

Imunohistokemična analiza izražanja glukokortikoidnih receptorjev pri zgodnjem raku dojk in njihov vpliv na odgovor na zdravljenje z neoadjuvantno sistemsko terapijo

Immunohistochemical analysis of glucocorticoid receptor expression in early breast cancer and its influence on response to treatment with neoadjuvant systemic therapy

Sraka Marjetka¹, Gazić Babara^{1,2}, Drev Primož², Grašič Kuhar Cvetka^{1,3}

¹Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

²Onkološki inštitut Ljubljana, Oddelek za patologijo, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

³Onkološki inštitut Ljubljana, Sektor internistične onkologije, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

Korespondenca: Marjetka Sraka

E-mail: valentincic.marjeta@gmail.com

Poslano / Received: 9. 4. 2024

Sprejeto / Accepted: 30. 4. 2024

doi:10.25670/oi2024-002on

IZVLEČEK

Izhodišča: Glukokortikoidni receptor (GR) je različno izražen na tumorskih in imunskih celicah raka dojk, njegova izraženost pa je morda odvisna od molekularnega podtipa raka dojk, prav tako njegova izraženost morda vpliva na odgovor na neoadjuvantno sistemsko terapijo. Naš namen je vpeljati zanesljivo imunohistokemično barvanje s protitelesi proti GR, drugi namen pa je oceniti izraženost GR na vzorcih raka dojk in preučiti, ali se ta izraža različno pri različnih podtipih in ali njegova izraženost vpliva na odgovor na neoadjuvantno sistemsko terapijo.

Metode: V predkliničnem delu raziskave smo izbrali zanesljivo protitelo proti GR, postopek imunohistokemičnega barvanja z izbranim protitelesom pa kalibrirali in validirali. V kliničnem delu raziskave smo ocenili izraženost GR na tumorskih in imunskih celicah pri raku dojk. Vzorci 162 bolnic so bili izbrani prospektivno v okviru raziskave AKRA, ki je potekala na Onkološkem inštitutu Ljubljana, in pozneje analizirani. Pridobili smo še podatke o pripadajočem tumorju.

Rezultati: Uvedli smo zanesljivo imunohistokemično barvanje s protitelesi proti GR in na vzorcih ocenili njegovo izraženost na tumorskih in imunskih celicah. Na tumorskih celicah so bili GR pozitivni pri trojno negativnem podtipu v 93,5 %, pri HER-2 pozitivnem podtipu pri 88,4 % in pri luminalnem B podtipu v 87,5 %, razlika med podtipi ni bila statistično značilna ($p = 0,746$). Kompletni patološki odgovor na neoadjuvantno sistemsko terapijo je bil prisoten v primeru pozitivnih GR v 31,8 %, v primeru negativnih GR pa v 22,2 %, kar prav tako ni bilo statistično značilno različno ($p = 0,589$). Izraženost na imunskih celicah je bila prisotna v vseh vzorcih na ≥ 80 % celic s stopnjo intenzitete 3, zato teh rezultatov nismo analizirali.

Zaključki: Uspešno smo uvedli imunohistokemično barvanje na GR, ocenili njegovo izraženost na vzorcih, vendar nismo uspeli dokazati povezanosti njegove izraženosti s podtipi in odgovorom na neoadjuvantno sistemsko terapijo.

Gljučne besede: rak dojk, glukokortikoidni receptor, imunohistokemija, neoadjuvantno sistemsko zdravljenje

ABSTRACT

Background: The glucocorticoid receptor (GR) is differentially expressed on tumour and immune cells in breast cancer, and its expression may depend on the molecular subtype of the cancer, and it may also influence the response to neoadjuvant systemic therapy. Our primary aim is to introduce reliable immunohistochemical staining with anti-GR antibodies, and our second aim is to evaluate the expression of GR in breast cancer samples and to study whether it is expressed differently in different subtypes and whether its expression has an impact on the response to neoadjuvant systemic therapy.

Methods: In the preclinical part of the research, we selected a reliable antibody against GR, and then we calibrated and validated the immunohistochemical staining procedure with the selected antibody. In the clinical part of the research, we evaluated the expression of GR on tumour and immune cells in breast cancer. Samples from 162 patients were selected prospectively as part of the AKRA study, which took place at the Institute of Oncology Ljubljana, and later analysed. We also obtained data on the associated tumour.

Results: We introduced reliable immunohistochemical staining with antibodies against GR and evaluated its expression on tumour and immune cells. On tumour cells, GR was positive in the triple-negative subtype in 93.5%, in the HER2-positive subtype in 88.4% and in the luminal B subtype in 87.5%; the difference between the subtypes was not statistically significant ($p = 0.746$). A complete pathological response to neoadjuvant systemic therapy was present in the case of positive GR in 31.8%, and in the case of negative GR in 22.2%, which was also not statistically significantly different ($p = 0.589$). Expression on immune cells was present in all samples on $\geq 80\%$ cells with an intensity level of 3, so we did not analyse these results.

Conclusions: We successfully introduced immunohistochemical staining for glucocorticoid receptor and evaluated its expression on the samples, but we failed to demonstrate the association of GR expression with subtypes and response to neoadjuvant systemic therapy.

Keywords: breast cancer, glucocorticoid receptor, immunohistochemistry, neoadjuvant systemic treatment

UVOD

Rak dojke je najpogostejši rak pri ženskah (1). Ocenjeno je, da je leta 2020 za rakom dojke na svetu zbolelo več kot 2 milijona žensk, umrlo pa jih je skoraj 700.000. Povprečna starostno standardizirana incidenčna stopnja je za leto 2020 v Evropi ocenjena na 112,1 zbolelih na 100.000 prebivalc, Slovenija pa je z vrednostjo 94,5/100.000 nekoliko pod evropskim povprečjem (2). Mednarodna agencija za raziskave raka (*angl. The International Agency for Research on Cancer (IARC)*) je ocenila, da je v letu 2020 rak dojke postal najpogostejše diagnosticirani rak na svetu (3).

Pri raku dojke opisujemo histološko diagnozo, poleg le-te pa so v klasifikaciji raka dojke zelo pomembni molekularni označevalci, ki jih določamo rutinsko na vseh invazivnih karcinomih. Estrogenški receptor (ER), progesteronski receptor (PR) ter proliferacijski faktor MIB-1 določamo imunohistokemično (IHK), receptor za epidermalni rastni faktor 2 (HER-2) pa z IHK, v določenih primerih tudi s fluorescentno hibridizacijo in situ (FISH) (2). Posamezni podtipi tako sledijo izraženosti molekularnih označevalcev, to so luminalni A, luminalni B, HER-2 pozitiven (luminalni in neluminalni) ter trojno negativni podtip (4).

Zgoraj opisani molekularni označevalci in delitev raka dojke v podtipje glede na te so v klinični praksi zelo pomembni, saj se

glede na določen podtip odločimo za najprimernejše sistemsko zdravljenje, pod čigar pojmom poznamo kemoterapijo, hormonsko terapijo, proti HER-2 usmerjena zdravila in imunoterapijo (5).

Še eden izmed hormonskih receptorjev, ki se poleg ER in PR izraža v tumorju dojke, je glukokortikoidni receptor (GR). GR je vseprisoten v človeškem telesu, njegovo izražanje vpliva na miriadi različnih bioloških procesov – tako na imunski in vnetni odziv kot tudi na rast in reprodukcijo, centralni živčni sistem, kardiovaskularni sistem, homeostazo vode, elektrolitov in glukoze (6,7,8). Na celični ravni GR med drugim uravnava tudi celično proliferacijo in apoptozo, njegovo delovanje pa je tkivno specifično (7,9,10,11).

