CHỮ VIẾT TẮT

AJCC : American Joint Committee on Cancer
BTD : Bậc tự do
CK : Cytokeratin
cs : Cộng sự
ĐMH : Độ mô học
EGFR : Epithelial growth factor receptor
ER : Estrogen receptor
FDA : US Food and Drug Administration
FISH : Fluorescence in situ hybridization (Phương pháp lai tại chỗ gắn huỳnh quang)
GĐ : Giai đoạn
GPB : Giải phẫu bệnh
HE : Hematoxylin-Eosin
HMMD : Hóa mô miễn dịch
hpf : High power field (Vi trường có độ phóng đại lớn)
HR : Hormone Receptor (Thụ thể nội tiết)
ICD : Immunogenic cell death (chết tế bào do miễn dịch)
Lâm sàng : Lâm sàng
LUMA : Luminal A (Lòng ống A)
LUMB : Luminal B (Lòng ống B)
MBH : Mô bệnh học
NPI : Nottingham prognostic index (Chỉ số tiên lượng Nottingham)
NST : No Specific type (typ không đặc biệt)
pCR : Pathology Complete Response (Đáp ứng bệnh học hoàn toàn)
PR : Progesteron receptor
TALs : Tumor associated lymphocytes (lympho kết hợp u)
TB : Trung bình
TDLU : Terminal Ductal Lobular Unit (Đơn vị tiểu thùy ống tận)
TEBs : Tubule End Buds (đầu các nụ tận)
TILs : Tumor infiltrating lymphocytes (lympho xâm nhập u)
TLPT : Trọng lượng phân tử
TNB- : Triple negative-non-basal (Bộ ba âm tính-không phải dạng đáy)
TNB+ : Triple negative-basal (Bộ ba âm tính-dạng đáy)
TNM : Tumor, Node, Metastasis
TNP : Triple negative phenotyp (phenotyp bộ ba âm tính)
TTXN : Tiểu thùy xâm nhập
UTBM : Ung thư biểu mô
WHO : World Health Organization (Tổ chức y tế thế giới)
XN : Xâm nhập

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư vú với hình ảnh mô bệnh học (MBH) tương tự nhau có thể biểu hiện lâm sàng, mức độ ác tính và đáp ứng với điều trị trái ngược nhau. Sự khác biệt này có thể là do sự hạn chế của bảng phân loại ung thư vú hiện thời, chủ yếu dựa vào hình thái học. Lý giải điều này là có thể do các tế bào u của cùng typ MBH xuất phát từ nguồn gốc khác nhau (tế bào mầm ung thư).

Các nghiên cứu về sự bộc lộ gen làm thay đổi cách phân loại ung thư vú ở mức độ phân tử. Sự phân tích khía cạnh bộc lộ gen và các đặc trưng hóa mô miễn dịch (HMMD) cho rằng ung thư vú không phải là một thực thể đơn thuần mà là một bệnh không đồng nhất, gồm một số typ sinh học đã được nhận ra. Gần đây, "chân dung phân tử" của các khối u vú đã được phát hiện qua phương pháp "phân cụm thứ bậc" của các nhóm gen. Các typ phân tử khác nhau rõ rệt về chủng tộc/sắc tộc, phân bố các yếu tố nguy cơ, tiên lượng, đáp ứng với điều trị, kết quả lâm sàng và cả thời gian sống thêm toàn bộ và không bệnh.

Bên cạnh việc sử dụng bảng phân loại MBH để phân typ MBH ung thư vú, chúng ta cần nhuộm HMMD để phân typ phân tử ung thư vú nhằm cung cấp các thông tin quan trọng để xác định các nhóm bệnh nhân cần được điều trị bổ trợ và cung cấp các thông tin dự báo tiên lượng bệnh chính xác. Ở Việt Nam, nghiên cứu về ứng dụng HMMD để phân typ phân tử ung thư vú chưa nhiều hoặc sử dụng các bảng phân loại với các tiêu chuẩn HMMD khác nhau. Chính vì lý do trên, chúng tôi chọn đề tài **"Nghiên cứu áp dụng phân loại phân tử ung thư biểu mô tuyến vú bằng phương pháp hóa mô miễn dịch"** nhằm các mục tiêu sau:

1. ***Xác định tỷ lệ các typ phân tử của ung thư biểu mô tuyến vú.***
2. ***Đánh giá mối liên quan giữa các typ phân tử với một số đặc điểm giải phẫu bệnh – lâm sàng của ung thư biểu mô tuyến vú.***

Những đóng góp mới và ý nghĩa thực tiễn của luận án

Thông qua nhuộm HMMD sử dụng bảng phân loại của Bhargava với các tiêu chuẩn HMMD rõ ràng, các typ lòng ống A và B chỉ bộc lộ với thụ thể nội tiết đơn thuần, các ung thư vú có thụ thể nội tiết và HER2+ được xếp vào một nhóm riêng, từ đó xác định các typ phân tử ung thư vú tương ứng với các phác đồ điều trị và tiên lượng khác nhau. Qua nghiên cứu này giúp cho các thầy thuốc lâm sàng áp dụng vào điều kiện thực tế của Việt Nam để đề ra phương pháp điều trị thích hợp và tiên lượng bệnh thêm chính xác.

Giới thiệu luận án: luận án dài 141 trang (chưa kể tài liệu tham khảo và phụ lục) gồm 4 chương: đặt vấn đề (2 trang), tổng quan tài liệu (37 trang), đối tượng và phương pháp nghiên cứu (16 trang), kết quả nghiên cứu (35 trang), bàn luận (48 trang), kết luận (2 trang), kiến nghị (1 trang), với 31 bảng, 5 biểu đồ, 5 hình, 7 ảnh, 134 tài liệu tham khảo (9 tài liệu tiếng Việt và 125 tài liệu tiếng Anh).

Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tế bào mầm ung thư và typ phân tử

Các nghiên cứu phân tử so sánh các tín hiệu gen đã xác định các quần thể biểu mô tuyến vú đại diện cho các phân nhóm ung thư khác nhau, điều này gợi ý rằng các tế bào nguồn khác nhau có thể sinh ra các phân nhóm u khác nhau. Tín hiệu gen tế bào mầm đa tiềm năng của vú/đáy kết hợp chặt chẽ nhất với kiểu bộc lộ gen của typ claudin-thấp, trong khi tín hiệu gen typ lòng ống tiền thân gần giống nhất với các tín hiệu gen của typ dạng đáy. Hơn nữa, các tế bào lòng ống tiền thân $ALDH^+$ ER^- tại mô vú ở người biểu hiện tín hiệu gen có liên quan chặt chẽ với typ dạng đáy. Tuy nhiên, các tế bào nguồn của các typ còn lại (LUMA, B và HER2) khó xác định. Mặc dù, kiểu bộc lộ của typ LUMA phù hợp với các tín hiệu gen tế bào lòng ống trưởng thành, nó có khả năng được coi như là một tập hợp con của tế bào nguồn trong quần thể này.

1.2. Phân loại phân tử ung thư biểu mô tuyến vú

1.2.1. Lịch sử phân loại phân tử UTBM tuyến vú

Năm 2000, Perou và cs đã nghiên cứu các kiểu bộc lộ gen của tế bào UTBM tuyến vú. Bằng việc sử dụng phương pháp phân cụm theo thứ bậc, có thể phân biệt các tín hiệu gen trong ung thư vú tương tự các gen phát hiện ở tế bào lympho, biểu mô, tế bào mỡ và tế bào đệm. Đây là cơ sở để phân loại phân tử ung thư vú. Năm 2002, van't Veer và cs đã thực hiện một nghiên cứu dựa vào sự bộc lộ gen và vai trò của nó trong ung thư vú, đề xuất sử dụng phương pháp này để phân loại phân tử nhằm lựa các chọn bệnh nhân có thể được hưởng lợi từ hóa trị. Năm 2003, Sorlie và cs đã sửa đổi phân loại phân tử này.

