, ha a locoregionális relapsus kockázata magas (4 vagy több pozitív nyirokcsomó, érintett sebészi rezekciós szél) [1].

1.4.3 Szisztémás kezelés

Az esetleges szisztémás kezelést fiatal nők esetében is a tumor biológiája határozza meg elsősorban (1. táblázat). Ugyanakkor figyelembe kell venni-a fiatal nő várhatóan hosszabb élettartama szempontjából- a különböző terápiaszerek potenciális, hosszú távú toxicitását: szekunder malignitás, cardiotoxicitás, az ováriumok irreverzibilis károsodása, stb. [1].

1.4.3.1 (Neo)adjuváns kemoterápia

A kezelés irányelvei nem különböznek az idősebb nőkben előforduló emlőrák kezelésében alkalmazott irányelvektől. A kezelés az I-III. stádiumban antraciklin alapú (taxánnal vagy anélkül), időtartama minimum 4, maximum 8 ciklus [1].

1.4.3.2 (Neo)adjuváns endokrin kezelés

Neoadjuváns endokrin kezelést a fiatal nőknél nem alkalmaznak. Hormon receptor pozitívitás esetén adjuváns endokrin kezelésként 5 évig Tamoxifen, esetleg GnRH analóg alkalmazandó. Aromatáz önmagában fiatal nők esetében kontraindikált [1].

1.4.3.3 Adjuváns anti-Her2 kezelés

Az egy évig tartó kezelés indikációja és hatékonysága fiatal nők Her2 pozitív emlőrákja esetében nem különbözik idősebb nőkéétől [11].

1. táblázat: Szisztémás kezelési ajánlások korai emlőrákban [11] (módosítva) a szubtypusok tekintetében ld. 2. táblázat

Szubtípus	Ajánlott kezelés	Megjegyzés
Luminalis A-szerű	ET esetek zömében	CT megfontolandó, ha <ul style="list-style-type: none"> - Lokálisan előrehaladott betegség (négy vagy több pozitív LN, minimum T3) - grade 3
LumB-szerű (HER2-negatív)	ET + CT esetek zömében	
LumB-szerű (HER2-pozitív)	CT + anti-HER2 + ET	
HER2+	CT + anti-HER2	
Tripla negatív	CT	

Rövidítések: ET: endokrin terápia, CT: kemoterápia, LN: nyirokcsomó, anti-HER2: Her2 ellenes kezelés, LumB: Luminalis B

1.5 Az emlőrák biológiája, prognosztikai és prediktív faktorok

A rosszindulatú emlődaganatokat két fő csoportra osztjuk sejteredetük alapján: a hámelemekből kiinduló daganatok a carcinomák, míg a szerv mesenchymalis elemeiből származnak a sarcomák. Kórszövettani osztályozásuk a World Health Organisation (WHO) által meghatározott kritériumok szerint történik [12].

Az emlő rosszindulatú daganatai döntő többségükben hám eredetűek, leggyakoribb formájuk az invazív (ductalis) emlőcarcinoma, kevésbé gyakoriak a lobularis carcinomák (mindkét formához társulhat, de önállóan is jelentkezhet in situ formájuk is) és egyéb speciális formák (pl. tubuláris-, micropapilláris carcinoma) [13]. Az emlő sarcomái ritkák, prognózisuk rossz [14].

A beteg életkora a betegség felfedezésekor fontos prognosztikai jelentőséggel bír, a fiatal nőket érintő emlőrák prognózisa rosszabb [15].

A tumor mérete a daganat felfedezése idején további fontos prognosztikus tényező: általában elfogadott, hogy a kisebb tumorok jobb prognózisúak (előfordul azonban, hogy viszonylag kisméretű tumor korán ad regionális nyirokcsomó áttétet, ez természetesen a prognózist negatívan befolyásolja) [16].

Régóta ismert prognosztikai faktor a regionális nyirokcsomók érintettsége [17].

Klasszikus prognosztikus tényező a tumor grádusa is, melyet a patológus a tumor hisztomorfológiai megjelenése (tubulus formálási tendencia, mag-grade, mitotikus aktivitás) alapján állapít meg. A Nottingham Prognostic Index (NPI) a tumor grádusát, méretét és a regionális nyirokcsomók érintettségét kombináló prognosztikai jelentőséggel bíró adat.

A betegség várható lefolyásának megítélésében, így az alkalmazandó további onkológiai kezelés tervezésében ma még mindig elsődleges jelentőségű a tumor TNM stádiumára (klinikai, patológiai) vonatkozó információ [18].

Az emlőrák rutin patológiai diagnosztikájának ma már nélkülözhetetlen részét képezik a prognózis megítélésében, a kezelés meghatározásában fontos immunhisztokémiai módszerek is. A hormonreceptor expresszió alapján az emlőrások két alapvető csoportra bonthatóak: ösztrogén receptor (ER) pozitív és negatív csoportokra, melyek biológiai viselkedése merőben eltérő lehet. Ez utóbbit genetikai vizsgálatok is alátámasztották: Perou és munkatársai cDNS-microarray profil alapján

írták le először az emlőrák genomikai szubtypusait [19], melyek a mai, kezelést meghatározó szubtypusok elsődleges formái.

A genetikai alapú szubtypus (intrinsic subtype) meghatározására alkalmas a PAM50 (Nanostring) RNS alapú single sample predictor [20].

A genetikai szubtypusokhoz hasonlóan immunhisztokémiailag is tovább karakterizálhatóak az ER+ és ER- tumorok, melynek a további kezelés szempontjából van prediktív szerepe (1. táblázat, 2. táblázat). Az ER+ csoporton belül a Luminális A és Luminális B proliferáló (HER2-) szubtypust a proliferációs aktivitás (Ki67 index), illetve a PgR kifejeződése különíti el, míg a Luminalis B másik alcsoportjában az ER pozitív mellett, a HER2 is amplifikált, illetve a fehérje expressziója fokozott. Az ER negatív csoportban megkülönböztetjük a HER2 pozitív (vagy újabban HER2 enriched) szubtypust, illetve a tripla negatív (ER-, PgR-, HER2-) szubtypust. A HER2 gén amplifikációja vagy fokozott fehérje expressziója kedvezőtlen prognosztikus jel (egyúttal prediktív a szisztémás anti-Her2 kezelést illetően)[11].

2. táblázat: Az emlőrák immunhisztokémiai (IHC) alapú szubtypusainak meghatározása az ESMO ajánlás [11] alapján (módosítva)

Intrinsic (genetikai) szubtypus [21]	IHC-alapú szubtypus	Megjegyzés
Luminalis A	<i>'Luminalis A-szerű'</i> <ul style="list-style-type: none"> • ER+ • HER2- • Ki67 alacsony* • PgR magas** 	*Ki67 határérték laboratórium függő**Ajánlott határérték 20% mind a Ki67, mind a PgR esetében
Luminalis B	<i>'Luminalis B-szerű (HER2-)'</i> <ul style="list-style-type: none"> • ER+ • HER2- <ul style="list-style-type: none"> ○ Ki67magas vagy ○ PgR alacsony 	
	<i>'Luminalis B-szerű (HER2+)'</i> <ul style="list-style-type: none"> • ER+ • HER2+ • bármely Ki67 • bármely PgR 	
HER2 enriched	<i>'HER2+'</i> <ul style="list-style-type: none"> • HER2+ • ER- PgR - 	
'Basal-like'	<i>'Tripla negatív'</i> <ul style="list-style-type: none"> • ER- PgR- • HER2- 	80% átfedés a 'tripla negatív' és intrinsic 'basal-like' szubtypus között (ebbe a csoportba tartozik a medulláris és adenoid cysticus carcinoma is, ez utóbbi jó prognózisú).

A genetikai alapú tesztek egy másik csoportja a betegség várható lefolyásának előrejelzésére szolgál [22] (3. táblázat). A MammaPrint (Agendia) fagyasztott mintán végzett, egyénileg tervezett cDNS alapú microarray vizsgálat, mely 70 gén mRNS-szintű kifejeződését vizsgálja [23]. Az Oncotype DX (Genomic Health, Inc.) 21 gént vizsgál valós idejű PCR-ral FFPE szövettani blokkokon, a vizsgálatot és az értékelést központilag a kaliforniai cég végzi [24]. A Mapquant DX (Ipsogen) 97 gén expresszióját értékeli fagyasztott mintán microarray módszerrel, grade 2 differenciáltságú emlőrák esetekben, a várható prognózist vizsgálva.

Ezek a prognosztikai tesztek főképp RNS-szintű vizsgálatokra támaszkodnak, és a proliferációval kapcsolatos géneket értékelik elsősorban. A sejtek egymáshoz, illetve környezetükhöz, a stromához való viszonyát, inváziós képességét, csupán néhány teszt vizsgálja [25-27].

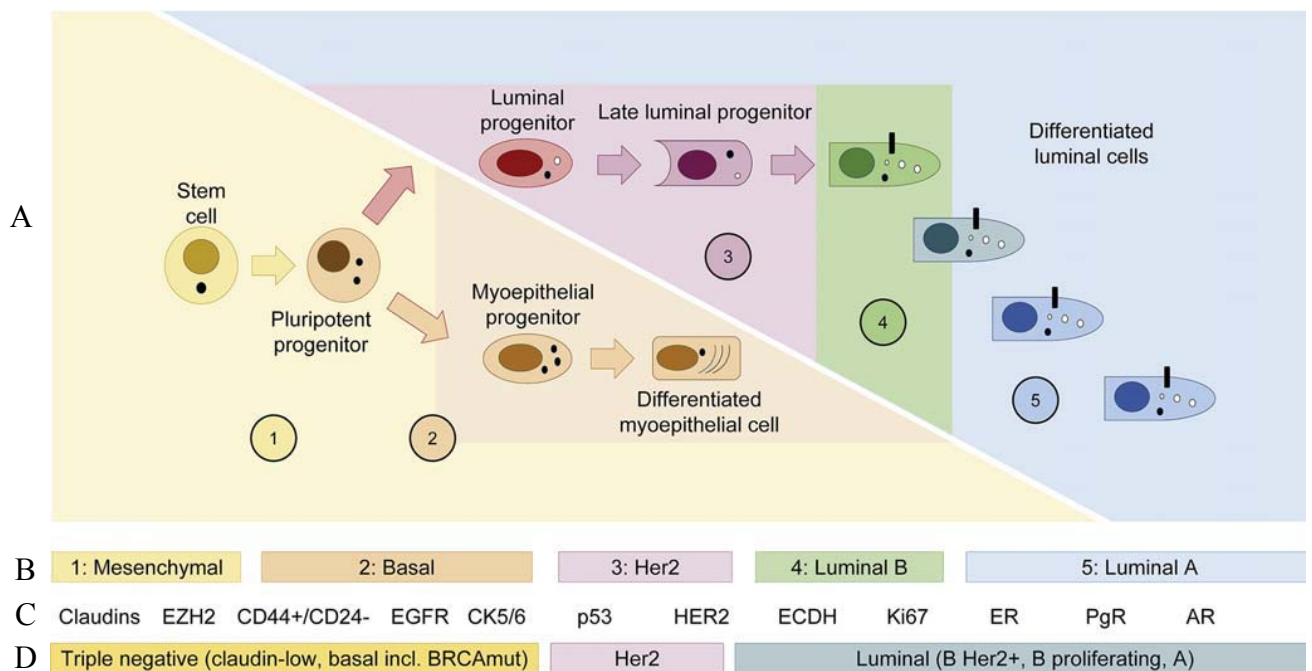
3. táblázat: Kereskedelmi forgalomban elérhető prognosztikus genomikai tesztek [22]

Teszt		Assay				Cél
Név	Cég	Elérhető	Gének száma	Szövet	Technika	
MammaPrint	Agendia	EU, USA	70	F/F	Microarray	Prognózis 61 éven felül
Oncotype DX	Genomic Health	EU, USA	21	Ffp	Q-RT-PCR	Prognózis, tamoxifen-kezelést követő kiújulás predikciója
Theros Breast Cancer Index	Biotheranostics	USA	2(5)	Ffp	Q-RT-PCR	PM prognózis, endokrin terápiát követő kiújulás predikciója
MapQuant DX	Ipsogen	EU	97	F/F	Microarray	Prognózis
Breast Bioclassifier	ARUP	USA	55	Ffp	RT-PCR	Prognózis
Celera Metastatic Score	Applera	-	14	Ffp	RT-PCR	Prognózis, tamoxifen-kezelést követő kiújulás predikciója
Breast Lymph Node (BLN) Assay	GeneSearch Veridex	UK	76	F/F	Microarray	Intraoperatív metasztáziskimutatás
Invasive Gene Signature	-	-	186	F/F	Microarray	Prognózis
Wound Response Indicator	-	-	512	F/F	Microarray	Prognózis
Nouvera Biosciences	Veridex	-	30	-	-	Prognózis, tamoxifen- és taxán kezelést követő kiújulás predikciója
eXagen	eXagen Diagnostics	-	3	Ffp	FISH	Prognózis
Mammostrat	Genomics	USA	5		IHC	PM prognózis

Rövidítések: F/F: friss vagy fagyasztott minta, Ffp: formalinfixált paraffinos metszet, IHC: immunhisztokémia, FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció, PM: menopauza után

1.5.1 Az emlőrák genomikai felosztása

Genomikai vizsgálatok alapján az emlőrák 6 fő csoportra osztható: Luminalis A, Luminalis B, Her2-enriched, basal-like, molekuláris apocrin és caludin-low, melyek jelentősen különböznek előfordulásukat és prognózisukat, valamint a kezelésre adott válaszukat tekintve [19, 21, 28, 29] (1. ábra).



1. ábra: Az emlőrák sejteredete (A), főbb genomikai szubtypusai (B), biomarkereik (C), immunhisztokémiai szubtypusai (D) (dr Szász A. Marcell által készített ábra)

1.5.2 Fiatal nők emlőrákjának klinikai és biológiai jellegzetességei

Több, régi, populációs tanulmány igazolta, hogy a fiatalkori emlőrák kedvezőtlen prognózisában a fiatal életkor önálló prognosztikai faktor [30, 31]. Ezek a tanulmányok ugyan általában a modern kemoterápiás éra előtt születtek és nem tartalmaztak kellő információt a tumor biológiájára vonatkozóan, azonban a jelen terápiás módozatokat és a tumor biológiai jellemzőit egyaránt vizsgáló közlemények is arra utalnak, hogy a fiatal nők emlőrákjának prognózisa rossz, idősebbekkel összehasonlítva sokkal gyakoribb a locoregionális és szisztémás relapszus, és a betegség miatt elhalálozott fiatal nők aránya is magasabb [32]. A fiatalkori emlőrák általában előrehaladottabb stádiumban kerül felfedezésre [33], amelyben szerepe lehet annak is, hogy e korcsoport (≤ 45 év) a nem szűrt populációba tartozik. A fiatal betegek emlőrákra vonatkozó családi anamnézise gyakran pozitív, a genetikai predispozíció lehetősége (elsősorban a BRCA tumorszupresszor gének csírasejtes mutációja) mindig felmerül.

A fiatal nők emlőrákjának biológiája kedvezőtlen: gyakoribb, hogy a tumor hormon receptor negatív, HER2 overexpressziót mutat, magas grádusú (grade 3), és kifejezett proliferációs aktivitás jellemzi [34-36].

1.6 Öröklött predispozíció, családi halmozódás

Fiatalkorban jelentkező tumorok esetében mindig felmerül az öröklött predispozíció, családi halmozódás szerepe. Paul Broca francia sebész és anatómus volt az, aki 1866-ban először írt a családi halmozódást mutató emlőrákról, felesége családjának ismertetésén keresztül, *Traité des tumeurs* [37] című könyvében (2. ábra).

Epidemiológiai adatok alapján az emlőrák esetek 27%-ának kialakulásáért genetikai tényezők a felelősek [38, 39], azonban csupán 5-10 %-ukban szerepel örökletes tényező, amelyek közül is csak 4-5%-ukban mutatható ki autoszomális domináns (AD) módon öröklődő, magas penetranciájú gének szerepe [40-43].



A

INFLUENCES HÉRÉDITAIRES.

151

cancer se transmet réellement par hérédité. Mais on peut sans cela démontrer la réalité de l'influence héréditaire, et l'exemple suivant, que je crois devoir rapporter avec quelques détails, ne laissera, je pense, place à aucun doute. J'en possède la relation écrite, en 1858, de la main même du docteur X... On me permettra de remplacer les véritables initiales par des lettres de convention.

1^{re} GÉNÉRATION. — Madame Z. meurt d'un *cancer du sein* en 1788, vers l'âge de 60 ans. Elle avait perdu plusieurs enfants en bas âge. Elle laissait quatre filles qui ont été mariées toutes les quatre, et que j'appellerai mesdames A, B, C, et D.

2^e GÉNÉRATION. — Les quatre filles de madame Z. :

- 1^o Madame A, morte d'un *cancer du foie*, en 1820, à 62 ans; née en 1758;
- 2^o Madame B, morte d'un *cancer du foie*, en 1805, à 43 ans; née en 1762;
- 3^o Madame C, morte d'un *cancer du sein*, en 1814, à 51 ans; née en 1763;
- 4^o Madame D, morte d'un *cancer du sein*, en 1827, à 54 ans; née en 1773.

3^e GÉNÉRATION.

- A. Madame A a eu trois filles qui vivent encore, et qui sont âgées de 68, 72, et 78 ans. Elles ne sont pas mariées;
- B. Madame B a eu cinq filles et deux fils :
 - 1^{er} fils, mort non cancéreux vers l'âge de 28 ans, sans enfants;
 - 2^e fils, mort d'un *cancer de l'estomac* à l'âge de 64 ans, sans enfants;
 - 1^{re} fille, morte d'un *cancer du sein* après opération et récidive, à 35 ans.
 - 2^e fille, morte d'un *cancer du sein* sans opération.....
 - 3^e fille, morte d'un *cancer du sein* sans opération.....
 - 4^e fille, morte d'un *cancer du foie*.....
 - 5^e fille, mariée, sans enfants, morte vers 60 ans, en 1858.

Elles sont mortes toutes les quatre entre 35 et 45 ans, en moyenne à 40 ans, et n'ont pas laissé d'enfant.

C. Madame C. a eu cinq filles et deux fils :

- 1^{er} fils, mort à l'armée, sans enfants;
- 2^e fils, âgé aujourd'hui de 72 ans et bien portant.....

a eu un fils mort paraplégique à 18 ans, et une fille unique âgée aujourd'hui de 24 ans, non mariée;

1^{er} fils, aujourd'hui 58 ans. Est bien portant. Il a trois fils bien portants dont l'aîné a 30 ans;

2^e fils, mort jeune aux colonies, sans enfants;

1^{re} fille, morte en couches de 27 à 30 ans;

2^e fille. Morte d'un *cancer du sein* en 1854, à 49 ans. Elle a laissé deux filles, dont l'aînée a 22 ans aujourd'hui. Elles sont bien portantes toutes deux;

3^e fille, morte phthisique à 41 ans.

1^{re} fille, morte d'un *cancer du sein* en 1817, à 37 ans. Laisant deux fils et trois filles.....

B

2. ábra: A. Paul Broca Traité des tumeurs [37] című könyvének (1866) belső lapja

B. Részlet a könyvből, amelyben a szerző az öröklődés szerepét vizsgálja a rosszindulatú daganatok kialakulásában egy család 3 generációjának ismertetésén keresztül, amelynek 26 felnőtt kort megélt tagja közül 11 nő halt meg emlőrákban, közülük heten 40 éves koruk előtt.

1.6.1 Magas penetranciájú gének

A genetikai ismeretek és alkalmazott technikák fejlődésével lehetővé vált a BRCA1 és BRCA2 gén klónozása. Bár e gének patogén mutációinak penetranciája magas, e mutációk viszonylag ritkák, együttes gyakoriságuk 0,4% körüli [44]. A BRCA1/BRCA2 patogén mutációi az emlőrák kialakulásának kockázatát 10-20-szorosára emelik. A TP53 gén csírasejtes mutációi is magas penetranciájú mutációk, bár ezek még kevésbé gyakoriak.

1.6.1.1 BRCA1

1990-ben vált ismertté, hogy a BRCA1 gén a 17-es kromoszómán helyezkedik el (chr17q), klónozása 1994-ben történt. A BRCA1 gén elsősorban a DNS hibajavításban szerepel (beleértve a homológ rekombinációt és nukleotid excision repair-t is), azonban szerepe van a sejtciklus szabályozásban is (ellenőrzőpont kontroll) [45].

A BRCA1 gén patogén mutációját 1/500-1000 személy hordozza (az ún. founder populációkat nem számolva), ennek szerepe a családi halmozódást mutató emlőrák esetek 7-10 %-áért felelős. A BRCA1 gén patogén mutációja az emlőrák kialakulásának élethosszra szóló 60-85%-os kockázatát jelenti, elsősorban fiatal életkorban a relatív kockázat (RR) emelkedésével jár (30 és 39 éves kor között az emlőrák RR 33, míg 60 és 69 éves kor között ez az érték 14-re csökken) [46]. Az ellenoldali emlőrák kialakulásának kockázata is nő: 70 éves korig a kumulatív kockázat 64% [47, 48].

A BRCA1 gén patogén mutációi az ováriumrák kialakulásának 40-60%-os emelkedett kockázatát okozzák, mely élethosszra szól [46], emellett emelkedik a hasnyálmirigyrák kialakulásának valószínűsége is [48, 49].

A BRCA1 gén 24 exonnal bír, legnagyobb a 11-es exon. Mutációk a kódoló régiók bármely területében kialakulhatnak, a leggyakoribbak *frameshift* mutációk, amelyek truncált proteinek kialakulását eredményezik. *Missense* mutációk (a mutációk 2%-át alkotják) esetében a klinikai jelentőség elbírálása (illetve polimorfizmusoktól való elkülönítésük) rendkívül nehéz. Az esetek 15-27%-ában a mutációk *génátrendeződésnek* (akár egész exont érintő deléció/inzerció/duplikáció) felelnek meg

[50]. Bár több száz különböző mutációt leírtak már, egyes populációkban bizonyos mutációk jelenléte a leggyakoribb (founder mutációk): pl askenázi zsidókban a c.68_69delAG és c.5266dupC (korábban 185delAG/5382insC) mutációk a populáció 1.2%-ában kimutathatóak. A c.5266dupC mutáció kelet-európaiakban (elsősorban Lengyelországban) is kimutatható.

A BRCA1 gén mutációihoz köthető emlőrák elsősorban magas grádusú invazív (ductalis) carcinoma, gyakran medulláris carcinomára emlékeztet: relatíve jól körülhatárolt, a magpolymorphismus kifejezett, számos osztódó sejtalakot tartalmaz [51, 52]. DCIS az invazív tumorhoz ritkábban társul, mint sporadikus emlőrák esetekben.

E tumorok 70-75%-ban hormonreceptor- és Her2 negatívak, gyakran bazális immunfenotípusúak (CK5/6, CK14, EGFR immunhisztokémiai reakció pozitív) [53].

A BRCA1 mutációhoz kötődő emlőrák (és a bazális fenotípusú sporadikus esetek is) gyakran őssejt fenotípust mutat (CD44+/CD24-) [54]. ALDH1 pozitív emlő őssejtek és aberráns luminalis progenitor sejtek egyaránt kimutathatóak BRCA1 mutáns emlőrák esetekben [55].

A legtöbb BRCA1 mutáns emlőrák genomikai vizsgálatokkal, cluster analízissel a bazális intrinsic szubtypus közelében rendeződik [56]. Azonban a BRCA1 asszociált tumorok 5-20 %-a ER pozitív, különösen, ha idősebb betegekben alakul ki [57].

1.6.1.2 BRCA2

A BRCA2 gén a DNS repair-ben (homológ rekombináció, kettős-szál törés hibajavítása) játszik fontos szerepet. Biallélikus mutációja áll Fanconi anémia (FANCD1) hátterében.

A BRCA2 gén patogén mutációja az emlő- és petefészekrák halmozódást mutató családok 10%-ában fordul elő, gyakorisága a normál populációban 1:600-1:800 személy [58]. Az emlőrák kialakulásával kapcsolatos, élethosszig tartó kockázat e gén patogén mutációival kapcsolatban 40-85% [46, 47]. Az askenázi zsidókban leggyakoribb patogén mutáció -(6174delT) c.5946delT- alacsony penetranciájú, így az ezzel kapcsolatos élethosszig tartó emlőrákkockázat 30-40%. A petefészekrák kialakulásának kockázata a BRCA2 gén patogén mutációja esetén 30%. Emelkedett továbbá az epeúti

rosszindulatú daganatok, a melanoma malignum és a hasnyálmirigy- valamint gyomorrák kialakulásának kockázata is.

A BRCA2 gén mutációja férfiakban a prosztaták kialakulásának élethosszig tartó 14-20%-os kockázatát jelenti. A férfi emlőrák RR-je 80-100-szoros a normál populációéhoz képest, a férfi emlőrák esetek 10%-a e gén patogén mutációihoz köthető [59], a mutáció hordozó férfiak 8-10%-ában alakul ki emlőrák [60].

A BRCA2 nagy gén, 27 exont tartalmaz, a legnagyobb a 11-es exon. Mutációk bármely kódoló régióban előfordulhatnak, a legtöbbjük *frameshift* mutáció. Nagy számban fordulnak elő *missense* mutációk is, melyek klinikai relevanciája legtöbbször nem egyértelmű. A nagy *génátrendeződések* sokkal kevésbé gyakoriak, mint BRCA1 mutáció esetén.

A BRCA2 asszociált emlőrák patológiailag heterogén, nem oly jellegzetes, mint a BRCA1 mutációk esetében kialakuló daganatok. Gyakrabban fordul elő közöttük lobularis carcinoma, mint a BRCA1 mutációi esetében, az invazív ductalis carcinoma esetekben a tubulusképzés sokkal kevésbé jellemző, mint sporadikus esetekben, gyakrabban társul DCIS-sel. Ezen tumorok gyakran ER+-ak, ugyanakkor magasabb grádusúak, mint a sporadikus emlőrások. Összességében, patológiai jellemzőik közelebb állnak a sporadikus emlőrásokéihez [61].

Idősebb nők esetében a BRCA2 mutáció asszociált ER+ emlőrák ritkább, a CIMBA tanulmány alapján az esetek 16%-ban az immunfenotípus tripla negatív [57].

1.6.1.3 TP53

A TP53 gén a sejtciklus szabályozásában kulcsfontosságú, a sejtciklus lassulását okozza, illetve apoptózist indukál.

A TP53 gén mutációja detektálható leggyakrabban a humán daganatokban. Szomatikus mutációi gyakran fordulnak elő szolid tumorokban. Csírasejtes mutációja okozza a Li-Fraumeni szindrómát (LFS), melynek részjelenségét képezik gyermekkori daganatok (lágyrész tumorok, osteosarcoma, gliomák, mellékvesekéreg carcinoma) és nagyon korai emlőrák (a génhiba hordozóinak 30%-ában alakul ki emlőrák a beteg 30 éves kora előtt). LFS az emlőrák esetek kevesebb, mint 0.1%-ában etiológiai tényező,

azonban a génhiba 18-60%-os kockázatfokozódást eredményez e betegek 45 éves koráig, a normál populációhoz viszonyítva.

1.6.1.4 Egyéb, potenciálisan magas kockázatú gének

Egyéb gének hibái is okozhatnak 40-60%-os emlőrák kockázatot, mint pl. a PTEN gén mutációi Cowden szindrómában, STK11 gén hibái Peutz-Jeghers szindrómában, vagy az E-Cadherin (CDH1) hibája, mely hereditér diffúz gyomorrák és emlőrák kialakulásának hátterében áll.

1.6.2 Közepes penetranciájú gének

Négy további gén mutációi az emlőrák kialakulásának relatív kockázatát 2-4-szeresére emelik. Előfordulásuk ritka, a populáció <0.6%-ában található meg.

1.6.2.1 ATM

Az ataxia teleangiectasia autoszomális recesszív módon öröklődő betegség, melyet az ATM gén homozigóta mutációi okoznak. Klinikailag ez a betegség progresszív cerebelláris ataxiával, oculomotorikus apraxiával, a conjunctiva teleangiectasiájával, immundeficienciával jár, azonban a malignus daganatok, köztük az emlőrák kialakulásának kockázatát is fokozza.

1.6.2.2 CHEK2

A CHEK2 ellenőrző pont kináz, a TP53 és BRCA1 által is igénybevett útvonalban szereplő tumor szupresszor gén. A gén csírasejtes mutációja -1100delC-melleyel kapcsolatban az emlőrák relatív rizikója 2.34. E mutáció hordozóiban gyakrabban alakul ki kétoldali emlőrák [62].

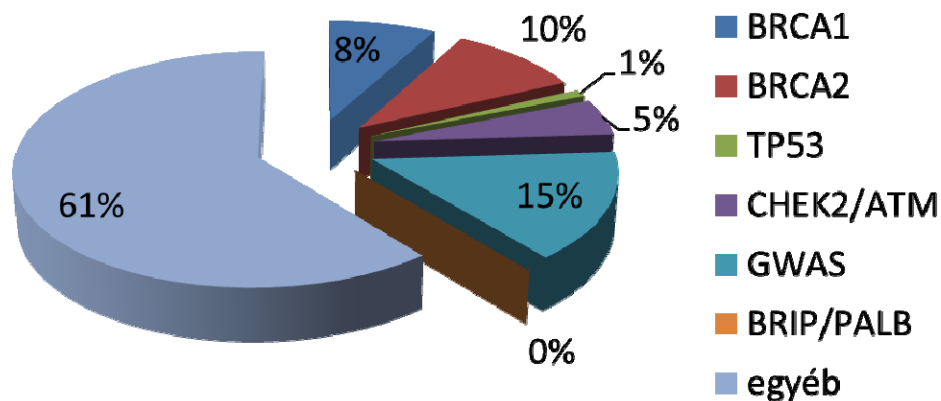
1.6.2.3 BRIP1

A BRIP1 gén által kódolt fehérje a BRCA1 kötődési partnere. Családi halmozódást mutató emlőrákban trunkáló mutációit mutatták ki. Biallelikus mutációja Fanconi anémia egy másik (BRCA2 mutációhoz asszociálttól eltérő) formáját okozza (FANC-J).

1.6.2.4 PALB2

A BRCA2 génnel együttműködve szerepel a homológ rekombinációban és a kettősszál-törés hibajavításában. Mutációival asszociált emlőrák RR 2.3, founder mutációja Finnországban fordul elő.

A magas és közepes kockázattal járó génekkel összefüggésben kialakuló, családi halmozódást mutató esetek arányait a 3. ábra, e gének összefoglalását a 4. táblázat tartalmazza.



3. ábra: Ismert kóroki szereppel bíró gének a családi halmozódást mutató emlőrák esetekben [39]

4. táblázat: Emlőrák kialakulására hajlamosító magas és közepes rizikójú gének (módosítva) [39]

Gén (Öröklésmenet)	Egyéb tumor	Gyakoriság (%)	A génnel kapcsolatba hozható emlőrák esetek aránya (%)	Arányuk a HPHBC- n belül (%)	Élethosszra szóló rizikó nőkben % (RR)
<i>BRCA1</i> (AD)	Ovarium	0.1	1.5	40	60–85
<i>BRCA2</i> (AD)	Ovarium/prostata, pancreas [HoZ- Fanconi (AR)]	0.1	1.5	40	40–85
<i>TP53</i> [LFS (AD)]	Sarcoma, glioma, mellékvese	0.0025	0.02	2	80–90
<i>PTEN</i> [Cowden szindróma (AD)]	Pajzsmirigy, colorectalis	0.0005	0.004	0.3	25–50
<i>CHEK2</i>	Colorectalis, prostata	0.5	0.5	0	18–20 (2.0)
<i>ATM</i> (AD & AR)	Lymphoma, leukaemia [HoZ (AR)]	0.5	0.5	0	20 (2.3)
<i>STK11</i> [Peutz- Jeghers (AD)]	Colorectalis	0.001	0.001	0.6	50
<i>BRIP1</i> (AD & AR)	HoZ-Fanconi (AR)	0.1	0.1	0	20 (2.0)
<i>PALB2</i> (AD & AR)	HoZ-Fanconi (AR)	0.1	0.1	0	20 (2.0)
E-Cadherin [<i>CDH1</i> (AD)]	Hereditár diffúz gyomorrák	0.005	0.01	0.2–1	40–60
<i>NF1</i> (AD)	Neurofibroma, glioma, MPNST	0.04	0.01	0	18

HPHBC: highly penetrant hereditary breast cancer (>3 rokon érintett) AD: autoszomális domináns, AR: autoszom. recesszív, HeZ: heterozigóta, HoZ: homozigóta, LFS: Li-Fraumeni szindróma

1.6.3 Alacsony penetranciájú gének

Az emlőrák kialakulásának kockázatát kissé fokozó allélek felelősek - akár polygénés multiplikatív formában- a fennmaradó familiáris emlőrák esetek kialakulásáért. Ezeket az alacsony penetranciájú géneket az 5. táblázat foglalja össze.

5. táblázat: Alacsony penetranciájú gének (módosítva) [39]

Gén	Locus	SNP	RR
<i>FGFR2</i>	10q26	rs2981582	1.26 (1.23– 1.30)
<i>TOX3/TNRC9</i>	16q12	rs3803662	1.11 (1.08– 1.14)
<i>MRPS30</i>	2q35	rs10941679	1.11 (1.03– 1.20)
<i>MAP3K1</i>	5q11	rs889312	1.13 (1.10– 1.16)
<i>CASP8</i>	2q33	rs1045485	0.89 (0.85– 0.94)
<i>FAM84B</i>	8q24	rs1328165	1.08 (1.05– 1.11)
<i>LSP1</i>	11p15	rs3817198	1.07 (1.04– 1.11)
<i>NEK10</i>	3p24	rs4973768	1.11 (1.08– 1.13)
<i>COX11</i>	17q23.2	rs6504950	0.95 (0.92– 0.97)
<i>TNP1/IGFBP5/IGFBP2/TNS1</i>	2q35	rs13387042	1.12 (1.09– 1.15)
<i>NOTCH2</i>	1p11.2	rs11249433	1.16 (1.09– 1.24)
<i>RAD51L1</i>	14q24.1	rs999737	0.94 (0.88– 0.99)
<i>MRPS30</i>	5p12	rs10941679	19.jan

<i>ESR1</i>		rs3757318	1.15 (1.08– 1.22)
<i>CDKN2a</i>	9q	rs1011970	1.09 (1.04– 1.14)
	10q	rs704010	1.07 (1.03– 1.11)
	10q	rs10995190	0.86 (0.82– 0.91)
	10q	rs2380205	0.94 (0.91– 0.98)

SNP: single nucleotide polymorphism, RR: relatív kockázat

1.7 A fiatalkori emlőrák speciális kérdései

A fiatal emlőrákos nők néhány egyedi problémával is szembesülnek, mely életkori sajátosságaikból következnek. A rákdiagnózis okozta pszichés sokk feldolgozása mellett a fiatal nőknek rövid idő alatt dönteniük kell a felajánlott sebészi, neoadjuváns, adjuváns kezelés elfogadásásáról, valamint szembesülniük kell azzal a ténnyel is, hogy a kezelés hatására terméketlenné válhatnak, így még nem szült, vagy további gyermekvállalást tervező nők esetében a fertilitás megőrzése fontos kérdés. A fiatal nők (és partnerük) pszichés vezetésének - a rák diagnózis feldolgozása mellett- a szexualitás, a testkép kérdéskörét is érintenie kell.