GR je član superdružine steroidnih receptorjev, ki delujejo kot transkripcijski faktorji in regulirajo izražanje različnih genov – bodisi promovirajo njihovo izražanje (transaktivacija) bodisi izražanje zavirajo (transrepresija). Svoje delovanje GR prožijo prek vezave specifičnih ligandov, ti so: 1) endogeni glukokortikoidi (GK), 2) sintetični GK ter 3) 6-okso-cholestan-3 β , 5 α -diol (OCDO), ki je derivat holesterola, onkometabolit (1). Ko se ligand veže na GR, se ta konformacijsko spremeni, poveže z drugim GR, čemur pravimo homodimerizacija, kompleks pa se nato premakne iz citoplazme v jedro, kjer se veže na posebno mesto na DNA, namreč na glukokortikoidni odzivni element (*angl. glucocorticoid response element, (GRE)*), s tem pa aktivira ali zavre transkripcijo tarčnega gena (12).

Pri raku dojke ob sistemskem zdravljenju velikokrat uporabljamo sintetične GK, predvsem v namen preprečitve alergičnih reakcij ter kot antiemetik (13,14,15,16). Kot omenjeno, ima GR prek svojih ligandov na celični ravni diapazon različnih učinkov, zato se poraja vprašanje, kako uporaba sintetičnih GK ob sistemskem zdravljenju vpliva na zdravljenje in klinični izid bolnika. Vloga GK in GR pri različnih rakah epiteljskega izvora je vprašljiva, velik delež raziskav pa dokazuje, da naj bi GK/GR pri solidnih rakah pospeševali celično proliferacijo in s tem razvoj tumorja (10,15).

Različne študije pričajo tudi o tem, da naj bi se GK prek GR vpletali v signalno pot ER in tako zavirali z estrogeni posredovano celično proliferacijo pri ER-pozitivnem raku dojke, da pa naj bi tudi zavirali s kemoterapijo spodbujeno celično apoptozo pri ER-negativnem raku dojke (12,17,18,19,20). Seveda ligandi brez efektorja (tj. GR) ne morejo prožiti svojega učinka, zato se je treba vprašati, kakšna je izraženost GR v celicah tumorja. Ob raziskovanju tega vprašanja so različni avtorji poročali, da naj bi bila visoka izraženost GR na tumorskih celicah povezana z boljšim odgovorom na zdravljenje s kemoterapijo v primeru ER-pozitivnega raka dojke, nasprotno pa naj bi bila visoka izraženost GR povezana s slabšim odgovorom na zdravljenje v primeru ER-negativnega raka dojke (21,22,23).

Tumor je sestavljen iz tumorskih celic in tumorskega mikrookolja, kjer so tudi imunske celice. Med temi je največje tumor infiltrirajočih limfocitov (TIL) (24). Naj pojasnimo, da GR niso izraženi le na tumorskih celicah, ampak tudi na imunskih celicah. Raziskave so pokazale, da je delež izraženosti TIL pomemben prediktivni napovedni dejavnik odgovora na neoadjuvantno sistemsko zdravljenje (NAST) pri vseh podtipih raka dojke (25,26). Višji je delež izraženosti TIL, boljši je odgovor na NAST pri vseh podtipih in boljše je preživetje pri HER-2 pozitivnem in trojno negativnem podtipu (25).

Imunski sistem je v osnovi tisti, ki prepozna spremenjene, tumorske celice in jih odstrani. Vendar različni signali iz tumorskega mikrookolja protitumorski imunski odgovor zavirajo, za takšen učinek pa naj bi bili odgovorni tudi GR. GK naj bi prek GR zavirali aktivacijo limfocitov T, čeprav so si rezultati o tem

nasprotujoči (27). Ugotovljeno je, da naj bi pod vplivom delovanja GR CD8 limfociti T postali nefunkcionalni (*angl. dysfunctional*) in izgubili svojo funkcijo citotoksičnosti. Ko so podrobneje na vzorcih melanoma raziskovali, kako GK prek GR vplivajo na preobrazbo teh celic, so ugotovili, da obstaja naraščajoči gradient izraženosti GR od naivnih do nefunkcionalnih CD8 limfocitov T. CD8 limfociti T, ki niso imeli izraženih GR ali pa so imeli nizko izražene GR, so opravljali svojo nalogo, to je zavirali rast tumorja, limfociti, ki pa so imeli visoko izražene GR, so, nasprotno, postali nefunkcionalni. GR naj bi torej prek GK promoviral ta nedelujoči oz. nefunkcionalni fenotip CD8 limfocitov T (28,29). Poudarimo naj, da študije o vplivu GR na imunskih celicah na razvoj raka dojke po našem vedenju še niso bile izvedene, rezultati raziskav o sami izraženosti GR na TIL v raku dojke pa podajajo nasprotujoče si rezultate (28,30,31).

V članku želimo predstaviti novo uvedeni protokol IHC-barvanja s protitelesi proti človeškemu GR in predstaviti analizo izraženosti GR na tumorskih in imunskih celicah na vzorcih raka dojke različnih podtipov ter nadalje našo ugotovitev, ali se GR izražajo različno med posameznimi podtipi in ali obstaja povezava med izraženostjo GR na tumorskih in imunskih celicah ter odgovorom na NAST.

METODE

Raziskava je bila opravljena na vzorcih, ki so bili pridobljeni v okviru prospektivne neintervencijske študije AKRA na Onkološkem inštitutu Ljubljana (OIL) v letih 2018–2021. Vanjo so bile vključene bolnice z operabilnim rakom dojke stadija IIA do IIIB, starejše od 18 let in zdravljene z NAST z antraciklini in taksani. Vključitvenim merilom so ustrezali vsi molekularni podtipi raka dojke, razen luminalni A podtip, pri katerem NAST ni prvo zdravljenje.

Najprej je bilo treba uvesti IHC-barvanje s protitelesi proti GR. Po pregledu literature, priloženih slik IHC-obarvanih preparatov in informacij na spletnih mestih proizvajalcev smo se odločili za klon D8H2 proizvajalca Cell Signaling, saj je pokazal jedrno lokalizacijo, različen spekter izražanja, zadovoljiv rezultat na pozitivni interni kontroli (stromalne celice) in največjo specifičnost in senzitivnost.

Po pridobitvi ustreznih protiteles je sledila kalibracija protokola IHC in nato analitična validacija kalibriranega protokola. Obarvali smo 12 testnih preparatov z različnimi kombinacijami parametrov. Za testne preparate smo uporabili rezine dveh tkivnih mrež, v katere je bilo vključenih skupno 71 različnih vzorcev: 31 vzorcev zdravih tkiv različnih organskih sistemov in 40 vzorcev invazivnih karcinomov dojke različnih histoloških tipov (IDC, ILC, mucinozni, medularni, metaplastični). Ob pregledu testnih preparatov zdravih tkiv smo tako ugotovili, da smo GR prikazali v ustreznih celicah – tako kot je opisano v literaturi, smo opazili, da je GR ubikvitaren na stromalnih celicah, v ustreznem celičnem kompartmentu (jedro), s primerno jakostjo reakcije (intenziteta obarvanja je zmerna do močna) in brez nespecifične reakcije (ni bilo obarvanja medcelične, membrane in citoplazme) (32,33). Ob pregledu testnih preparatov invazivnih karcinomov dojke smo opazili razpon reakcije od popolnoma negativne (brez kakršnega koli obarvanja tumorskih celic ob pozitivni notranji kontroli – fibrociti, endotelijske celice žil) do močno pozitivne (močno obarvanje jeder vseh tumorskih celic), zato smo zaključili, da je protokol dobro kalibriran in pripravljen za uporabo.

Sledilo je barvanje vzorcev. Uporabili smo parafinske bloke v formalin fiksiranega tkiva, ki so vsebovali ohranjeno tumorsko tkivo. Izmed 172 vzorcev smo izločili vzorec bolnice, ki ni podpisala soglasja za dodatne raziskave na ostanku tumorskih vzorcev. IHC-določanje antigena GR smo opravili na 2 do 4 µm tankih rezinah v formalinu fiksiranega in v parafin vklopljenega tkiva. Rezine smo položili na površinsko obdelana predmetna

stekla »TOMO Adhesive Slide« (kat. št. TOM-11, proizvajalec Matsunami Glass, Osaka, Japonska) in jih sušili 2 uri pri 56 °C.