1.2.4. Phân loại phân tử ung thư vú bằng HMMD

Do sự đơn giản và sự phù hợp về lâm sàng của phân loại phân tử, các dấu ấn HMMD có thể được sử dụng để xác định các thứ typ phân tử trong chẩn đoán thường quy. Sự phù hợp không thể đạt được 100% giữa phân loại phân tử (sử dụng bộ gen nội sinh) và tiêu chuẩn HMMD, nhưng một công thức để sử dụng trong thực hành bệnh học hàng ngày là có thể thực hiện được. Phương pháp này biểu hiện một sự thay đổi khả thi bởi vì một nửa các trường hợp ung thư vú xảy ra ở các nước nơi mà sự phân tích các yếu tố tiên lượng cần tới sự tiết kiệm, dễ thực hiện và có thể làm được.

1.2.5. Các typ phân tử UTBM tuyến vú

1.2.5.1. Typ lòng ống A và B

Typ lòng ống A (LUMA) là loại biệt hóa cao nhất, chiếm 30,7 – 55,0% ung thư vú, gồm các typ MBH: ống và tiểu thùy, song cũng có typ đặc biệt với tiên lượng tốt, như typ ống nhỏ, nhầy, mắt sàng.

Typ lòng ống B (LUMB) chiếm 16,0-20,4% ung thư vú. Chúng bao gồm cả typ ống và tiểu thùy và thường biệt hóa vừa. Các u tiểu thùy cũng có cả hai typ kinh điển và đa hình.

Typ lòng ống bộc lộ thụ thể nội tiết và các dấu ấn biểu mô lòng ống của tuyến vú. Chúng bộc lộ CK8/18, ER và các gen kết hợp với sự hoạt hóa của chúng như LIV1 và CCND1. Dưới 20% các u lòng ống có đột biến p53 và thường là ĐMH I. Typ LUMA bộc lộ gen ER cao hơn và bộc lộ gen tăng sinh tế bào thấp hơn typ LUMB.

Đặc trưng lâm sàng: Typ LUMB có ĐMH cao hơn. Typ lòng ống thường gặp ở phụ nữ lớn tuổi, 54-58 tuổi, sau mãn kinh và GĐ I hoặc II, kích thước u nhỏ hơn. Typ LUMB xu hướng di căn hạch cao hơn LUMA.

Đáp ứng với điều trị: typ lòng ống có tiên lượng tốt, tuy nhiên, typ LUMB có tiên lượng xấu hơn LUMA. Ung thư vú ER(+) ít đáp ứng với hóa trị. Tỷ lệ đáp ứng bệnh học hoàn toàn ở typ LUMA là 1,8%, LUMB là 1,6% so với 33% ở typ HER2 và 30,3% ở typ dạng đáy. Typ LUMA có thời gian sống thêm 5 năm không bệnh cao nhất.

1.2.5.2. Typ HER2

Typ HER2 chiếm 4,0 -16,0% ung thư vú. Về MBH, typ này thường không hình thành ống và nhân đa hình, ĐMH cao. Tuy nhiên, nhân chia 3 điểm chiếm <1/4 typ HER2. Do đó, NPI thường là 7 hoặc 8 điểm. Sự biệt hóa tiết rụng đầu chiếm ưu thế ở typ HER2. Typ này cũng có một số đặc điểm: hoại tử, xâm nhập bạch mạch, thường thấy ở u TNP. Typ HER2 được đặc trưng bởi sự bộc lộ quá mức các gen khác như GRB7 trong giải trình tự ERBB2. Như typ dạng đáy, typ HER2 có tỷ lệ đột biến p53 cao (40-80%).

Đặc trưng lâm sàng: không thấy sự kết hợp giữa typ HER2 với tuổi, chủng tộc hoặc bất kỳ nguy cơ khác. Mặc dù typ HER2 và typ dạng đáy ở cùng nhóm ER(-), song về LS có sự khác nhau giữa chúng.

Đáp ứng điều trị: tiên lượng xấu. Khác với typ dạng đáy, typ HER2 có thuốc nhắm trúng đích: kháng thể đơn dòng kháng HER2 là trastuzumad. Hiệu quả của trastuzumab khi kết hợp với hóa trị trong ung thư vú di căn và tái phát giảm rõ rệt là nền tảng để khẳng định rằng có thể kiểm soát khối u với liệu pháp nhắm trúng đích.