1.7.1 Emlőrák és terhesség

A fiatal életkor a családalapítás ideje, az emlőrák esetek 0,6%-ban a betegség tényére a terhesség vagy a szoptatás ideje alatt, illetve a posztpartum időszakban derül fény.

1.7.1.1 A terhességi emlőrák

Terhességi emlőrának nevezzük a várandósság ideje alatt, vagy a szülést követő 1 éven belül, a posztpartum időszakban kialakult emlőrákot. Ez a definíció azonban nem általános érvényű, egyes szerzők a posztpartum időszakot a szülést követő 6 hónapnak, míg mások 2 évnak tekintik [63, 64].

A terhességnek kettős hatása van az emlőrák kialakulását tekintve: bár hosszú távon protektív, epidemiológiai vizsgálatok alapján az is ismert, hogy a szülést követő időszakban átmenetileg fokozza az emlőrák kialakulásának kockázatát. Ez az emelkedett rizikójú időszak 2-15 év lehet, sőt, idős primipara nők esetében akár ennél is hosszabb [65-67].

A terhességi emlőrák incidenciája a fejlett országokban 1/10000-1/3000 terhesség. Várhatóan növekvő gyakorisággal találkozunk ezzel a kórképpel, miután a nők első gyermeküket egyre későbbi életkorban vállalják, az életkor emelkedésével pedig a daganatok előfordulási valószínűsége is nő. Becslések szerint a ≤ 40 éves nők körében előforduló emlőrák esetek 10%-a terhességhez kapcsolódó [68].

A terhességi emlőrák rendkívül bonyolult kérdés társadalmi, etikai, pszichológiai vagy akár orvosi szempontból. A terhes/laktáló emlő szerkezet változása miatt a diagnózis nehéz, az anya kemoterápiás kezelése - amely bizonyos esetekben halaszthatatlan - potenciálisan magzatkárosító. A klinikusok kevés tapasztalattal rendelkeznek a terhességi emlőrák komplex diagnosztikáját, kezelését illetően, így előfordul, hogy a diagnózis késik, az anya nem a megfelelő időben kapja meg az adekvát kezelést, esetleg -a terhességére való tekintettel- csökkentett dózissal, inadekvát kezelést kap. Előfordul az is, hogy a terhesség megkérdőjelezhető befejezésére kerül sor, vagy indukált koraszülést választ a kezelőorvos.

A terhességi emlőrák prognózisa - a legtöbb közlemény alapján- kedvezőtlen [63, 69-72]. Nem világos azonban, hogy ez a kedvezőtlen prognózis a terhesség következménye, vagy a betegek fiatal életkorából adódik, amely önmagában is kedvezőtlen prognosztikai faktor [73].

A terhességi emlőrakkal foglalkozó tanulmányok ritkák, és közülük is csak néhány foglalkozik a betegség patológiai karakterizálásával. Ez utóbbiak többsége az invazív tumor típusával, differenciáltságával, TNM - és hormonális receptor státuszával

foglalkozik (mely legtöbbször inkomplett adatokat tartalmaz ez utóbbi tekintetében), azonban a Her2 státusz [74-81], a Ki67 proliferációs index [74, 77, 79], a p53 [74, 80], az immunhisztokémiai fenotipizáláson alapuló tumor szubtípus [77], valamint az invazív tumorhoz esetlegesen társuló in situ komponens jellemzőit illetően [81] csupán kevés adat található az irodalomban.

1.7.1.2 Terhesség emlőrák után

A fiatalkori emlőrákos betegek egy másik csoportjának az emlőrák diagnózisakor még nincs gyermeke, esetleg további gyermekeket szeretne, így ezeknél a betegeknél fontos kérdés a fertilitás megőrzése, illetve egy későbbi terhesség lehetőségének megteremtése: annak eldöntése, hogy az emlőrák diagnózisa és kezelése után vállalható-e terhesség, és ha igen, mikor?

1.7.1.2.1 A termékenység megőrzése

A kemoterápia ismert direkt toxikus hatással van a primordiális tüszőkre, még azoknál a fiatal nőknél is csökkent az ovárium rezerv kapacitása, akiknek a kezelés befejezése után szabályos menstruációs ciklusa van. Így a kezelés megkezdése előtt a fertilitás megőrzésének kérdése a beteggel mindenképp megbeszélést igényel! A kemoterápia megkezdése előtt az ovarium stimulálása (nagy dózisban alkalmazott aromatáz gátló vagy tamoxifen, kis dózisú folliculus stimuláló hormonnal (FSH), amely az ösztadiol szint nagyfokú emelkedését kiküszöböli) elegendő számú petesejt érését biztosítja akár egyetlen menstruációs ciklus alatt. Így lehetőség van a petesejtek, illetve amennyiben a betegnek van partnere, esetleg donor sperma alkalmazásával- embryo fagyasztásra [82, 83]. További lehetőség a petefészek szövet fagyasztása, amely a kezelés befejezése után visszaültethető, bár ez jelenleg még nem széles körben alkalmazott eljárás [84, 85].

Az International Society of Fertility Preservation ajánlásai alapján az emlőrák diagnózisakor a beteg számára lehetővé kell tenni a termékenység megőrzésének kérdésében jártas szakemberrel való konzultációt is. A termékenység megőrzése irányában tett lépésekre a legalkalmasabb a sebészi kezelés befejezése és az adjuváns

kezelés megkezdése közötti időszak. Embrió vagy petesejt fagyasztás a legmegfelelőbb eljárás. Amennyiben a beteg neoadjuváns kezelést kap, az ovárium szövet fagyasztása megfontolandó [85].

1.7.1.2.2 Az emlőrák utáni terhesség hatása a prognózisra

A fiatal emlőrákos nők közül ma már egyre többen tervezik, hogy gyermeket vállalnak emlőrákjuk kezelését követően. Irodalmi adatok alapján a fiatal emlőrákos nők 40-50%-a gondolkozik gyermekvállaláson, azonban csupán 4-7%-uk vállalja a terhességet. Mind a betegek, mind kezelőorvosaik körében nagy a félelem - különösen az ER+ tumorok esetében- egy esetleges terhesség negatív hatásait illetően. Erre utal az a tény is, hogy e betegeknél az indukált abortusz gyakorisága 30% [86]. Sajnos nagyon kevés evidencia áll rendelkezésre az emlőrák utáni terhesség biztonságosságát illetően. H.A. Azim Jr és munkatársainak közelmúltbeli retrospektív tanulmánya ER+ emlőrákos nők kezelés utáni terhességének hatásait vizsgálva azt találta, hogy a terhességet kiviselt nők teljes túlélése jobb volt, mint a párosított, kontroll eseteké: emlőrákjuk után terhességet nem vállaló fiatal nőké. Ugyan a terhesség protektív jellegét nem tudták kimutatni, eredményeik azonban arra utalnak, hogy az emlőrák utáni terhességnek nincs negatív hatása a betegség prognózisát illetően. A vizsgált betegek valamennyien 60 hónapos endokrin terápiát követően vállalták terhességüket (a kontrollcsoport betegei is 60 hónapos endokrin kezelésben részesültek) [87]. Jelenleg folyamatban van a Breast International Group és a North American Breast Cancer Group közös prospektív vizsgálata, mely azoknak a fiatal emlőrákos nőknek kíván útmutatást nyújtani, akik a klasszikus endokrin terápia befejezténél korábban kívánnak gyermeket vállalni [88].

1.7.2 A szexualitás és pozitív testkép

Fiatal emlőrákos nők esetében a beteg pszichés vezetésének része a szexualitás és a pozitív testkép kérdésköre is, mely a beteg életkori sajátosságaiból adódóan a személyiség és önkép meghatározó része ebben a populációban is. E tényezők részletes tárgyalása azonban túlmutat jelen dolgozat keretein.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink első részében emlőrákos fiatal nők eseteit hasonlítottuk össze idősebb nők emlőrák eseteivel, a tumor biológiai jellemzőit, az esetleges kezelési különbségeket és a prognózisbeli különbségeket vizsgálva (részletes kérdéseket ld. e fejezet 2.1 és 2.2 alpontjaiban).

Miután fiatal nők emlőrákja kapcsán a családi halmozódás, a genetikai prediszpozíció szerepe mindig felmerül - ezen belül is leggyakrabban a BRCA1/2 gén mutációi - így statisztikai algoritmus segítségével határoztuk meg e gének mutációinak hordozási valószínűségét fiatal betegcsoportunkban, majd eredményeinket összevetettük a vizsgált betegek BRCA genetikai tesztjének eredményével (részletesebben ld. e fejezet 2.3 alpontjában).

A 2007-ben leírt claudin-low molekuláris szubtypusú emlőrák prognózisa kedvezőtlen, immunfenotípusa - a BRCA1 mutációhoz társuló emlőrákhoz hasonlóan - leggyakrabban tripla negatív, így azt vizsgáltuk, BRCA-asszociált emlőrák esetekben a claudin-low fenotípus kimutatható-e? (ld. e fejezet 2.4 alpontjában)

Végül arra kerestük a választ, van-e prognózisbeli különbség a terhességi emlőrák és a fiatal nők nem terhességhez kötődő emlőrákja között, illetve van-e eltérés a tumor biológiájában? (ld. e fejezet 2.5 alpontjában)

2.1 Fiatalkori és idősebb betegeket érintő emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők és kimenetel alapján

1. Van-e különbség a grade megoszlásában a nagyon fiatal és az idősebb betegek emlőrákja között?
2. Van-e különbség a T és N stádium tekintetében a nagyon fiatal és az idősebb nők emlőrákja között?
3. Van-e különbség a nagyon fiatal és az idősebb nők emlőrákjának IHC-alapú szubtypusainak megoszlása között?

4. Van-e különbség a fiatal emlőrákos nők prognózisában, ha a pozitív emlő- és petefészekrák családi anamnézisű betegek túlélését hasonlítjuk össze a negatív családi anamnézisű betegekével?
5. Van-e különbség a prognózisban, ha a negatív családi anamnézisű betegek túlélését hasonlítjuk össze azon betegek túlélésével, akiknek a családjában bármilyen malignus betegség már előfordult (nem kizárólag emlő-, vagy petefészek rák)?
6. Függ-e a túlélés az alkalmazott kezeléstől (neoadjuváns vs adjuváns)?
7. Van-e különbség a nagyon fiatal és az idősebb emlőrákos nők túlélésében?

2.2 Fiatal- és időskori emlődaganatok morfológiai és molekuláris sajátosságainak összehasonlítása

A daganatok morfológiai és immunhisztokémiai sajátosságai mennyire térnek el a rosszabb prognózisú fiatalkori és az általában kedvezőbbnek vélt, idősebb nőket érintő tumorokban? Milyen mértékű az intratumorális heterogenitás a két vizsgált csoportban?

2.3 A BRCA mutáció státusz előrejelzése a BRCAPRO algoritmussal

Előrejelezhető-e a BRCA mutáció státusz az általunk kiválasztott fiatalkori emlőrákos kohortban a részletes családi anamnézis és a fiatalkori emlőrák esetek immunhisztokémiai tulajdonságainak ismeretében?

2.4 BRCAmut és claudin-low emlőtumorok: közös leszármazottak?

Kimutatható-e a claudin-low fenotípus halmozódása BRCA mutáció asszociált emlőrákban?

2.5 A terhességi emlőrák (PABC) klinikopatológiája és kimenetele

1. Van-e különbség terhességi emlőrák eseteink és a hozzájuk párosított kontroll - nem terhességi - emlőrák esetek között a klinikopatológiai jellemzőkben?
2. A tumorok immunhisztokémiai sajátosságai, IHC-alapú szubtípusa eltérnek-e a két csoportban?
3. Van-e különbség az alkalmazott kezelés tekintetében a terhességi és nem terhességi emlőrák esetekben?
4. Van-e különbség a két csoport prognózisában?

3. MÓDSZEREK

3.1 Fiatalkori és idősebb betegeket érintő emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők és kimenetel alapján

Betegek. 1999. január 1 és 2009. december 31. között a Semmelweis Egyetem II.sz Patológiai Intézetének archivumában fellelt százhat, 35 éves vagy annál fiatalabb emlőrákos nő esetét elemeztük. Ezen esetek klinikopatológiai adatait összevetettük 55 nő (36-45 év) -2. csoport, 214 nő (46-65 év) -3. csoport, 110 nő (66-75 év) -4. csoport és 58 nő (idősebb, mint 75 éves) -5. csoport adataival. Szűrően kiemelt emlőrákos nőbetegek nem kerültek a vizsgálatba.

Patológiai jellemzők, immunhisztokémia. A tumor kórszövettani típusát, mag grade-jét, ösztrogén receptor (ER), progeszteron receptor (PgR) expresszióját, Ki67 proliferációs indexét és Her2 expresszióját vizsgáltuk. Az immunhisztokémiai reakciók részletezését lásd Függelék 1-ben. Az immunhisztokémiai reakciók értékelése az érvényben lévő guideline-ok útmutatása alapján történt [89, 90].

Fluoreszcens in situ hibridizáció. A FISH vizsgálat részletezését lásd Függelék 1-ben. Ahol a Her2 IH vizsgálat és a HER2 FISH eredménye nem egyezett az expresszió tekintetében, ott az érvényben lévő ajánlásoknak megfelelően a HER2 FISH vizsgálat eredményét tekintettük mérvadónak.

IHC szubtypusok. Az immunhisztokémiai reakciók eredménye alapján meghatároztuk a szubtypusokat: Luminalis A-nak (LumA) tekintettük azon ER+ és PgR+/- tumorokat, amelyek Ki67 proliferációs indexe 20% alattinak bizonyult, Luminalis B-nek (LumB) az ER+ és PgR+/- tumorokat, amelyek Ki67 proliferációs indexe 20% felett volt, vagy ugyanakkor Her2 expressziót is mutattak. Az ER-, PgR- és Her2- tumorokat a tripla negatív (TNBC), míg az ER-, PgR- de Her2+ tumorokat a Her2+ szubtypusba soroltuk.

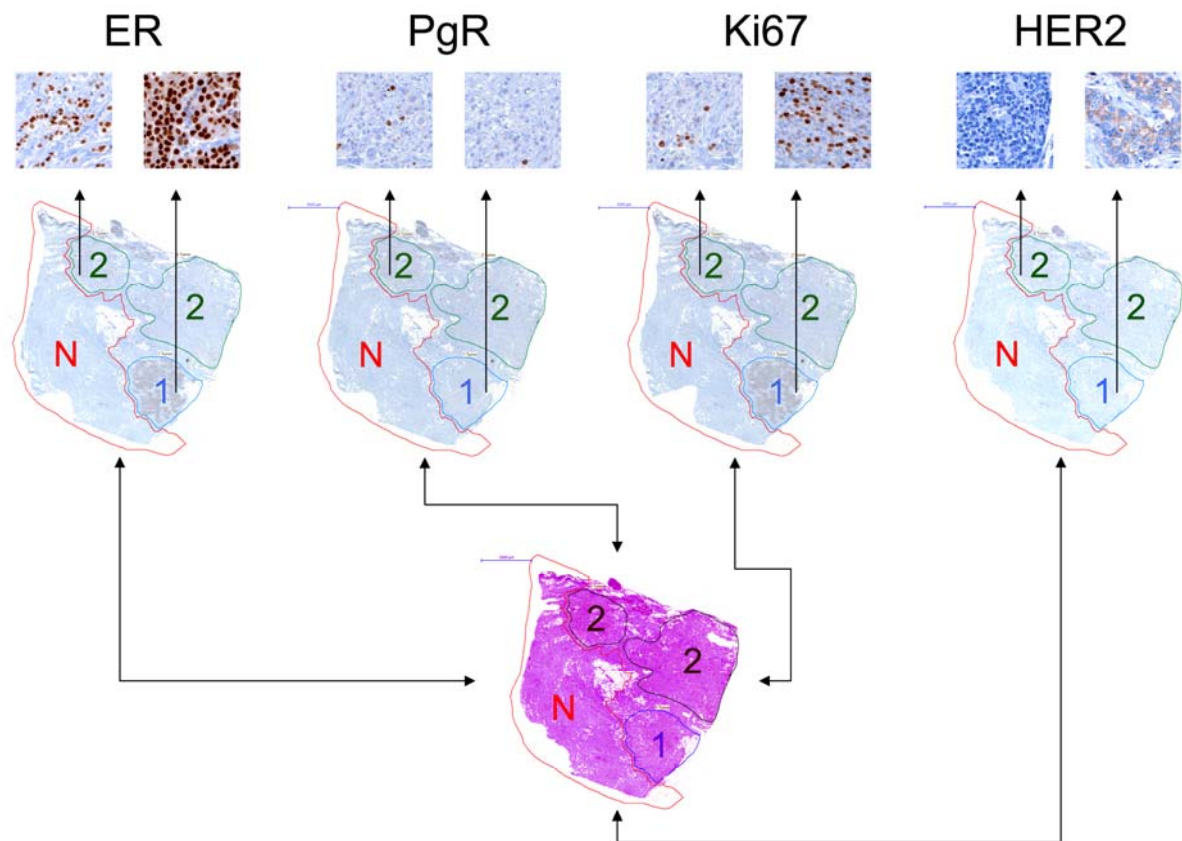
Anamnézis. A ≤ 35 éves betegeknél és családjuknál részletes kérdőívet küldtünk, amelyben egyéni és családi anamnézisükre vonatkozó kérdések szerepeltek. (A kérdőívet lásd a Függelék 2-ben)

Statisztika. A különböző életkori csoportok klinikopatológiai és prognosztikai adatait χ^2 teszttel és Kruskal-Wallis teszttel hasonlítottuk össze. A relapsus mentes túlélést Kaplan-Meier módszerrel vizsgáltuk. A teljes túlélés idejének a tumor első diagnózisa és a beteg halála között eltelt időt tekintettük, az összehasonlításokban a log-rank tesztet használtuk. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0.05$ -t tekintettük. A statisztikai elemzés a Statistica 9.0 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA) és az SPSS 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) segítségével történt. Vizsgálatunkat a Semmelweis Egyetem Regionális Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta (TUKEB 17/2006.)

3.2 Fiatal- és időskori emlődaganatok morfológiai és molekuláris sajátosságainak összehasonlítása

Betegek. Negyvenegy fiatal (≤ 35 év) és 33 idős (>65 év) emlődaganatos beteg tumorát vizsgáltuk, amelyek patológiai feldolgozása a Semmelweis Egyetem II. sz Patológiai Intézetében történt. Vizsgálatunkat a Semmelweis Egyetem Regionális Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta (TUKEB 17/2006, 141/2009.)

Hisztomorfológia. A daganatszövetet -representatív blokkjaiból lemetzés után készített HE-festett metszeteken- a morfológiai megjelenés alapján területekre osztottuk. Az egyes területeket a metszetek digitalizálása után (Mirax MIDI, 3DHistech Kft, Budapest) annotáltuk (4. ábra).



4. ábra: A HE festés alapján meghatározott tumorrégiók és az immunhisztokémiai reakciók értékelése során meghatározott területek.

Immunhisztokémia (IHC) és fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH). A receptorok kimutatását automatizált rendszerben végeztük (Ventana Benchmark, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Fluoreszcens in situ hibridizációt HER2 és 17-es centroszómát tartalmazó Poseidon probákkal végeztük (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Hollandia). A felhasznált antitestek tekintetében ld. Függelék 3.

Az IHC reakciókat intenzitás (0-3) és eloszlás (0-100) szerint értékeltük (Madaras Lilla, Szász Attila Marcell), majd a kapott intenzitás és eloszlás értékeket összeszoroztuk, 0-300 értéket kapva (Histoscore) [91]. FISH vizsgálat esetében a 2.2 feletti Her2/CE17 arányt tekintettük amplifikáltnak. Nem amplifikáltnak értékeltük a 2.2 alatti, és poliszómiásnak a 3 feletti centromer kópiát hordozó tumorsejteket.

Statisztika. Az értékelést SPSS 15.0 Family Pack szoftverrel végeztük (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A területek értékelésekor kapott eredmények összehasonlítására chi-négyzet tesztet alkalmaztunk, a statisztikai tesztek kétoldalúak voltak.

3.3 A BRCA mutáció státusz előrejelzése a BRCAPRO algoritmussal

Betegek. A Semmelweis Egyetem II. sz. Patológiai Intézetének archívumában szereplő, 2000. január 1. és 2007. december 31. között diagnosztizált 35 éves vagy fiatalabb emlőrákos nőbeteg esetét elemeztük. Azért a 35 éves vagy fiatalabb emlőrákos nők eseteit vizsgáltuk, mert az érvényben levő ajánlások szerint e betegek BRCA genetikai vizsgálata indokolt [48, 92]. Kutatásunkhoz etikai engedéllyel rendelkezünk a Semmelweis Egyetem Regionális Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottságától. (TUKEB 17/2006.)

Anamnézis. A családi érintettség felmérésére egy általunk összeállított, 18 kérdésből álló kérdőívet használtunk. (Függelék 2)

Patológiai jellemzők, immunhisztokémia, fluoreszcens in situ hybridizáció. A fiatal nők invazív emlőrákjának szövettani típusát, differenciáltságát, ösztrogén receptor (ER)-, progeszteron receptor (PgR) expresszióját, Her2 státuszát és cytokeratin 5/6 (CK5/6) kifejeződését vizsgáltuk. (Az alkalmazott IHC antitesteket, HER2 FISH metódust ld. Függelék 1-ben)

BRCAPRO algoritmus. A BRCA mutáció hordozási valószínűségének előrejelzéséhez komputerezált statisztikai modellt- BRCAPRO (CancerGene, BayesMendel, Dallas, TX, USA) alkalmaztunk. Ha a beteg BRCAPRO által értékelt, BRCA mutáció státuszra vonatkozó hordozási valószínűsége eléri a 10%-ot, genetikai vizsgálat indokolt.

Genetikai vizsgálat. A BRCA1/2 gének vizsgálatának eredményeihez az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris Genetikai Osztályának jóvoltából jutottunk. (OEP finanszírozott BRCA genetikai teszt a vizsgálatunk idején központilag csak ebben az intézményben történt Magyarországon.)

3.4 BRCA mutáció asszociált és claudin-low emlőrák: közös leszármazottak?

In silico betegcsoport. Tizenhat BRCA mutáció hordozó (BRCAmut) (12 GSE50567 [93], 2 GSE18864 [94] és 2 GSE 3744 [95]), és 17 BRCA vad típusú tumor (BRCAwt) -mint kontroll- (10 GSE18864 [94] és 7 GSE50567 [93]) génexpressziós adatait

használtuk fel három korábban publikált, nyilvánosan elérhető adatbázisból. Esetkontroll vizsgálatot végeztünk, amelyben az ER státusz és a betegek életkora is ismert volt. Mintavétel előtt egyik beteg sem részesült (neoadjuváns) kezelésben. A kiválasztott és letöltött nyers .CEL file-okat MAS5 algoritmus szerint R statisztikai környezetben normalizáltuk Affymetrix Bioconductor könyvtár alkalmazásával (R, version 2.10.1, Vienna, Austria). Mivel ez a technika bizonyult a legmegbízhatóbbnak az eljárások összehasonlítása során [96].

Az immunhisztokémiai vizsgálatba bevont betegek vizsgálata. A Chaim Sheba Medical Center (CSMC), Tel Hashomer, Izrael betegeiből összeállított vizsgálati csoportba 22 BRCA mutációt hordozó nő került, akiknek hozzáférhető formalin fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) emlőtumor szövetük volt. BRCA mutációjukat korábban Sanger szekvenálás igazolta, ismert volt a mutáció anyai vagy apai eredete is (6. táblázat). A kontroll csoportba 19 emlőrákos nő került, akiknek műtéti anyaga a Semmelweis Egyetem II.Sz Patológiai Intézetében került feldolgozásra, míg BRCA mutáció analízisük a Semmelweis Egyetem I.Sz Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében történt. A CSMC és a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága a kutatást 0144-13-SMC és IKEB-17/2006, 139/2009, 141/2009 szám alatt hagyta jóvá.

Szöveti multiblokk technika. Az FFPE blokkokat és metszeteiket két patológus értékelte (Madaras Lilla, Nóra Bálint Lahat) és szöveti multiblokk (tissue microarray, TMA) készült az egyes tumorokból (2-3 henger 2 mm átmérőjű szövet az invazív tumorból esetenként, összesen 2 blokkba ágyazva) az MTA-1 TMA készítő eszközzel (Beecher Instruments, Inc., Sun Prairie, WI, USA).

Immunhisztokémia, fluoreszcens in situ hybridizáció. Négy µm vastag TMA metszetek majd IHC reakciók készültek automatizált immunhisztokémiai festőrendszerben (Ventana Benchmark XT, Ventana, Tucson, AZ, USA) a gyártó utasításainak megfelelően a következő antitestekkel: AR, CD24, CD44, CK5/6, claudin-1, claudin-3, claudin-4, claudin-7, E-Cadherin, EGFR, ER, EZH2, HER2, Ki67, P53, PgR, vimentin (FÜGGELÉK 3). A metszeteket Panoramic 250beta metszetszkennel (3DHistech Ltd., Budapest, Hungary) digitalizáltuk. Az immunhisztokémiai reakciók értékelésénél a reakció intenzitását (0-3) és kiterjedését (0-5) vettük figyelembe, egy az Allred score-hoz hasonló kombinált értéket hozva létre (0, 2-8). [97]. A Ki67 immunhisztokémiai reakció értékelése 0-100% skálán történt. Az ER és PgR expressziójának kvantifikálása

az Allred rendszer szerint történt [97]. A Her2 expresszió értékelése a standard 0-3+ skálán történt, FISH vizsgálatot a score 2+ esetekben végeztünk. Egyéb immunhisztokémiai reakciók esetében, a <3 értéket negatívnak, a 3-4 -et alacsony, és a 4< értéket magas expressziójúnak értékeltük.

Genetikai szubtypusok. A nyilvános microarray adatbázisból származó betegek daganatai esetében rendelkezésre álltak azon gének kifejeződését jellemző számok is, amelyek segítségével a PAM50 emlődaganat altípus predictor által megadott szubtypust is meg tudtuk határozni az R statisztikai program alkalmazásával [98].

Statisztika. Az adatokat Microsoft Office Excel táblázatban (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) rögzítettük. Chi-négyzet próba értékeit vettük figyelembe ordinális változók statisztikai összefüggéseinek elemzése során. Parametrikus változók esetében kétmintás t-próbát alkalmaztunk SPSS 15.0 program segítségével (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A szignifikancia szintet .05 értéknél fogadtuk el.

6. táblázat:

BRCA mutációs spektrum és öröklődés- Chaim Sheba Medical Center betegek

BRCA	Százalék (%)	MUTÁCIÓ	Esetszám (%)	Anyai/Apai eredet
1	14 (63.6%)	185delAG	11 (50.0%)	8/3 (36.3%/13.6%)
		Y978X	1 (4.5%)	1/0 (4.5%/0)
		A1708E	1 (4.5%)	1/0 (4.5%/0)
		5382insC	1 (4.5%)	1/0 (4.5%/0)
1+2	1 (4.5%)	185delAG + 6174delT	1 (4.5%)	1/1 (2.25%/2.25)
2	7 (31.8%)	6174delT	5 (22.7%)	3/2 (13.6%/9.1%)
		K2411T	1 (4.5%)	1/0 (4.5%/0)
		7906insA	1 (4.5%)	0/1 (0/4.5%)

3.5 A terhességi emlőrák (PABC) klinikopatológiája és kimenetele

Betegek. Etikai engedély (TUKEB 17/2006, 3/2013) birtokában áttekintettük intézetünk adatbázisát és rögzítettük az 1998. január 1. és 2012. november 1. között diagnosztizált, 45 éves vagy fiatalabb nők emlőrák eseteit.

Patológiai jellemzők, immunhisztokémia, fluoreszcens in situ hybridizáció. A hisztopatológiai adatokat: a tumor típusa, a grade, multifocalitás, az esetlegesen társult in situ léziók jellemzői, az invazív tumor mérete, a regionalis nyirokcsomó státusz, TNM státusz, a Nottingham Prognosztikai Index (NPI), lymphovascularis invázió jelenléte és az immunhisztokémiai jellemzőket: ER, PgR és Her2 expresszió, Ki67 proliferációs index és p53 expresszió értékeltük. (Az antitestek jellemzőit, a metodológiát Függelék 1 tartalmazza.) Az immunhisztokémiai reakciók értékelése a vizsgálat idején érvényben lévő guideline-ok útmutatása alapján történt [89, 90]. (A FISH vizsgálat részletezését lásd Függelék 1-ben.) Ahol a Her2 IH vizsgálat és a HER2 FISH eredménye nem egyezett az expresszió tekintetében, ott az érvényben lévő ajánlásoknak megfelelően a HER2 FISH vizsgálat eredményét tekintettük mérvadónak. Az invazív tumort ER és/vagy PgR pozitívnak akkor tekintettük, ha a tumorsejtek legalább 10%-a mutatott intranuclearis pozitív reakciót. A Ki67 proliferációs marker esetében az ajánlásoknak megfelelően a legalább 14%-os labeling indexet értékeltük magasnak [99].

IHC szubtípus. Az invazív tumor immunhisztokémiai jellemzői alapján megállapítottuk az IHC-alapú szubtípusát: ER (és esetlegesen PgR) pozitív tumorokat, amelyek Ki67 proliferációs indexe alacsony volt a Luminalis A (LumA) szubtípusba, ER (és esetlegesen PgR) pozitív tumorokat, amelyek Ki67 proliferációs indexe magas volt, vagy ugyanakkor Her2 expressziót is mutattak a Luminalis B (LumBprol vagy LumBHer2+) szubtípusba soroltuk, míg a hormon receptor negatív és Her2 expressziót mutató tumorok a Her2+ szubtípusba, valamint a hormon receptor negatív és Her2 expressziót sem mutató tumorok a tripla negatív szubtípusba kerültek.

Kezelési adatok, anamnézis, relapsus. Áttekintettük a kiválasztott emlőrákos betegek Medsol adatait és rögzítettük a locoregionalis illetve szisztémás kezelésre vonatkozó információkat, a személyes és családi anamnesztikus adatokat, a szülésekre vonatkozó adatokat, valamint a betegség esetleges locoregionalis és/vagy szisztémás relapsusára vonatkozó információkat is.

Terhességi emlőrákos betegek. A fentiek alapján kiválasztottuk a terhességi emlőrákos eseteket: azokat a betegeket, akinek emlőrákja a terhessége alatt jelentkezett, vagy a szülést követő 1 éven belül alakult ki.

Kontroll betegcsoport. A fentebb említett két adatbázis alapján minden terhességi emlőrákos beteghez hozzá rendeltünk egy kontroll –nem terhességi emlőrákos- beteget életkora (± 1 év) és emlőrák diagnózisának éve (± 1 év) alapján.

Statisztika. Nem egyenletes eloszlású folyamatos változó esetén a párosított Wilcoxon tesztet használtuk. Ordinalis változók esetében a chi-négyzet és a Fischer-féle exact tesztet alkalmaztuk. A túlélési adatokat a Kaplan-Meier módszerrel értékeltük. A teljes túlélés tartamát az első emlőrák diagnózistól a halálig, vagy az utolsó követés idejéig tartó periódusban határoztuk meg. A betegségmentes túlélés időtartamát az első emlőrák diagnózis idejétől a relapsus (locoregionalis vagy szisztémás) idejéig, vagy az emlőrákból eredő halálozás idejéig, relapsus mentes betegeknél az utolsó követés időpontjáig tartó periódusban határoztuk meg. Összehasonlítást a túlélést tekintve log-rank statisztikával végeztünk. A prognosztikus faktorok multivariáns analízise a Cox-féle regressziós modell segítségével történt. A különbségeket szignifikánsnak tekintettük, ha $p \leq 0.05$ volt. A statisztikai értékelést a Statistica 9.0 szoftverrel (StatSoft Inc. Tulsa, OK) végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Fiatalkori és idősebb betegeket érintő emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők és kimenetel alapján

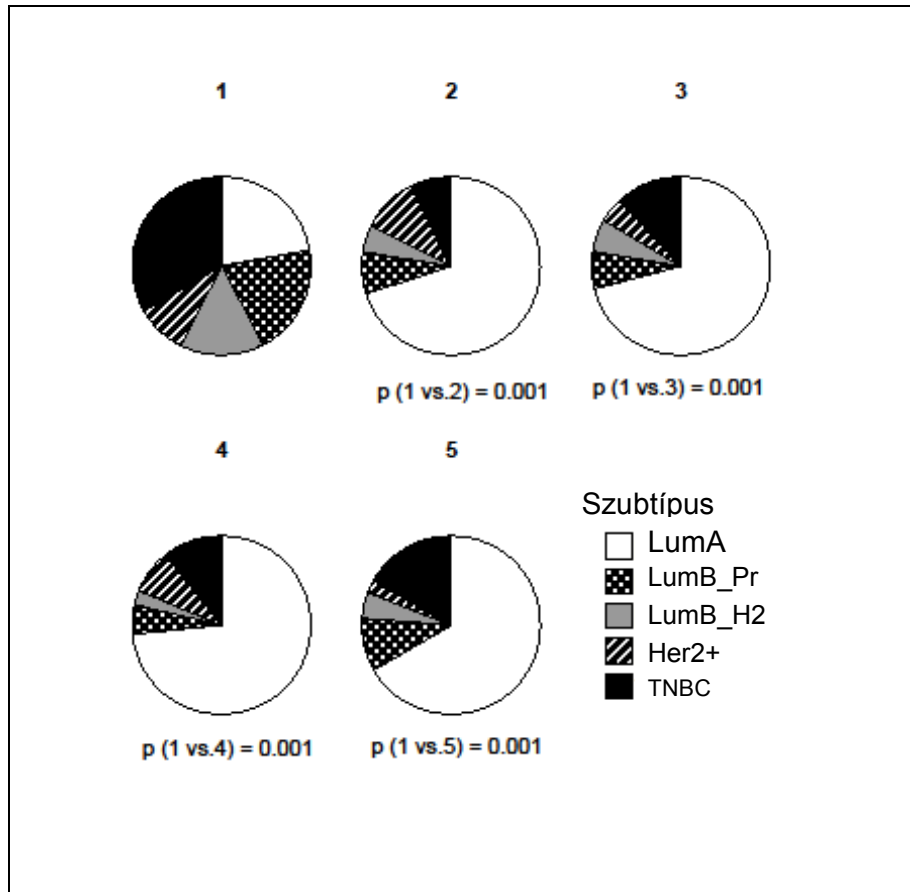
A fiatalkori emlőrákos betegek medián életkora 31,64 év volt (tartomány: 22-35 év). Az esetek 67,96%-ában (70 beteg) a tumor alacsonyan differenciált (grade III) volt és csak 4 esetben (3,73%) volt a tumor magasan differenciált (grade I). Kilencvenkilenc esetben tudtuk meghatározni az immunhisztokémiai paramétereken alapuló szubtypust: LumA volt az esetek 22.22%-a, LumB 35.35%-a, Her2+ 9.09%-a, míg TNBC 33.33%-a.

A kontroll csoportok medián életkora: 2. csoport (36-45 év): 41.95, 3. csoport (46-65 év): 54.53, 4. csoport (66-75 év):70.09, 5. csoport (76 évnél idősebbek): 80.66. A vizsgált tumor jellemzőket a különböző életkori csoportokban a 7. táblázat mutatja.