IHC-prikaz antigena GR smo opravili v avtomatskem barvalcu Ventana Benchmark Ultra« (proizvajalec Ventana Medical Systems ROCHE inc., Tucson, Arizona, ZDA). Epitope smo razkrili v barvalcu s segrevanjem v pufru z visokim pH »High pH Cell Conditioning Solution 1« (kat. št. 950-124, proizvajalec Ventana Medical Systems ROCHE inc. Tucson, Arizona, ZDA) 88 minut pri 100 °C. Razkriti epitop smo detektirali s komercialno dostopnim primarnim zajčjim monoklonskim protitelesom »Glucocorticoid Receptor (D8H2) XP® Rabbit mAb« – (klon D8H2, kat. št. #3660, proizvajalec Cell Signalling Technology, Danvers, Massachusetts, ZDA), razredčeno 1 : 2000 z diluentom »DAKO REAL™ antibody diluent« (kat. št. S2022, proizvajalec DAKO Agilent, Santa Clara, Kalifornija, ZDA). Primarno protitelo smo inkubirali v barvalcu 60 minut pri 37 °C in nato specifično vezano primarno protitelo vizualizirali s trisopenjskim detekcijskim sistemom na osnovi multimerov »OptiView DAB IHC Detection Kit« (kat. št. 760-700, proizvajalec: Ventana Medical Systems ROCHE inc., Tucson, Arizona, ZDA) po navodilih proizvajalca in preparate kontrastirali s hematoksilinom »Hematoxylin II« (kat. št. 790-2208, proizvajalec: Ventana Medical Systems ROCHE inc., Tucson, Arizona, ZDA) po navodilih proizvajalca.

Ob ocenjevanju se je izkazalo, da je na 9/171 preparatih vzorec pičel in ni primeren za oceno izraženosti GR, zato smo teh 9 vzorcev izločili iz raziskave.

Ocenjevanje izraženosti GR na tumorskih in imunskih celicah je semikvantitativno, izvedli sta ga dve neodvisni ocenjevalki – somentorica (BG) in avtorica Prešernove naloge (MS). Za oceno izraženosti GR na tumorskih in imunskih celicah smo se odločili uporabiti Allred seštevke, ki se uporablja tudi za oceno drugih hormonskih receptorjev pri raku dojke (34). Odločili smo se zapisati odstotek in oceno intenzitete posebej za tumorske in imunske celice. V poglavju z rezultati bomo razložili, zakaj se je za izraženost GR na imunskih celicah to izkazalo za nesmiselno. Ker je bila stopnja ujemanja med ocenjevalkama zadostna (koeficient korelacije znotraj razreda (ICC) je znašal 0,859), smo Allred seštevka za vsak vzorec povprečili. Nadalje smo Allred seštevke razdelili v dve Allred skupini, Allred seštevka 0 in 2 sta tvorila skupino negativno izraženih GR (v nadaljevanju neg. GR), seštevki 3–8 pa so tvorili skupino pozitivno izraženih GR (v nadaljevanju poz. GR) (34).

Za bolnice, katerih vzorce smo ocenili, smo v podatkovni bazi WebDoctor (Marand, Ljubljana, Slovenija) pridobili še naslednje podatke: starost ob diagnozi, klinični stadij tumorja pred pričetkom zdravljenja, klinični stadij bezgavk pred pričetkom zdravljenja, histologija tumorja, gradus tumorja, izraženost ER, PR, HER-2, MIB-1, TIL, molekularni podtip tumorja in odgovor na NAST, ki smo ga razdelili na dve kategoriji: popolni odgovor (*angl. complete pathologic response (pCR)*), kar pomeni odsotnost ostanka invazivnega raka v dojki (in situ karcinom je bil dovoljen) in odsotnost zasevkov v pazdušnih bezgavkah. Za nepopolni odgovor smo označili, če je bil prisoten ostanek invazivnega karcinoma v dojki in/ali pazdušnih bezgavkah (od tu dalje ne-pCR) (35).

Za analizo podatkov smo uporabili statistični program SPSS različice 24.0 (IBM Corp., Armonk, New York, ZDA). Za primerjavo podatkov bolnic med skupinama z neg. GR in poz. GR ter med skupinama pCR in ne-pCR uporabimo test hi-kvadrat za opisne spremenljivke, če je izpolnjena njegova predpostavka (največ 20 % vrednosti pričakovanih frekvenc ima vrednost, manjšo od 5), sicer uporabimo Fisherjev eksaktni test. Za številke spremenljivke s simetrično, normalno porazdelitvijo uporabimo test t za neodvisna vzorca, za številke spremenljivke

z asimetrično porazdelitvijo neparametrični test Mann-Whitney. Določili smo stopnjo statistične značilnosti $\alpha = 0,05$.

Za primerjavo spremenljivk izraženost GR in podtip ter izraženost GR in odgovor na NAST smo uporabili post-hoc hi-kvadrat test in dobljene vrednosti p primerjali s stopnjo statistične značilnosti, v katero smo vnesli Bonferronijev popravek v izogib napaki prvega reda. Za oceno mere povezanosti in v izogib napaki drugega reda smo uporabili logistično regresijo, s katero smo izračunali razmerje obetov (OR) in 95-% interval zaupanja (IZ) za OR.

REZULTATI

Značilnosti bolnic in tumorja

V levem delu tabele 1 predstavljamo osnovne značilnosti preučevanega vzorca bolnic ($n = 162$). Povprečna starost bolnic je bila 50,4 leta, najbolj zastopan je bil invazivni duktalni karcinom (95,7 %), gradus 3 (72,2 %) klinični stadij T2 (74,1 %), med molekularnimi podtipi je prevladoval luminalni B podtip (54,3 %).

Izraženost glukokortikoidnega receptorja

S slike 1 je razvidno, da je imelo le 11,1 % vzorcev neg. GR na tumorskih celicah, preostalih 88,9 % pa poz. GR na tumorskih celicah (65,5 % zelo visok Allred seštevek 7–8). Na slikah 2 in 3 prilagamo primere stopnje intenzitete izraženosti GR na tumorskih celicah 0 (negativna reakcija) in 3.

Enako kot na tumorskih celicah smo odstotek in intenziteto obarvanja želeli oceniti tudi na imunskih celicah, konkretno na TIL. Ob pregledu vseh obarvanih vzorcev smo ugotovili, da je GR ubikvitaren na TIL. ≥ 80 -% izraženostjo in močno intenziteto izražanja (stopnja intenzitete 3). Večjih razlik v izražanju GR na TIL med posameznimi vzorci tako nismo zaznali. Zaključili smo, da naš namen in cilj odkrivanja izraženosti GR na imunskih celicah presega metodo IHC in se zato odločili, da podatkov o izraženosti GR na imunskih celicah ne poročamo. Na sliki 4 prikazujemo tipičen primer izraženosti GR na TIL ob neg. GR na tumorskih celicah.

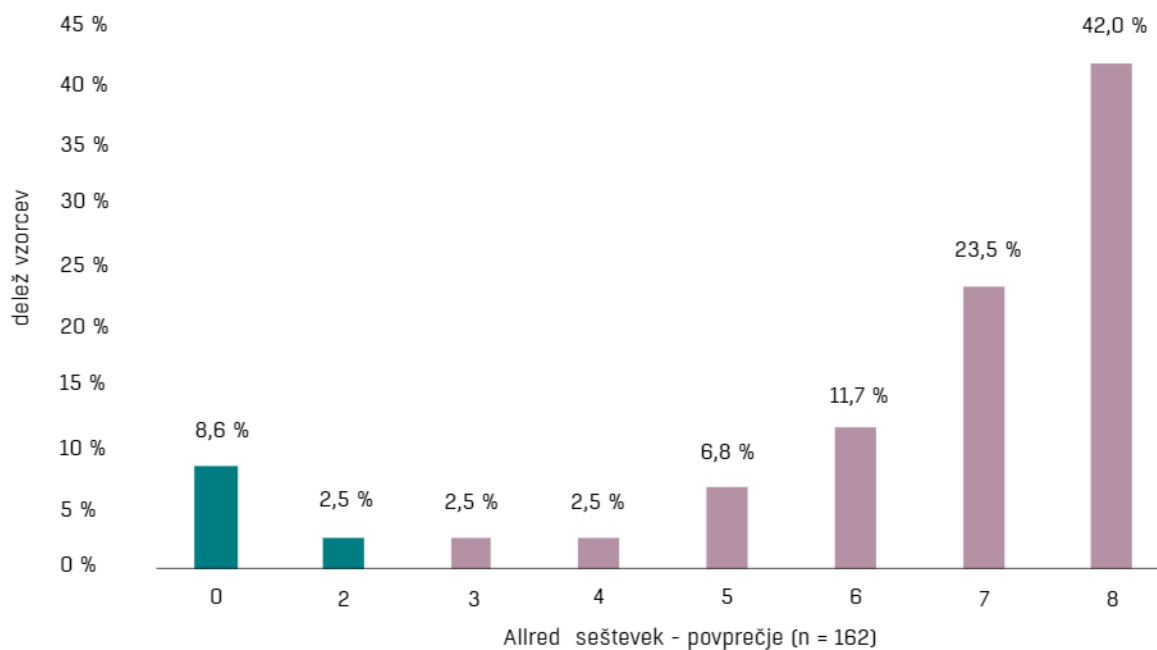
Tabela 1: Klinične značilnosti bolnic in tumorja.