1.2.5.3. Ung thư biểu mô ba âm tính và typ dạng đáy

U bộ ba âm tính (typ dạng đáy) chiếm xấp xỉ 16,0 - 22,0% các ung thư vú. Về hình thái, hay gặp 3 typ: dạng đám, ống không đặc hiệu, hoặc bán hủy, có thể có đặc điểm dị sản tế bào hình thoi. Nhân đa hình cao, 2-5 nhân chia/1 hfp, hoại tử cục bộ và xâm nhập lympho, tương bào giống như

UTBM thể tủy. Bờ xâm lấn, hiếm có thành phần nội ống và tăng sinh vi mạch dạng cầu thận. Typ dạng đáy không bộc lộ ER và các gen liên quan, bộc lộ HER2 thấp, bộc lộ mạnh với CK5/6, CK17 và các gen tăng sinh tế bào cao. Các khối u này rất ác tính, ĐMH cao và thường có đột biến p53.

Đặc trưng lâm sàng: 80-90% các u TNP là typ dạng đáy. Phần lớn các phụ nữ có BRCA1(+) thường phát triển thành loại u này. Ở khối u này, tỷ lệ di căn hạch không tương ứng theo kích thước u như các typ khác.

Đáp ứng với điều trị: có tiên lượng xấu. Tuy nhiên, khối u này nhạy cảm cao với hóa trị. TNP nói chung và typ dạng đáy nói riêng có tỷ lệ đáp ứng bệnh học hoàn toàn lớn hơn typ lòng ống.

1.2.5.4. Typ lòng ống A và B lai HER2

LAHH và LBHH chiếm <9% ung thư vú. Về hình thái, chúng biệt hóa vừa và ưu thế thể ống không đặc biệt. Tuy nhiên, UTBM tiểu thùy đa hình cũng nằm trong nhóm này nếu chúng có HER2+. Typ LAHH bộc lộ ER thường cao hơn LBHH. Một số u LBHH cũng có thể có hình thái biệt hóa tiết rụng đầu. Về các đặc trưng GPB-LS, HMMD, điều trị, tiên lượng, các typ này kết hợp giữa typ lòng ống và typ HER2. Sự đáp ứng bệnh học hoàn toàn với điều trị của typ LAHH là 0% và LBHH là 8,3%, thấp hơn nhiều so với typ HER2 và dạng đáy.

1.3.2. Ứng dụng HMMD trong phân typ phân tử UTBM tuyến vú

Phân typ phân tử có thể được thực hiện bằng sự phân tích gen kết hợp với kết quả HMMD. Mặc dù độ nhạy kém hơn, HMMD có thể là một sự thay thế phân tích gen có ích.

Typ lòng ống: bộc lộ ER, PR, Bcl-2 và CK8/18 và Ki67 thấp. Một dấu ấn bổ sung là GATA3, bộc lộ ở typ lòng ống, với mức cao hơn chủ yếu ở typ LUMA, nó cho thấy một sự tiên lượng tốt hơn. Typ LUMA bộc lộ ER cao và có tiên lượng tương đối tốt.

Typ lòng ống lai HER2 (LAHH và LBHH): mức độ bộc lộ ER ở typ LAHH thường cao hơn LBHH. Kiểu hình miễn dịch của các typ này tương tự như typ lòng ống nói chung và typ HER2.

Typ HER2: biểu hiện HER2(+) và HR(-). Một số trường hợp typ HER2 cũng có thể bộc lộ EGFR. Các trường hợp HER2(2+) cần sử dụng FISH để đánh giá sự khuếch đại gen HER2.

Typ dạng đáy: ER(-), PR(-), HER2(-) và bộc lộ với CK5/6 và/hoặc EGFR. Chỉ số Ki-67 cao. UTBM dạng đáy có đặc điểm dị sản bộc lộ với EGFR, CK5/6, CK14, CK17 và p63 ở phần lớn các trường hợp.

Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Gồm mẫu bệnh phẩm kèm theo hồ sơ bệnh án của 495 bệnh nhân ung thư vú xâm nhập được điều trị phẫu thuật cắt vú tại Bệnh viện K từ 01/2012 đến tháng 6/2014.