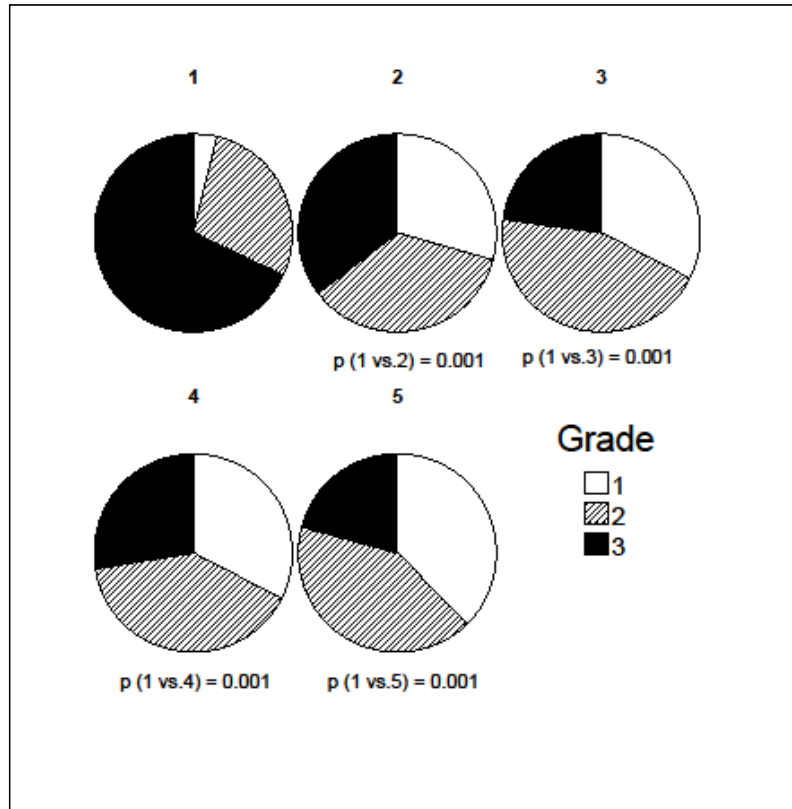
7. táblázat: A vizsgált 544 nőbeteg emlőtumorának jellemzői

Életkori csoportok		1	2	3	4	5	p (chi-sq.)
N		107	55	214	110	58	
IHC-alapú szubtypus	<i>LumA</i>	22.22%	70.00%	70.90%	73.33%	66.67%	0.001
	<i>LumB_Pr</i>	20.20%	7.50%	6.72%	5.33%	9.52%	
	<i>LumB_H2</i>	15.15%	5.00%	5.97%	2.67%	4.76%	
	<i>Her2+</i>	9.09%	10.00%	4.48%	8.00%	2.38%	
	<i>TNBC</i>	33.33%	7.50%	11.94%	10.67%	16.67%	
Grade	1	3.88%	29.41%	32.61%	32.65%	37.74%	0.001
	2	28.16%	35.29%	44.57%	39.80%	41.51%	
	3	67.96%	35.29%	22.83%	27.55%	20.75%	
T	1	31.91%	10.74%	11.62%	13.52%	11.61%	0.001
	2	39.36%	27.52%	29.33%	27.05%	27.10%	
	3	2.13%	30.20%	29.52%	28.11%	28.39%	
	4	1.06%	30.20%	28.95%	29.89%	29.68%	
	y0	5.32%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
	y1	8.51%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
	y2	6.38%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
	y3	4.26%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
N	0	25.58%	41.46%	44.72%	44.83%	43.48%	0.001
	1	27.91%	51.22%	51.22%	46.55%	52.17%	
	2	15.12%	7.32%	4.07%	8.62%	4.35%	
	3	3.49%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
	y0	13.95%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
	y1	6.98%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
	y2	4.65%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
	y3	2.33%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	

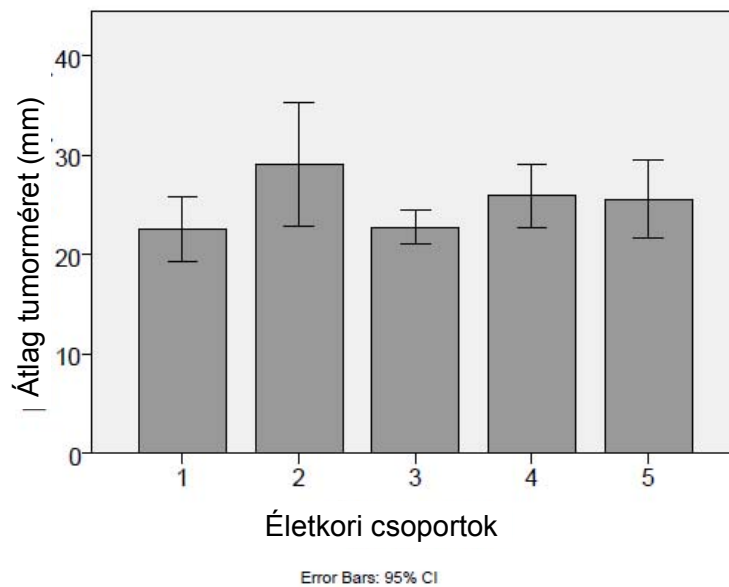
Szignifikáns különbség volt a nagyon fiatal nők és az egyéb életkori csoportok között az IHC-alapú szubtypus (5. ábra), a grade (6. ábra), a T és az N stádium tekintetében, azonban a mm-ben mért tumor méret nem mutatott számottevő eltérést (7. ábra).



5. ábra: IHC-alapú szubtypusok megoszlása a különböző életkori csoportokban



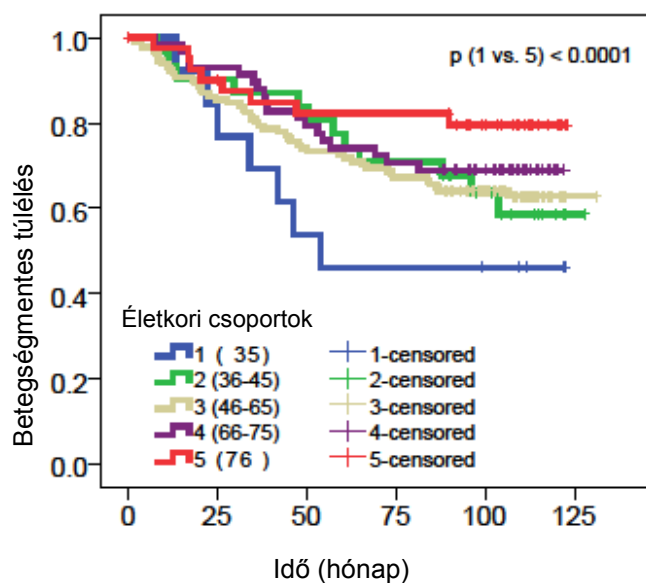
6. ábra: Grade megoszlása a különböző életkori csoportokban



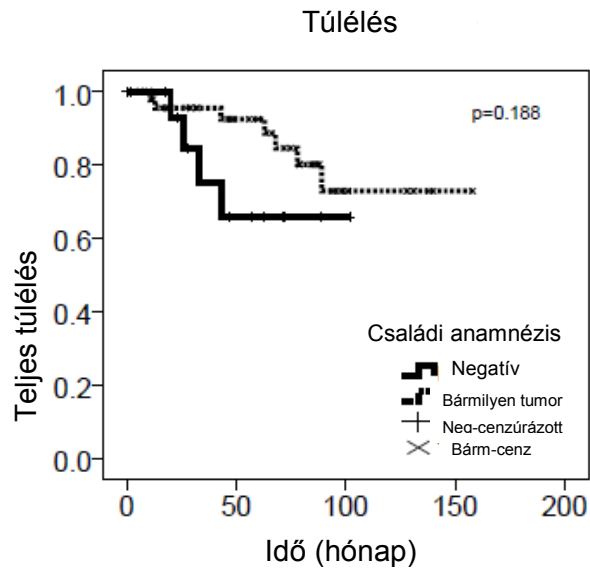
7. ábra: Tumorméret a különböző életkori csoportokban (mm)

A családi és egyéni anamnézissel kapcsolatos kérdőívre ebben a vizsgálatban válaszoló 49 fiatal beteg (45.79%) közül 25 esetben (51.02%) fordult elő a betegek első-, vagy másodfokú rokonai között emlő- vagy petefészekrák. Tizenhárom esetben (26.53%) volt a betegek családi anamnézise negatív, míg 11 esetben (22.44%) egyéb rosszindulatú daganatos betegség jelentkezett a családban. Összehasonlítva a pozitív családi anamnézisű fiatal emlőrákos eseteket a negatív anamnézisűekkel, az előbbi esetek 52%-a TNBC volt, míg az utóbbi csoportban a LumA szubtípusú daganat volt a leggyakoribb (46.15%).

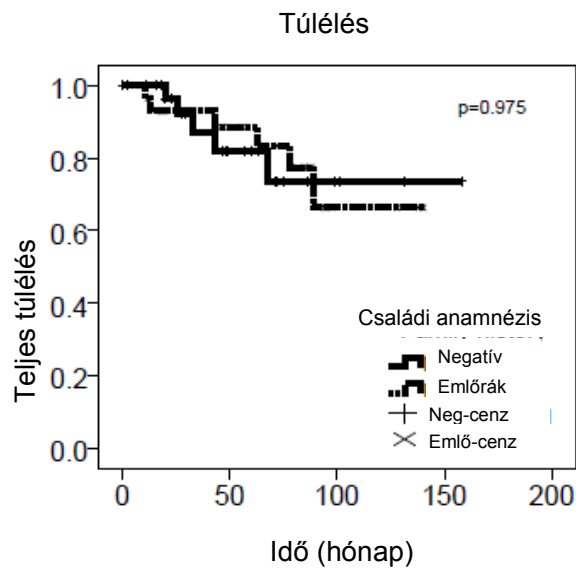
A különböző életkori csoportok túlélési adatait vizsgálva a nagyon fiatal betegek csoportja mutatta a legrosszabb prognózist (8. ábra). A vizsgálati periódus végéig a 35 éves vagy fiatalabb 107 nőbeteg közül 25 halt meg (23.36%). Nem volt szignifikáns különbség a pozitív emlő- vagy petefészekrák családi anamnézisű betegek és a negatív családi anamnézisű betegek túlélése között (az ismert családi anamnézisű esetek száma alacsony) (9. és 10. ábra). Ötvenhat esetben állt rendelkezésünkre a fiatal nőbetegek pontos kezelésével kapcsolatos információ. Huszonnégy beteg (22.42%) részesült neoadjuváns, míg 32 beteg (29.9%) adjuváns kezelésben. Ötvenegy esetben (47.66%) a kezelésekről nem volt információ. Nem volt szignifikáns különbség a túlélésben az alkalmazott kemoterápia (neoadjuváns vs adjuváns) függvényében, bár a neoadjuváns kezelés terápiás előnyre utaló tendenciát mutatott (11. ábra).



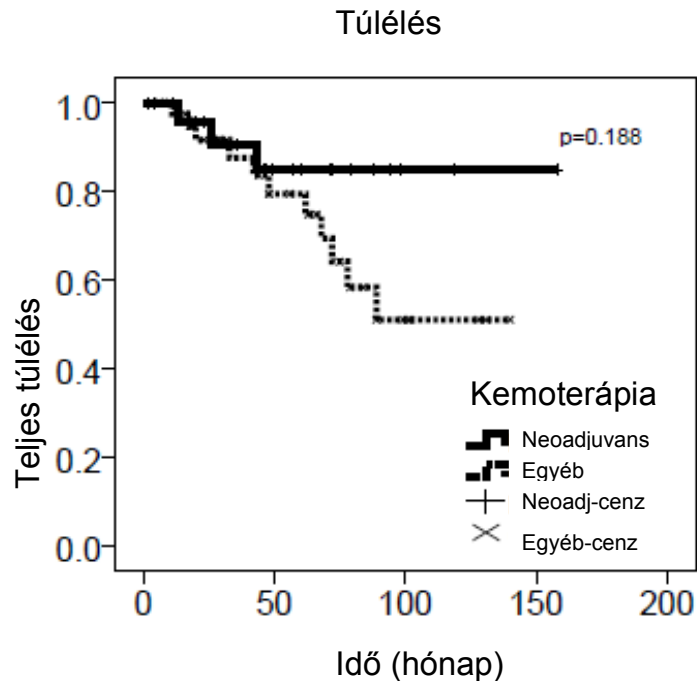
8. ábra: A ≤ 35 éves nők csoportjának volt a legrosszabb prognózisa



9. ábra: Nem mutatkozott szignifikáns különbség a negatív és pozitív családi anamnézisű betegek teljes túlélésében.



10. ábra: Nem mutatkozott szignifikáns különbség a negatív családi anamnézisű betegek és azon betegek teljes túlélése között, akiknek családjában emlőrák fordult elő.



11. ábra: Nem volt szignifikáns különbség a teljes túlélésben az alkalmazott kemoterápia (neoadjuvans vs adjuvans) függvényében, bár a neoadjuvans kezelés túlélési előnyre utaló tendenciát mutatott.

4.2 Fiatal- és időskori emlődaganatok morfológiai és molekuláris sajátosságainak összehasonlítása

A vizsgálatba bevont esetek klinikopatológiai adatait a 8. táblázat tartalmazza.

A morfológiai heterogenitás alapján a 41 fiatalkori tumorból 19 esetben (46,3%) viszonylag homogénnek mondható területek voltak láthatóak: a daganat egykomponensű volt. Tizenhét (41,5%) tumor esetében két területet különböztettünk meg. Két daganat bírt 4 régióval (4,8%). Egy-egy tumor (2,4-2,4-2,4%) volt három, öt, illetve hat területre osztható a szöveti kép alapján. Az időskorúak közül 20 (60,6%) volt egy-, 10 (30,3%) két-, és 3 (9,1%) háromkomponensű daganat. A fiatalkorúak között a tumorrégiók átlagos száma több volt, mint az idősekénél (1,82 vs. 1,48 régió/tumor), és

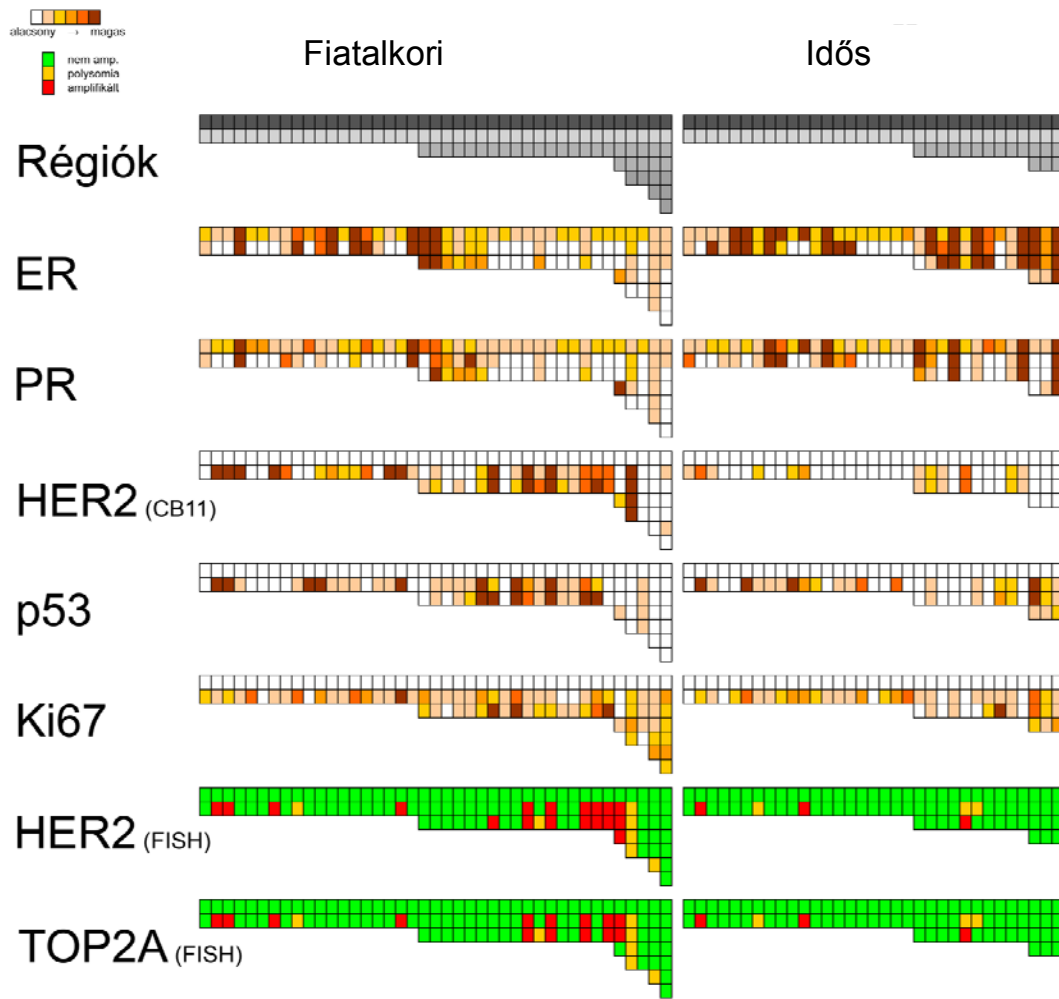
kismértékben nagyobb volt a heterogén morfológia aránya (53,6% vs. 39,4%, $p = 0.353$).

Az immunhisztokémiai reakciókat a hisztopatológiai megjelenéstől függetlenül értékeltük, és az egyes területeket az elektronikus metszeteken annotáltuk (ld. Módszer 4. ábra). Ezt követően a morfológiai és IHC területeket digitálisan egymásra vetítettük. A tumorok megjelenése és immunfenotípusa egy fiatalkori daganat kivételével megegyezett ($p < 0.001$). Utóbbi esetében az azonos megjelenésű tumorrégiók között kétféle intenzitású reakciót láttunk az ösztrogén-receptor kifejeződést tekintve: egy negatív, illetve egy Histoscore szerinti 60 pontos területet.

Az immunhisztokémiai reakciók értékelésekor a fiatalkori daganatok esetében az ösztrogén-receptor kifejeződését tekintve 6 esetben (14,6%), a progeszteron-receptornál ugyancsak 6 (14,6%), a Her2 festődésnél 8 (19,5%), a Ki67 kifejeződésnél 14 esetben (34,1%) figyeltünk meg különböző területeket. HER2 FISH esetében két tumornál láttunk az egyik régióban poliszómiát. A TOP2A gén kópiaszáma két esettől eltekintve követte a HER2 gén kópiaszámát. Az időskori daganatokban az ösztrogén-receptor ellenes IHC reakcióban 6 (18,2%), a progeszteron-receptor ellenes IHC reakcióban 3 (9,1%), a Her2 immunhisztokémiai metszeteket áttekintve nulla, a Ki67-festődésnél 7 esetben (21,2%) láttunk egy daganaton belül egymástól eltérő területeket. Az egyik, 2 morfológiai komponensű, összességében HER2 amplifikált esetben a tumor egyik régiója nem mutatott génszokszorozódást (12. ábra). Ugyanebben az esetben figyeltük meg azt a jelenséget, hogy a TOP2A gén normális kópiaszáma mellett izolált HER2 génamplifikáció volt detektálható. A fiatal- és időskori daganatok esetében az egyes tumorrégiók között a HER2 immunhisztokémiai heterogenitása tekintetében találtunk szignifikáns különbséget ($p = 0,007$). Az ösztrogén- ($p = 0,681$), progeszteronreceptor ($p = 0,468$), p53 ($p = 0,552$) és Ki67 ($p = 0,220$) esetében csak tendenciák voltak megfigyelhetőek.

8. táblázat: A fiatal- és időskori emlőrák eseteink klinikopatológiai jellemzői

Csoport		Fiatal	Idős
Életkor (átlag, szórás)		28,4 ± 5,9	69,8 ± 4,4
Szöveti típus (arány, %)	IDC	37/41 (90,24%)	26/33 (78,79%)
	ILC	2/41 (4,88%)	3/33 (9,09%)
	Egyéb	2/41 (4,88%)	4/33 (12,12%)
Grade (arány, %)	1	2/41 (4,88%)	8/33 (24,24%)
	2	11/41 (26,83%)	16/33 (48,48%)
	3	28/41 (68,29%)	9/33 (27,27%)
Nekrózis	(arány, %)	26/41 (63,41%)	9/33 (27,27%)
Gyulladás	(arány, %)	18/41 (43,90%)	7/33 (21,21%)
Vérérvázió	(arány, %)	18/41 (43,90%)	12/33 (36,36%)
Nyirokér-invázió	(arány, %)	17/41 (41,46%)	10/33 (30,30%)
Altípus (arány, %)	Luminalis A	10/41 (24,39%)	17/33 (51,52%)
	Luminalis B (HER2-)	7/41 (17,07%)	7/33 (21,21%)
	Luminalis B (HER2+)	8/41 (19,51%)	1/33 (3,03%)
	HER2+	8/41 (19,51%)	2/33 (6,06%)
	Tripla-negatív	8/41 (19,51%)	6/33 (18,18%)



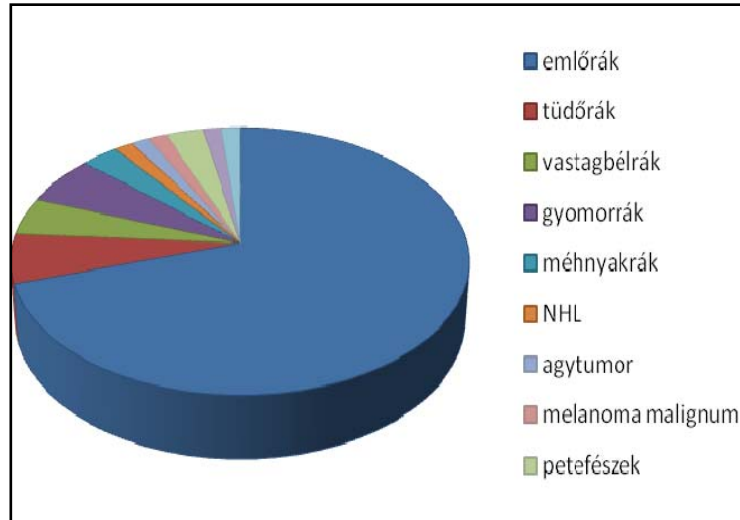
12. ábra: Az egyes morfológiai régiók (felső sor), és az immunhisztokémiai vizsgálattal meghatározott területek festődési intenzitása (másodiktól az ötödik sorig), valamint a FISH értékelés eredményei (alsó sor). Az egyes betegekhez tartozó normál szövetek és tumorrégiók függőlegesen egymás alatt helyezkednek el.

4.3 A BRCA mutáció státusz előrejelzése a BRCAPRO algoritmussal

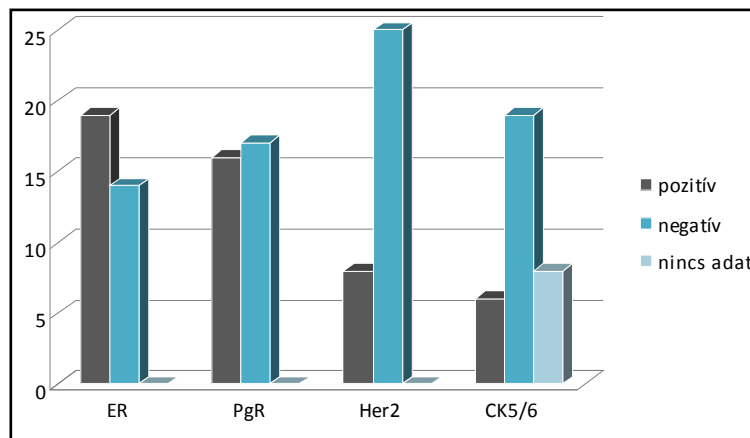
A Központi Adatfeldolgozó, Nyilvántartó és Választási Hivataltól megkaptuk a fellelhető betegek elérhetőségeit. Az általuk nyilvántartottak szerint vizsgálatunk idején (2008. február) a 73 beteg közül 60 nő élt. (A címlista nem volt teljes, 4 beteg értesítési címét nem találták, így végül 56 betegnek küldtük el a kérdőívet.)

Az elküldött kérdőívekre 32 válaszlevél érkezett, így a továbbiakban ez a 32 beteg és családjaik kerültek be vizsgálatunkba. (Egy betegünkről tudtuk meg, hogy a közelmúltban elhunyt, az ő kérdőívét édesanyja töltötte ki, így ő is szerepel a 32 vizsgált személy közt.)

A 2000. január 1 és 2007. december 31 között vizsgált, kérdőívünkre válaszoló 32 beteg családjában összesen 73 rosszindulatú daganatos megbetegedés fordult elő (átlag 2.28 malignus tumor/család) (13. ábra). A legtöbb családban 1-1 tumor jelentkezett, azonban 3 családnál családonként 5-5 rosszindulatú daganatos betegséget regisztráltunk. A 32 emlőtumor közül 4 TNBC volt, hét tumor bazális citokeratin expressziót is mutatott. (14. ábra)



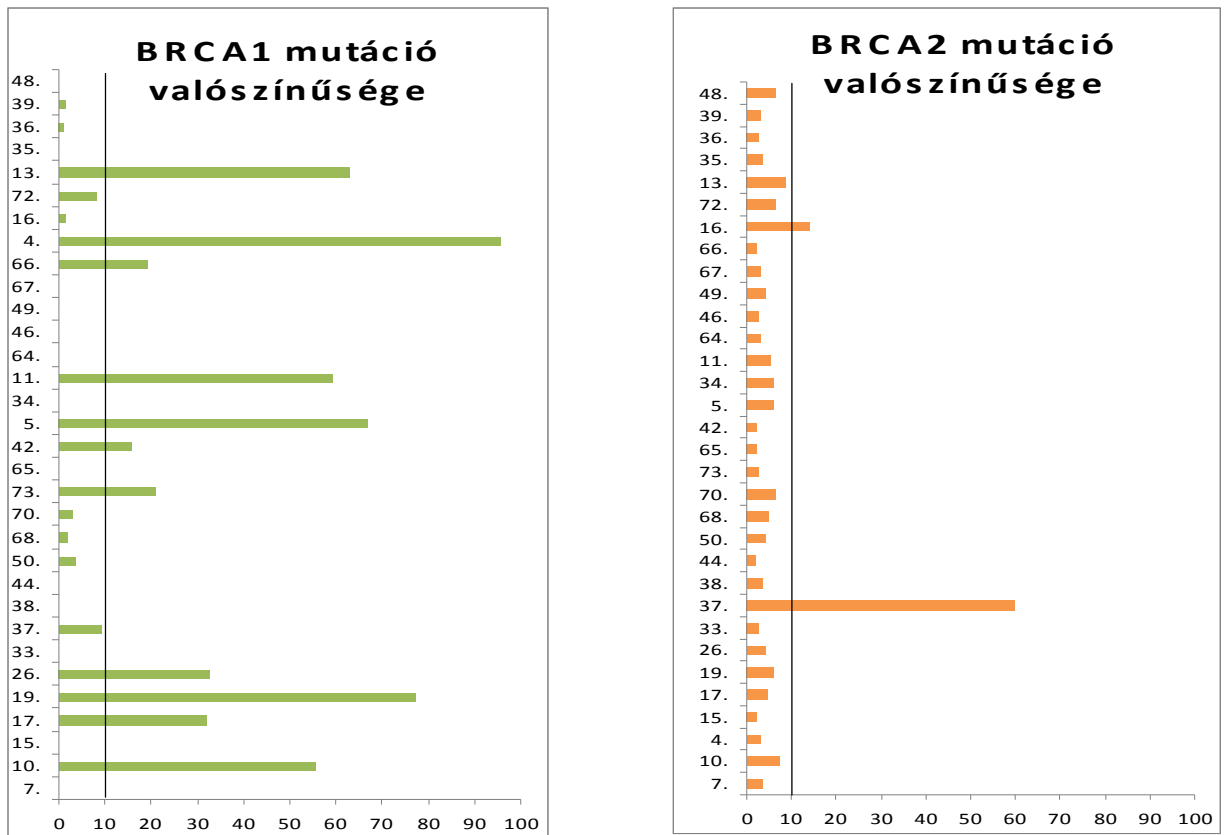
13. ábra: A vizsgált 32 családban előforduló rosszindulatú daganatok



14. ábra: A 32 vizsgált emlőrákos fiatal nő mintáinak immunfenotípus megoszlása

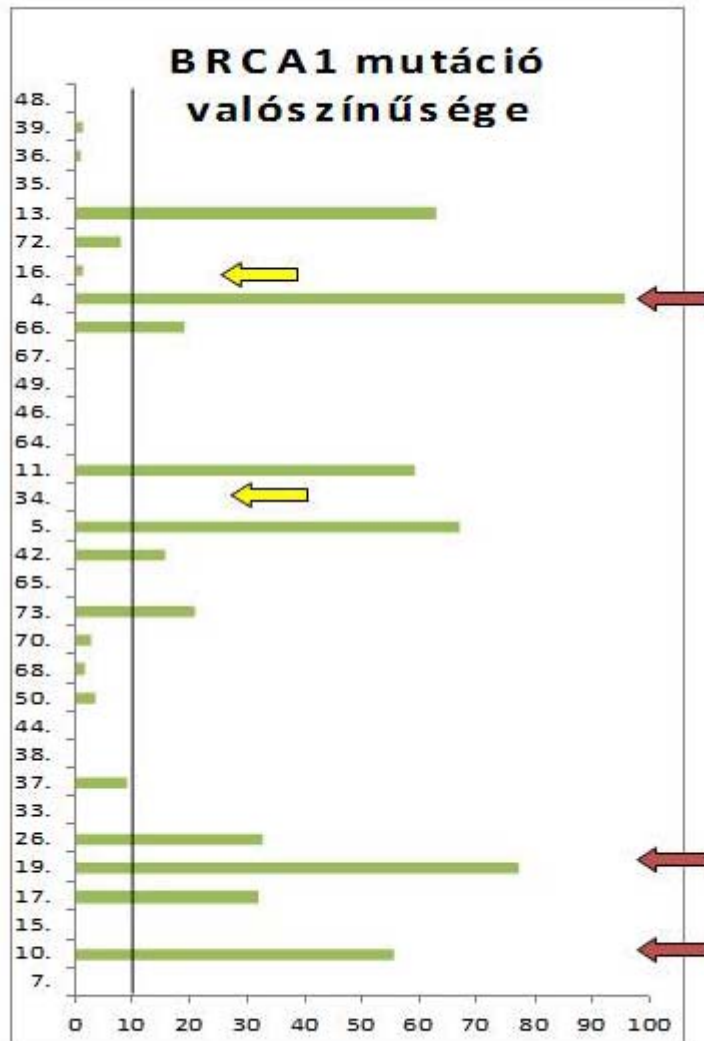
A 32 vizsgált betegből tizenegyen 10% feletti valószínűséggel hordoznak BRCA1 mutációt. A mutációt nagy valószínűséggel hordozók csoportjában három beteg tumora TNBC, hét betegé bazális fenotípusú, egy fiatal nőé pedig FISH vizsgálattal Her2 pozitív.

BRCA2 esetében 2 beteg eredménye haladja meg a 10%-ot. Az ő daganataik immunfenotípusa hormonreceptor negatív (ER- és PgR-) (15. ábra)



15. ábra: A BRCAPRO által meghatározott hordozási valószínűségek BRCA1 és BRCA2 esetén. Függőleges tengelyen a proband azonosító száma, míg a vízszintesen a hordozási valószínűség százalékos értéke látható. A 10%-os küszöbérték függőleges vonallal jelölve.

Az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris Genetikai Osztályának nyilvántartása szerint az általunk intézetünk adatbázisában fellelt 73 beteg közül mindössze 11 fiatal nő esetében végeztek genetikai vizsgálatot. A részletes vizsgálatunkban szereplő 32 beteg közül 5 fiatal nő BRCA tesztjét végezték el. Hármójuknál BRCA1 mutáció jelenléte igazolódott, két beteg vizsgálata negatív eredményt adott. BRCA2 mutáció nem fordult elő (16. ábra).



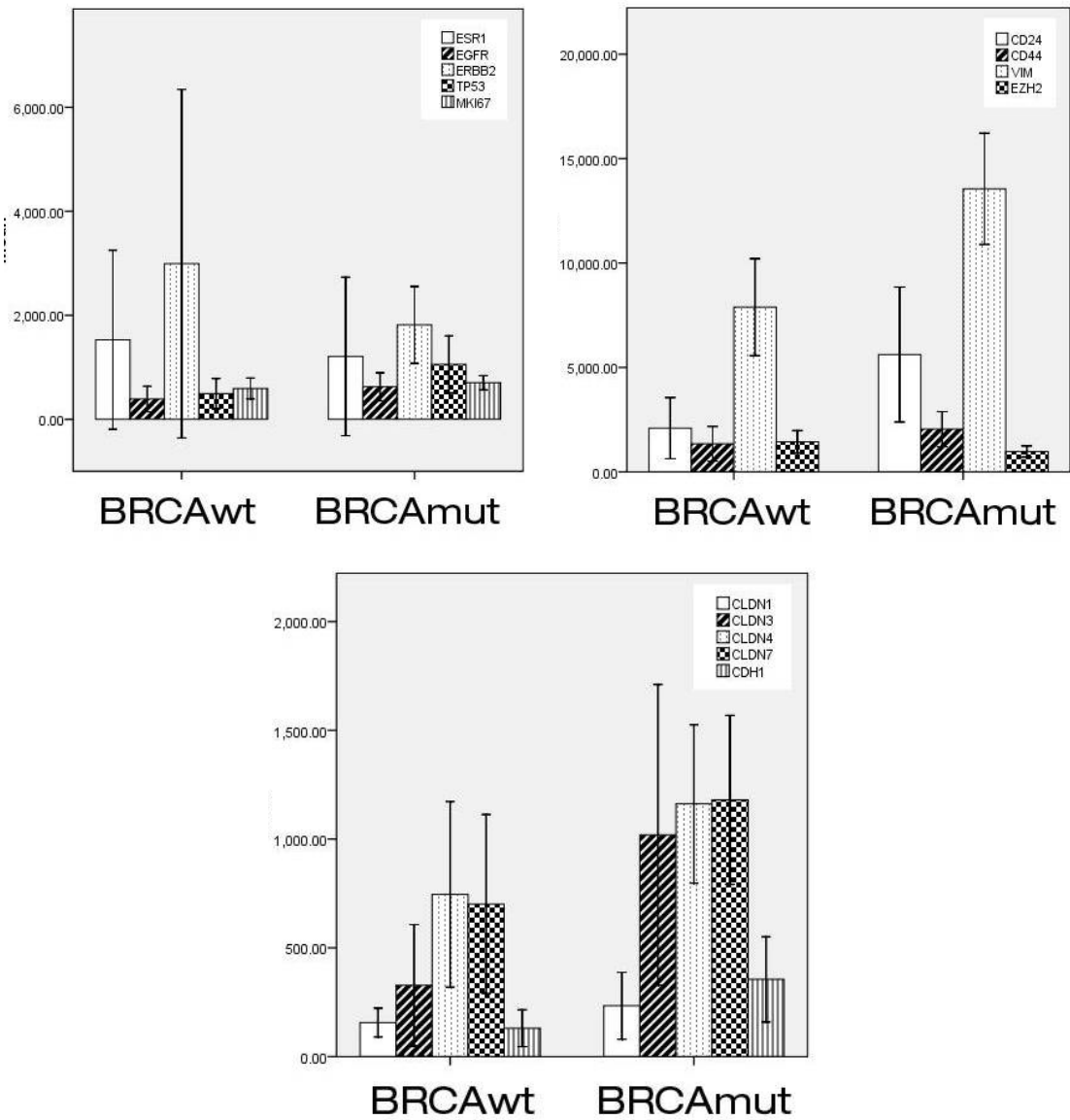
16. ábra: A BRCAPRO eredményeinek összevetése a genetikai tesztek eredményével.
(BRCA1 pozitív ←: BRCA1 negatív ← genetikai tesztek eredménye)

4.4 BRCA mutáció asszociált és claudin-low emlőrák: közös leszármazottak?

In silico betegcsoport vizsgálata. A közölt génexpressziós adatok alapján meghatároztuk azokat a géneket (BRCA100, Függelék 4), amelyek expressziós mintázata leginkább megkülönbözteti a BRCAmut és BRCAwt mintákat. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a claudinok ebben az elkülönítésben alkalmazhatóak-e. A CLDN1

(ROC=0.785, $p=0.00026$), CDH1 (ROC=0.785, $p=0.00022$), CLDN7 (ROC=0.723, $p=0.0088$), CLDN3 (ROC=0.696, $p=0.020$) és CLDN4 (ROC=0.685, $p=0.027$) fellelhető volt, de számos egyéb gén (BRCA100) alkalmasabbnak bizonyult a BRCAmut vs. BRCAwt csoportok elkülönítésében.