	vse bolnice n = 162	neg. GR n = 18 (11,1 %)	poz. GR n = 144 (88,9 %)	p- vrednost	ni pCR n = 113 (70 %)	pCR n = 49 (30 %)	p- vrednost
Starost v letih [povprečje (SD)]	50,4 (11,3)	53,4 (11,6)	50,0 (11,3)	0,255	51,0 (10,9)	48,9 (12,1)	0,732
Klinični stadij tumorja [n (%)]				0,886			0,076
≤ 20 mm	36 (22,2)	3 (8,3)	33 (91,7)		21 (58,3)	15 (41,7)	
21–50 mm	120 (74,1)	15 (12,5)	105 (87,5)		86 (71,7)	34 (28,3)	
> 50 mm	6 (3,7)	0 (0)	6 (100)		6 (100)	0 (0)	
Klinični stadij bezgavk [n (%)]				0,572			0,011
Negativne	43 (26,5)	6 (14,0)	37 (86,0)		23 (53,5)	20 (46,5)	
Pozitivne	119 (73,5)	12 (10,1)	107 (89,9)		90 (75,6)	29 (24,4)	
Histologija tumorja [n (%)]				0,569			0,103
IDC	155 (95,7)	17 (11,0)	138 (89,0)		106 (68,4)	49 (31,6)	
Drugo*	7 (4,3)	1 (14,3)	6 (85,7)		7 (100)	0 (0)	
Gradus tumorja [n (%)]				0,348			0,001
2	44 (27,2)	7 (15,9)	37 (84,1)		39 (88,6)	5 (11,4)	
3	117 (72,2)	11 (9,4)	106 (90,6)		73 (62,4)	44 (37,6)	
Neznano	1 (0,6)	0 (0)	1 (100)		1 (100)	0 (0)	
Izraženost MIB-1 [n (%)]				1,000			0,024
< 20%	17 (10,5)	2 (11,8)	15 (88,2)		16 (94,1)	1 (5,9)	
≥ 20%	145 (89,5)	16 (11,0)	129 (89,0)		97 (66,9)	48 (33,1)	
Izraženost TIL [mediana (IQR)]	10,0 (5,0–30,0)	4,0 (1,0–10,0)	15,0 (5,0–30,0)	0,008	5,0 (3,0–25,0)	20,0 (5,0–40,0)	0,001
Podtip tumorja [n (%)]				0,746			< 0,001
Luminalni B	88 (54,3)	11 (12,5)	77 (87,5)		73 (83,0)	15 (17,0)	
HER-2 pozitivni	43 (26,5)	5 (11,6)	38 (88,4)		20 (46,5)	23 (53,5)	
Trojno negativni	31 (19,1)	2 (6,5)	29 (93,5)		20 (64,5)	11 (35,5)	

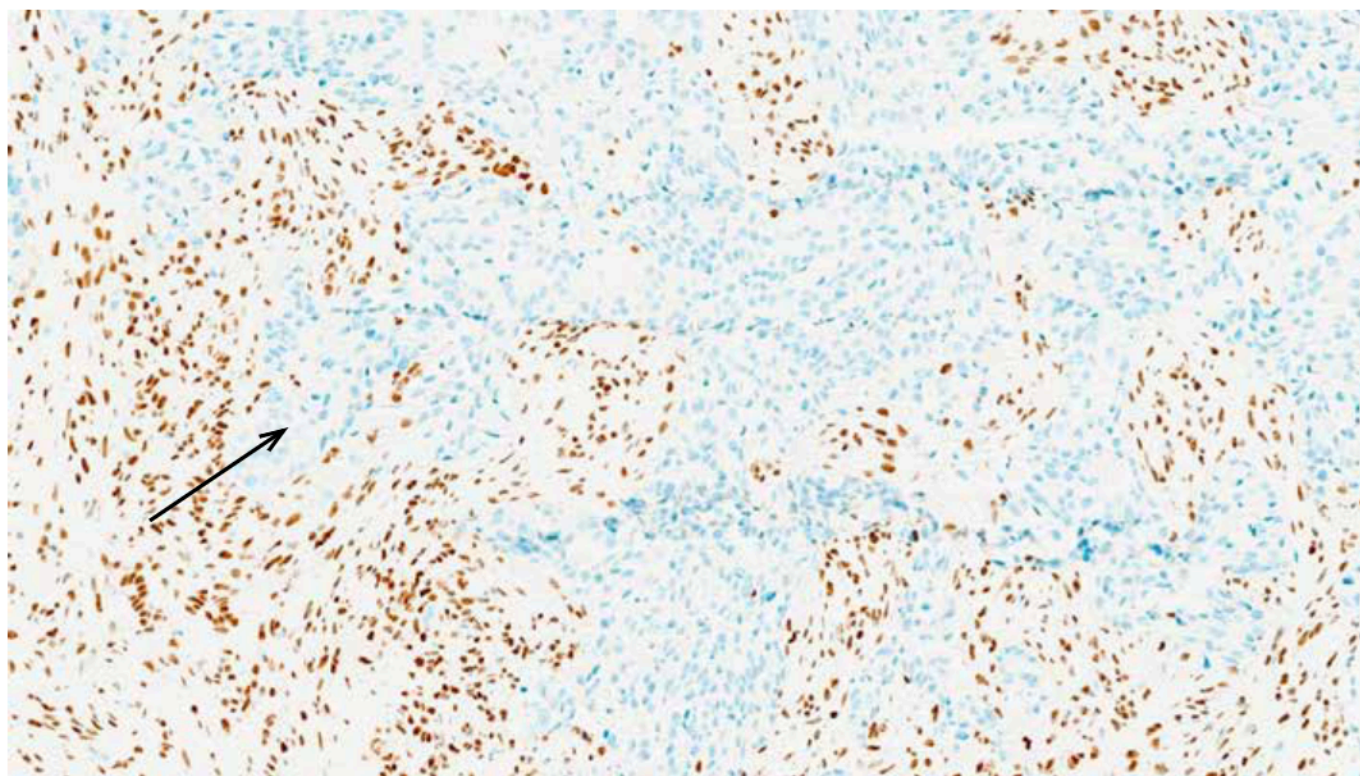
Okrajšave: DC – invazivni duktalni karcinom, MIB-1 – celični proliferacijski indeks, TIL – tumor infiltrirajoči limfociti.

*V skupino »drugo« so zajeti naslednji histološki podtipi: invazivni lobularni karcinom, duktalni karcinom in situ in še nekateri redkejši.