2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn

- Có ghi nhận đầy đủ các dữ kiện: họ tên, tuổi, ngày vào viện, kinh nguyệt, vị trí khối u, chẩn đoán và giai đoạn lâm sàng.
- Được phẫu thuật cắt tuyến vú và vét hạch.
- Khối u vú nguyên phát và chưa điều trị hóa chất trước mổ cắt u.
- Có chẩn đoán MBH là ung thư biểu mô tuyến vú xâm nhập.
- Có khối nến đủ tiêu chuẩn để nhuộm HMMD.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

- Không đáp ứng được các tiêu chuẩn chọn trên.
- Ung thư biểu mô tuyến vú tại chỗ hoặc tái phát, ung thư vú nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: mô tả cắt ngang

2.2.2. Nội dung nghiên cứu

Các biến số nghiên cứu gồm:

- Phân typ phân tử ung thư vú và sự bộc lộ dấu ấn HMMD: ER, PR, HER2, Ki-67, p53, p63, CK5/6, CK17, CK18, Bcl2, EGFR.
- Các thông số GPB-LS: Tuổi, tình trạng kinh nguyệt, vị trí, GĐ, mức độ nguy cơ, typ và nhóm MBH, ĐMH, NPI, tình trạng hạch, kích thước, XN bạch mạch, thành phần ung thư tại chỗ, hoại tử, XN lympho.

2.2.3 Cách thức tiến hành

Thu thập các mẫu mô ung thư vú tại Khoa Giải phẫu bệnh - Bệnh viện K để nhuộm H-E và HMMD. Nhận định kết quả MBH, ĐMH và HMMD: các tiêu bản đều được nhận định kết quả bởi NCS và cán bộ hướng dẫn. Xác định typ MBH theo phân loại của WHO-2012, phân typ phân tử theo bảng phân loại của Bhargava. Các thông số LS được thu thập từ hồ sơ bệnh án của bệnh nhân.

2.2.4. Xử lý số liệu: Sử dụng phần mềm SPSS 10.0.

Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân loại phân tử ung thư biểu mô tuyến vú

3.1.1. Phân bố các typ phân tử

Bảng 3.1: Phân bố các typ phân tử

		N		%	
Typ lòng ống A (LUMA)		165		33,3	
Typ lòng ống B (LUMB)		74		14,9	
Bộ ba âm tính	Không dạng đáy	103	18	20,8	3,6
	Dạng đáy		85		17,2
Typ HER2		99		20,0	
Typ LAHH		17		3,5	
Typ LBHH		37		7,5	
Tổng số		495		100,0	

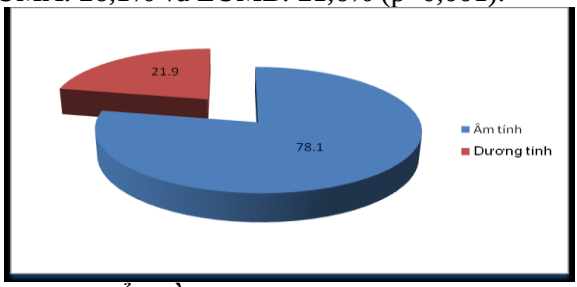
Nhận xét: typ LUMA chiếm tỷ lệ cao nhất 33,3%, HER2 (20,0%), typ TNB+: 17,2%, LUMB: 14,9%, các typ khác chiếm tỷ lệ thấp.

3.2. Typ phân tử và sự bộc lộc các dấu ấn HMMD, HER2

Bảng 3.5: Sự bộc lộ HER2 theo các typ phân tử

HER2	0/1+		2+		3+		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%	N	%
LUMA	122	73,9	43	26,1	0	0,0	165	33,3
LUMB	58	78,4	16	21,6	0	0,0	74	14,9
TNB-	13	72,2	5	27,8	0	0,0	18	3,6
TNB+	74	87,1	11	12,9	0	0,0	85	17,2
HER2	0	0,0	14	14,1	85	85,9	99	20,0
LAHH	0	0,0	2	11,8	15	88,2	17	3,5
LBHH	0	0,0	5	13,5	32	86,5	37	7,5
Σ	267	53,9	96	19,4	132	26,7	495	

Nhận xét: HER2(3+): 26,7%. Ở HER2(2+), typ TNB- chiếm tỷ lệ cao nhất: 27,8%, typ LUMA: 26,1% và LUMB: 21,6% (p<0,001).