Összehasonlítva a claudinok expresszióját a két csoport között, CLDN 1, 3, 4, 7, 10 expressziója magasabb mRNS szinttel járt BRCAmut tumorokban, mint a BRCAwt esetekben ($p=0.339$, $p=0.062$, $p=0.126$, $p=0.082$ és $p=0.784$). Az ESR1, ERBB2 expressziója alacsonyabb volt BRCAmut vs. BRCAwt tumorokban ($p=0.770$ és $p=0.477$), ugyanakkor EGFR, TP53, VIM és MKI67 magasabb expresszió felé mutató tendenciával járt a mutáns tumorokban ($p=0.179$, $p=0.064$, $p=0.002$ és $p=0.347$) (17. ábra).



17. ábra: A különböző markerek expressziója (95% CI) a publikus adatbázisokból származó BRCA mutáns (BRCAmut) és vad (BRCAwt) tumorokban.

A PAM50 predictor klasszifikálta a tumorokat a különböző génexpressziós mintázaton alapuló-intrinsic szubtypus szerint, ami nem minden esetben felelt meg, a mintához korábban hozzárendelt IHC alapú szubtypusnak (9. táblázat): 4 BRCAmut Basal-like eset Luminal B, míg 1 BRCAwt Basal-like eset Her2-E és 1 BRCAwt Luminalis eset Basal-like reklasszifikációt kapott.

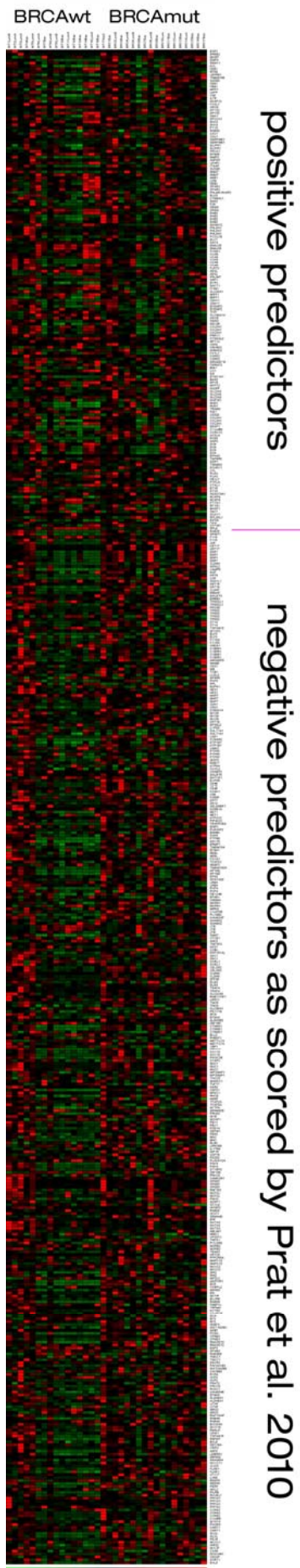
Az ún. „9-Cell Line Claudin-low Predictorban” [100] szereplő pozitív és negatív prediktor géneket kerestük a publikált adatbázisból származó esetekben. Az Agilent array-ben megtalálható 437 pozitív prediktor és 370 negatív prediktor gén közül, 161 és 354 lelhető fel az Affymetrix array paneljében. Megvizsgáltuk, vajon a BRCAmut minták magasabb szinten expresszálják-e a pozitív prediktor géneket, illetve alacsonyabb szinten expresszálják-e a negatív prediktor géneket, mint a BRCAwt tumorok. A pozitív prediktorok centroid \pm SD-je magasabb expressziós szintet mutatott a BRCAwt tumorok eseteiben (2258.73 \pm 716.39) mint a BRCAmut tumorokban (1904.40 \pm 544.27), $p=0.114$; míg a negatív gének expressziója alacsonyabb volt a BRCAwt tumorokban (1553.60 \pm 490.40) mint a BRCAmut esetekben (1621.82 \pm 360.62), $p=0.647$. Ezért e vizsgálataink alapján a BRCAmut tumorokra nem jellemző a claudin-low fenotípus, valamint a pozitív és negatív prediktor gének alapján a BRCAmut tumorok nem alkotnak homogén csoportot (Függelék 5 és 6) (18. ábra).

9. táblázat: In silico betegsoport- klinikopatológiai jellemzők

Group	Data set [Ref]	Platform (patient/ sample count)	Query	Age, years	Histology	Grade	Mutation	Subtype (published)	Subtype (assigned) [†]	ER status	PgR	HER2	Neo-adjuvant Tx	Miller-Payne		
BRCAm ut	GSE50567 [14]	GPL570 (12/13 [†])	GSM1223663	42	Medullary carcinoma	NA	BRCAl 5392insC Ex20	Basal	Basal	0	NA	NA	NA	NA		
			GSM1223664	NA	IDC	NA	BRCAl 5392insC Ex20	Basal	Luminal B	0	NA	NA	NA	NA	NA	
			GSM1223665*	51	IDC	NA	BRCAl 5392insC Ex20	Basal	Basal	Luminal B	0	NA	NA	NA	NA	
			GSM1223666*	51	IDC	NA	BRCAl 5392insC Ex20	Basal	Basal	Basal	0	NA	NA	NA	NA	
			GSM1223667	55	Medullary carcinoma	NA	BRCAl 5392insC Ex20	Basal	BRCAl 5392insC Ex20	Basal	Basal	0	NA	NA	NA	NA
			GSM1223668	49	IDC	NA	BRCAl 4159delA Ex11	Basal	BRCAl 4159delA Ex11	Basal	Luminal B	0	NA	NA	NA	NA
			GSM1223669	52	Medullary carcinoma	NA	BRCAl 5392insC Ex20	Basal	BRCAl 5392insC Ex20	Basal	Basal	0	NA	NA	NA	NA
			GSM1223670	41	IDC	NA	BRCAl 5392insC Ex20	Basal	BRCAl 5392insC Ex20	Basal	Luminal B	0	NA	NA	NA	NA
			GSM1223671	48	IDC	NA	BRCAl 617G Ex5	Basal	BRCAl 617G Ex5	Basal	Basal	0	NA	NA	NA	NA
			GSM1223672	NA	IDC	NA	BRCAl 5392insC Ex20	Basal	BRCAl 5392insC Ex20	Basal	Basal	0	NA	NA	NA	NA
			GSM1223673	62	IDC	NA	BRCAl 5392insC Ex20	Basal	BRCAl 5392insC Ex20	Basal	Basal	0	NA	NA	NA	NA
			GSM1223674	62	IDC	NA	BRCAl 5392insC Ex20	Basal	BRCAl 5392insC Ex20	Basal	Basal	0	NA	NA	NA	NA
			GSM1223675	NA	IDC	NA	BRCAl 9631delC Ex25	Basal	BRCAl 9631delC Ex25	Luminal X	Luminal B	+	NA	NA	NA	NA
			GSM65491 [15]	GPL570 (2/2)	GSM65491	NA	NA	NA	BRCAX germline	NA	Luminal B	NA	NA	NA	NA	NA
			GSM65492	NA	NA	NA	NA	NA	BRCAX germline	NA	Luminal B	NA	NA	NA	NA	NA
GSE18864 [15]	GPL570 (2/2)	GSM467527	44	NA, biopsy before Tx	3	BRCAl germline	NA	Luminal A	0	0	0	0	Yes	5		
GSM467606	58	NA, surgical resection	3	BRCAl germline	3	BRCAl germline	NA	Basal	0	0	0	0	NA	No		
BRCAm t	GSE18864 [15]	GPL570 (10/10)	GSM467523	59	NA, biopsy before Tx	3	wt	NA	Basal	0	0	0	0	Yes	3	
			GSM467524	49	NA, biopsy before Tx	3	wt	NA	Luminal A	0	0	0	0	0	Yes	4
			GSM467525	39	NA, biopsy before Tx	3	wt	NA	Basal	Basal	0	0	0	0	Yes	5
			GSM467526	68	NA, biopsy before Tx	3	wt	NA	Basal	Basal	0	0	0	0	Yes	1
			GSM467527	62	NA, biopsy before Tx	3	wt	NA	Basal	Luminal B	0	0	0	0	Yes	1
			GSM467528	39	NA, biopsy before Tx	3	wt	NA	Basal	Basal	0	0	0	0	Yes	4
			GSM467529	51	NA, biopsy before Tx	3	wt	NA	Basal	Basal	0	0	0	0	Yes	4
			GSM467530	43	NA, biopsy before Tx	3	wt	NA	Basal	Luminal A	0	0	0	0	Yes	4
			GSM467531	41	NA, biopsy before Tx	3	wt	NA	Basal	Luminal A	0	0	0	0	Yes	3
			GSM467532	41	NA, biopsy before Tx	3	wt	NA	Basal	Basal	0	0	0	0	Yes	3
			GSM467533	53	NA, biopsy before Tx	3	wt	NA	Basal	Basal	0	0	0	0	Yes	1
			GSM1223676	70	Medullary carcinoma	NA	wt	NA	Basal	Basal	0	0	0	0	NA	NA
			GSM1223677	27	IDC	NA	wt	NA	Luminal X	Basal	0	0	0	0	NA	NA
			GSM1223678	74	IDC	NA	wt	NA	Luminal X	Luminal A	0	0	0	0	NA	NA
			GSM1223679	59	IDC	NA	wt	NA	Luminal X	Luminal B	0	0	0	0	NA	NA
GSM1223680	57	IDC	NA	wt	NA	Luminal X	Luminal B	0	0	0	0	NA	NA			
GSM1223682	NA	IDC	NA	wt	NA	Basal	Her2	0	0	0	0	NA	NA			
GSM1223683	48	IDC	NA	wt	NA	Luminal X	Luminal A	+	0	0	0	0	NA	NA		

Mean/median age of the BRCAm ut group was 51.3/51.0 years (SD: 7.1) and mean/median age of the BRCAm t group was 52.4/52.0 (SD: 12.8). IDC = Invasive ductal carcinoma; NA = not available; Tx = treatment; * identical patient with two available GEO data sets; † current results based on PAM50 predictor.

§ A szubtípus újraértékelése a PAM50 predictor [98] alapján történt



18. ábra: Heat-map - BRCA vad típusú (BRCAwt) tumor minták (bal oldali 17 eset) és BRCA mutáns (BRCAmut) tumor minták (jobb oldali 17 eset), a claudin-low szubtypust meghatározó pozitív és negatív predictor gének expressziója (fentről lefelé). Alacsonyabb expresszió- zöld. Magasabb expresszió-piros.

10. táblázat: Az immunhisztokémiai vizsgálatba bevont esetek klinikopatológiai adatai

Csoport		BRCAmut		BRCAwt	
		Esetszám	Százalék	Esetszám	Százalék
ÖSSZES		22	100%	19	100%
Életkor	≤ 35	9	40.9%	0	0,0%
	36-45	6	27.3%	4	21,1%
	46-55	5	22.7%	5	26,3%
	56 ≤	1	4.5%	10	52,6%
	ismeretlen	1	4.5%	0	0,0%
Szöveti típus	IDC/NOS	14	63.6%	14	73,7%
	ILC	0	0	2	10,5%
	mucinosus	0	0	1	5,3%
	micropapillaris	0	0	2	10,5%
	ismeretlen	8	36.4%	0	0,0%
Tumor méret	≤ 1.0	7	31.8%	2	10,5%
	1.1-2.0	5	22.7%	6	31,6%
	2.1 ≤	2	9.1%	10	52,6%
	ismeretlen	8	36.4%	1	5,3%
N	0	10	45.5%	5	26,3%
	micrometastasis	1	4.5%	0	0,0%
	1	2	9.1%	7	36,8%
	2	1	4.5%	5	26,3%
	ismeretlen	8	36.4%	2	10,5%
Grade	2	2	9.1%	8	42,1%
	3	15	68.2%	10	52,6%
	ismeretlen	5	22.7%	1	5,3%
ER	0	14	63.6%	8	42,1%
	1% ≤	8	36.4%	11	57,9%
PgR	0	16	72.7%	14	73,7%
	1% ≤	6	27.3%	5	26,3%
Her2	0	10	45.5%	12	63,2%
	1	3	13.6%	2	10,5%
	2	3*	13.6%	2**	10,5%
	3	5	22.7%	2	10,5%
	ismeretlen	1	4.5%	1	5,3%

*Valamennyi eset FISH vizsgálati eredménye: nem amplifikált

** Egyik esetben alacsony kópiaszámú polysomia, míg a másik esetben HER2 gén amplifikáció volt kimutatható FISH vizsgálattal

Az immunhisztokémiai vizsgálatba bevont betegek vizsgálata Eseteink klinikopatológiai jellemzőit a 10. táblázatban foglaltuk össze. A FFPE mintával bíró betegcsoportban immunhisztokémiai tipizálást végeztünk. Egy-egy Her2 pozitív tumor fordult elő a BRCA1 és a BRCA2 mutáció hordozók között. A többi BRCA2 mutáns tumor Luminalis, míg a legtöbb BRCA1 mutáns tumor TNBC immunfenotípusú volt (19. ábra).

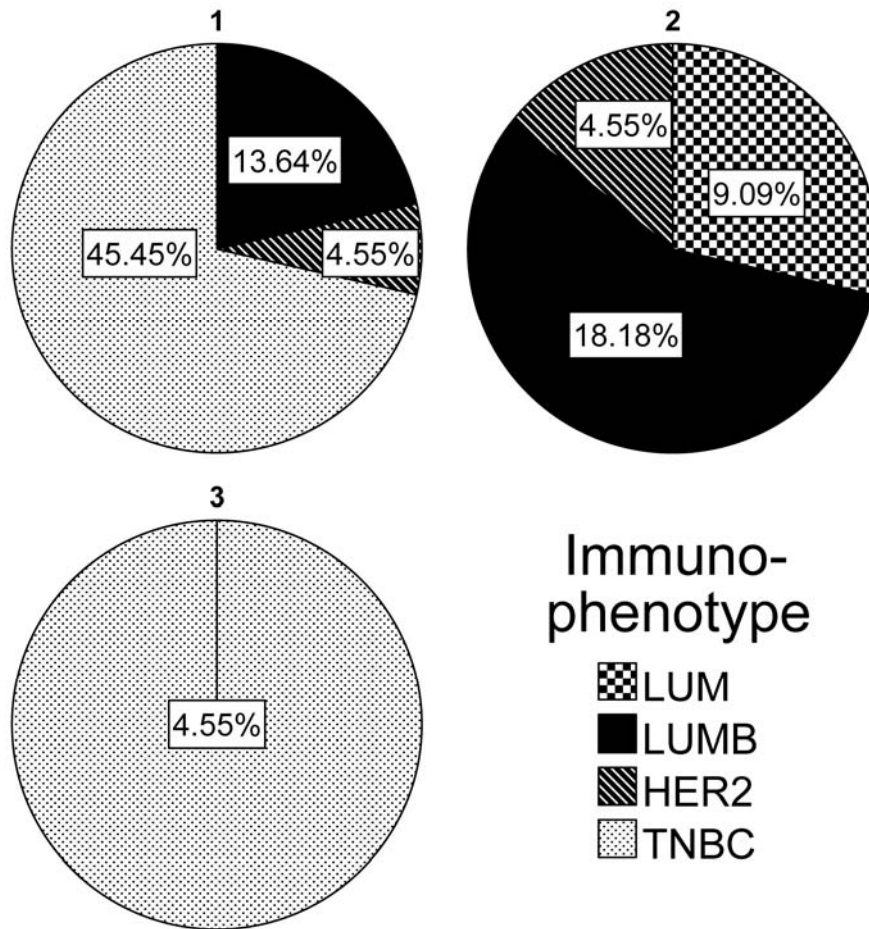
A claudin 1, -3 and -7 expressziója alig volt kimutatható a BRCAmut tumorokban, azonban a claudin 4 expressziója 45.5%-ukban volt megfigyelhető (10/22), az E-cadherin-t 68.5%-uk (15/22) expresszálta (11. táblázat, 20. ábra). Nem volt jelentős különbség ezen markerek expressziójában a BRCA1 és BRCA2 mutációt hordozó betegek tumorai között ($p=1.000$, $p=1.000$, $p=0.344$, $p=0.200$, $p=0.501$).

A minták többsége nem fejezte ki a CD24-et (81.8%, 18/22) de kifejezett pozitivitást mutatott CD44-gyel (77.3%, 17/22). EZH2 negatív volt 5 (22.7%), alacsony expressziójú 8 (36.4%) és pozitív 9 (40.9%) eset. A vimentin immunhisztokémiai reakció többnyire negatív volt (10, 45.5%) vagy alacsony expressziót mutatott (5, 22.7%), míg pozitívnak 7 esetben mutatkozott (31.8%). Az EGFR IHC reakció negatív volt 8 (36.4%), alacsony expressziójú 5 (22.7%), míg pozitív 7 (31.8%) esetben (20. ábra). Nuclearis p53 pozitív volt megfigyelhető az esetek 76.2%-ában (16/21).

Vizsgálataink alapján az apától örökölt BRCA mutációkhoz kapcsolódó tumorok esetében mind az ER, mind a PgR expressziója alacsonyabb volt, mint az anyától örökölt mutációhoz kapcsolódó tumorok eseteiben ($p=0.038$, $p=0.050$).

Összehasonlítva a BRCAmut és BRCAwt mintákat (11. táblázat), azt találtuk, hogy a BRCAmut tumorok kevésbé fejezik ki az ER-t és PgR-t, míg az EGFR, Her2 és p53 expressziója magasabb, mint a BRCAwt tumoroké. A CD24 és CD44 expressziója alacsonyabb, míg az EZH2 és vimentin kifejeződése magasabb volt a BRCAmut esetekben, a CD24/CD44 arány alacsony/magas volt e tumorokban, míg magas/magas a BRCAwt tumorokban. A tight junction molekulák és adhézións molekulák tekintetében a claudin-1, -4, 7 és E-cadherin expressziója volt alacsonyabb és a claudin-3-é magasabb a BRCAmut mintákban. A claudin 3-t kivéve, valamennyi marker kimutatható volt mind a BRCAmut, mind a BRCAwt esetekben: claudin3 expresszió azonban nem volt detektálható a BRCAwt tumorokban. (20-22. ábra)

Szignifikáns pozitív és negatív korreláció volt kimutatható: legerősebb volt a pozitív korreláció a CD24 és CD44, valamint a claudin-1 között, a claudin-1 és claudin-4 valamint a Ki67 között; míg negatívnak bizonyult az E-cadherin és vimentin; illetve az EGFR és ER korrelációja.



19. ábra: BRCA mutáció asszociált emlőrák esetek (CSMC betegcsoport) IHC- alapú szubtípusa a FFPE minták alapján (1: BRCA1 mutáció ; 2: BRCA2 mutáció és 3: BRCA1 és BRCA2 mutáció).

11. táblázat: Az immunhisztokémiai vizsgálatba bevont betegek tumor mintáin értékelt proteinek expressziója

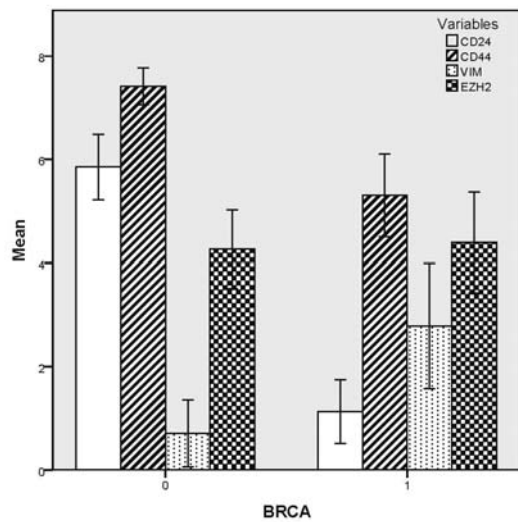
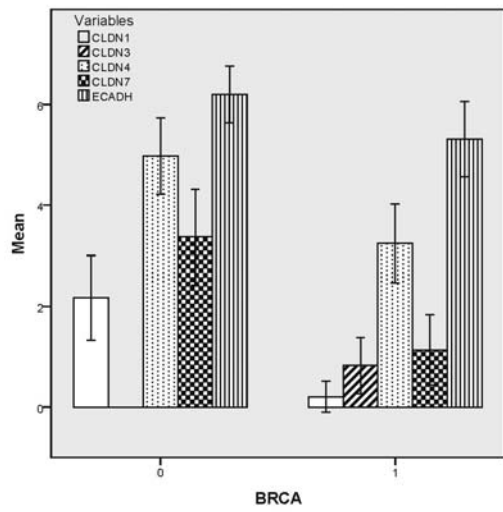
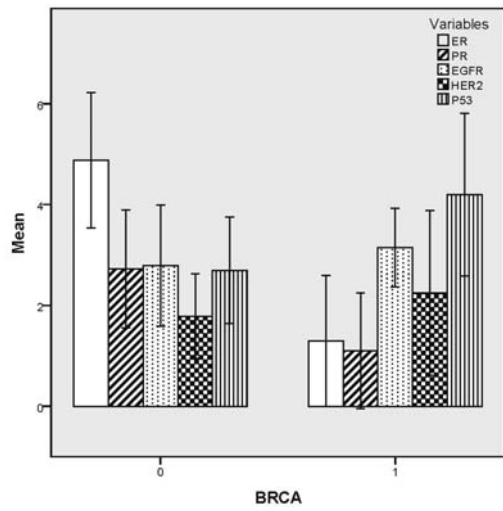
Group	BRCAwt (n = 19) ^a				BRCA1 (n = 15) ^a				BRCA2 (n = 8) ^a				p value
	mean	high	negative	low	mean	high	negative	low	mean	high	negative	low	
AR	1.56	1 (5.6)	13 (72.2)	4 (22.2)	0.88	1 (6.7)	13 (86.7)	1 (6.7)	0.24	0 (0)	7 (100)	0 (0)	0.310
CD24	6.04	14 (73.7)	0 (0)	5 (26.3)	0.67	0 (0)	13 (100)	0 (0)	1.71	0 (0)	6 (75)	2 (25)	0.000
CD44	7.45	19 (100)	0 (0)	0 (0)	5.56	11 (84.6)	1 (7.7)	1 (7.7)	6.45	7 (100)	0 (0)	0 (0)	0.001
CK56	0.13	0 (0)	19 (100)	0 (0)	0.44	0 (0)	14 (93.3)	1 (6.7)	0.13	0 (0)	8 (100)	0 (0)	0.606
CLDN1	2.07	2 (11.1)	11 (6.1)	5 (27.8)	0.38	0 (0)	12 (92.3)	1 (7.7)	0	0 (0)	8 (100)	0 (0)	0.010
CLDN3	0	0 (0)	19 (100)	0 (0)	0.94	0 (0)	11 (84.6)	2 (15.4)	0.36	0 (0)	7 (100)	0 (0)	0.034
CLDN4	4.86	11 (57.9)	3 (15.8)	5 (26.3)	3.63	7 (50)	3 (21.4)	4 (28.6)	3.33	4 (50)	3 (37.5)	1 (12.5)	0.164
CLDN7	3.42	8 (42.1)	9 (4.4)	2 (10.5)	1.06	0 (0)	11 (78.6)	3 (21.4)	0.71	0 (0)	7 (87.5)	1 (12.5)	0.019
ECADH	6.19	15 (83.3)	1 (5.6)	2 (11.1)	4.81	11 (64.7)	3 (17.6)	3 (17.6)	4.98	75,00	1 (12.5)	1 (12.5)	0.086
EGFR	2.75	6 (33.3)	11 (61.1)	1 (5.6)	3.25	6 (50)	5 (41.7)	1 (8.3)	2.85	1 (12.5)	4 (50)	3 (37.5)	0.873
ER	4.97	11 (64.7)	6 (35.3)	0 (0)	3.22	5 (41.7)	7 (58.3)	0 (0)	2.14	1 (14.3)	4 (57.1)	2 (28.6)	0.246
EZH2	4.35	10 (55.6)	3 (16.7)	5 (27.8)	3.7	6 (42.9)	4 (28.6)	4 (28.6)	3.88	3 (37.5)	1 (12.5)	4 (50)	0.747
HER2	2.18	3 (15.8)	12 (63.2)	4 (21.1)	2.39	4 (33.3)	8 (66.7)	0 (0)	2.57	2 (28.6)	4 (57.1)	1 (14.3)	0.680
p53	2.4	5 (26.3)	13 (68.4)	1 (5.3)	4.67	9 (64.3)	3 (21.4)	2 (14.3)	4	3 (42.9)	3 (42.9)	1 (14.3)	0.106
PR	2.31	6 (33.3)	12 (66.7)	0 (0)	2.51	4 (33.3)	8 (66.7)	0 (0)	2.43	2 (28.6)	4 (57.1)	1 (14.3)	0.794
VIM	0.63	1 (5.3)	17 (89.5)	1 (5.3)	3.22	7 (43.8)	7 (43.8)	1 (6.75)	2.73	2 (25)	4 (50)	2 (25)	0.005
Ki67	15.22	5 (27.8)	9 (50)	4 (22.2)	13.2	2 (16.6)	9 (75.0)	1 (8.3)	1.17	0 (0)	3 (100)	0 (0)	0.073

Utolsó oszlopban az expressziós szintek összehasonlítása- Kruskal-Wallis teszt

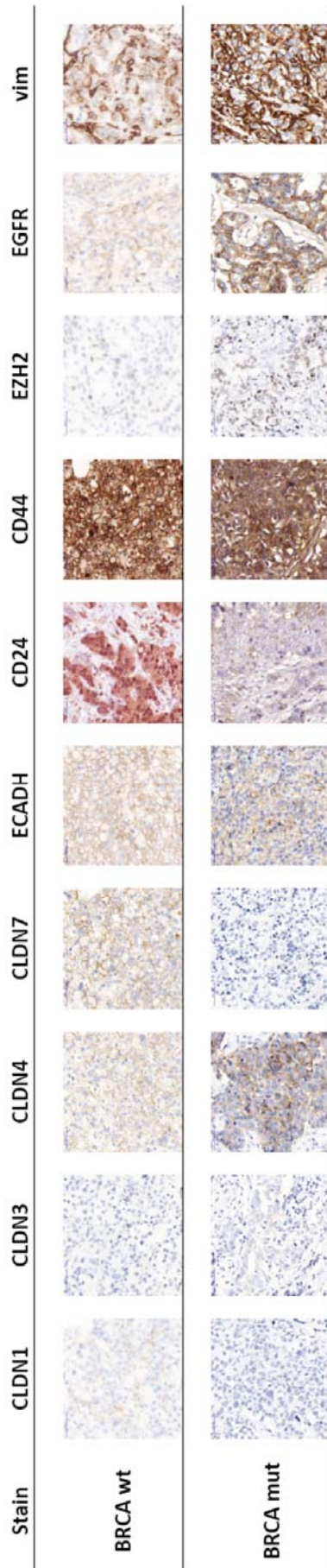
A betegek száma mellett zárójelben százalékos arányuk szerepel.

Az egyes immunhisztokémiai reakciókban értékelt összesetszám-a reakció értékelhetőségétől függően- különböző.

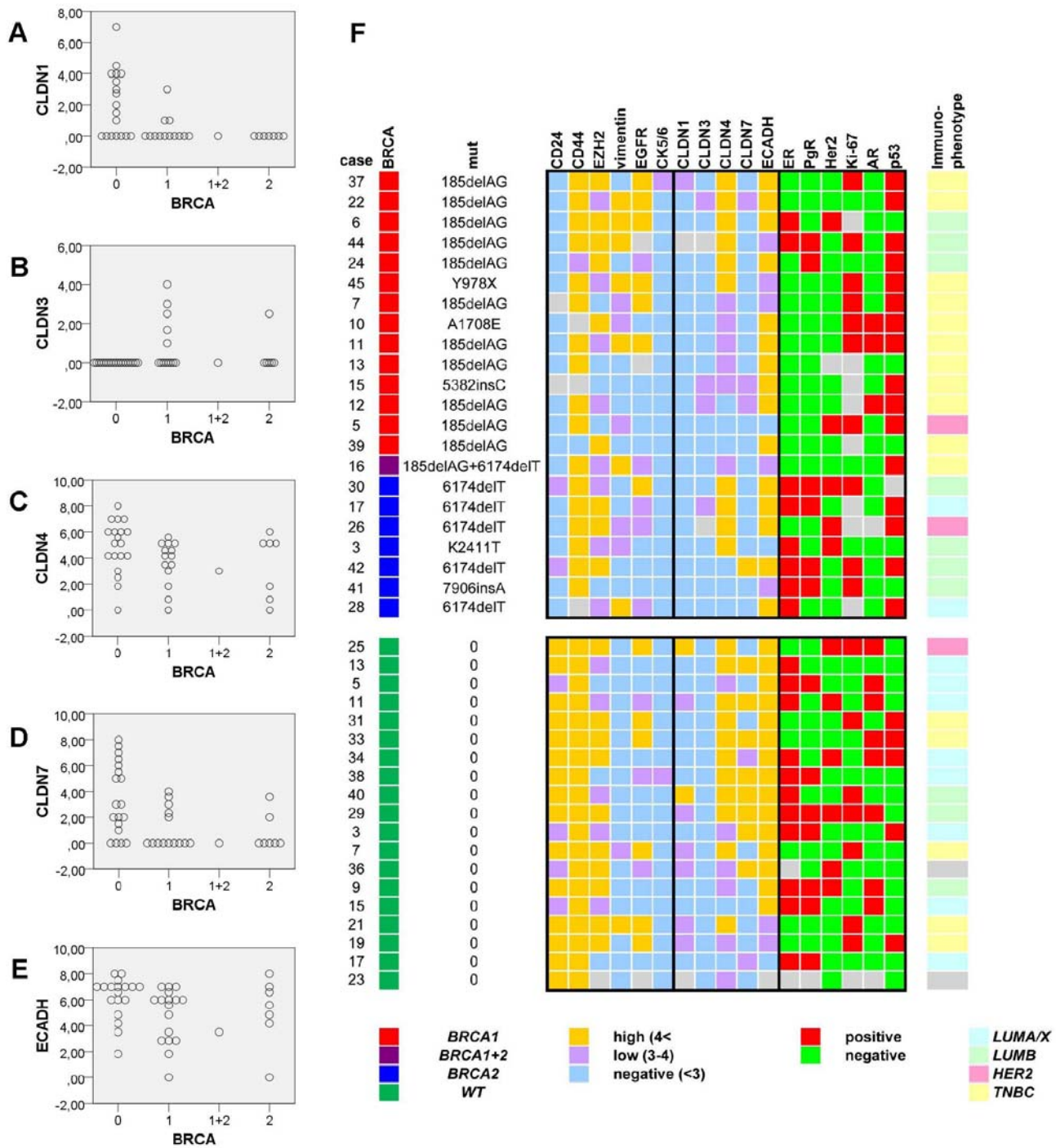
Az egyetlen BRCA 1 és 2 mutációt egyszerre mutató esetet mindkét csoportban feltüntettük.



20. ábra: A különböző IHC markerek expressziója (95% CI) a BRCA mutáns (BRCA1, 2, 1+2) -1- és vad (BRCA wt)-0- tumorokban.



21. ábra: IHC reakciók BRCA mutáns (BRCAmut) és vad (BRCAwt) tumorokban: tight junction fehérjék (claudin-1, 3-, -4, -7) és E-cadherin, valamint őssejt markerek (CD24/CD44, EZH2), EGFR és vimentin (400x nagyítás, chromogen: DAB).



22. ábra: Claudinok és E-cadherin expressziója (A-E). Heat-map- expresszált proteinek és IHC-alapú szubtypus (F), emlőrák esetek-sorok szerint, IHC markerek- függőleges oszlopok.

4.5 A terhességi emlőrák (PABC) klinikopatológiája és kimenetele

Klinikai adatok vizsgálata. Az áttekintett időszakban (1998.01.01-2012.11.01) harmincegy terhességi emlőrákos esetet találtunk, melyek közül 10 a terhesség alatt, 21 a szoptatás ideje alatt, illetve a szülést követő 1 éven belül manifesztálódott. A kezelés illetve a betegek adatait a 12. táblázat tartalmazza. Mindkét csoportban az életkor mediánja 34 év volt az emlőrák diagnózisakor.

12. táblázat: Életkor és kezelési adatok - PABC és kontroll betegek

			PABC N=31	Control N=31	p-value
Age		median (years)	34	34	match
Surgery	Breast	BCS ^a	12 (38.7%)	14 (45.2%)	(BCS ^a vs other) 0,448 ^m
		mastectomy ^b	18 (58%)	14 (45.2%)	
		bilat mastectomy ^c	1 (3.2%)	1 (3.2%)	
		subcut mastect ^d	0 (0%)	2 (6.5%)	
	Axilla	x ^e	1 (3.2%)	1 (3.2%)	1 ⁿ
		SNLB ^f	4 (12,9%)	3 (9,7%)	
ALND ^g		26 (83,9%)	27 (87,1%)		
Oncological Treatment	Neoadj ^h	all	15 (48,4%)	10 (32,3%)	0,196 ^m
		followed by chemotx	11 (35,5%)	6 (19,4%)	0,342 ^m
	Chemotx ⁱ	yes	24 (77,4%)	24 (77,4%)	0,605 ^m
		no	5 (16,1%)	7 (22,6%)	
		nd ^o	2 (6,5%)	0 (0%)	
	Regimen ^j	antracyclin	6(19.4%)	7(22.6%)	0,839 ^m
		antracyclin+taxane	9(29%)	9(29%)	
		trastuzumab	4(12,9%)	8(25,8%)	
		other	5(16,1%)	6(19,4%)	
	Radiotx ^k	nd ^o	4(12,9%)	0(0%)	0,668 ^m
		yes	22 (70,9%)	22 (70,9%)	
		no	7 (22,5%)	9 (29%)	
		nd ^o	2 (6,5%)	0 (0%)	
	Endocr ^l	yes	12 (38,7%)	24 (77,4%)	0,004 ^m
		no	17 (54,8%)	7 (22,6%)	
nd ^o		2 (6,5%)	0 (0%)		

^a emlőmege tartó műtét, ^b módosított radikális mastectomia, ^c kétoldali mastectomia, ^d subcutan mastectomia, ^e nem történt sebészi beavatkozás, ^f őrszem nyirokcsomó biopszia, ^g axilláris nyirokcsomók

eltávolítása, ^h neoadjuváns kemoterápia, ⁱ adjuváns kemoterápia, ^j adjuváns kemoterápia módoszatai, ^k besugárzás, ^l hormonkezelés, ^m Chi-négyzet próba, ⁿ Fisher teszt, ^o nincs adat

A terhesség ideje alatt alkalmazott kezelések. A terhesség ideje alatt felfedezett esetek között 3 beteg emlőrákja az első-, 6 betegé a második-, míg egy betegé a harmadik trimeszterben manifesztálódott.