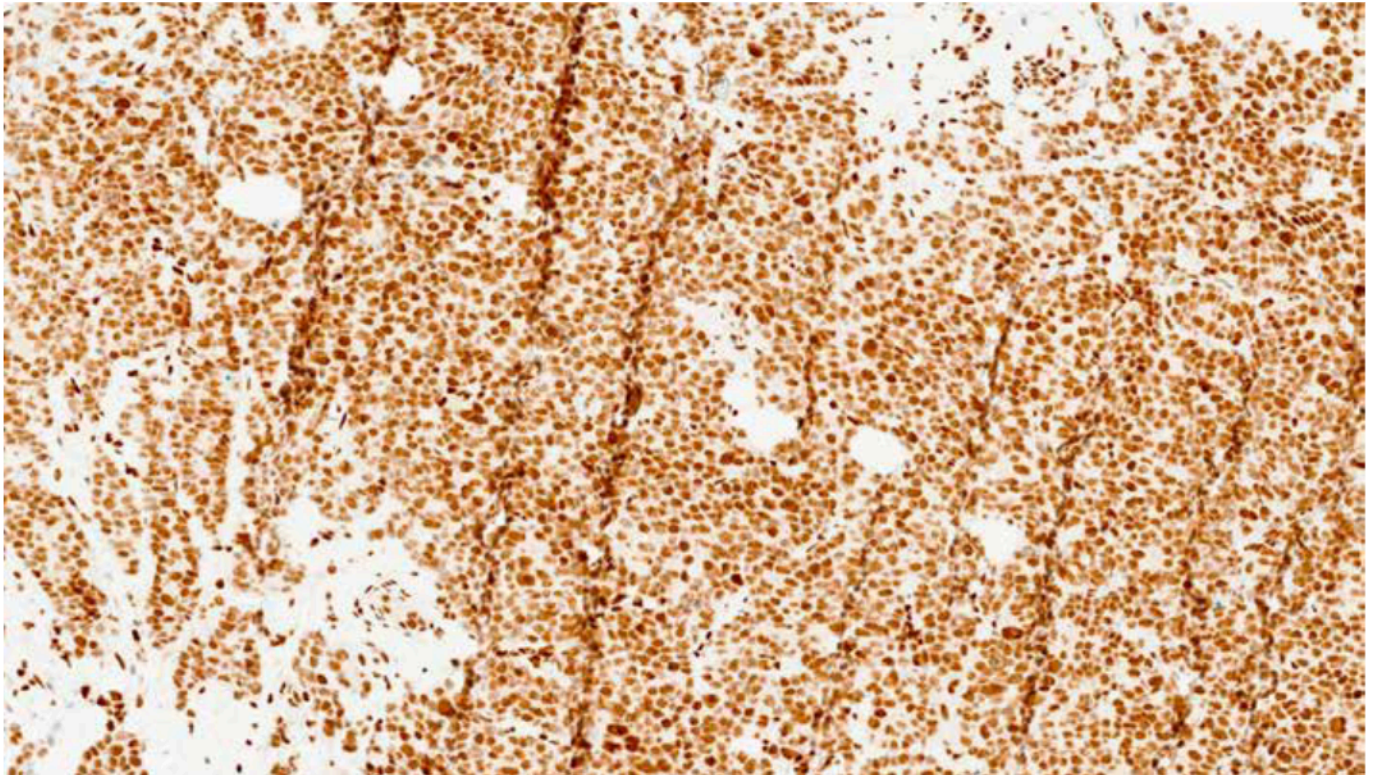
Slika 1: Prikaz deležev vzorcev glede na povprečni Allred seštevek obeh ocenjevalk (n = 162). Ocenjena je Izraženost glukokortikoidnih receptorjev na tumorskih celicah.



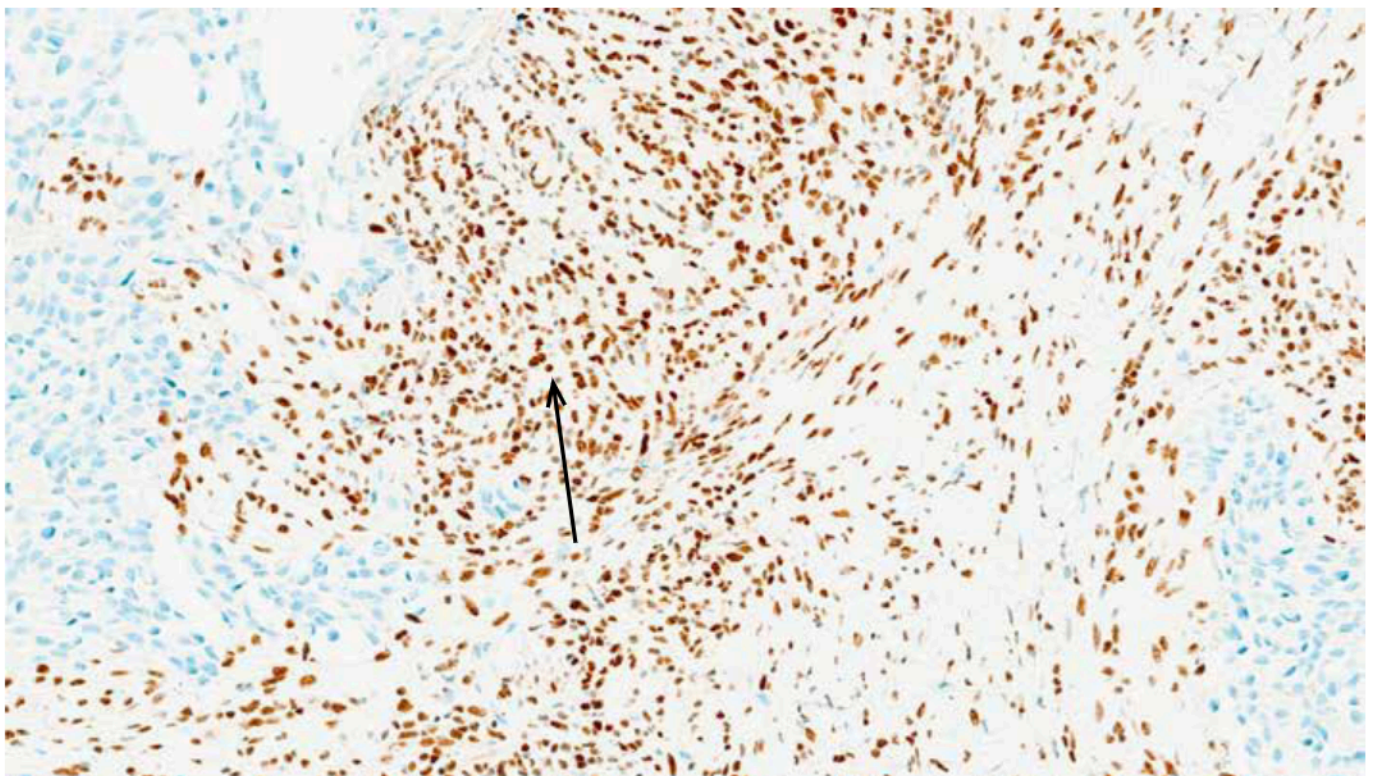
Slika 2: Prikaz Izraženosti glukokortikoidnih receptorjev na tumorskih celicah stopnje Intenzitete 0. S puščico so označene tumorske celice (modro).



Slika 3: Prikaz izraženosti glukokortikoidnih receptorjev na tumorskih celicah stopnje Intenzitete 3. Na sliki so skoraj izključno tumorske celice.



Slika 4: Močna reakcija na tumor infiltrirajočih limfocitih (TIL). 100 % izraženost glukokortikoidnih receptorjev (GR) na TIL s stopnjo Intenzitete 3, izraženost GR na tumorskih celicah pa je 0%. Puščica nakazuje TIL. Modro obarvane so tumorske celice.