6 beteg kapott sebészi kezelést (4 emlőmegtartásos műtét /BCS/, 2 mastectomia, mind a 6 esetben axillaris blokk disszekcióval/ALND/) még a terhessége alatt, amit a szülés után adjuváns kezelés követett 4 esetben. Egy beteg kapott neoadjuváns kemoterápiát, amit mastectomia követett ALND-vel még a terhesség ideje alatt, majd a szülés után adjuváns kezelés. Egy betegnél történt a terhesség ideje alatt emlőmegtartásos műtét és adjuváns kemoterápia (6xFEC).

A terhesség kimenetele. Egy beteg terhességét a 23. gesztációs héten megszakították, 5 betegnél történt elektív császármetszés (29-34 gesztációs hét között), míg 4 beteg spontán szült (közülük 1 koraszülés).

A terhességi emlőrákos nők és a kontroll betegek kezelésének összehasonlítása. Nem volt szignifikáns különbség az esetek és kontrollok sebészi beavatkozását tekintve (BCS vs mastectomia). Mindkét csoportban elsősorban ALND történt az axilla ellátásában.

A neoadjuváns, adjuváns kemo- ill. radioterápia gyakoriságának ill. az alkalmazott protokollok tekintetében sem volt a különbség szignifikáns. Adjuváns endokrin terápia kétszer gyakrabban fordult elő a kontroll csoportban. ($p=0.004$)

Relapszus- és túlélésbeli különbségek. A 13. táblázat foglalja össze a terhességi emlőrákos nők és a kontroll esetek relapszusra, túlélésre és családi anamnézisre vonatkozó adatait.

Terhességi emlőrákban a relapszus szignifikánsan gyakoribb volt, mint a kontroll csoportban ($p=0.003$), 14 nőbetegnél jelentkezett a betegség szisztémás kiújulása a PABC csoportban (45.2%), míg a kontroll csoportban 3 nőbetegnél (9.7%) ($p=0.0003$). A PABC esetekben a szisztémás relapszus a LumBprol alcsoportban volt a leggyakoribb (10-ből 6 betegnél fordult elő), ezt követte gyakoriságban a tripla negatív (TNBC) alcsoport (5 betegnél a 15-ből), ezek a betegek mind a betegségük következtében hunytak el.

A betegségmentes és teljes túlélés szignifikánsan rosszabb volt a terhességi emlőrákos nők esetében ($p=0.0004$ és $p=0.0007$) (23. a. és c. ábra) Külön vizsgálva a terhes és

posztpartum terhességi emlőrákos betegek túlélését a kontroll betegekhez képest, a posztpartum terhességi emlőrákos betegek betegségmentes ($p=0.001$) és teljes túlélése ($p=0.00008$) szignifikánsan rövidebb volt, mint a kontroll csoportba tartozó nőbetegeké. A terhes betegek betegségmentes túlélése szignifikánsan rosszabb volt, mint a kontroll betegeké ($p=0.007$), azonban teljes túlélésük nem különbözött szignifikánsan (23. b. és d. ábra).

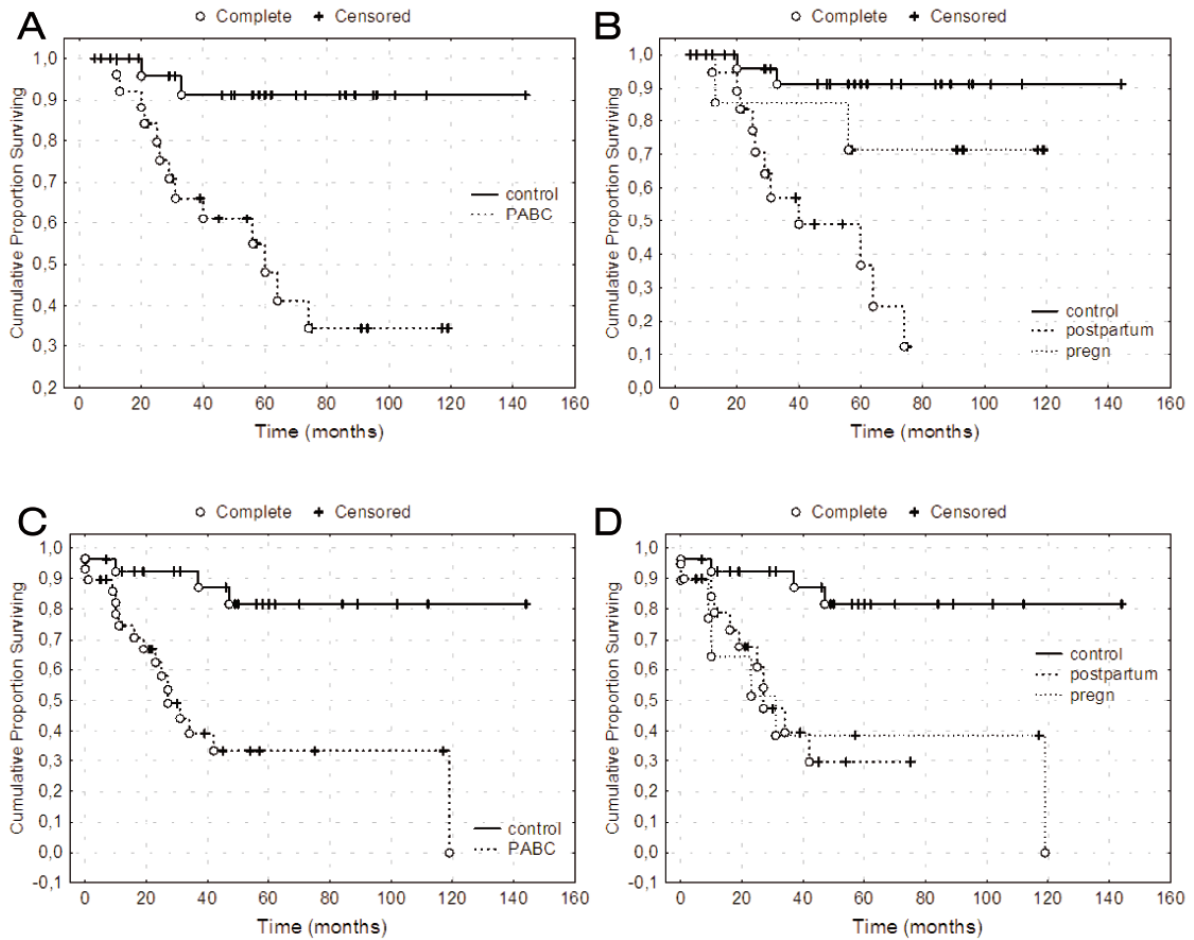
A PABC kimenetele kedvezőtlenebb volt, 13 beteg hunyt el a betegség következtében (41.9%) a terhességi emlőrákos nők közül, míg a kontroll csoportban 2 beteg (6.5%) halt meg az emlőrák következtében ($p=0.005$) (24. ábra).

Anamnézis. A családi anamnézist illetően nem volt különbség a teljes- és az emlőrákra vonatkozó családi anamnézis tekintetében a két csoport között.

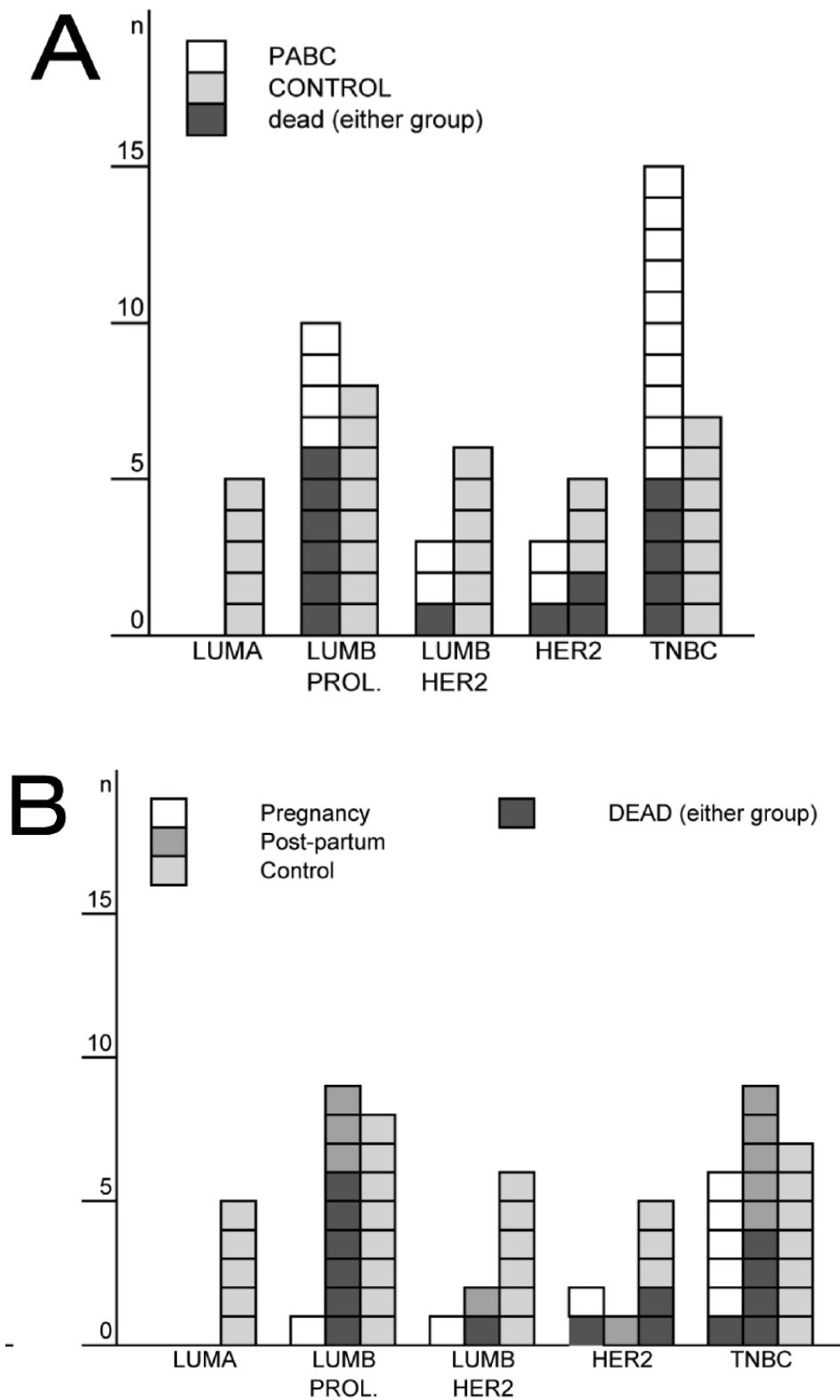
13. táblázat: A terhességi emlőrákos (PABC) és kontroll betegek relapszusra vonatkozó, túlélési és családi anamnesztikus adatai

			PABC	Control	p-value
			N=31	N=31	
Relapse		yes	18 (58,1%)	4 (12,9%)	0,0003 ^f
		no	12 (38,7%)	25 (80,6%)	
		nd ^a	1 (3,2%)	2 (6,5%)	
	Loco-regional	yes	6 (19,4%)	1 (3,2%)	0,102 ^f
		no	24 (77,4%)	28 (90,3%)	
		nd ^a	1 (3,2%)	2 (6,5%)	
	Systemic	yes	14 (45,2%)	3 (9,7%)	0,003 ^f
		no	16 (51,6%)	26 (83,9%)	
		nd ^a	1 (3,2%)	2 (6,5%)	
Death	Deceased		13 (41,9%)	2 (6,5%)	0,005 ^e
	Alive	All	18 (58,1%)	29 (93,5%)	
		alive with disease	1 (3,2%)	2 (6,5%)	
		no evidence of disease	17 (54,8%)	27 (87,1%)	
Death/IHC subtype ^b		LumA	0/0	0/5	Lásd 24. ábra
		LumBprol	6/10	0/8	
		LumBHer2	1/3	0/6	
		Her2+	1/3	2/5	
		TNBC ^c	5/15	0/7	
Family history	All	positive	14 (45,2%)	15 (48,4%)	0,558 ^e
		negative	7 (22,6%)	5 (16,1%)	
		nd ^a	10 (32,3%)	11 (35,5%)	
	BC related ^d	positive	8 (25,8%)	7 (22,6%)	0,837 ^e
		negative	13 (41,9%)	13 (41,9%)	
		nd ^a	10 (32,3%)	11 (35,5%)	

^a nincs adat, ^b immunhisztokémiai szubtypus, ^c tripla negatív fenotípus, ^d emlőrákra vonatkozó családi anamnézis, ^e chi négyzet próba, ^f Fisher exact teszt



23. ábra: A: Terhességi emlőrákos (PABC) és kontroll betegek teljes túlélése ($p=0.0007$). B: Terhes, posztpartum és kontroll betegek teljes túlélése ($p=0.002$). Kontroll vs posztpartum $p=0.00008$, kontroll vs terhes $p=0.203$, posztpartum vs terhes $p=0.049$). C: Betegségmentes túlélés terhességi emlőrákos és kontroll betegek esetében ($p=0.0004$). D: Betegségmentes túlélés terhes, posztpartum és kontroll betegek esetében ($p=0.007$). Kontroll vs posztpartum $p=0.001$, kontroll vs terhes $p=0.007$, posztpartum vs terhes $p=0.979$).



24. ábra: A: A terhességi emlőrákos, a kontroll betegek és az elhunyt betegek immunhisztokémiai szubtípusa (n: betegek száma). B: Terhes, posztpartum és kontroll betegek immunhisztokémiai szubtípusa, az elhunyt betegek külön kiemelve (n: betegek száma).

14. táblázat: Terhességi emlőrákos és kontroll betegek tumorainak patológiai jellemzői

		PABC N=31	Control N=31	p-value
Type	IDC ^a	26 (83,9%)	30 (96,8%)	0,195 ^p
	Other	5 (16,1%)	1 (3,2%)	
Associated in situ carcinoma	none	11(35,5%)	14(45,2%)	0,017 ^o
	EIC non-high ^b	3(9,7%)	3(9,7%)	
	EIC high ^c	14(45,2%)	3(9,7%)	
	DCIS non-high ^d	1(3,2%)	4(12,9%)	
	DCIS high ^e	2(6,5%)	7(22,6%)	
Multifocal disease	No	24 (77,4%)	28 (90,3%)	0,306 ^p
	Yes	7 (22,6%)	3 (9,7%)	
Grade	1	0 (0%)	2 (6,5%)	0,199 ^o
	2	5 (16,1%)	8 (25,8%)	
	3	26 (83,9%)	21 (67,7%)	
T	T1	6 (19,4%)	8 (25,8%)	0,522 ^o
	T2	9 (29%)	12 (38,7%)	
	T3	1 (3,2%)	1 (3,2%)	
	yT0	2 (6,5%)	3 (9,7%)	
	yT1	5 (16,3%)	4 (12,9%)	
	yT2	4 (12,9%)	3 (9,7%)	
	yT3	4 (12,9%)	0 (0%)	
N	Nx	1(3,2%)	1(3,2%)	0,646 ^o
	N0	6(19,4%)	9(29%)	
	N1	4(12,9%)	7(22,6%)	
	N2	4(12,9%)	2(6,5%)	
	N3	2(6,5%)	2(6,5%)	
	yN0	4(12,9%)	5(16,1%)	
	yN1	6(19,4%)	4(12,9%)	
	yN2	2(6,5%)	1(3,2%)	
yN3	2(6,5%)	0(0%)		
ER	ER+	13 (41,9%)	19 (61,3%)	0,127 ^o
	ER-	18 (58,1%)	12 (38,7%)	
PgR	PgR+	4 (12,9%)	12 (38,7%)	0,04 ^o
	PgR-	27 (87,1%)	19 (61,3%)	
ER+PgR+		4	12	0,149 ^p
ER+PgR-		9	7	
Her2	Her2+	6 (19,4%)	11(35,5%)	0,155 ^o
	Her2-	25(80,6%)	20(64,5%)	
Ki67	high	31 (100%)	24 (77,4%)	0,01 ^p
	low	0 (0%)	6 (19,4%)	
	nd ^f	0 (0%)	1 (3,2%)	
P53	positive	15 (48,4%)	17 (54,8%)	0,774 ^o
	negative	9 (29,3%)	12 (38,8%)	
	nd ^f	7 (22,6%)	2 (6,5%)	
NPI ^f	median (range)	6(3,24-8,5)	4,65(3,24-7,2)	0,03 ^g
	excellent (2-2,4) ^g	0 (0%)	0(0%)	
	good(>2,4-3,4) ^h	2(6,5%)	5(16,1%)	
	intermed(>3,4-5,4) ⁱ	7(22,6%)	12(38,8%)	
	poor(>5,4) ^j	14(45,1%)	9(29%)	
na ^k	8(25,8%)	5(16,1%)	0,228 ^o	
LVI ^l	no	10 (32,3%)		15(48,4%)
yes	19 (61,3%)	15 (48,4%)		
	nd ^f	2 (6,5%)	1 (3,2%)	
IHC-Subtype ^m	LumA	0 (0%)	5 (16,1%)	0,015 ^o
	LumBprol	10 (32,3%)	8 (25,8%)	
	LumBHer2	3 (9,7%)	6 (19,4%)	
	Her2	3 (9,7%)	5 (16,1%)	
	TNBC ⁿ	15(48,4%)	7 (22,6%)	

a Invazív ductalis carcinoma, b Extenzív intraductalis carcinoma komponens, nem magas mag grade-ű, c Extenzív intraductalis carcinoma komponens, magas mag grade-ű, d Ductalis in situ carcinoma, nem magas magr grade-ű, e Ductalis in situ carcinoma magas mag grade-ű, f Nottingham Prognosticus Index, g Nagyon jó prognózisú- NPI, h Jó prognózisú-NPI, i közepes prognózisú-NPI, j Rossz prognózisú- NPI, k NPI nem meghatározható- neoadjuváns kemoterápiát követő részleges vagy teljes patológiai válasz

l Lymphovascularis invasio m IHC-alapú szubtypus, n tripla negatív immunfenotípus o Chi-négyzet teszt p Fisher exact teszt q Wilcoxon teszt r nincs adat

Patológiai adatok elemzése. A 14. táblázat foglalja össze a terhességi emlőrákos és a kontroll csoportba tartozó nők emlőrákjának patológiai jellemzőit.

A leggyakoribb szövettani típus mindkét csoportban a magas grádusú invazív ductális carcinoma (IDC) volt. A két csoport között nem volt szignifikáns különbség a tumor T és N stádiumában.

Neoadjuváns kemoterápiával kezelt betegek esetében tumor méretnek a kezelés előtti tumor méretet tekintettük a medián tumor méret számolásánál. Ez utóbbi a PABC esetekben 24 mm (tartomány: 10-100mm) volt, míg a kontroll eseteknél 22 mm (tartomány: 9-85mm) ($p=0.13$) (25. ábra).

A Nottingham Prognosztikai Index medián értéke PABC esetén 6 volt (tartomány:3,24-8,5) és 4,5 a kontrolloknál (tartomány:3,24-7,2) (26. ábra). Ez alapján, összesítve, a PABC csoport a rossz prognózisú, míg a nem terhességi emlőrákos csoport a közepes prognózisú kategóriába sorolódott ($p=0.03$). A vizsgálat e részéből kizárásra kerültek azok a betegek, akik neoadjuváns kezelést követően patológiai komplett vagy parciális választ mutattak.

A daganat nyirok- vagy vérerekben történő terjedése a terhességi emlőrákos esetek 61,3%-ban, míg a kontroll esetek 48,4%-ban volt megfigyelhető ($p=0.228$).

A PABC esetek 58%-a, míg a kontroll esetek 38,8%-a bizonyult ER negatívnak. A PgR expressziója tekintetében a különbség szignifikáns volt a terhességi emlőrákos és a kontroll esetek között: míg a PABC esetek 87,1% volt PgR negatív, addig a kontroll esetek 61,3%-ban nem láttunk PgR expressziót ($p=0.04$).

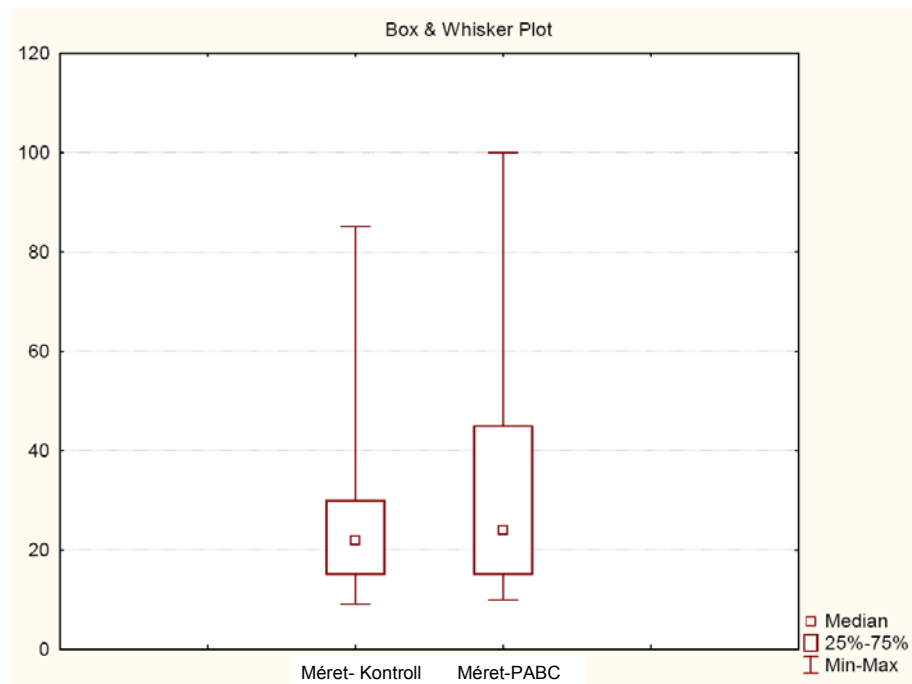
Nem volt jelentős különbség a két csoport között Her2 státusz és p53 expresszió tekintetében.

Valamennyi terhességi emlőrákos beteg tumorára magas proliferációs index (Ki67>14%) volt jellemző ($p=0.01$).

Az immunhisztokémiai szubtypus tekintetében a PABC esetek között leggyakrabban a TNBC esetek (48%) fordultak elő, ezt követték gyakoriságban a LumB prol esetek (32,3%). Ebben a csoportban nem voltak Lum A esetek.

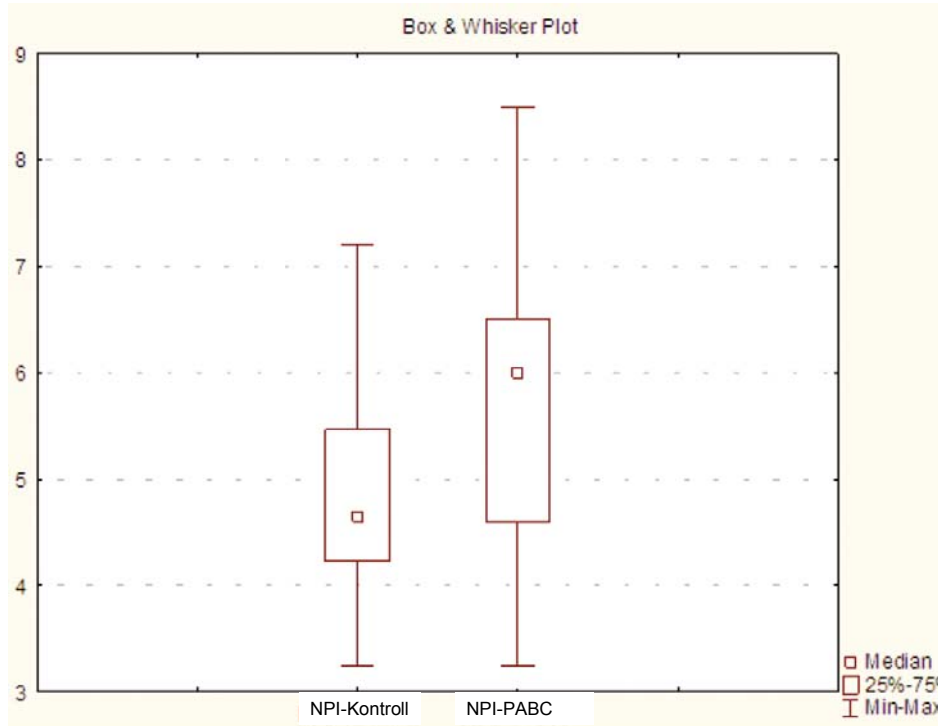
Szignifikáns volt a különbség a két csoport között a társult in situ léziók tekintetében is ($p=0.017$). A terhességi emlőrákos esetek 45.2%-a magas grádusú extenzív intraduktális karcinóma komponenssel társult, ugyanez a kontroll esetek csupán 9.7%-ában volt megfigyelhető. A kontroll csoportban a leggyakoribb társult in situ lézió a kis kiterjedésű magas grádusú in situ duktális karcinóma volt (22.6%), 45%-ukban nem volt társuló in situ lézió megfigyelhető.

Többváltozós Cox proporcionális modell analízissel a terhesség ténye összefüggést mutatott a relapszussal és a túléléssel (15. táblázat).



$p=0,13$ (Wilcoxon test)

25. ábra: Tumorméret a terhességi emlőrákos (PABC) és kontroll csoportban



26. ábra: Nottingham prognosztikai index (NPI) a terhességi emlőrákos (PABC) és a kontroll csoportban. ($p=0.03$, Wilcoxon teszt)

15. táblázat: Többváltozós Cox proporcionális modell analízis- összefüggés a túléléssel

Prognosztikus faktor	RR (95% CI)	p
Csoport (PABC vagy Kontroll)	3.265 (1.433-7.442)	0,005
Életkor	1.169 (0.98-1.394)	0,083
Műtét (mastectomia vagy emlőmegtartás)	0.885 (0.472-1.66)	0,703
Szöveti típus (IDC vagy egyéb)	1.142 (0.932-1.399)	0,2
Többgócúság (Egygócú vagy többgócú tumor)	0.86 (0.194-3.813)	0,842
T (T1 vs. T2 vs. T3 vs. yT0 vs. yT1 vs. yT2 vs. yT3)	0.969 (0.888-1.056)	0,471
N (Nx vs. N0 vs. N1 vs. N2 vs. N3 vs. yN0 vs. yN1 vs. yN2 vs. yN3)	1.029 (0.944-1.121)	0,521
ER (pos vs. neg.)	0.989 (0.282-3.468)	0,986
Her2 (pos vs. neg.)	0.524 (0.439-5.294)	0,507

5. MEGBESZÉLÉS

5.1 Fiatalkori és idősebb betegeket érintő emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők és kimenetel alapján

Irodalmi adatok szerint a fiatal, emlőrákos nők prognózisa rosszabb [33, 101, 102]. Az emlőrák kialakulásának kockázata emelkedett, ha az elsőfokú rokonok között emlő-, vagy petefészekrák fordult elő, illetve amennyiben több rokont is érintett a betegség [103, 104]. A Cancer Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (CGoHFiB) szerint 80 éves korig az emlőrák kumulatív incidenciája az érintett elsőfokú rokonok számának függvényében: 7.8% ha nincs érintett rokon, 13.3% egy elsőfokú rokon érintettségének esetén, 21.1% ha két elsőfokú rokon is érintett [104].

Tanulmányunkban a vizsgált fiatal nők 51,02%-nak családjában fordult elő emlő-, vagy petefészekrák az első-, vagy másodfokú rokonok között. Ez a magas arány a genetikai faktorok jelentős szerepére utal. Loman és mtsai hasonló eredményekről számoltak be 2001-ben, amikor a svéd populációban előforduló fiatalkori emlőrák esetek családi anamnézis adatait vizsgálták emlő- és petefészekrák előfordulása tekintetében. Vizsgálataik szerint fiatal emlőrákos betegek csaknem felének a családjában fordult elő emlő-, vagy petefészekrák. A betegek 9%-ánál a BRCA1 vagy BRCA2 gén csírasejtes mutációja volt kimutatható [105].

Evans és mtsai tanulmányukban azt találták, hogy a BRCA1 vagy BRCA2 gén csírasejtes mutációja ritka az olyan fiatal nőkben, akiknek a családi anamnézise negatív (12,7% vs 80% a pozitív családi anamnézisű betegeknél). Ezek az eredmények a családi anamnézis pontos dokumentálásának fontosságára hívják fel a figyelmet! Az izolált fiatalkori emlőrák esetek között elsősorban a grade 3 differenciációjú és a TNBC tumorokban fordult elő BRCA1 vagy BRCA2 mutáció [106].

Vizsgálatainkban a pozitív családi anamnézisű betegek 52%-ának TNBC szubtípusú tumora volt, míg a negatív családi anamnézisű betegek legjellemzőbb tumora LumA (46,15%) szubtípusú volt. Irodalmi adatok szerint az 50 éves kor előtt kialakuló emlőrák eseteket vizsgálva, a pozitív családi anamnézisű betegek között gyakoribb az ER és PgR negatív emlőrák a negatív családi anamnézisű betegekkel összehasonlítva [107].

Ugyanakkor az is ismert tény, hogy a 40 évesnél fiatalabb nők között a nyirokcsomó-negatív betegek esetében a LumA szubtypusú emlőrakos nők 10 éves túlélése 94%, míg a TNBC szubtypusúaké 72% [108]. Anders és mtsai ezt a szubtypusokhoz és a grade-hez társuló gének behatásának tartják, amelyek életkor függőek is [109]. Egy korábbi tanulmányukban már utaltak arra, hogy a fiatalkori emlőrak különálló biológiai entitást képvisel, amire specifikus jelátviteli útvonalak jellemzőek [73].

Vizsgálataink szerint 25 (23,36%) fiatal nőbeteg hunyt el a betegsége következtében. A legtöbb elhunyt beteg LumB illetve TNBC szubtypusú tumorral bírt.

Nem találtunk szignifikáns különbséget a túlélésben a negatív családi anamnézisű és az emlő- ill. petefészekrák tekintetében pozitív családi anamnézisű betegek között. Nem mutatott szignifikáns eltérést a betegek túlélése az alkalmazott terápia (neoadjuváns vs adjuváns) függvényében.

Tanulmányunk a nagyon fiatalkori emlőrak kedvezőtlen prognózisára utal. Ebben az életkori csoportban kedvezőtlenebb biológiai jellegzetességekkel bíró daganat típusok a gyakoribbak (TNBC és LumB szubtypusú emlőrak). TNBC típusú daganat magasabb arányban fordult elő a pozitív családi anamnézisű betegeknél.

A terápiás módokatól független magas arányú halálozás azt is sugallja, hogy ebben az életkori csoportban hatékonyabb kezelési protokollokra lenne szükség.

5.2 Fiatal- és időskori emlődaganatok morfológiai és molekuláris sajátosságai közötti összefüggések vizsgálata

Az emlőrakos megbetegedés még mindig az egyik vezető daganatos halálok [2, 110]. A rohamos fejlődés ellenére a diagnosztika és kezelés egyes kérdései még válaszra várnak (prevenció, szenzitívebb diagnosztikus markerek, progresszió predikciója, személyre szabott kezelés, rezisztencia elleni küzdelem). Ezek megértéséhez az emlődaganatokról alkotott „modern“ képünk közelebb vitt, de új kérdések sorát is felvetette [19]. A daganatok heterogenitása klinikai és molekuláris szinten is rendkívül nagy [111, 112].

Vizsgálatunkban fiatalokban és idősekben kialakuló tumorerő különböző megjelenésű régióit elemeztük az immunfenotípust meghatározó immunpanel és FISH reakciók eloszlása szempontjából. Hasonló felmérések már készültek, de korcsoportok összevetése kétdimenziós feltérképezéssel még nem történt [113]. A fiatalokban

található szélesebb morfológiai heterogenitást mutató tumorok magyarázhatják a nagyobb molekuláris szintű diverzitást is, aminek diagnosztikus és terápiás következményei is lehetnek (pl. core biopszia vétel, neoadjuváns terápia).

Az egyes területek közötti fehérje expressziós különbség lehet a metodikai eljárás következménye is (patológiai feldolgozás), ezért az értékelési eljárások ezt kompenzálni igyekeznek a pozitívítási küszöb pontosabb beállításával [114]. Felmérésünkben ennek pontosabb meghatározását kíséreltük meg az egyes területek külön értékelésével és a Histoscore használatával [91]. A Her2 kifejeződés és HER2 génamplifikáció heterogenitása az egyik legnagyobb varianciát mutató és terápiás szempontból messzemenő következményekkel járó kérdés [115]. A fiatalkori tumorok egyikében láttunk részleges HER2 poliszómiát, és az egyik időskori esetben egy területre kiterjedő HER2 génamplifikációt.

A két leginkább elfogadott tumorprogressziós (összejt hipotézis és klonális evolúciós/szelekciós) modell verseng egymással, amelyek azonban nem zárják ki egymást; sőt legvalószínűbb, hogy együtt működnek (ugyanúgy egy sejtben bekövetkezett zavaroknak tulajdonítják a tumoros megbetegedést). A heterogenitást azonban eltérő módon közelítik meg: aberráns differenciációs program megvalósulásaként vagy különböző fenotípusú sejtek versengéseként látják azt. Az idősebb betegekben látható ösztrogén-receptor kifejeződésében észlelhető nagyobb heterogenitás intenzitásbeli különbségekből adódik, és tulajdonképpen nem a receptor jelenléte vagy hiánya adta a különbségeket, míg a fiatalkori daganatokban ez utóbbi is előfordult. A proliferációs marker tekintetében fordított a helyzet: egy időskori tumorban látható nem osztódó régió, míg a fiatalok esetében inkább intenzitásbeli különbségek vannak, és a tumorok mindenképpen jobban proliferálnak, rosszabb prognózist sejtetve. Az egyes daganatok dinamikus képére, feldolgozáskor kimerevített „pillanatfelvételt” látva, teljes biztonsággal nem következtethetünk.

Akárhogy is fogjuk fel a kimenetelt legjobban meghatározó sejtcsoportok eredetét, a kép mindig árnyalt marad: a teljes tumor átlagos kifejeződési mintázatát vagy az egyes régiók külön vett pontos értékeinek átlagát véve nagyjából ugyanoda jutunk. Azonban az egyes területek prognosztikus jelentősége nagyon is eltérő lehet, amelyet a technika fejlődésével, valamint a kezelési adatok és követési információ birtokában lehet tovább vizsgálni, elemezni.

5.3 A BRCA mutáció státusz előrejelzése a BRCAPRO algoritmussal

Az utóbbi években különböző matematikai modellek láttak napvilágot, melyek előrejelzik a vizsgált beteg BRCA génmutáció hordozásának valószínűségét, illetve a mutációhoz társuló rosszindulatú daganatok kialakulásának rizikóját.

A létező modellek közül a Claus-féle [41] vagy a Parmigiani-féle [116], családfaelemzésre épít, míg a Gail-féle [117] modell vagy a Tyrer-Cuzick modell [118] egyes – az emlőrák rizikója szempontjából fontos – klinikai paramétereket is értékeli, például a diagnózist megelőző bármiféle, az emlőn végzett beavatkozás, rassz, etnikum, testtömeg index, menopauza ténye, vagy az emlőállomány denzitása.

A modelleknek két fő típusa létezik: az empirikus megközelítésen alapulók (statisztikai eredményeken alapul, genotípus = fenotípus); illetve a mendeli törvényeken alapulók, melyek nemcsak a mutáció jelenlétét, hanem annak kifejeződését (penetrancia) is figyelembe veszik (genotípus \neq fenotípus).

A BRCAPRO (CancerGene, BayesMendel, Dallas, TX, USA) egy olyan statisztikai modell és szoftver, mely a vizsgált egyén (egészséges vagy beteg) BRCA1/2 mutáció hordozási valószínűségének elemzését végzi, valamint meghatározza, mi a valószínűsége emlő- illetve petefészekrák kialakulásának a vizsgált beteg további életében (5 éves periódusokra bontva) [116] (27. ábra).

A program a mutáció hordozás valószínűségének meghatározásában a Bayes-szabályt (feltételes valószínűség szabálya) használja fel, az ismert családi anamnézis és a szisztematikusan frissített korfüggő penetrancia- és prevalencia értékek alapján. Ez utóbbiak az átlag népeiségre és az askenázi zsidó populációra külön-külön vonatkozó értékek, miután ez utóbbi populációban a BRCA mutációk előfordulása jóval gyakoribb (átlag populáció: 1 mutáció hordozó/800 fő, askenázi zsidó populáció: 1 mutáció hordozó/40-50 fő) [48].

A szoftver a vizsgált egyén („proband”) családfaelemzését végzi, a családtagok daganatos anamnézisének értékelésével (különös tekintettel a családban előforduló emlő- és petefészekrák esetekre), valamint figyelembe veszi az elsődleges daganatok immunhisztokémiai jellemzőit is, értékelve az ösztrogén receptor (ER), progeszteron receptor (PgR), cytokeratin 14 (CK14) és cytokeratin 5/6 (CK5/6) expresszióját (A

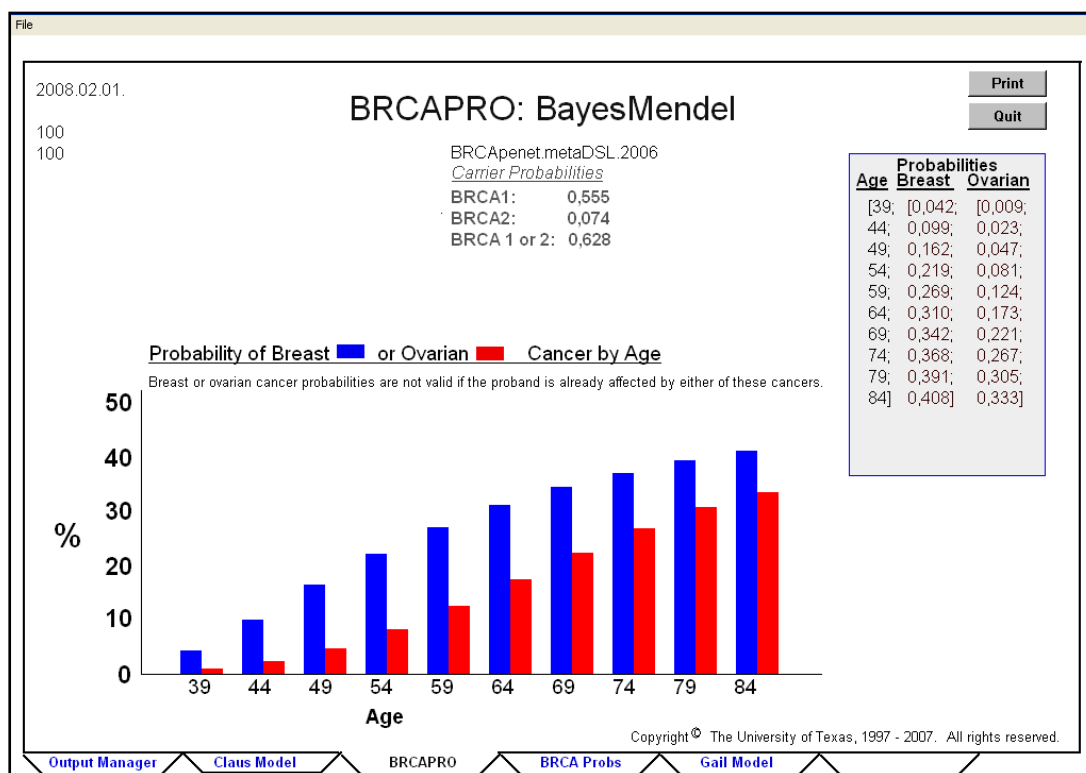
Her2/neu státusz értékelése nem szerepel a programban, mert a mutáció hordozás valószínűségének szempontjából az ER státusz ismeretében nem szolgál többlet prediktív értékkel.) [119].

A „proband” esetében elsődleges kérdés, hogy volt-e emlőrákja, és ha igen, hány éves korában, a vizsgált személy jelenleg hány éves, illetve ha már nem él, halála bekövetkeztekor hány éves volt? A negatív daganatos anamnézisű családtagok adatai is értékes információt jelentenek, az ő esetükben is ismerni kell életkorukat a vizsgálat időpontjában, illetve amennyiben már nem élnek, hány évesen haltak meg?

Paul A. James és munkatársai hat matematikai módszer (Frank, Couch, BRCAPRO, Adelaide, FHAT, Manchester score) genetikai teszt eredményéhez viszonyított specificitását és szenzitivitását határozta meg [120]. A BRCAPRO bizonyult a leghatékonyabbnak: érzékenysége 88%, specificitása 61% volt a BRCA1, míg 71% illetve 61% a BRCA2 gén mutációját tekintve.

A BRCAPRO hátránya, hogy egészséges családdal vagy kisszámú daganatos beteg vérrokonnal bíró nő rizikóját alulértékeli, míg a daganatos betegségek szempontjából terhelt családoknál a „proband” esetében túlbecsüli a várható emlőrák kockázatát, hiszen nem veszi figyelembe más, az emlőrák kialakulásával kapcsolatba hozható gének szerepét [121].

Ha a beteg BRCAPRO által értékelt, BRCA mutáció státuszra vonatkozó hordozási valószínűsége eléri a 10%-ot, genetikai vizsgálat indokolt.



27. ábra: A BRCAPRO szoftver panele: a BRCA1 és BRCA2 csírasejtes mutációinak hordozási valószínűsége ill. emlő- vagy petefészekrák kialakulásának valószínűsége 5 évenkénti bontásban

Az általunk vizsgált esetek közül a három pozitív genetikai teszttel bíró beteg esetében az algoritmus a BRCA mutáció hordozási valószínűségét a 10%-os határérték felett jelezte. Huszonhét fiatal nőnél nem történt azonban genetikai teszt, így vizsgálatunk legnagyobb tanulsága az, hogy betegeink esetében az ajánlásokkal ellentétben, nem minden 35 éves vagy fiatalabb nőnél végeztek BRCA genetikai tesztet. Egy másik tanulmányunkban a Semmelweis Egyetem Radiológiai és Onkoterápiás Klinikáján kezelt 35 évesnél fiatalabb emlőrákos betegeket vizsgálva is feltűnő volt, hogy az 51 beteg közül csupán ötnél történt BRCA genetikai vizsgálat (2 esetben BRCA1, 1 esetben BRCA2 mutáció igazolódott) [122]. Megfontolandó tehát, hogy fiatalkori emlőrák esetek core biopsziás/cytológiai/műtéti preparátumainak patológiai feldolgozása után a hiszto/cytopatológiai lelet vélemény részében a patológus javasolja a BRCA genetikai teszt elvégzését.

5.4 *BRCA* mutáció asszociált és claudin-low emlőrák: közös leszármazottak?

Az emlőrák claudin-low molekuláris szubtypusának leírására 2007-ben került sor, e csoportot a claudin 3, 4 és 7 TJ fehérjék valamint az E-cadherin calcium-dependens sejtadhéziós protein alacsony expressziója jellemzi [123].

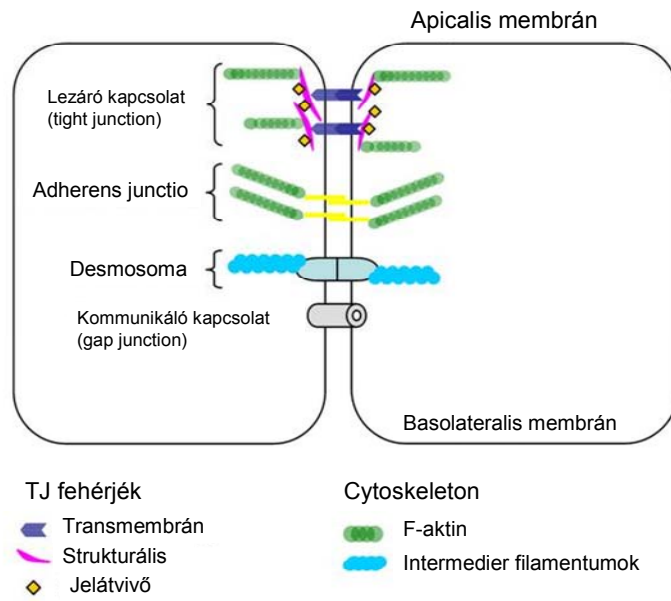
2010-ben Prat és munkatársai [100] részletesen vizsgálták a claudin-low tumorok 1.) molekuláris jellemzőit, 2.) klinikai és hisztopatológiai jellegzetességeit 3.) előfordulását az ismert emlőrák sejtvonalakban és egér modellekben, valamint 4.) differenciációs státuszát. A vizsgált 337 mintából 32 beteg tumora tartozott a claudin-low szubtypusba. Cluster analízis alapján a claudin-low tumorok a bazális szubtypusúak közvetlen közelébe rendeződtek. E tumorok nem mutattak következetes bazális CK (CK 5, 14, 17) expressziót, a HER2 valamint a luminalis markerek (CK 18, 19, ER, PgR, GATA3) expressziója kifejezetten alacsony volt. Bár a claudin-low csoport a bazális tumorokhoz sok tekintetben hasonló génexpressziós jellegzetességeket mutatott, nem volt jellemző erre a szubtypusra a bazális emlőrákoknál egyébként karakterisztikus proliferációs gének kifejezett expressziója. Jellemzően magasabb volt azonban az immunválaszhoz kötődő, a sejt-kommunikációban szereplő, az extracelluláris mátrix és sejt-differenciáció, sejt migráció és angiogenezis génjeinek expressziója. Szignifikánsan alacsony expressziót mutattak a sejtadhézióban szereplő claudin 3, 4, 7, occludin és E-cadherin gének, immunhisztokémiai vizsgálattal is alacsony vagy hiányzó expressziót mutatott fehérjetermékük. Ezen jellegzetességek alapján e tumorokra az epithelialis-mesenchymalis transitio (EMT) jellemző. A claudin-low szubtypusú tumorok további jellegzetessége differenciációs státuszuk: jellemzően $CD44^+/CD24^{-low}$ és $CD49f^+$ (integrin α_6)/EpCAM $^{-low}$ (epithelialis differenciációs markerek) expressziós mintázatot mutatnak, amely Tumor Initiating Cell (TIC) [124] és emlő őssejtek (MaSCs)[55] expressziós mintázatának felel meg. A 4 eredetileg azonosított fő szubtypussal (LumA, LumB, HER2+, basalis) összehasonlítva a claudin-low tumorok mutatták a legmagasabb ALDH1A1 mRNS expressziót, mely szintén őssejt fenotípusra jellemző [125].

A vizsgált minták összességében 7-14%-a volt claudin-low szubtypusú, ezen daganatok 61-71%-a tripla negatívnak (ER-,PgR-, Her2-) bizonyult. Szövet-tani jellegzetességeik alapján e tumorok 24%-a mutatott medulláris carcinoma-szerű megjelenést (expanzív

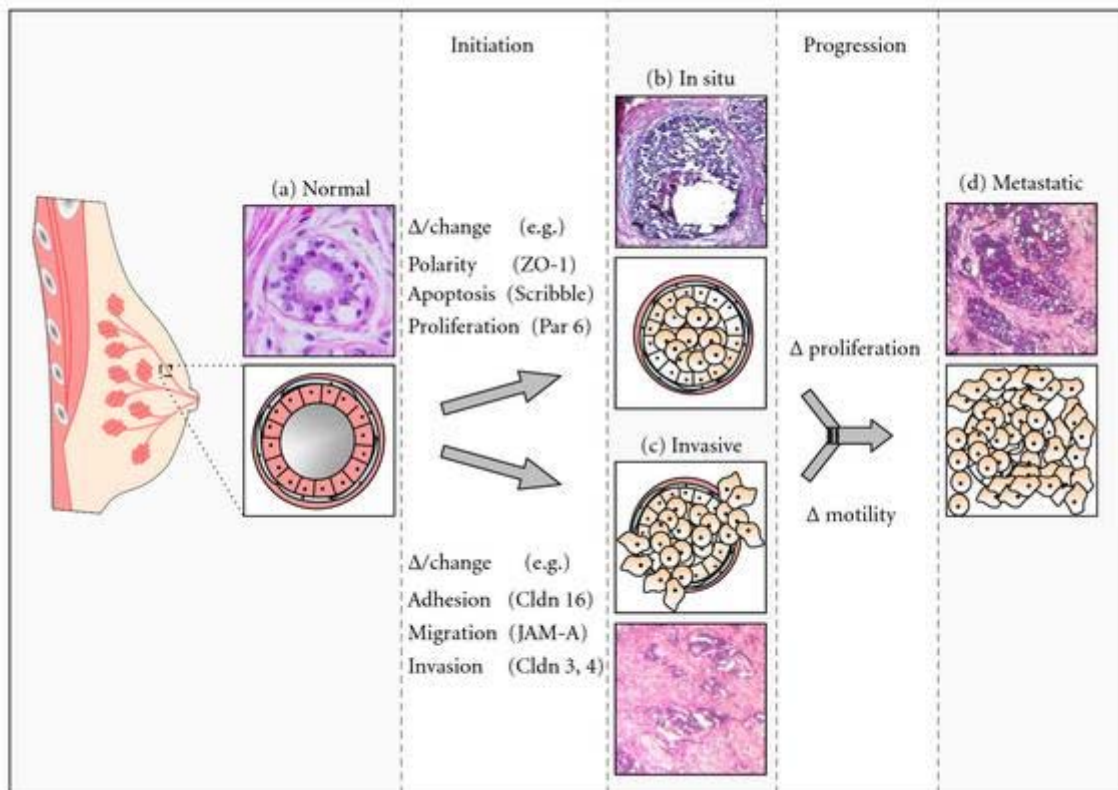
növekedés, tumort infiltráló lymphocyták jelenléte), 10%-uk metaplasztikus emlőráknak, 57%-uk invazív ductalis carcinoma -nem speciális típusnak (IDC NOS) bizonyult. Kaplan-Meier analízissel azoknak a betegeknek volt a legrosszabb prognózisa, akiknek claudin-low szubtypusú daganata volt. A neoadjuvánsan anthracyclin/taxán alapú kemoterápiával kezelt betegek között a claudin-low esetekben alacsonyabb volt a pCR (patológiai komplett válasz) a bazális tumorokhoz viszonyítva (39% vs 73%), azonban ez az arány magasabb volt, mint Luminalis A vagy B tumoroknál. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a claudin-low tumorok, bár némiképp reagálnak a kemoterápiára, összességében rossz prognózisúak és hatékonyan a jelenleg alkalmazott kemoterápiás szerekkel nem kezelhetők.

A szövettani megjelenésében medulláris carcinoma-szerű és metaplasztikus carcinomákban (melyek a claudin-low tumorok esetében is dominálnak) a BRCA1 gén gyakran metilált, a BRCA1 mutációt hordozó nők emlőtumora az esetek 50%-ban medulláris jellegű [126, 127]. Felmerül tehát, hogy a BRCA1 deficienciának szerepe lehet a claudin-low tumorok kialakulásában is.

Tight junction (TJ) fehérjék, claudinok szerepe az emlőrák kialakulásában, progressziójában A sejtek közötti kapcsolatokért felelős struktúrák 3 nagy csoportját különítjük el: a kommunikáló kapcsolatokat (gap junction), a horgonyzó kapcsolatokat (desmosoma, adherens junctio) és a lezáró kapcsolatokat (tight junction) (28. ábra). Ez utóbbi csoport integráns fehérjéi közé tartoznak a claudinok. A claudin család első tagjait 1998-ban írták le. Normál emlőszövetben a claudin 1, 2, 3, 4 és 7 fordul elő. Mai ismereteink szerint a TJ fehérjék változásai legalább kétféleképp hathatnak az invazív emlőrák kialakulásában: csökkenthetik az apoptózist és fokozhatják a sejtproliferációt, kontrollálatlan sejtburjánzást eredményezve. Továbbá csökkentik a sejtadhéziót és fokozhatják a sejtek motilitását elősegítve ezzel a sejtek migrációját az invázió során. Metasztatikus fázisban mind a sejtek proliferációja, mind motilitása fokozódhat [128] (29. ábra).



28. ábra: Sejt-sejt adhéziós komplexek hámsejtekben [128].



29. ábra: Tight junction (TJ) fehérjék lehetséges szerepei az emlőrák kialakulásában,

progressziójában: Az emlőrák a TDLU-k luminális epithelialis sejtjeiből indul ki (a). A TJ fehérjék változásai legalább kétféleképp hathatnak a tumor kialakulásában: csökkenthetik az apoptózist és fokozhatják a sejtproliferációt, kontrollálatlan sejt szaporodást eredményezve (b). Csökkenhet továbbá a sejtadhézió és fokozódhat a sejtek motilitása, elősegítve ezzel a sejtek migrációját az invázió során (c). Metasztatikus fázisban mind a sejtek proliferációja, mind motilitása fokozódhat (d) [128].

In silico vizsgálat. Tanulmányunkban a claudinok és összejtmarkerek expresszióját vizsgáltuk BRCA gén csírasejtes mutációját hordozó emlőrákos (BRCAmut) betegcsoportok elérhető adatait tanulmányozva. Az elérhető, publikus BRCAmut adatokban és párosított kontroll csoportban azonosítottuk a Top 100 - legjobban működő - géneket (BRCA100), amelyek elkülönítik a BRCAmut és BRCAwt emlőrák mintákat [93-95]. Ezen gének expressziója és a mutáció státusz kifejezett korrelációt mutat ($AUC \geq 0.9$ a top 3 gén esetében), ami a mutációnak a génexpressziós profilt érintő kifejezett transzkripciós hatására utal. A génexpressziós profil tehát tükrözheti a mutáció státuszt, mint ahogy ezt a “Basal BRCA1 signature” és a “LumB BRCA2 signature” [129] is mutatja. Az általunk megfigyelt és a korábban közölt mintázatokban nem fordultak elő ugyanazon gének, kivéve a FTSJ2 gént, amely szerepel a LumB BRCA2 és az általunk megállapított BRCA100 signature esetében egyaránt. A claudinok 0.685 és 0.785 közötti AUC-t mutattak, ami arra utal, hogy a BRCA mutáns tumorok speciális claudin expresziós profillal bírnak.

BRCAmut tumorokban, BRCAwt daganatokhoz képest, mRNS szinten a claudinok magasabb expressziójának tendenciája volt megfigyelhető. Az ESR1, ERBB2 alacsonyabb, míg EGFR, TP53, VIM és MKI67 magasabb expressziójának tendenciáját láttuk, bár tanulmányunk hátránya a kis esetszám.

A PAM50 prediktor az eredetileg megállapított immunhisztokémiai fenotípushoz képest reklaszifikált a 13 BRCAmut tumor közül 4-et (négy basal-like szubtypusút a Luminalis B intrinsic szubtypusba sorolt) és kettőt a 7 BRCAwt tumorból (egy basal-like szubtypusút a Her2-E és egy Luminalis szubtypusút a basal-like szubtypusba). Ez az összességében 33%-os (6/20) eltérés - miszerint ER negatív esetek végül Luminalis vagy Her2-E szubtypusúaknak megfelelően viselkedhetnek, míg egyes ER pozitív esetek bazális jellegzetességeket mutathatnak - más szerzők által is leírásra került [130].

Az ún. „9-Cell Line Claudin-low Predictor” ismert génjei a publikus adatbázisból származó 34 esetben fellelhetőek voltak [100]: miután a predictor Agilent, míg az ismert BRCA státuszú emlőrák esetek, általunk a publikus adatbázisokból letöltött génexpressziós profilja Affymetrix platformból származott, így a platform különbségek miatt csupán 161/437 pozitív és 354/370 negatív predictor gén expresszióját tudtuk értékelni. A pozitív predictor gének magasabb expressziójának tendenciája volt megfigyelhető a BRCAwt tumorokban a BRCAmut tumorokhoz képest, míg a negatív predictor gének expressziója a BRCAwt tumorokban bizonyult alacsonyabbnak, így arra következtettünk, hogy génexpressziós profiljuk alapján a BRCAmut tumorok nem tartoznak a claudin-low szubtípusú tumorok közé, illetve összehasonlítva a BRCAwt tumorokkal nem alkotnak homogén csoportot sem a pozitív, sem a negatív prediktor gének expressziója alapján. A vizsgálatot limitálja azonban, hogy egyelőre nincs claudin-low tumorokra vonatkozó, mindenki számára hozzáférhető Affymetrix U133 vagy U133plus2 platform alapú adatbázis, megnehezítve a nagy esetszámú összehasonlító tanulmányok és a bioinformatikai elemzésre alkalmas training set kialakítását.

Immunhisztokémiai vizsgálatba bevont betegek. A FFPE mintával bíró BRCAmut betegcsoportunkban (22 beteg) 1 Her2 pozitív tumor szerepelt a BRCA2 mutációt hordozó esetek között, az összes többi BRCA2 mutáns eset Luminális szubtípusú volt, míg a BRCA1mut tumorok többsége TNBC volt immunhisztokémiai sajátosságai alapján.

Claudin-1, -3 és -7 expressziója alig volt megfigyelhető az általunk immunhisztokémiailag vizsgált BRCAmut tumor mintákban, míg claudin-4 expressziót 22-ből 10 tumor, és E-cadherin expressziót 22-ből 15 eset mutatott. Nem volt szignifikáns különbség e markerek expressziójában BRCA1 és BRCA2 mutáns tumorok között. Ez a megfigyelésünk alátámasztja, hogy a BRCAmut tumorok disztinktív profilt mutatnak a sejtdhéziós molekulák tekintetében, amit a magasabb E-cadherin és claudin-4 expresszió jellemez, így nem felelnek meg a claudin-low szubtípus expressziós profiljának. A claudin-4 gén a promoter régiójában ZEB kötődési hellyel bír, így a BRCAmut tumorok feltehetően más mechanizmussal bírhatnak a claudinok down-regulálásában, mint az epithelialis mesenchymalis transitio [131].

A tight junction molekulák pl. claudinok csökkent expresszióját számos emlőrákkal foglalkozó tanulmány leírta [132-134], azonban a claudin-1 fokozott expresszióját is megfigyelték basal-like tumorokban [135], különösen idősebb betegek esetében [136]. A claudin-3 és-4 expressziója kifejezettebb high grade és ER negatív tumorok eseteiben, különösen basal-like emlőrákokban [135, 137]. A Claudin-4 és E-cadherin fokozott expressziója a betegség kedvezőtlenebb prognózisára utal [138, 139].

A BRCAmut tumormintáink többsége nem expresszálta a CD24-et, míg kifejezett CD44 expressziót mutatott - az EZH2 negativitása vagy alacsony expressziója mellett - az esetek kétharmadában. Eseteink többségében a vimentin alacsony expressziója, vagy hiánya volt megfigyelhető, kifejezett pozitivitása az esetek 31.8%-ában volt látható. EGFR IHC pozitivitást az esetek mintegy egyharmada mutatott. A 21 esetünk közül (1 esetben az immunhisztokémiai reakció nem volt biztonsággal értékelhető), p53 onkoprotein expressziót az esetek 76.2%-ában láttunk (16/21), ami alátámasztja, hogy a p53 a „BRCA-ság” fontos tényezője BRCAmut és Basal-like emlőrákokban [140].

A vad típusú esetekkel összehasonlítva a BRCAmut esetek gyakrabban mutattak p53 mutációt, magasabb EGFR1 és EGFR2 expressziót azonban a hormon receptor expressziójuk alacsonyabb volt. A CD24/CD44 a BRCAmut tumorokban inkább az össejt fenotípusra utalt, amit a magasabb vimentin és EZH2 expressziójuk is alátámasztott.

Vizsgálataink alapján az apától örökölt BRCA mutációkhoz kapcsolódó tumorok esetében mind az ER, mind a PgR expressziója alacsonyabb volt, mint az anyától örökölt mutációhoz kapcsolódó tumorok eseteiben – ennek magyarázata lehet, hogy az apai ágon öröklött BRCA mutációk között gyakoribb volt a BRCA1 mutáció (11/14, 78.5%), mint az anyától örökölt mutációt mutató esetekben (4/7, 57.1%).

A legkifejezettebb pozitív korreláció a CD24 és CD44, valamint valamennyi claudin és az E-cadherin expressziója között mutatkozott. A claudin-4 expressziója pozitívan korrelált az E-cadherin, EZH2 és az EGFR expresszióval, míg negatívan a az ER expresszióval. E-cadherin negatív korrelációja volt megfigyelhető vimentinnel, EGFR-rel és ER-rel.

Az mRNS-szintű (publikus adatbázisokból származó adatok) és fehérje-szintű (immunhisztokémiai elemzéseink) expressziós adatok között eltérések mutatkoztak melyeket magyarázhat: (i) az esetszámok alacsonyak voltak mind az in silico mind az

immunhisztokémiai vizsgálatokban- annak ellenére, hogy minden publikusan elérhető BRCA vad és mutáns eset génextpressziós adatait, valamint intézetünk és intézményünk archivumaiban fellelt valamennyi BRCAmut és BRCAwt esetet alkalmaztunk. (ii) A FFPE mintával bíró csoportot nem tudtuk életkor és hormon receptor státusz/szubsztípus szerint az *in silico* csoporthoz rendelni (iii) epigenetikus szabályozó mechanizmusok módosíthatják az általunk vizsgált fehérjék translatios folyamatát.

5.5 A terhességi emlőrák (PABC) klinikopatológiája és kimenetele

Ami a terhességi emlőrák kimenetelét illeti, a rendelkezésre álló adatok ellentmondásosak: egyes szerzők szerint a terhességi és a hasonló korú nők nem terhességi emlőrájának kimenetelében nincs különbség [76, 78, 141], míg mások szerint a PABC rosszabb prognózisú [63, 69-71]. Azim és munkatársai 30 tanulmányt vizsgáló meta-analízisükben azt találták, hogy a terhességi emlőrák prognózisa rossz, különösen, ha a szülést követően (1 éven belül) alakul ki [142]. Saját vizsgálataink is a PABC rosszabb prognózisát támasztják alá, a terhességi emlőrákos eseteink között szignifikánsan gyakoribb volt a betegség szisztémás kiújulása és ezek a fiatal nők nagyobb arányban haltak meg betegségük következtében. A terhes emlőrákos betegek és a posztpartum betegek betegségmentes túlélése egyaránt rosszabb volt a kontroll betegeknél, illetve a posztpartum emlőrákos nők teljes túlélése is alulmúlta a kontroll betegekéét.

Egyes tanulmányok szerint a PABC kedvezőtlenebb kimenetele abból ered, hogy a diagnózis ezeknél a betegeknél késik, ami előrehaladottabb kezdeti betegség stádiumot eredményez.[64, 143] Mi nem találtuk úgy, hogy a sebészi és onkológiai kezelés később volna a PABC-s betegek esetében a kontrollokéhoz viszonyítva, igaz ugyan, hogy azt egyik csoport esetében sem tudtuk vizsgálni, mennyi idő telt el az első tünetek jelentkezése és a definitív emlőrák diagnózis ideje között. A betegség diagnóziskor észlelt stádiuma (méret, T, N) nem volt szignifikánsan eltérő a két csoport esetében, a kezelési gyakorlat (sebészi kezelés, neoadjuvánsan kezelték aránya és az alkalmazott kemoterápiás szerek) tekintetében sem mutatkozott jelentős eltérés, az endokrin kezelést kivéve, ami gyakoribb volt a kontroll csoportban.

A Nottingham Prognosztikus Index egy olyan folyamatos változó, amely az emlőrák több prognosztikai faktorát is magában foglalja (grádus, tumor méret, metasztatikus nyirokcsomók száma) [144, 145]. Bár a betegek két csoportja között nem volt szignifikáns eltérés, amikor a grádust, tumorméretet, T és N stádiumot külön vizsgáltuk, a NPI (mely ezeket a faktorokat kombinálja) medián értéke a két csoportban jelentős különbséget mutatott: a PABC csoport a rossz prognózisú csoportba, míg a kontroll betegek a közepes prognózisú csoportba kerültek. Ez az adat a tumor jelentősen agresszívebb viselkedésére utal a terhességi emlőrákos csoportban, melyre a klasszikus hisztopatológiai faktorok csupán individuális értékelése nem enged következtetni.

A PgR expresszióbeli különbségek is szignifikánsak voltak a két csoport között, a terhességi emlőrákos esetek jórészt PgR negativitást mutattak. Bár több volt az ER + PgR- Luminalis B tumor a PABC esetek között, ez a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns. A terhességi emlőrákos és a kontroll betegek közötti jelentős PgR expresszióbeli különbséget az magyarázza, hogy a PABC esetek közt jóval több volt a TN tumor, mint a kontroll csoportban (a Her2 expresszióbeli különbség nem volt számottevő).

A Ki67 proliferációs index minden PABC esetben 15% feletti volt, ez megjelent az IHC szubtípus értékelésnél is: nem volt Luminalis A tumor a terhességi emlőrákos csoportban. A PABC esetek 48.4% TN és 32,3%-a LumB prol szubtípusú volt, ez a két IHC-alapú alcsoport lefedte a PABC esetek több, mint 80%-át, míg ugyanez a két szubtípus a kontroll esetek 48%-ában fordult elő. Az általunk megfigyelt gyakori TN szubtípus a terhességi emlőrákos nők között más szerzők által is leírásra került már [80].

Az IHC-alapú szubtípus tükrében elemezve a túlélési adatokat, a legkedvezőtlenebb prognózist a LumB prol és TN fenotípusú esetek mutatták, különösen a posztpartum esetek között. Ez a megfigyelés kiemeli a Ki67 proliferációs index elemzésének fontosságát az ER+ Her2- esetek körében, hiszen így detektálhatóak a LumB prol fenotípusú esetek, melyek várható prognózisa rosszabb, így agresszívebb onkológiai kezelést igényelnek.

Az in situ ductalis carcinoma komponens jelenléte a betegség lokális kontrollja szempontjából kiemelkedően fontos. A lokális kiújulás valószínűsége nagyobb, ha az in situ ductalis carcinoma magas mag grádusú, ha comedo nekrozissal társul, ha extenzív

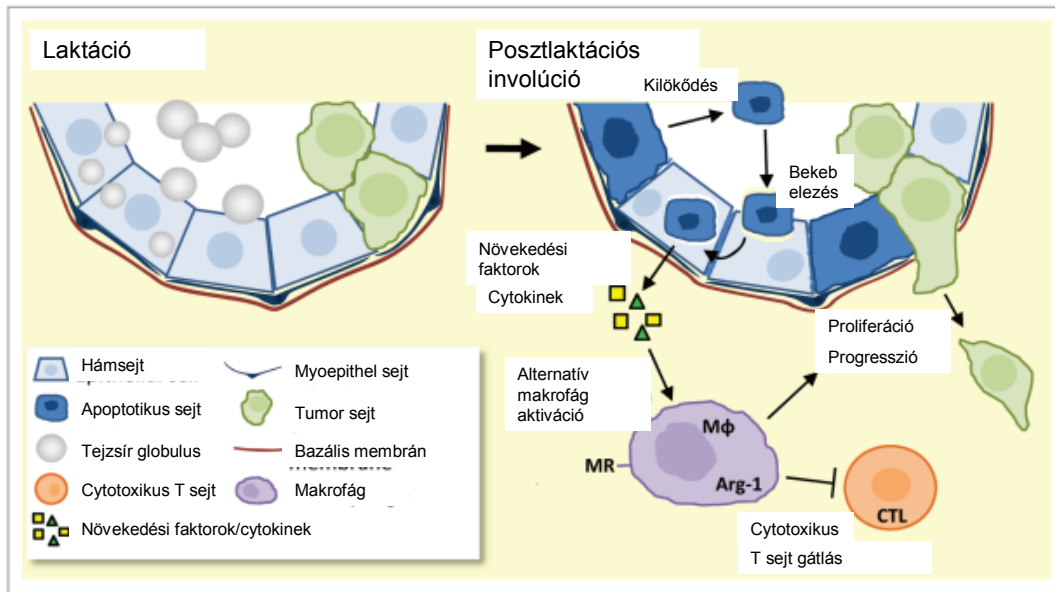
kiterjedésű, ha a sebési széleket involválja, illetve ha a beteg fiatal [146-148]. Ezek a tényezők, azonban nem függetlenek egymástól, mert fiatal (≤ 45 év) betegeknél gyakoribb a magas mag grádusú, comedo nekrozissal társuló DCIS, melynek kiterjedése is nagyobb általában, mint az idősebb nők eseteiben előforduló in situ ductalis carcinoma mérete (71,73).

Vizsgálatainkban a PABC esetekben gyakrabban találtunk magas mag grádusú, comedo nekrozissal társult extenzív DCIS-t, mint a kontroll esetekben, azonban a két csoport között nem volt számottevő különbség a betegség lokális kiújulásának tekintetében. Ez a megfigyelés egyrészt e betegség kedvezőtlenebb biológiai sajátosságait tükrözi, mert egyre több molekuláris szintű adat utal arra, hogy a magas mag grádusú DCIS a magas grádusú invazív ductalis carcinomáéhoz hasonló számos, komplex genetikai eltérést mutat, melyek jelentősen eltérnek az alacsony grádusú DCIS-ben és IDC-ben látottakétól [149, 150]. Másrészt a társult DCIS komponens extenzív volta utalhat a terhesség, illetve a posztpartum állapot által létrehozott megváltozott szöveti környezet tumor növekedést favorizáló szerepére is.