V sredinskem delu tabele 1 predstavljamo značilnosti našega vzorca bolnic glede na izraženost GR. Bolnice v skupini z neg. GR so v povprečju za 3,4 leta starejše od tistih s poz. GR, kar pa ni bilo statistično značilno različno. Opazimo tudi, da je v skupini s poz. GR statistično značilna višja izraženost TIL (mediana 15 %) kot v skupini z neg. GR (mediana 4 %, $p = 0,008$). Izraženost GR ni v povezavi s kliničnim stadijem tumorja, kliničnim stadijem bezgavk, histologijo in gradusom. Prav tako GR ni v povezavi s posameznimi podtipi: na sliki 5 prikazujemo primerjavo izražanja GR na tumorskih celicah med posameznimi podtipi v obliki naloženega stolpčnega diagrama s prikazom deležev posameznih kategorij v odstotkih. Ugotovili smo, da luminalni B podtip nima statistično značilnega večjega ali manjšega razmerja obetov za pozitivno izražen GR kot trojno negativni podtip (OR = 0,5; 95-% IZ za OR = [0,1; 2,3]) ali HER-2 pozitivni podtip (OR = 1,1; 95-% IZ [0,4; 3,3]). Tudi HER-2 pozitivni podtip nima statistično značilno večjega ali manjšega razmerja obetov za pozitivno izražen GR kot trojno negativni podtip (OR = 0,5; 95-% interval zaupanja za OR = [0,1; 2,9]).

Patološka kompletna remisija

pCR je bil dosežen pri 30 % vseh bolnic. V desnem delu tabele 1 predstavljamo značilnosti vzorca bolnic glede na odgovor na NAST (bodisi pCR bodisi ne-pCR). Odkrili smo statistično pomembno razliko med pCR in: stadijem bezgavk ($p = 0,011$), gradusom tumorja ($p = 0,001$), izraženostjo MIB-1 ($p = 0,024$) in izraženostjo TIL ($p = 0,001$). Zapisane p vrednosti v tabeli 1 so zgolj eksploratorne (36,37). Nismo pa odkrili statistično značilne razlike med odgovorom na NAST in skupinama z neg. GR in poz. GR ($p = 0,589$; OR = 1,59 s 95-% IZ za OR = [-2,6; 3,7]), kar prikazujemo na sliki 6 v obliki naloženega stolpčnega diagrama s prikazom deležev posameznih kategorij v odstotkih.

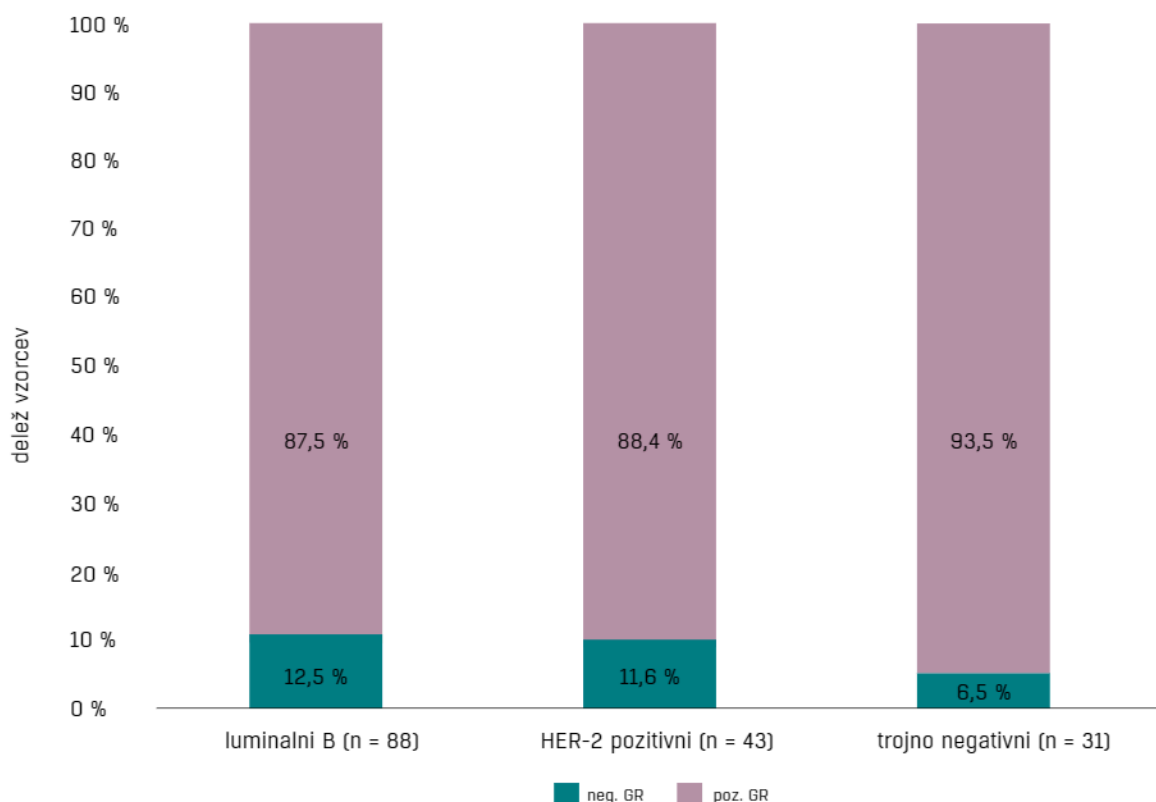
RAZPRAVA

V raziskavi prikazujemo kalibracijo in validacijo protokola za IHK-barvanje proti GR in nadalje oceno izraženosti GR na 162 vzorcih rakov bolnic, pridobljenih v okviru raziskave AKRA, in povezavo med izraženostjo GR na tumorskih celicah in posameznimi podtipi ter odgovorom na NAST.

Ob sami zasnovi raziskave je bila težavna odločitev o izbiri načina ocenjevanja izraženosti GR na tumorskih celicah. V literaturi se namreč pojavljajo različni načini ocenjevanja izraženosti GR, med najpogosteje uporabljenimi metodami je t. i. seštevek H (*angl. H score*), ki je seštevek zmnožkov odstotka izraženih celic in stopnje intenzitete, seštevek pa je torej zvezna spremenljivka, ki lahko zavzame vrednosti 0–300. Še ena od pogosto uporabljenih metod ocenjevanja izraženosti GR je seštevek Allred. Ob zasnovi raziskave smo se za način ocenjevanja vzorcev odločali med obema metodama. Seštevek H resda poda nekoliko kakovostnejšo oceno izraženosti GR, vendar ima v praksi določene omejitve, saj je takšen način ocenjevanja odstotka celic, ki izražajo določeno stopnjo intenzitete reakcije, težaven, zahteva pa tudi večjo izkušnost ocenjevalca, zato je po našem mnenju težko verjetno, da bi se takšen sistem vpeljal v prakso kot potencialni del presejanja tumorskih vzorcev na izraženost GR.

Poleg same metode ocenjevanja izraženosti GR je problematično tudi postavljanje meje pozitivnosti oz. negativnosti. Med avtorji, ki so za ocenjevanje izraženosti uporabljali seštevek H, so različno postavljene meje pozitivnosti oz. negativnosti. Morda še najbližje naši je raziskava Catteau in sod., ki so za ocenjevanje izraženosti GR tako kot mi uporabili seštevek Allred, s tem da so seštevke razdelili v tri skupine: skupino z Allred seštevkom 0 in 2 so označili kot negativno, skupino s seštevki 3–4 kot šibko pozitivno in skupino s seštevki 5–8 kot močno pozitivno (38). Sami smo mejo negativnosti postavili pri Allred skupini 2, pri

Slika 5: Primerjava deležev vzorcev z izraženimi glukokortikoidnimi receptorji (poz. GR) in neizraženimi glukokortikoidnimi receptorji (neg. GR) na tumorskih celicah med posameznimi podtipi.



čemer ta še spada v skupino z neg. GR. Pri tem smo se zgedovali po Fauzi in sod. v primeru ocenjevanja izraženosti ER na vzorcih raka dojk (34). Takšna meja je bila za ER postavljena na podlagi obširnih raziskav vpliva hormonske terapije na celokupno preživetje bolnic in preživetje brez ponovitve bolezni (39). V primeru GR je ta meja postavljena zgolj arbitrarno, saj študij o tem, katere bolnice bi potencialno imele korist od terapije z antagonistom GR ali pa terapije z GK, ni. Strinjamo se z Block in sod., da je za namen postavljanja meje pozitivnosti potreben veliko večji uvid v poznavanje najnižje izraženosti GR, ki bi še potencialno imela korist od morebitnega tarčnega zdravljenja z antagonistom GR (7), zato bi bilo pravilneje, da meje pozitivnosti ne bi postavljali, ampak podatke analizirali glede na Allred seštevke, vendar ob relativno majhnem vzorcu in ob delitvi v relativno veliko število skupin (Allred seštevke je 8) to predstavlja problem za obdelavo podatkov s statistično analizo.

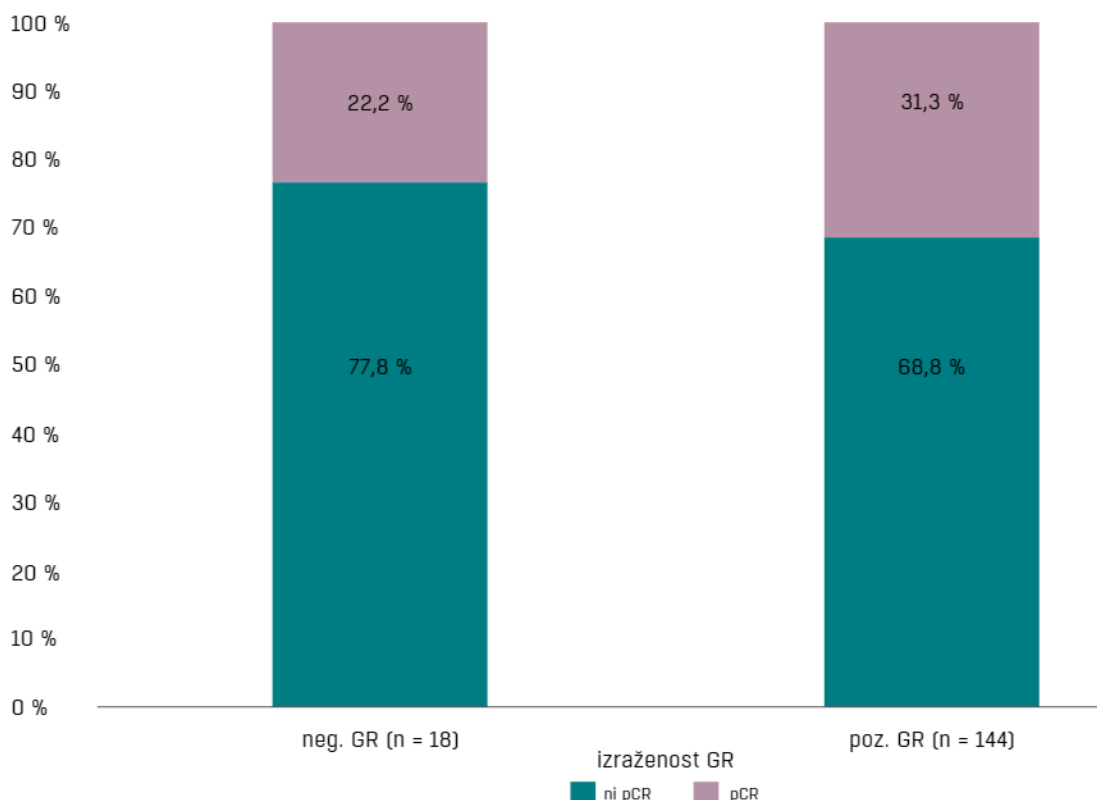
Ob pregledu obarvanih vzorcev smo naleteli na zanimivo odkritje – GR so bili namreč obilno izraženi na TIL, v resnici pa na celotni tumorski stromi. Na vseh preparatih smo zaznali v TIL najmanj 80-% obarvanost na GR stopnje intenzitete 3. To nas napeljuje na misel, da so GR ubikvitarni na TIL, izraženost GR na TIL pa je neodvisna od podtipa raka.

Ocena izraženosti GR na tumorskih celicah se je izkazala za uporabnejšo. Skupine posameznih molekularnih podtipov smo primerjali med sabo glede na razlike v izražanju GR. Nismo zaznali statistično značilne razlike v izražanju GR med posameznimi podtipi. Deleži vzorcev s poz. GR se med posameznimi podtipi približno ujemajo (87,5 % za luminalni B podtip, 88,4 % za HER-2 pozitivni podtip in 93,5 % za trojno negativni podtip). Zaznali smo nekoliko višji delež poz. GR v skupini s trojno negativnim podtipom, vendar razlika ni bila statistično značilna. Podobnost v deležih vzorcev z neg. in poz. GR znotraj

posameznih podtipov nas navede na misel, da izraženost GR ni povezana z ostalimi prediktivnimi dejavniki – ER, PR, HER-2 in MIB-2. Primerljiva študija, v kateri je bila uporabljena IHC kot metoda določanja izraženosti GR na vzorcih raka dojk različnih podtipov, podobno kot mi poroča, da med posameznimi podtipi ni zaznanih razlik v izražanju GR (14), medtem ko deFazio in sod. poročajo, da naj bi izraženost GR obratno korelirala z izražanjem ER in naj bi bila torej izraženost GR višja v primeru ER-neg. tumorja (40). Različne rezultate gre morda pripisati drugačni metodi, ki so jo slednji uporabili; izraženost GR in ER so namreč preučevali na 19 različnih celičnih linijah raka dojk, z Northern blotting pa so analizirali GR mRNA. Za korelacijo med izražanjem mRNA in izražanjem specifičnega proteina, v katerega se mRNA prevede, vemo, da je od gena do gena različna, konkretno za izražanje mRNA GR in proteina GR pa po našem vedenju še neraziskana (41).

Primerjali smo tudi izraženost GR in odgovor na NAST, kjer je bil odstotek pCR pri pozitivnih GR za 9,6 % višji kot pri negativnih GR, vendar na našem (majhnem) vzorcu to ni bilo statistično značilno različno. Morda je to povezano z dejstvom, da je delež tumorjev s pozitivnimi GR (sicer statistično neznačilno) najvišji pri HER-2 pozitivnem in trojno negativnem podtipu, kjer je delež pCR najvišji (višji v primerjavi z luminalnim B podtipom). Na (neznačilno) povezanost izraženosti GR in pCR verjetno vpliva tudi dejstvo, da je v skupini s poz. GR statistično značilna višja izraženost TIL kot v skupini z neg. GR, pCR pa je značilno povezan z izražanjem TIL. Glede na naše rezultate lahko sklepamo, da izraženost GR ni uporabna kot samostojni prediktivni dejavnik odgovora na NAST pri raku dojk. Ta ugotovitev nam da misliti, da se signalne poti GR prek sintetičnih GK ne vpletajo v delovanje citostatikov. V literaturi smo zaznali veliko število ujemajočih se in nasprotujočih si ugotovitev. Nejasna je že sama vloga GK/GR v tumorju, neodvisno od terapije s citostatiki. Različne raziskave

Slika 6: Primerjava med odgovorom na neoadjuvantno sistemsko terapijo glede na izraženost glukokortikoidnih receptorjev.



govorijo v prid GK/GR kot proto-onkogenov, ki prek različnih signalnih poti pospešujejo celično proliferacijo in s tem razvoj tumorja, ugotavlja pa se tudi, da naj bi bil učinek GK/GR odvisen od koncentracije GK (10,42,43). V naši študiji nismo proučevali morebitne vloge prejetih eksogenih GK in različnih citostatikov na pCR in drugih izidov, kot sta preživetje brez ponovitve bolezni in celokupno preživetje, bi pa to bilo vsekakor smiselno preučiti.

ZAKLJUČEK

Uspešno smo uvedli IHK-barvanje s protitelesi proti GR, protokol smo kalibrirali in ga validirali. Pozitivni GR so prisotni pri več kot 87,5 % tumorjev, neodvisno od molekularnega podtipa. Odstotek pCR je bil za skoraj 10 % višji pri tumorjih s pozitivnimi GR, vendar statistično neznačilno in posledično GR ni prediktivni dejavnik za pCR na NAST.