A terhességi emlőrák és a nem terhességi emlőrák eltérő kimenetelét a tumorbiológiai különbségek mellett magyarázhatja a terhesség miatti relatív immunszuprimált állapot, a megváltozott hormonális környezet (a méhlepény és foetus, mint új endokrin „szervek”, a terhesség következtében magasabb ösztrogén, progeszteron és növekedési hormon szint, a magasabb prolaktin szint a laktáció idején). A terhesség következtében megváltozott tumor mikrokörnyezet (az emlő növekedési faktorok iránti fokozott érzékenysége), a posztpartum remodeling-amely során a posztlaktációs involúció okozta extracelluláris mátrix átalakulás a sebgyógyuláshoz hasonló környezetet teremt [151]-olyan ismert tényezők, amelyek a tumornövekedést és áttétképzést serkentik. O'Brien és munkatársai kimutatták a posztlaktációs involúcióhoz társuló, aktivált M2-típusú makrofágok szerepét, amelyek a tumor-asszociált makrofágokhoz (TAM) hasonló tulajdonságokat mutattak, mely utóbbiak növekedési faktorok termelésén keresztül serkentik a daganatok burjánzását. Éretlen makrofágok a citotoxikus T-sejtek blokkolásával hozzájárulhatnak az immunszuprimált mikrokörnyezet kialakításához [152, 153]. A Fornetti és munkatársai által kidolgozott modell bemutatja, hogyan válnak a posztlaktációs hámsejtek fagocitáló sejtekké és kebelezik be az apoptotikus (korábban tejtermelő) sejteket az involúció során, miközben ők maguk citokineket és növekedési

faktorokat termelnek (30. ábra), elősegítve ezzel a tumornövekedést elősegítő mikrokörnyezet kialakulását [154].

Ez utóbbi terület azonban egyelőre csak kevésbé vizsgált, pedig a tumor mikrokörnyezet célzott kezelése esetleg hozzájárulhatna a terhességi emlőrák prognózisának javításához.



30. ábra: A posztlaktációs hámsejtek szerepe a tumornövekedést és progressziót elősegítő mikrokörnyezet kialakításában [151]

6. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A nagyon fiatal (35 év alatti) nőket érintő emlőrák prognózisa rossz (a betegek 23,36%-a hunyt el betegségé következtében).
2. A fiatal nők között előforduló emlőrák biológiája kedvezőtlen (gyakori TNBC és LumB szubtípus).
3. A fiatal emlőrákos nők családjában gyakrabban fordul elő emlő- és petefészekrák.
4. A pozitív családi anamnézisű fiatal nőbetegek emlőrákja gyakran TNBC immunfenotípusú.
5. A BRCA mutáció státusz előrejelzésére a részletes családi anamnézist és az emlőrák immunfenotípusának ismeretét igénylő matematikai algoritmus (pl. BRCAPRO) alkalmazható.
6. Az általunk vizsgált magyarországi betegcsoportban az ajánlásokkal ellentétben, nem minden 35 évnél fiatalabb emlőrákos beteg esetében került sor BRCA mutáció irányú genetikai vizsgálatra.
7. A BRCA mutációnak a génexpressziós profilt érintő kifejezett transzkripciós hatása van (TOP 100 gén expressziós profilja alapján a BRCAmut és vad típusú daganatok elkülöníthetőek).
8. A BRCA mutáns tumorok speciális claudin expressziós profillal bírnak.
9. A BRCA mutáns tumorokra nem jellemző a claudin-low fenotípus.
10. Ugyanazon tumor esetében a PAM50 single sample predictor által megállapított szubtípus eltérő lehet az IHC-alapú szubtípustól.
11. A terhességi emlőrák prognózisa kedvezőtlenebb, mint a terhességtől függetlenül kialakuló fiatalkori emlőrák eseteké, különösen, ha a posztpartum periódusban manifesztálódik.
12. A terhességi emlőrák biológiája kedvezőtlen (gyakori a TNBC és LumBprol immunfenotípus).
13. Terhességi emlőrákban gyakrabban fordul elő az invazív tumorhoz asszociált extenzív, magas mag grade-ű comedo necrosissal is társuló DCIS.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Bár az emlőrák a posztmenopauzális nők betegsége elsősorban, a betegek mintegy 5,5%-a 40 évesnél, 2%-a 35 évesnél fiatalabb a diagnózis idején. Ezekben a korcsoportokban ez a leggyakoribb daganatos halálozási ok. Fiatal nők emlőrákjának esetében mindig felmerül az öröklött prediszpozíció lehetősége, az esetek 5%-ában a tumor kialakulásában kimutatható autoszomális domináns módon öröklődő magas penetranciájú gének (leggyakrabban a BRCA1/2) szerepe. A fiatal nők emlőrákja az esetek 10%-ában a terhességhez köthető.

A nagyon fiatal (≤ 35 év) emlőrákos nők korcsoportját 4 idősebb korcsoporttal klinikopatológiai és prognosztikai szempontból összehasonlító vizsgálatunk alapján a nagyon fiatal nőket érintő emlőrák biológiája kedvezőtlen - e betegek emlőrákjának szubtypus meghatározásánál gyakori volt a Luminalis B és tripla negatív fenotípus. A betegség prognózisa az idősebb emlőrákos nők betegségének várható kimenetelével összehasonlítva rossz. Vizsgálatunk továbbá kiemelte a családi anamnézis ismeretének jelentőségét is.

Speciális algoritmusokkal (pl. BRCAPRO) a családi anamnézis és a vizsgált beteg emlőtumorának immunfenotípusa ismeretében a BRCA 1/2 mutáció státusz előre jelezhető.

A nagyon fiatal és idősebb nők emlőtumor mintáit összehasonlító morfológiai vizsgálatunkban a fiatalok emlőtumor mintái gyakrabban mutattak intratumorális heterogenitást.

In silico betegcsoport publikus emlőrák adatainak és génexpressziós profiljának elemzése, valamint ismert BRCA mutációt hordozó és kontroll emlőrákos nőbetegek FFPE emlőtumor mintáinak immunhisztokémiai vizsgálata alapján a BRCA1/2 mutációt hordozó esetek nem mutatják a claudin-low immunfenotípust.

A terhességi emlőrák jellemzőit vizsgáló párosított esetkontroll tanulmányunkban a PABC rosszabb prognózisú betegségnek bizonyult, mint a nem terhességi emlőrák, kedvezőtlen biológiáját tükrözte a gyakori TNBC és LumB proliferáló immunfenotípus, a társuló extenzív, magas mag grádusú, comedo nekrozist is mutató DCIS komponens. Az NPI jelezte a terhességi emlőrák várhatóan kedvezőtlen kimenetelét.

8. SUMMARY

Breast cancer is a disease of postmenopausal women mainly, however in 5,5% of the cases the women affected are younger than 40 years of age and 2% of breast cancer patients are younger than 35 years. It is the most common malignancy related cause of death in these young age groups. Genetic predisposition is always suspected in early-onset breast cancer and about 5% of these cases are indeed related to mutation of high penetrance genes (most commonly BRCA1 or BRCA2) with an autosomal dominant inheritance. Early-onset breast cancer in 10 % of the cases is pregnancy related.

By comparing a cohort of very young women affected by BC to that of 4 older age cohorts of BC patients based on clinicopathological features and prognosis, we have concluded that early-onset breast cancer had unfavourable biology: Luminal B and triple negative subtypes have predominated. Prognosis of very young women affected by breast cancer was worse. We have also concluded the prognostic significance of breast cancer related family history. By using special algorithms, like BRCAPRO, based on detailed, breast cancer related family history and tumor immunohistochemistry, BRCA mutation status can be predicted.

By comparing breast cancer samples of very young women to that of older women based on morphology, we have found more frequent intratumoral heterogeneity in young women's BC samples.

Claudin-low breast cancer characteristics overlap with those of BRCA mutation associated (BRCAmut) tumors; therefore we have investigated whether these are identical subtypes by using public gene expression data sets of BRCAmut and BRCAwt cases, and FFPE tumor samples of a separate cohort of patients with known BRCA mutations, and BRCAwt patients'. We have concluded that BRCAmut tumors don't display the claudin-low phenotype.

On comparison of PABC and non-PABC cases in a paired case control study PABC had a worse prognosis. Unfavourable tumor biology of PABC was demonstrated by frequent triple negative and Luminal B proliferating phenotype and by the associated high grade extensive DCIS, with comedo-type necrosis. Nottingham Prognostic Index assessed PABC as of unfavourable prognosis.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Cardoso F, Loibl S, Pagani O, Graziottin A, Panizza P, Martincich L, Gentilini O, Peccatori F, Fourquet A, Delaloge S, Marotti L, Penault-Llorca Fdr, Kotti-Kitromilidou AM, Rodger A, Harbeck N. (2012) The European Society of Breast Cancer Specialists recommendations for the management of young women with breast cancer. *European Journal of Cancer*, 48: 3355-3377.
2. Tusnady G, Gaudi I, Rejto L, Kasler M, Szentirmay Z. (2008) [Survival chances of Hungarian cancer patients in the National Cancer Registry]. *Magy Onkol*, 52: 339-349.
3. Merrill RM, Capocaccia R, Feuer EJ, Mariotto A. (2000) Cancer prevalence estimates based on tumour registry data in the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Int J Epidemiol*, 29: 197-207.
4. Bland KI, Menck HR, Scott-Conner CE, Morrow M, Winchester DJ, Winchester DP. (1998) The National Cancer Data Base 10-year survey of breast carcinoma treatment at hospitals in the United States. *Cancer*, 83: 1262-1273.
5. Canello G, Maisonneuve P, Mazza M, Montagna E, Rotmensz N, Viale G, Pruneri G, Veronesi P, Luini A, Gentilini O, Goldhirsch A, Colleoni M. (2013) Pathological features and survival outcomes of very young patients with early breast cancer: How much is "very young"? *The Breast*, 22: 1046-1051.
6. Freedman RA, Partridge AH. (2013) Management of breast cancer in very young women. *The Breast*, 22, Supplement 2: S176-S179.
7. Leclere B, Molinié F, Trétarre B, Stracci F, Daubisse-Marliac L, Colonna M. (2013) Trends in incidence of breast cancer among women under 40 in seven European countries: A GRELL cooperative study. *Cancer Epidemiology*, 37: 544-549.
8. Freitas-Junior R, Freitas NMA, Curado MP, Martins E, Silva CMB, Raha RMS, Queiroz GS. (2010) Incidence trend for breast cancer among young women in Goiânia, Brazil. *Sao Paulo Med J*, 128: 81-84.

9. Johnson RH, Chien FL, Bleyer A. (2013) Incidence of breast cancer with distant involvement among women in the United States, 1976 to 2009. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 309: 800-805.
10. Bouchardy C, Fioretta G, Verkooijen HM, Vlastos G, Schaefer P, Delaloye JF, Neyroud-Caspar I, Balmer Majno S, Wespi Y, Forni M, Chappuis P, Sappino AP, Rapiti E. (2007) Recent increase of breast cancer incidence among women under the age of forty. *Br J Cancer*, 96: 1743-1746.
11. Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, Cardoso F. (2013) Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*.
12. Lakhani SR EI, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. WHO Classification of Tumours of the Breast. WHO, 2012.
13. Ehemann CR, Shaw KM, Ryerson AB, Miller JW, Ajani UA, White MC. (2009) The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999-2004. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18: 1763-1769.
14. Trent IJ, 2nd, Benjamin RS, Valero V. (2001) Primary soft tissue sarcoma of the breast. *Current treatment options in oncology*, 2: 169-176.
15. Canello G, Maisonneuve P, Rotmensz N, Viale G, Mastropasqua MG, Pruneri G, Veronesi P, Torrisi R, Montagna E, Luini A, Intra M, Gentilini O, Ghisini R, Goldhirsch A, Colleoni M. (2010) Prognosis and adjuvant treatment effects in selected breast cancer subtypes of very young women (<35 years) with operable breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 21: 1974-1981.
16. Wo JY, Chen K, Neville BA, Lin NU, Puniglia RS. (2011) Effect of very small tumor size on cancer-specific mortality in node-positive breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29: 2619-2627.
17. Packaud RA, Prosnitz LR, Bobrow SN. (1977) Selection of breast cancer patients for adjuvant chemotherapy. Another look at the prognostic importance of involved lymph nodes. *Jama*, 238: 1034-1036.

18. Sinn HP, Helmchen B, Wittekind CH. (2010) [TNM classification of breast cancer: changes and comments on the 7th edition]. *Der Pathologe*, 31: 361-366.
19. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406: 747 - 752.
20. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS. (2009) Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, 27: 1160-1167.
21. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas A, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale AL. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 10869 - 10874.
22. Penzvalto Z, Mihaly Z, Gyorffy B. (2009) [Gene expression based multigene prognostic and predictive tests in breast cancer]. *Magy Onkol*, 53: 351-359.
23. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. (2002) A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *The New England journal of medicine*, 347: 1999-2009.
24. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. (2004) A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *The New England journal of medicine*, 351: 2817-2826.
25. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. (2003) A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature genetics*, 33: 49-54.
26. Chang HY, Nuyten DSA, Sneddon JB, Hastie T, Tibshirani R, Sørlie T, Dai H, He YD, van't Veer LJ, Bartelink H, van de Rijn M, Brown PO, van de Vijver

- MJ. (2005) Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 3738-3743.
27. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, Hallett M, Park M. (2008) Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nature medicine*, 14: 518-527.
 28. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC. (2006) Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 295: 2492 - 2502.
 29. Prat A, Perou CM. (2009) Mammary development meets cancer genomics. *Nat Med*, 15: 842-844.
 30. Winchester DP, Osteen RT, Menck HR. (1996) The National Cancer Data Base report on breast carcinoma characteristics and outcome in relation to age. *Cancer*, 78: 1838-1843.
 31. Albain KS, Allred DC, Clark GM. (1994) Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 35-42.
 32. Fredholm H, Eaker S, Frisell J, Holmberg L, Fredriksson I, Lindman H. (2009) Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. *PLoS One*, 4: doi: 10.1371.
 33. Aebi S, Gelber S, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Collins J, ThÄLrlimann B, Rudenstam CM, Lindtner J, Crivellari D, Cortes-Funes H, Simoncini E, Werner ID, Coates AS, Goldhirsch A. (2000) Is chemotherapy alone adequate for young women with oestrogen-receptor-positive breast cancer? *The Lancet*, 355: 1869-1874.
 34. Colleoni M, Rotmensz N, Peruzzotti G, Maisonneuve P, Orlando L, Ghisini R, Viale G, Pruneri G, Veronesi P, Luini A, Intra M, Cardillo A, Torrìs R, Rocca A, Goldhirsch A. (2006) Role of endocrine responsiveness and adjuvant therapy

- in very young women (below 35 years) with operable breast cancer and node negative disease. *Annals of Oncology*, 17: 1497-1503.
35. Lin CH, Lu YS, Huang CS, Kuo KT, Wang CC, You SL, Lin PH, Chang DY, Kuo WH, Chang KJ, Cheng AL. (2011) Prognostic molecular markers in women aged 35 years or younger with breast cancer: is there a difference from the older patients? *J Clin Pathol*, 64: 781-787.
 36. Azim Jr HA, Azim H. (2013) Breast cancer arising at a young age: Do we need to define a cut-off? *The Breast*, 22: 1007-1008.
 37. Broca P. *Traité des tumeurs*. Asselin-Béchet-Labé, Paris, 1866.
 38. Zugazagoitia J, Pérez-Segura P, Manzano A, Blanco I, Vega A, Custodio A, Teulé A, Fachal L, Martínez B, González-Sarmiento R, Cruz-Hernández JJ, Chirivella I, Garcés V, Garre P, Romero A, Caldés T, Díaz-Rubio E, de la Hoya M. (2014) Limited family structure and triple-negative breast cancer (TNBC) subtype as predictors of BRCA mutations in a genetic counseling cohort of early-onset sporadic breast cancers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 1-7.
 39. Lalloo F, Evans DG. (2012) Familial Breast Cancer. *Clinical Genetics*, 82: 105-114.
 40. Claus EB, Risch N, Thompson WD. (1991) Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am J Hum Genet*, 48: 232-242.
 41. Newman B, Austin MA, Lee M, King MC. (1988) Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *PNAS*, 85: 3044-3048.
 42. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 250: 1684-1689.
 43. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266: 66-71.
 44. Kurian AW. (2010) BRCA1 and BRCA2 mutations across race and ethnicity: distribution and clinical implications. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 22: 72-78.
 45. Roy R, Chun J, Powell SN. (2011) BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer*, 12: 68-78.

46. Chen S, Iversen ES, Friebel T, Finkelstein D, Weber BL, Eisen A, Peterson LE, Schildkraut JM, Isaacs C, Peshkin BN, Corio C, Leondaridis L, Tomlinson G, Dutson D, Kerber R, Amos CI, Strong LC, Berry DA, Euhus DM, Parmigiani G. (2006) Characterization of BRCA1 and BRCA2 mutations in a large United States sample. *J Clin Oncol*, 24: 863-871.
47. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjakoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DF. (2003) Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*, 72: 1117-1130.
48. Carroll JC, Cremin C, Allanson J, Blaine SM, Dorman H, Gibbons CA, Grimshaw J, Honeywell C, Meschino WS, Permaul J, Wilson BJ. (2008) Hereditary breast and ovarian cancers. *Can Fam Physician*, 54: 1691-1692.
49. Thompson D, Easton DF. (2002) Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*, 94: 1358-1365.
50. Hogervorst FB, Nederlof PM, Gille JJ, McElgunn CJ, Grippeling M, Prunel R, Regnerus R, van Welsem T, van Spaendonk R, Menko FH, Kluijt I, Dommering C, Verhoef S, Schouten JP, van't Veer LJ, Pals G. (2003) Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Cancer Res*, 63: 1449-1453.
51. Iau PT MM, Ali A, Sng JH, Macmillan RD, Pinder S, Denley HE, Ellis IO, Wenzycyk P, Scott N, Cross G, Blamey RW. (2004) Are medullary breast cancers an indication for BRCA1 mutation screening? A mutation analysis of 42 cases of medullary breast cancer
Breast Cancer Res Treat, May;85(1): 81-88.
52. Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP, Gusterson BA, Anderson TJ, van de Vijver MJ, Farid LM, Venter D, Antoniou A, Storfer-Isser A, Smyth E, Steel CM, Haites N, Scott RJ, Goldgar D, Neuhausen S, Daly PA, Ormiston W, McManus R, Scherneck S, Ponder BAJ, Ford D, Peto J, Stoppa-Lyonnet D,

- Bignon Y-J, Struewing JP, Spurr NK, Bishop DT, Klijn JGM, Devilee P, Cornelisse CJ, Lasset C, Lenoir G, Barkardottir RB, Egilsson V, Hamann U, Chang-Claude J, Sobol H, Weber B, Stratton MR, Easton DF. (1998) Multifactorial Analysis of Differences Between Sporadic Breast Cancers and Cancers Involving BRCA1 and BRCA2 Mutations. *Journal of the National Cancer Institute*, 90: 1138-1145.
53. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, Penault-Llorca F, van der Vijver M, Parry S, Bishop T, Benitez J, Rivas C, Bignon YJ, Chang-Claude J, Hamann U, Cornelisse CJ, Devilee P, Beckmann MW, Nestle-Kramling C, Daly PA, Haites N, Varley J, Lalloo F, Evans G, Maugard C, Meijers-Heijboer H, Klijn JG, Olah E, Gusterson BA, Pilotti S, Radice P, Scherneck S, Sobol H, Jacquemier J, Wagner T, Peto J, Stratton MR, McGuffog L, Easton DF. (2005) Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res*, 11: 5175-5180.
54. Fillmore C, Kuperwasser C. (2008) Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Research*, 10: R25.
55. Lim E, Vaillant F, Wu D, Forrest NC, Pal B, Hart AH, Asselin-Labat ML, Gyorki DE, Ward T, Partanen A, Feleppa F, Huschtscha LI, Thorne HJ, Fox SB, Yan M, French JD, Brown MA, Smyth GK, Visvader JE, Lindeman GJ. (2009) Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature medicine*, 15: 907.
56. Vargas A, Reis-Filho J, Lakhani S. (2011) Phenotype-Genotype Correlation in Familial Breast Cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16: 27-40.
57. Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, Domchek SM, Eccles D, Nevanlinna H, Ramus SJ, Spurdle A, Robson M, Sherman M, Mulligan AM, Couch FJ, Engel C, McGuffog L, Healey S, Sinilnikova OM, Southey MC, Terry MB, Goldgar D, O'Malley F, John EM, Janavicius R, Tihomirova L, Hansen TVO, Nielsen FC, Osorio A, Stavropoulou A, Benítez J, Manoukian S, Peissel B, Barile M, Volorio S, Pasini B, Dolcetti R, Putignano AL, Ottini L, Radice P, Hamann U, Rashid MU, Hogervorst FB, Kriege M, van der Luijt RB, Peock S,

- Frost D, Evans DG, Brewer C, Walker L, Rogers MT, Side LE, Houghton C, Weaver J, Godwin AK, Schmutzler RK, Wappenschmidt B, Meindl A, Kast K, Arnold N, Niederacher D, Sutter C, Deissler H, Gadzicki D, Preisler-Adams S, Varon-Mateeva R, Schönbuchner I, Gevensleben H, Stoppa-Lyonnet D, Belotti M, Barjhoux L, Isaacs C, Peshkin BN, Caldes T, de la Hoya M, Canadas C, Heikkinen T, Heikkilä Pi, Aittomäki K, Blanco I, Lazaro C, Brunet J, Agnarsson BA, Arason A, Barkardóttir RB, Dumont M, Simard J, Montagna M, Agata S, D'Andrea E, Yan M, Fox S, Rebbeck TR, Rubinstein W, Tung N, Garber JE, Wang X, Fredericksen Z, Pankratz VS, Lindor NM, Szabo C, Offit K, Sakr R, Gaudet MM, Singer CF, Tea M-K, Rappaport C, Mai PL, Greene MH, Sokolenko A, Imyanitov E, Toland AE, Senter L, Sweet K, Thomassen M, Gerdes A-M, Kruse T, Caligo M, Aretini P, Rantala J, von Wachenfeld A, Henriksson K, Steele L, Neuhausen SL, Nussbaum R, Beattie M, Odunsi K, Sucheston L, Gayther SA, Nathanson K, Gross J, Walsh C, Karlan B, Chenevix-Trench G, Easton DF, Antoniou AC. (2011) Pathology of Breast and Ovarian Cancers among BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: Results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 21: 134-147.
58. Group ABCS. (2000) Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. *Anglian Breast Cancer Study Group. Br J Cancer*, 83: 1301-1308.
59. Basham VM, Lipscombe JM, Ward JM, Gayther SA, Ponder BA, Easton DF, Pharoah PD. (2002) BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based study of male breast cancer. *Breast Cancer Res*, 4: R2.
60. Evans DG, Susnerwala I, Dawson J, Woodward E, Maher ER, Lalloo F. (2010) Risk of breast cancer in male BRCA2 carriers. *J Med Genet*, 47: 710-711.
61. Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP, Gusterson BA, Anderson TJ, van de Vijver MJ, Farid LM, Venter D, Antoniou A, Storfer-Isser A, Smyth E, Steel CM, Haites N, Scott RJ, Goldgar D, Neuhausen S, Daly PA, Ormiston W, McManus R, Scherneck S, Ponder BA, Ford D, Peto J, Stoppa-Lyonnet D, Bignon YJ, Struwing JP, Spurr NK, Bishop DT, Klijn JG, Devilee P, Cornelisse CJ, Lasset C, Lenoir G, Barkardóttir RB, Egilsson V, Hamann U,

- Chang-Claude J, Sobol H, Weber B, Stratton MR, Easton DF. (1998) Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Natl Cancer Inst*, 90: 1138-1145.
62. Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, Oldenburg R, Hollestelle A, Houben M, Crepin E, van Veghel-Plandsoen M, Elstrodt F, van Duijn C, Bartels C, Meijers C, Schutte M, McGuffog L, Thompson D, Easton D, Sodha N, Seal S, Barfoot R, Mangion J, Chang-Claude J, Eccles D, Eeles R, Evans DG, Houlston R, Murday V, Narod S, Peretz T, Peto J, Phelan C, Zhang HX, Szabo C, Devilee P, Goldgar D, Futreal PA, Nathanson KL, Weber B, Rahman N, Stratton MR. (2002) Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet*, 31: 55-59.
63. Johansson ALV, Andersson TML, Hsieh C-C, Cnattingius S, Lambe M. (2011) Increased Mortality in Women with Breast Cancer Detected during Pregnancy and Different Periods Postpartum. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 20: 1865-1872.
64. Woo JC, Yu T, Hurd TC. (2003) Breast cancer in pregnancy: A literature review. *Archives of Surgery*, 138: 91-98.
65. Lyons T, Schedin P, Borges V. (2009) Pregnancy and Breast Cancer: when They Collide. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 14: 87-98.
66. Liu Q, Wu J, Lambe M, Hsieh S-F, Ekblom A, Hsieh C-C. (2002) Transient increase in breast cancer risk after giving birth: postpartum period with the highest risk (Sweden). *Cancer Causes & Control*, 13: 299-305.
67. Lambe M, Hsieh C-c, Trichopoulos D, Ekblom A, Pavia M, Adami H-O. (1994) Transient Increase in the Risk of Breast Cancer after Giving Birth. *New England Journal of Medicine*, 331: 5-9.
68. Nugent P, O'Connell TX. (1985) Breast cancer and pregnancy. *Archives of Surgery*, 120: 1221-1224.
69. Ali SA, Gupta S, Sehgal R, Vogel V. (2012) Survival Outcomes in Pregnancy Associated Breast Cancer: A Retrospective Case Control Study. *The Breast Journal*, 18: 139-144.

70. Moreira WB, Brandão EC, Soares AN, Lucena CEMd, Antunes CMF. (2010) Prognosis for patients diagnosed with pregnancy-associated breast cancer: a paired case-control study. *Sao Paulo Medical Journal*, 128: 119-124.
71. Bonnier P, Romain S, Dilhuydy JM, Bonichon F, Julien JP, Charpin C, Lejeune C, Martin PM, Piana L. (1997) Influence of pregnancy on the outcome of breast cancer: A case-control study. *International Journal of Cancer*, 72: 720-727.
72. Azim Jr. HA, Santoro L, Russell-Edu W, Pentheroudakis G, Pavlidis N, Peccatori FA. (2012) Prognosis of pregnancy-associated breast cancer: A meta-analysis of 30 studies. *Cancer Treatment Reviews*, 38: 834-842.
73. Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, Wang Y, Marcom PK, Marks JR, Febbo PG, Nevins JR, Potti A, Blackwell KL. (2008) Young Age at Diagnosis Correlates With Worse Prognosis and Defines a Subset of Breast Cancers With Shared Patterns of Gene Expression. *Journal of Clinical Oncology*, 26: 3324-3330.
74. Middleton LP, Amin M, Gwyn K, Theriault R, Sahin A. (2003) Breast carcinoma in pregnant women. *Cancer*, 98: 1055-1060.
75. Hahn KME, Johnson PH, Gordon N, Kuerer H, Middleton L, Ramirez M, Yang W, Perkins G, Hortobagyi GN, Theriault RL. (2006) Treatment of pregnant breast cancer patients and outcomes of children exposed to chemotherapy in utero. *Cancer*, 107: 1219-1226.
76. Halaska MJ, Pentheroudakis G, Strnad P, Stankusova H, Chod J, Robova H, Petruzelka L, Rob L, Pavlidis N. (2009) Presentation, Management and Outcome of 32 Patients with Pregnancy-Associated Breast Cancer: A Matched Controlled Study. *The Breast Journal*, 15: 461-467.
77. Azim Jr HA, Botteri E, Renne G, Dell'Orto P, Rotmensz N, Gentilini O, Sangalli C, Pruneri G, Di Nubila B, Locatelli M, Sotiriou C, Piccart M, Goldhirsch A, Viale G, Peccatori FA. (2012) The biological features and prognosis of breast cancer diagnosed during pregnancy: A case-control study. *Acta Oncologica*, 51: 653-661.
78. Murphy CG, Mallam D, Stein S, Patil S, Howard J, Sklarin N, Hudis CA, Gemignani ML, Seidman AD. (2012) Current or recent pregnancy is associated

- with adverse pathologic features but not impaired survival in early breast cancer. *Cancer*, 118: 3254-3259.
79. Genin A-S, Lesieur B, Gligorov J, Antoine M, Selleret L, Rouzier R. (2012) Pregnancy-associated breast cancers: Do they differ from other breast cancers in young women? *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 21: 550-555.
 80. Pilewskie M, Gorodinsky P, Fought A, Hansen N, Bethke K, Jeruss J, Scholtens D, Khan S. (2012) Association between Recency of Last Pregnancy and Biologic Subtype of Breast Cancer. *Ann Surg Oncol*, 19: 1167-1173.
 81. Reed W, Hannisdal E, Skovlund E, Thoresen S, Lilleng P, Nesland JM. (2003) Pregnancy and breast cancer: a population-based study. *Virchows Archiv*, 443: 44-50.
 82. Oktay K, Buyuk E, Libertella N, Akar M, Rosenwaks Z. (2005) Fertility Preservation in Breast Cancer Patients: A Prospective Controlled Comparison of Ovarian Stimulation With Tamoxifen and Letrozole for Embryo Cryopreservation. *Journal of Clinical Oncology*, 23: 4347-4353.
 83. Oktay K, Cil AP, Bang H. (2006) Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 86: 70-80.
 84. Decanter C, Robin G. (2013) Stratégies de préservation de la fertilité chez la femme jeune atteinte de cancer du sein ou d'hémopathie maligne. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 41: 597-600.
 85. Kim SS, Donnez J, Barri P, Pellicer A, Patrizio P, Rosenwaks Z, Nagy P, Falcone T, Andersen C, Hovatta O, Wallace H, Meirow D, Gook D, Kim S, Tzeng C-R, Suzuki S, Ishizuka B, Dolmans M-M. (2012) Recommendations for fertility preservation in patients with lymphoma, leukemia, and breast cancer. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29: 465-468.
 86. Ives A, Saunders C, Bulsara M, Semmens J. Pregnancy after breast cancer: population based study. 2007.
 87. Azim HA, Kroman N, Paesmans M, Gelber S, Rotmensz N, Ameye L, De Mattos-Arruda L, Pistilli B, Pinto A, Jensen M-B, Cordoba O, de Azambuja E, Goldhirsch A, Piccart MJ, Peccatori FA. (2013) Prognostic Impact of Pregnancy After Breast Cancer According to Estrogen Receptor Status: A Multicenter Retrospective Study. *Journal of Clinical Oncology*, 31: 73-79.

88. Pagani O, Partridge A, Korde L, Badve S, Bartlett J, Albain K, Gelber R, Goldhirsch A. (2011) Pregnancy after breast cancer: if you wish, ma'am. *Breast Cancer Research and Treatment*, 129: 309-317.
89. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FCG, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC. (2010) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28: 2784-2795.
90. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JMS, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF. (2013) Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 138(2): 241-256.
91. Jonat W, Maass H, Stegner HE. (1986) Immunohistochemical Measurement of Estrogen Receptors in Breast Cancer Tissue Samples. *Cancer research*, 46: 4296s-4298s.
92. Oláh E. (2005) BRCA1 és BRCA2 gének. *Magyar Tudomány*, 8: 989-1000.
93. Lisowska KM, Dudaladava V, Jarzab M, Huzarski T, Chmielik E, Stobiecka E, Lubinski J, Jarzab B. (2011) BRCA1-related gene signature in breast cancer: the role of ER status and molecular type. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 3: 125-136.
94. Li Y, Zou L, Li Q, Haibe-Kains B, Tian R, Li Y, Desmedt C, Sotiriou C, Szallasi Z, Iglehart JD, Richardson AL, Wang ZC. (2010) Amplification of LAPT4B and YWHAZ contributes to chemotherapy resistance and recurrence of breast cancer. *Nature medicine*, 16: 214-218.

95. Richardson AL, Wang ZC, De Nicolo A, Lu X, Brown M, Miron A, Liao X, Iglehart JD, Livingston DM, Ganesan S. (2006) X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer cell*, 9: 121-132.
96. Gyorffy B, Molnar B, Lage H, Szallasi Z, Eklund AC. (2009) Evaluation of microarray preprocessing algorithms based on concordance with RT-PCR in clinical samples. *PloS one*, 4: doi: 10.1371.
97. Allred D, Harvey J, Berardo M, Clark G. (1998) Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*, 11: 155-168.
98. Parker J, Mullins M, Cheang M, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush J, Stijleman I, Palazzo J, Marron J, Nobel A, Mardis E, Nielsen T, Ellis M, Perou CM, Bernard PS. (2009) Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*, 27: 1160 - 1167.
99. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. (2009) Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 101: 736-750.
100. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. (2010) Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 12: R68.
101. Han W, Kim S, Ae Park I, Kang D, Kim S-W, Youn Y-K, Oh S, Choe K, Noh D-Y. (2004) Young age: an independent risk factor for disease-free survival in women with operable breast cancer. *BMC Cancer*, 4: 82.
102. Fodor J ME, Zaka Z, Polgar C, Major T. (2005) Local relapse in young (< or = 40 years) women with breast cancer after mastectomy or breast conserving surgery: 15-year results. *Magy Onkol* 49: 205–208, 203.
103. Claus EB RN, Thompson WD (1990) Age at onset as an indicator of familial risk of breast cancer. *Am J Epidemiol* 131: 961–972.

104. Cancer CGoHFiB. (2001) Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet*, 358: 1389–1399.
105. Loman N, Johannsson O, Kristoffersson U, Olsson H, Borg A. (2001) Family History of Breast and Ovarian Cancers and BRCA1 and BRCA2 Mutations in a Population-Based Series of Early-Onset Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93: 1215-1223.
106. Evans DG, Howell A, Ward D, Lalloo F, Jones JL, Eccles DM. (2011) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in triple negative breast cancer. *Journal of Medical Genetics*, 48: 520-522.
107. Jiang X CJ, Chavez-Uribe E, Fernandez Rodriguez B, Celeiro Munoz C Redondo CM, Peña Fernandez M, Novo Dominguez A, Pereira CD, Martínez ME, García-Caballero T, Fraga Rodriguez M, Antúnez J, Carracedo A, Forteza-Vila J, Gago-Dominguez M. (2012) Family history and breast cancer hormone receptor status in a Spanish cohort. *PLoS One*, 7: doi: 10.1371.
108. van der Hage J, Mieog JS, van de Velde C, Putter H, Bartelink H, van de Vijver M. (2011) Impact of established prognostic factors and molecular subtype in very young breast cancer patients: pooled analysis of four EORTC randomized controlled trials. *Breast Cancer Research*, 13: R68.
109. Anders CK, Fan C, Parker JS, Carey LA, Blackwell KL, Klauber-DeMore N, Perou CM. (2011) Breast Carcinomas Arising at a Young Age: Unique Biology or a Surrogate for Aggressive Intrinsic Subtypes? *Journal of Clinical Oncology*, 29: e18-e20.
110. Kamangar F, Dores GaM, Anderson WF. (2006) Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. *Journal of Clinical Oncology*, 24: 2137-2150.
111. Michaela A, Anita M, Horst Z, Axel W, Markus K, Peter H, Heinz Hf, Martin W. (1999) Intratumoral Heterogeneity in Breast Carcinoma Revealed by Laser-Microdissection and Comparative Genomic Hybridization. *Cancer genetics and cytogenetics*, 110: 94-102.

112. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lonning P, Borresen-Dale AL. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 10869-10874.
113. Sharifi-Salamatian V, de Roquancourt A, Rigaut JP. (2000) Breast carcinoma, intratumour heterogeneity and histological grading, using geostatistics. *Anal Cell Pathol*, 20: 83-91.
114. Allred DC, Bustamante MA, Daniel CO, Gaskill HV, Cruz AB, Jr. (1990) Immunocytochemical analysis of estrogen receptors in human breast carcinomas. Evaluation of 130 cases and review of the literature regarding concordance with biochemical assay and clinical relevance. *Arch Surg*, 125: 107-113.
115. Wu JM, Halushka MK, Argani P. (2010) Intratumoral heterogeneity of HER-2 gene amplification and protein overexpression in breast cancer. *Human pathology*, 41: 914-917.
116. Parmigiani G, Berry DA, Aguilar O. (1998) Determining Carrier Probabilities for Breast Cancer—Susceptibility Genes BRCA1 and BRCA2. *The American Journal of Human Genetics*, 62: 145-158.
117. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C, Mulvihill JJ. (1989) Projecting Individualized Probabilities of Developing Breast Cancer for White Females Who Are Being Examined Annually. *Journal of the National Cancer Institute*, 81: 1879-1886.
118. Tyrer J, Duffy SW, Cuzick J. (2004) A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. *Statistics in Medicine*, 23: 1111-1130.
119. Tai YC, Chen S, Parmigiani G, Klein AP. (2008) Incorporating tumor immunohistochemical markers in BRCA1 and BRCA2 carrier prediction. *Breast Cancer Res*, 10: 401.

120. James PA, Doherty R, Harris M, Mukesh BN, Milner A, Young MA, Scott C. (2006) Optimal selection of individuals for BRCA mutation testing: a comparison of available methods. *J Clin Oncol*, 24: 707-715.
121. Berry DA, Iversen ES, Jr., Gudbjartsson DF, Hiller EH, Garber JE, Peshkin BN, Lerman C, Watson P, Lynch HT, Hilsenbeck SG, Rubinstein WS, Hughes KS, Parmigiani G. (2002) BRCAPRO validation, sensitivity of genetic testing of BRCA1/BRCA2, and prevalence of other breast cancer susceptibility genes. *J Clin Oncol*, 20: 2701-2712.
122. Székely B ML, Szentmártoni G, Szász AM, Baranyák Z, Szittyá L, Torgyík L, Zergényi E, Borbényi E, Kenessey I, Korompay A, Langmár Z, Bánhidý F, Kulka J, Dank M. (2010) A fiatal- és idős kori emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők alapján. *Magyar Onkológia*, 54: 19-26.
123. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Van Dyke T, Perou CM. (2007) Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*, 8: R76.
124. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133: 704 - 715.
125. Ginestier C, Hur M, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer C, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha M, Dontu G. (2007) ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1: 555 - 567.
126. Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM, Springall RJ, Ryder K, Steele D, Savage K, Gillett CE, Schmitt FC, Ashworth A, Tutt AN. (2006) BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene*, 26: 2126.

127. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB, Herman JG. (2000) Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst*, 92: 564 - 569.
128. Brennan K, Offiah G, McSherry EA, Hopkins AM. (2010) Tight junctions: a barrier to the initiation and progression of breast cancer? *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010: 460607.
129. Larsen MJ, Kruse TA, Tan Q, Lænkholm A-V, Bak M, Lykkesfeldt AE, Sørensen KP, Hansen TvO, Ejlersen B, Gerdes A-M, Thomassen M. (2013) Classifications within Molecular Subtypes Enables Identification of *BRCA1/BRCA2* Mutation Carriers by RNA Tumor Profiling. *PloS one*, 8: e64268. doi: 10.1371.
130. Bastien RR, Rodriguez-Lescure A, Ebbert MT, Prat A, Munarriz B, Rowe L, Miller P, Ruiz-Borrego M, Anderson D, Lyons B, Alvarez I, Dowell T, Wall D, Segui M, Barley L, Boucher K, Alba E, Pappas L, Davis C, Aranda I, Fauron C, Stijleman I, Palacios J, Anton A, Carrasco E, Caballero R, Ellis M, Nielsen T, Perou C, Astill M, Bernard P, Martin M. (2012) PAM50 Breast Cancer Subtyping by RT-qPCR and Concordance with Standard Clinical Molecular Markers. *BMC medical genomics*, 5: 44.
131. Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, Tulchinsky E, Van Roy F, Berx G. (2005) SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell–cell junctions. *Nucleic Acids Research*, 33: 6566-6578.
132. Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, Novak PK, Szilak L, Kiss A, Bogi K, Schaff Z. (2005) Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res*, 7: R296-305.
133. Soini Y. (2004) Claudins 2, 3, 4, and 5 in Paget's disease and breast carcinoma. *Human pathology*, 35: 1531-1536.
134. Soini Y. (2005) Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. *Histopathology*, 46: 551-560.

135. Blanchard A, Skliris G, Watson P, Murphy L, Penner C, Tomes L, Young T, Leygue E, Myal Y. (2009) Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. *Virchows Archiv*, 454: 647-656.
136. Blanchard A, Ma X, Dueck K, Penner C, Cooper S, Mulhall D, Murphy L, Leygue E, Myal Y. (2013) Claudin 1 expression in basal-like breast cancer is related to patient age. *BMC cancer*, 13: 268.
137. Kulka J, Szasz AM, Nemeth Z, Madaras L, Schaff Z, Molnar IA, Tokes AM. (2009) Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas. *Pathol Oncol Res*, 15: 59-64.
138. Szasz AM, Nemeth Z, Gyorffy B, Micsinai M, Krenacs T, Baranyai Z, Harsanyi L, Kiss A, Schaff Z, Tokes A-M, Kulka J. (2011) Identification of a claudin-4 and E-cadherin score to predict prognosis in breast cancer. *Cancer science*, 102: 2248-2254.
139. Howard EM, Lau SK, Lyles RH, Birdsong GG, Umbreit JN, Kochhar R. (2005) Expression of E-cadherin in high-risk breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 131: 14-18.
140. Holstege H, Horlings H, Velds A, Langerod A, Borresen-Dale A-L, van de Vijver M, Nederlof P, Jonkers J. (2010) BRCA1-mutated and basal-like breast cancers have similar aCGH profiles and a high incidence of protein truncating TP53 mutations. *BMC cancer*, 10: 654.
141. Beadle BM, Woodward WA, Middleton LP, Tereffe W, Strom EA, Litton JK, Meric-Bernstam F, Theriault RL, Buchholz TA, Perkins GH. (2009) The impact of pregnancy on breast cancer outcomes in women ≤ 35 years. *Cancer*, 115: 1174-1184.
142. Azim HA, Santoro L, Russell-Edu W, Pentheroudakis G, Pavlidis N, Peccatori FA. (2012) Prognosis of pregnancy-associated breast cancer: A meta-analysis of 30 studies. *Cancer treatment reviews*, 38: 834-842.
143. Guinee F, Hess KR, Taylor SH, Olsson H, Möller T, Fahey T, Gladikov JV, van den Blink JW, Bonichon F, Dische S, Yates JW, Cleton F. (1994) Effect of pregnancy on prognosis for young women with breast cancer. *The Lancet*, 343: 1587-1589.

144. Kollias J, Murphy C, Elston C, Ellis I, Robertson J, Blamey R. (1999) The prognosis of small primary breast cancers. *Eur J Cancer*, 35: 908 - 912.
145. Albergaria A, Ricardo S, Milanezi F, Carneiro V, Amendoeira I, Vieira D, Cameselle-Teijeiro J, Schmitt F. (2011) Nottingham Prognostic Index in Triple-Negative Breast Cancer: a reliable prognostic tool? *BMC Cancer*, 11: 299.
146. Collins LC, Achacoso N, Nekhlyudov L, Fletcher SW, Haque R, Quesenberry CPJ, Puligandla B, Alshak NS, Goldstein LC, Gown AM, Schnitt SJ, Habel LA. (2009) Relationship Between Clinical and Pathologic Features of Ductal Carcinoma In Situ and Patient Age: An Analysis of 657 Patients. *The American Journal of Surgical Pathology*, 33: 1802-1808.
147. Schnitt SJ. (2010) Local Outcomes in Ductal Carcinoma In Situ Based on Patient and Tumor Characteristics. *JNCI Monographs*, 2010: 158-161.
148. Goldstein NS, Vicini FA, Kestin LL, Thomas M. (2000) Differences in the pathologic features of ductal carcinoma in situ of the breast based on patient age. *Cancer*, 88: 2553-2560.
149. Vincent-Salomon A, Lucchesi C, Gruel N, Raynal V, Pierron G, Goudefroye R, Reyat F, Radvanyi F, Salmon R, Thierry J-P, Sastre-Garau X, Sigal-Zafrani B, Fourquet A, Delattre O. (2008) Integrated Genomic and Transcriptomic Analysis of Ductal Carcinoma In situ of the Breast. *Clinical Cancer Research*, 14: 1956-1965.
150. Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lacroix-Triki M, Marchió C, Reis-Filho JS. (2010) Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology*, 57: 171-192.
151. Fornetti J, Martinson H, Borges V, Schedin P. (2012) Emerging targets for the prevention of pregnancy-associated breast cancer. *Cell Cycle*, 11: 639-640.
152. O'Brien J, Schedin P. (2009) Macrophages in Breast Cancer: Do Involution Macrophages Account for the Poor Prognosis of Pregnancy-Associated Breast Cancer? *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 14: 145-157.
153. O'Brien J, Lyons T, Monks J, Lucia MS, Wilson RS, Hines L, Man Y-g, Borges V, Schedin P. (2010) Alternatively Activated Macrophages and Collagen Remodeling Characterize the Postpartum Involuting Mammary Gland across Species. *The American journal of pathology*, 176: 1241-1255.

154. Fornetti J, Martinson H, Borges V, Schedin P. (2012) Emerging targets for the prevention of pregnancy-associated breast cancer. *Cell Cycle*, 11: 639-640.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. Madaras L; Balint N; Gyorffy B; Tokes AM; Barschack I;Yosepovich A;Friedman E; Paluch-Shimon S; Zippel D; Baghy K; Timar J; Kovalszky I; Kulka J; Szasz AM BRCA Mutation Related and Claudin-low Breast Cancer: Blood Relatives or Stepsisters? PATHOBIOLOGY (ISSN: 1015-2008) 2015 Nov 14;83(1):1-12. (2015) (DOI:10.1159/000439135)

2. Madaras L, Baranyák Z, Kulka J, Szász AM, Kovács A, Lan PH, Székely B, Dank M, Nagy T, Kiss O, Harsányi L, Barbai T, Kenessey I, Tőkés AM Retrospective Analysis of Clinicopathological Characteristics and Family History Data of Early-Onset Breast Cancer: A Single-Institutional Study of Hungarian Patients PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 19:(4) pp. 723-729. (2013)

3. Madaras L, Kovacs KA, Szasz AM, Kenessey I, Tokes AM, Szekely B, Baranyak Z, Kiss O, Dank M, Kulka J Clinicopathological Features and Prognosis of Pregnancy Associated Breast Cancer - A Matched Case Control Study. PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 20:(3) pp. 581-590. (2014)

4. Madaras L, Szász MA, Baranyák Z, Tőkés AM, Szittyá L, Lotz G, Székely B, Szentmártoni G, Dank M, Baranyai Z, Kulka J Fiatal- és időskori emlődaganatok morfológiai és molekuláris sajátosságai közötti összefüggések [Morphological and immunophenotypical heterogeneity in breast cancers of young and elderly women] MAGYAR ONKOLÓGIA 56:(2) pp. 75-78. (2012)

A disszertációtól független közlemények

1. Madaras L, Kovacs KA, Szasz AM, Tokes AM, Szekely B, Baranyak Z, Kiss O, Kenessey I, Dank M, Kulka J Clinicopathological features and prognosis of pregnancy associated breast cancer: A matched case control study VIRCHOWS ARCHIV 463:(2) p. 248. (2013)
2. Madaras L, Szirtes I, Bata P, Riesz P, Somoracz A, Szekely E, Romics M, Majoros A, Borka K, Szasz MA, Nyirady P A pozitív sebészi szél jelentősége radikális prosztatektómia esetén. MAGYAR ONKOLÓGIA 58:(3) pp. 204-210. (2014)
3. Szasz A, Gyorffy B, Nemeth Z, Krenacs T, Baranyai Z, Harsanyi L, Dank M, Madaras L, Tokes AM, Kulka J Claudin-4/E-cadherin Index to Predict Prognosis in Breast Cancer EUROPEAN JOURNAL OF CANCER 47:(Suppl. 1) p. S181. (2011)
4. Szasz AM, Tokes AM, Micsinai M, Krenacs T, Jakab C, Lukacs L, Nemeth Z, Baranyai Z, Dede K, Madaras L, Kulka J Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. CLINICAL & EXPERIMENTAL METASTASIS 28:(1) pp. 55-63. (2011)
IF:3.524
5. Szekely B, Madaras L, Szentmartoni G, Szasz AM, Baranyak Z, Szittyá L, Torgyik L, Zergenyi E, Borbenyi E, Kenessey I, Korompay A, Langmar Z, Banhidy F, Kulka J, Dank M A fiatal- és időskori emlőrák összehasonlítása klinikopatológiai jellemzők alapján [Comparison of breast cancer in young and old women based on clinicopathological features] MAGYAR ONKOLÓGIA 54:(1) pp. 19-26. (2010)
6. Kulka J, Szász AM, Németh Zs, Madaras L, Schaff Zs, Molnár I, Tőkés AM Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 15: pp. 59-64. (2009)
IF:1.152

7. Kulka J, Tőkés AM, Tóth AI, Szász AM, Farkas A, Borka K, Járay B, Székely E, Istók R, Lotz G, Madaras L, Korompay A, Harsányi L, László Z, Rusz Z, Molnár BA, Molnár IA, Kenessey I, Szentmártoni G, Székely B, Dank M. Az emlődaganatok primer szisztémás kemoterápiára adott válasza az immunhisztokémiai fenotípus tükrében [Immunohistochemical phenotype of breast carcinomas predicts the effectiveness of primary systemic therapy] MAGYAR ONKOLÓGIA 53:(4) pp. 335-343. (2009)
8. Szasz AM, Micsinai M, Tokes AM, Madaras L, Krenacs T, Kulka J Proteomic Profiling of Breast Carcinomas Based on Claudin Expression Pattern. CANCER RESEARCH 69:(24) p. 864S.
9. Székely E, Madaras L, Kulka J, Járay B, Nagy L. Leiomyosarcoma of the female breast PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 7:(2) pp. 151-153. (2001)
10. Székely E, Schaff Z, Madaras L, Kupcsulik P, Zsirka A Trabecular angiomyolipoma mimicking hepatic cell carcinoma PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 6:(3) pp. 224-226. (2000)

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Időrendi sorrendben haladva szeretnék először is köszönetet mondani dr **Székely Eszternek**, aki a patológia gyakorlatvezetőm volt a Semmelweis Egyetemen, nélküle nem lettem volna patológus...

Köszönet illeti munkahelyi vezetőimet, professzor **Antonio Duarte-t** (Serviço de Patologia, Hospital de Santa Maria, Faculdade de Medicina de Lisboa, Lisboa, Portugal), az általa vezetett intézetben kezdtem el patológus rezidensként dolgozni, **Kádár Anna** Professzor asszonyt, akinek köszönhetem, hogy a II.sz Patológiai Intézetben dolgozom és aki folyamatosan biztatott és támogatott PhD munkám során, **Bati Lifschitz** Professzor asszonyt (Sourasky Medical Center, Department of Pathology, Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel), **Schaff Zsuzsa** Professzor asszonyt, **Tímár József** Professzor urat, akik folyamatos technikai és szellemi segítséget nyújtottak.

Ez a munka nem jöhetett volna létre a II. sz Pathologiai Intézet emlő munkacsoportjának közreműködése nélkül: **Kulka Janina** Professzor asszony, aki a konzulensem és akitől abszolút szerencsésként az emlőpatológiát is tanulhattam, dr **Szász A. Marcell**, akinek zsenialitása megkérdőjelezhetetlen, **Tőkés Annamária** és dr **Kovács K. Attila**, akik közreműködése nélkül nem születhettek volna cikkek...

Köszönet illeti a klinikus kollégákat: onkológusokat, sebészeket, nőgyógyászokat és mindazokat, akik emlőrák betegekkel foglalkoznak...

Természetesen, nagyon köszönöm a II.sz Patológiai Intézetben valaha is velem dolgozó valamennyi patológus kollégámnak, akik ha kellett helyettesítettek, vagy csak biztattak, külön köszönet **dr Kovács Margit** c. egyetemi docensnek, aki a pályám elején oly sokat ült velem a mikroszkópnál...és egyáltalán valamennyi munkatársamnak, akik a mindennapokban a munkámat segítik. Külön köszönet **Azumah Erzsébetnek**, **Sklánczné Samodai Erikának**, **Grineusz Enikőnek**, **Laczik Ceciliának** és **Gittingerné Balogh Lenkének** a technikai és adminisztratív segítségért. Köszönet **Baghy Kornéliának** és **Kovalszky Ilona** Professzor asszonynak (I. sz Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem) a BRCA tanulmányban nyújtott segítségükért.

Köszönöm az izraeli kollégák közreműködését és támogatását: dr **Andrea Gat** (Head of Breast Unit, Sourasky Medical Center, Department of Pathology, Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel), professor **Eitan Friedman** (Susanne Levy Gertner Oncogenetics Unit, The Gertner Institute of Human Genetics, Department of Internal Medicine, Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel), professor **Iris Barschack**, dr **Nora Balint Lahat**, dr **Ady Josepovich** (Department of Pathology, Chaim Sheba Medical Center, Tel Hashomer, Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel).

És persze nem utolsó sorban köszönet illeti családomat, akik e munka idején is elviseltek és támogattak: férjem **Szentgyörgyi Zoltán** és fiaim **Szentgyörgyi Bálint** és **Szentgyörgyi András**. Külön köszönet illeti édesanyámat, dr **Szunainé Vágó Erzsébetet**.

FÜGGELÉK

FÜGGELÉK 1- ALKALMAZOTT ANTITESTEK, IMMUNHISZTOKÉMIAI ÉS FISH MÓDSZEREK

IHC	ER		PR	
PERIOD	Antibody	Method	Antibody	Method
1998-2003	Novocastra NCL-L-ER 6F11	manual	Novocastra NCL-PGR-312	manual
2003-2008	Novocastra NCL-L-ER 6F11	Ventana ES	Novocastra NCL-PGR-312	Ventana ES
2008-2011	Novocastra NCL-L-ER 6F11	Ventana ES, Ventana Benchmark XT	Novocastra NCL-PGR-312	Ventana ES, Ventana Benchmark XT
2012-	Ventana Confirm antiEST receptor SP1	Ventana Benchmark XT	Ventana Confirm antiPROG receptor 1E2	Ventana Benchmark XT

IHC	Ki67		Her2	
PERIOD	Antibody	Method	Antibody	Method
1998-2003	DAKO M7240	manual	DAKO cerbB-2	manual
2003-2008	DAKO M7240	Ventana ES	Novocastra CB11	Ventana ES
2008-2011	DAKO M7240	Ventana ES, Ventana Benchmark XT	Novocastra CB11	Ventana ES, Ventana Benchmark XT
2012-	DAKO M7240	Ventana Benchmark XT	Ventana Confirm antiHer2/neu 4B5	Ventana Benchmark XT

IHC	p53	
PERIOD	Antibody	Method
1998-2003	DAKO M7001	manual
2003-2008	DAKO M7001	Ventana ES
2008-2011	DAKO M7001	Ventana ES, Ventana Benchmark XT
2012-	DAKO M7001	Ventana Benchmark XT

FISH	Her2 FISH	
PERIOD	Probe	Method
2004-2008	INFORM Her2/neu FISH test	Ventana Benchmark
2008-2010	Kreatech POSEIDON HER2/SE17	manual
2010-	Zytovision ZytoLight SPEC HER2/CEN17	manual

2004 előtt a HER2 FISH vizsgálat központilag, az Országos Onkológiai Intézetben történt

FÜGGELÉK 2- KÉRDŐÍV

<p>KÉRDŐÍV</p> <p>1. Hogyan vette/vették észre betegségét? (A megfelelő választ húzza alá!)</p> <p>önvizsgálat szűrővizsgálat (mammográfia) egyéb orvosi vizsgálat során</p> <p>Egyéb:.....</p> <p>2. Betegsége előtt szedett-e fogamzásgátlót? Ha igen, mit és mennyi ideig?</p> <p>nem</p> <p>igen:.....</p> <p>3. Dohányzik, illetve dohányzott-e? Ha igen, mennyi ideig és milyen mértékben (szál/nap)?</p> <p>nem</p> <p>igen:.....</p> <p>4. Alkoholt fogyaszt-e, illetve fogyasztott-e? Ha igen, mit és milyen rendszerességgel?</p> <p>nem igen:.....</p> <p>5. Mennyi volt testsúlya, ill. magassága betegsége előtt?kg.....cm</p> <p>6. Mikor volt az első menstruációja?</p> <p>7. Betegsége előtt átlagosan hány napig tartott menstruációja ?</p> <p>8. Hány kihordott terhessége volt?</p> <p>9. Amennyiben szült, hány éves korában született az első gyermeke?</p> <p>10. Amennyiben szült, gyermekét szoptatta-e?</p> <p>nem igen</p>

11. A kezelés hatására sikerült-e tumormentes (daganatmentes) állapotot elérni?

nem **igen**

12. Amennyiben igen, megmaradt-e a tünetmentes állapot, vagy daganata később kiújult?

.....

13. Jelenlegi betegsége előtt kapott-e bármilyen okból sugárkezelést?

nem **igen**

14. Ha igen, milyen okból?

.....

15. Jelenlegi betegsége előtt találtak-e *jóindulatú elváltozást* valamelyik emlőjében?

nem **igen**

16. *Családjában volt-e valakinek daganatos megbetegedése, ha igen, mely rokonának, és milyen betegségben szenvedett?*

nem **igen:**

.....

.....

17. *Az itt említett családtagok közül kinél hány éves korban jelentkezett a daganat, milyen műtétre került sor, illetve él-e még? (Ha már nem él, mennyi idősen hunyt el?)*

.....

.....

18. *Önnél, vagy daganatos betegségben szenvedő családtagjánál történt-e valaha genetikai vizsgálat? Ha igen, mikor, hol és milyen eredménnyel?*

.....

FÜGGELÉK 3- ALKALMAZOTT IMMUNHISZTOKÉMIAI ANTITESTEK

Antitest	Forgalmazó, klón	Hígítás
AR	DAKO anti-AR (AR441)	1:50
CD24	R&D SYSTEMS anti-CD24 (528807)	1:50
CD44	R&D SYSTEMS anti-hCD44v6 (2F10)	1:100
Claudin-1	Cell Marque anti- Cldn1	1:100
Claudin-3	Invitrogen anti- Cldn3	1:100
Claudin-4	Invitrogen anti-Cldn4(3E2C1)	1:100
Claudin-7	Invitrogen anti-Cldn7 (5D10F3)	1:100
E-Cadherin	DAKO antiE-Cadh (NCL-38)	1:100
EGFR	Ventana EGFR (3C6)	RTU
ER	Ventana antiEST receptor SP1	RTU
EZH2	BD Bioscience anti-EZH-2	1:50
HER2	Ventana Her2-(4B5)	RTU
Ki67	DAKO Ki67(MIB1)	1:100
P53	DAKO P53 (DO-7)	1:500
PgR	Ventana antiPgR receptor (1E2)	RTU
Vimentin	DAKO anti VIM (V9)	1:1200

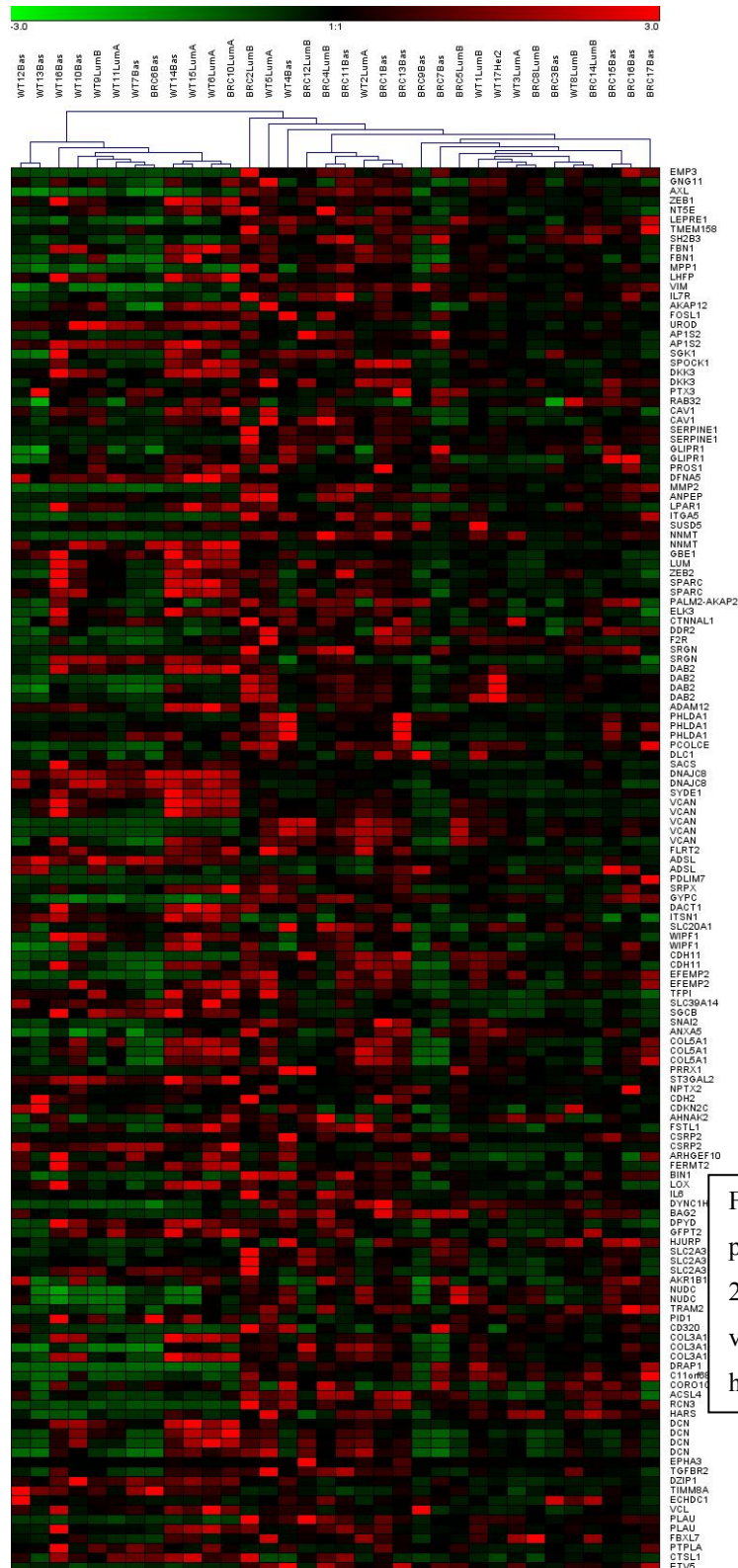
FÜGGELÉK 4- A BRCA100 GÉN, MELY A BRCA VAD ÉS MUTÁNS TÍPUSÚ EMLŐRÁK MINTÁKAT ELKÜLÖNÍTI

AUC rank	ID	Symbol	ROC	p value
1	209130_at	SNAP23	0.931	0
2	218205_s_at	MKNK2	0.900	1.08E-14
3	221540_x_at	DKFZP686M0199 /// GTF2H2 /// LOC728340 /// LOC730394	0.900	9.99E-16
4	209422_at	PHF20	0.896	1.59E-14
5	214259_s_at	AKR7A2	0.896	9.57E-14
6	218570_at	KBTBD4 /// PTPMT1	0.896	8.82E-13
7	33760_at	PEX14	0.896	7.18E-11
8	204972_at	OAS2	0.893	1.12E-11
9	204025_s_at	PDCD2	0.889	2.32E-13
10	210797_s_at	OASL	0.889	5.74E-13
11	221737_at	GNA12	0.886	6.79E-12
12	216598_s_at	CCL2	0.884	1.85E-09
13	202759_s_at	AKAP2 /// PALM2 /// PALM2-AKAP2	0.882	8.70E-12
14	217099_s_at	GEMIN4	0.879	2.52E-10
15	221883_at	PKNOX1	0.879	1.08E-10
16	200628_s_at	WARS	0.875	4.47E-08
17	206553_at	OAS2	0.875	9.00E-09
18	211799_x_at	HLA-C	0.875	1.53E-10
19	217502_at	IFIT2	0.875	1.10E-09
20	200973_s_at	TSPAN3	0.874	1.04E-10
21	213797_at	RSAD2	0.874	8.12E-10
22	218094_s_at	DBNDD2 /// SYS1-DBNDD2	0.874	8.12E-10
23	201582_at	SEC23B	0.872	3.24E-10
24	204265_s_at	GPSM3	0.872	8.10E-10
25	205552_s_at	OAS1	0.872	2.02E-08
26	218356_at	FTSJ2	0.872	4.25E-10
27	214456_x_at	SAA1 /// SAA2	0.869	2.52E-10
28	214937_x_at	PCM1	0.869	3.85E-09
29	201701_s_at	PGRMC2	0.865	2.31E-09
30	202117_at	ARHGAP1	0.865	5.02E-09
31	204141_at	TUBB2A	0.865	3.63E-09
32	213702_x_at	ASAHI	0.865	2.31E-09
33	218400_at	OAS3	0.865	2.56E-08
34	219100_at	OBFC1	0.865	4.88E-08
35	44783_s_at	HEY1	0.865	1.22E-07
36	200056_s_at	C1D	0.862	6.23E-08
37	200810_s_at	CIRBP	0.862	1.14E-07

38	200847_s_at	TMEM66	0.862	9.72E-09
39	201186_at	LRPAP1	0.862	1.58E-08
40	202321_at	GGPS1	0.862	1.87E-09
41	202365_at	UNC119B	0.862	3.66E-09
42	204747_at	IFIT3	0.862	1.58E-08
43	208785_s_at	MAP1LC3B	0.862	2.83E-09
44	211733_x_at	SCP2	0.862	2.72E-08
45	212369_at	ZNF384	0.862	7.17E-09
46	214988_s_at	SON	0.862	2.58E-07
47	219765_at	ZNF329	0.862	1.07E-08
48	219848_s_at	ZNF432	0.862	3.76E-09
49	207571_x_at	C1orf38	0.858	2.77E-07
50	211528_x_at	HLA-G	0.858	2.85E-08
51	214022_s_at	IFITM1	0.858	4.40E-08
52	215884_s_at	UBQLN2	0.858	2.61E-08
53	213716_s_at	SECTM1	0.856	7.65E-09
54	215253_s_at		0.856	2.02E-07
55	201415_at	GSS	0.855	2.59E-07
56	202038_at	UBE4A	0.855	2.59E-07
57	203651_at	ZFYVE16	0.855	4.99E-08
58	204806_x_at	HLA-F	0.855	8.33E-09
59	205660_at	OASL	0.855	7.49E-09
60	208728_s_at	CDC42	0.855	1.19E-07
61	211395_x_at	FCGR2C	0.855	3.24E-08
62	211911_x_at	FAM20B /// HLA-B /// HLA-C /// MICA /// MICB /// XXbac- BPG181B23.1	0.855	3.86E-08
63	213994_s_at	SPON1	0.855	3.59E-07
64	214109_at	LRBA	0.855	2.12E-07
65	214113_s_at	RBM8A	0.855	6.40E-08
66	214281_s_at	RCHY1	0.855	3.24E-08
67	217436_x_at	HLA-J	0.855	1.86E-08
68	218420_s_at	C13orf23	0.855	3.24E-08
69	218465_at	TMEM33	0.855	1.49E-07
70	219697_at	HS3ST2	0.855	1.40E-06
71	200857_s_at	NCOR1	0.851	2.93E-07
72	201601_x_at	IFITM1	0.851	5.16E-08
73	202820_at	AHR	0.851	7.00E-07
74	208894_at	HLA-DRA	0.851	9.17E-08
75	208898_at	ATP6V1D	0.851	3.98E-08
76	210582_s_at		0.851	3.32E-08
77	210692_s_at	SLC43A3	0.851	4.34E-08
78	210785_s_at	C1orf38	0.851	1.56E-07

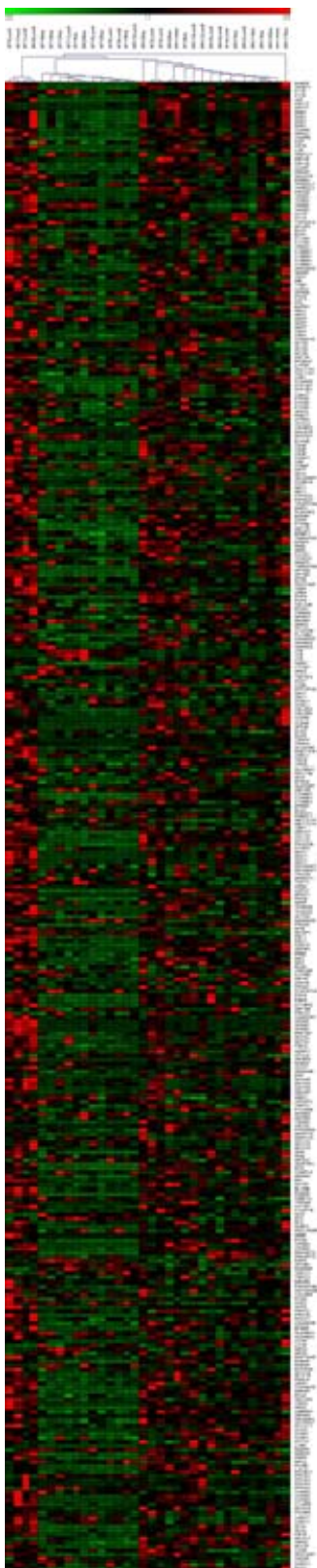
79	212171_x_at	VEGFA	0.851	2.82E-06
80	214349_at	---	0.851	5.16E-08
81	214484_s_at	OPRS1	0.851	7.82E-08
82	218178_s_at	CHMP1B	0.851	2.93E-07
83	220559_at	EN1	0.851	1.25E-07
84	221432_s_at	SLC25A28	0.851	3.56E-07
85	204006_s_at	FCGR3A /// FCGR3B	0.849	1.68E-07
86	209944_at	ZNF410	0.849	9.14E-08
87	201195_s_at	SLC7A5	0.848	1.20E-07
88	201658_at	ARL1	0.848	8.81E-07
89	202411_at	IFI27	0.848	9.45E-08
90	209852_x_at		0.848	1.11E-07
91	212380_at	KIAA0082	0.848	3.74E-07
92	221050_s_at	GTPBP2	0.848	1.02E-07
93	221582_at	HIST3H2A	0.848	2.17E-07
94	200014_s_at	HNRNPC	0.844	8.75E-07
95	200756_x_at	CALU	0.844	9.82E-07
96	201053_s_at	PSMF1	0.844	4.16E-07
97	201125_s_at	ITGB5	0.844	6.72E-06
98	201385_at	DHX15	0.844	3.18E-07
99	201785_at	RNASE1	0.844	1.43E-07
100	202070_s_at	IDH3A	0.844	3.18E-07

FÜGGELÉK 5- A CLAUDIN LOW EXPRESSZIÓS MINTÁZAT 151 POZITÍV PREDIKTOR GÉNJE



Függőlegesen a 151 pozitív prediktör gén- Prat és mtsai 2010-es közleményéből- vízszintesen az esetek hierarchikus klasztere.

FÜGGELÉK 6- A CLAUDIN LOW EXPRESSZIÓS MINTÁZAT 354 NEGATÍV PREDIKTOR GÉNJE



Függőlegesen a 354 negatív prediktor gén- Prat és mtsai 2010-es közleményéből-vízszintesen az esetek hierarchikus klasztere.