LITERATURA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(3): 209-249.
2. Novaković S, Zakotnik B, Žgajnar J, Duratović Kunjević A, Kovač V, uredniki. 34. onkološki vikend: ob 25-letnici Združenja za senologijo SZD: 25 let razvoja zdravljenja raka dojk v Sloveniji: dosedanji uspehi in pogled naprej in državni program obvladovanja raka: zbornik: Bled, Rikli Balance Hotel, 25. in 26. november 2022. Ljubljana: Kancerološko združenje Slovenskega zdravniškega društva, Onkološki inštitut; 2022.
3. International Agency for Research on cancer, World Health Organization. Breast Cancer Awareness Month [spletna stran na internetu] [pridobljeno 5.8.2023]. Lyon: International Agency for Research on cancer; 2023. Dostopno na: <https://www.iarc.who.int/news-events/breast-cancer-awareness-month-2022/>.
4. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S et al. ESMO Guidelines Committee. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015; 26(5): 8-30.
5. Moo TA, Sanford R, Dang C et al.. Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clin.* 2018; 13(3): 339-354.
6. Nicolaides NC, Galata Z, Kino T et al. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids.* 2010; 75(1): 1-12.
7. Block TS, Murphy TI, Munster PN et al. Glucocorticoid receptor expression in 20 solid tumor types using immunohistochemistry assay. *Cancer Manag Res.* 2017; 9: 65-72.
8. Lien HC, Lu YS, Cheng AL et al. Differential expression of glucocorticoid receptor in human breast tissues and related neoplasms. *J Pathol.* 2006; 209 (3): 317-27.
9. Baschant U, Tuckermann JT. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010; 120 (2-3): 69-75.
10. Vilasco M, Communal L, Mourra N et al. Glucocorticoid receptor and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 130 (1): 1-10.
11. Al-Alem U, Mahmoud AM, Batai K et al. Genetic Variation and Immunohistochemical Localization of the Glucocorticoid Receptor in Breast Cancer Cases from the Breast Cancer Care in Chicago Cohort. *Cancers (Basel).* 2021; 13 (10): 2261.
12. Noureddine LM, Tredan O, Hussein N et al. Glucocorticoid Receptor: A Multifaceted Actor in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (9): 4446.
13. Keith BD. Systematic review of the clinical effect of glucocorticoids on nonhematologic malignancy. *BMC Cancer.* 2008; 84 (8).
14. Elkashif A, Bingham V, Haddock P et al. Glucocorticoid Receptor Expression Predicts Good Outcome in response to Taxane-Free, Anthracycline-Based Therapy in Triple Negative Breast Cancer. *J Oncol.* 2020 May 20;2020:3712825.
15. Mitre Aguilar IB, Moreno Mitre D, Melendez Zajgla J et al. The Role of Glucocorticoids in Breast Cancer Therapy. *Curr Oncol.* 2022; 30(1): 298-314.

16. Grunberg SM, Dugan M, Muss H et al. Effectiveness of a single-day three-drug regimen of dexamethasone, palonosetron, and aprepitant for the prevention of acute and delayed nausea and vomiting caused by moderately emetogenic chemotherapy. *Support Care Cancer*. 2009; 17 (5): 589-94.
17. Chen Z, Lan X, Wu D et al. Ligand-dependent genomic function of glucocorticoid receptor in triple-negative breast cancer. *Nat Commun*. 2015; 6: 8323.
18. Sorrentino G, Ruggeri N, Zannini A et al. Glucocorticoid receptor signalling activates YAP in breast cancer. *Nat Commun*. 2017; 8: 14073.
19. Yang F, Ma Q, Liu Z et al. Glucocorticoid Receptor: MegaTrans Switching Mediates the Repression of an ER α -Regulated Transcriptional Program. *Mol Cell*. 2017; 66 (3): 321-331.
20. Karmakar S, Jin Y, Nagaich AK. Interaction of glucocorticoid receptor (GR) with estrogen receptor (ER) α and activator protein 1 (AP1) in dexamethasone-mediated interference of ER α activity. *J Biol Chem*. 2013; 288 (33): 24020-34.
21. Pan D, Kocherginsky M, Conzen SD. Activation of the glucocorticoid receptor is associated with poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Res*. 2011; 71 (20): 6360-70.
22. Bakour N, Moriarty F, Moore G et al. Prognostic Significance of Glucocorticoid Receptor Expression in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. 2021; 13(7): 1649.
23. Gandhi S, Elkhanany A, Oshi M et al. Contribution of Immune Cells to Glucocorticoid Receptor Expression in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(13): 4635.
24. Whiteside TL. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Role in Solid Tumor Progression. *Exp Suppl*. 2022; 113: 89-106.
25. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol*. 2018; 19 (1): 40-50.
26. Zgura A, Galesa L, Bratila E et al. Relationship between Tumor Infiltrating Lymphocytes and Progression in Breast Cancer. *Maedica (Bucur)*. 2018; 13(4): 317-320.
27. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol*. 2017; 17 (4): 233-247.
28. Acharya N, Madi A, Zhang H et al. Endogenous Glucocorticoid Signaling Regulates CD8⁺ T Cell Differentiation and Development of Dysfunction in the Tumor Microenvironment. *Immunity*. 2020; 53 (3): 658-671.
29. Deng Y, Xia X, Zhao Y et al. Glucocorticoid receptor regulates PD-L1 and MHC-I in pancreatic cancer cells to promote immune evasion and immunotherapy resistance. *Nat Commun*. 2021; 12 (1): 7041.
30. Prabhu JS, Patil S, Rajarajan S et al. Triple-negative breast cancers with expression of glucocorticoid receptor in immune cells show better prognosis. *Ann Oncol*. 2021; 32 (2): 35.
31. Basu A, Ramamoorthi G, Jia Y et al. Immunotherapy in breast cancer: Current status and future directions. *Adv Cancer Res*. 2019; 143(295-349).
32. Baker GM, Murphy T, Block T et al. Development and validation of an immunohistochemistry assay to assess glucocorticoid receptor expression for clinical trials of mifepristone in breast cancer. *Cancer Manag Res*. 2015; 7: 361-8.
33. Oakley RH, Cidlowski JA. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 132 (5): 1033-44.
34. Ahmad Fauzi MF, Wan Ahmad WSHM, Jamaluddin MF et al. Allred Scoring of ER-IHC Stained Whole-Slide Images for Hormone Receptor Status in Breast Carcinoma. *Diagnostics*. 2022; 12 (12): 3093.
35. Earl H, Provenzano E, Abraham J et al. Neoadjuvant trials in early breast cancer: pathological response at surgery and correlation to longer term outcomes - what does it all mean? *BMC Med*. 2015; 13: 234.
36. Altman N, Krzywinski M. P values and the search for significance. *Nat Methods*. 2017; 14: 3-4.
37. Amrhein V, Greenland S, McShane B. Retire statistical significance. *Nature*. 2019; 567: 305-307.
38. Catteau X, Simon P, Buxant F et al. Expression of the glucocorticoid receptor in breast cancer-associated fibroblasts. *Mol Clin Oncol*. 2016; 5 (4): 372-376.
39. Kreidieh F, Sadek RF, Zhang LF et al. Validity of I% Hormonal Receptor Positivity Cutoff by the ASCO/College of American Pathologists Guidelines at the Georgia Cancer Center. *JCO Precis Oncol*. 2022 Feb;6:e2100201.
40. deFazio A, Chiew YE, McEvoy M et al. Antisense estrogen receptor RNA expression increases epidermal growth factor receptor gene expression in breast cancer cells. *Cell Growth Differ*. 1997; 8 (8): 903-11.
41. Gry M, Rimini R, Strömberg S et al. Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genomics*. 2009; 10: 365.
42. Giudice A, Aliberti SM, Barbieri A et al. Potential Mechanisms by which Glucocorticoids Induce Breast Carcinogenesis through Nrf2 Inhibition. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2022; 27(7): 223.
43. Mojica CAR, Ybanez WS, Olarte KCV et al. Differential Glucocorticoid-Dependent Regulation and Function of the ERFFI1 Gene in Triple-Negative Breast Cancer. *Endocrinology*. 2020 Jul 1;161(7):bqaa082.

© Avtor(ji). To delo je objavljeno pod licenco Creative Commons Priznanje avtorstva 4.0.

© The author(s). This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>