Biểu đồ 3.1: HER2(2+) và FISH

Nhận xét: 21,9% bệnh nhân HER2(2+) có khuếch đại gen HER2.

Bảng 3.6: Sự bộc lộ Ki67 theo các typ phân tử

Ki67	Thấp		TB		Cao		Tổng số		Trung bình
	n	%	n	%	n	%	N	%	
LUMA	97	58,8	34	20,6	34	20,6	165	33,3	19,5±1,6
LUMB	41	55,4	17	23,0	16	21,6	74	14,9	21,6±2,9
TNB-	6	33,3	2	11,1	10	55,6	18	3,6	43,8±3,2
TNB+	23	27,1	15	17,6	47	55,3	85	17,2	
HER2	27	27,3	21	21,2	51	51,5	99	20,0	38,4±2,9
LAHH	3	17,6	7	41,2	7	41,2	17	3,5	32,1±5,4
LBHH	9	24,3	9	24,3	19	51,4	37	7,5	32,4±3,8
	206	41,6	105	21,2	184	37,2	495		

Nhận xét: ở Ki67 thấp: typ LUMA và B: 58,8% và 55,4%. Trái lại, ở Ki67 cao: các typ TNB- (55,6%), TNB+ (55,3%), typ HER2(51,5%) và LBHH (51,4%). Sự tiên lượng giảm dần: LUMA, LUMB, LAHH, HER2, LBHH, TNB- và TNB+ ($p<0,001$).

Bảng 3.7: Tình trạng p53 trong các typ phân tử

p53	0 điểm		1 điểm		2 điểm		3 điểm		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%
LUMA	124	75,1	17	10,3	11	6,7	13	7,9	165	33,3
LUMB	46	62,1	7	9,5	10	13,5	11	14,9	74	14,9
TNB-	2	11,1	0	0,0	7	38,9	9	50,0	18	3,6
TNB+	32	37,7	4	4,7	15	17,6	34	40,0	85	17,2
HER2	37	37,4	1	1,0	23	23,2	38	38,4	99	20,0
LAHH	6	35,3	1	5,9	5	29,4	5	29,4	17	3,5
LBHH	11	29,7	1	2,7	11	29,7	14	37,9	37	7,5
Σ	258	52,1	31	6,3	82	16,6	124	25,0	495	

Nhận xét: TNB-, TNB+, HER2 và LBHH có tỷ lệ p53(+) 3 điểm cao nhất: 50,0%; 40,0%; 38,4% và 37,9%. Sự tiên lượng giảm dần: LUMA, LUMB,LAHH, HER2, LBHH, TNB+ và TNB- ($p<0,001$).

Bảng 3.8: Tình trạng Bcl2 trong các typ phân tử

Bcl-2	Âm tính		Dương tính		Tổng số	
	n	%	n	%	N	%
LUMA	21	12,7	144	87,3	165	33,3
LUMB	16	21,6	58	78,4	74	14,9
TNB-	14	77,8	4	22,2	18	3,6
TNB+	58	68,2	27	31,8	85	17,2
HER2	76	76,8	23	23,2	99	20,0
LAHH	6	35,3	11	64,7	17	3,5
LBHH	12	32,4	25	67,6	37	7,5
Σ	203	41,0	292	59,0	495	

Nhận xét: LUMA, B và LAHH, LBHH có tỷ lệ Bcl2(+) cao nhất: 87,3%; 78,4%; 64,7% và 67,6%. Sự tiên lượng giảm dần: LUMA, LUMB, LBHH, LAHH, TNB+, HER2 và TNB- (p<0,001).

Bảng 3.9: Sự bộc lộ p53-Bcl2 theo các typ phân tử

P53,Bcl2	(+)(+)		(+)(-)		(-)(+)		(-)(-)		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%
LUMA	37	22,4	3	1,8	106	64,3	19	11,5	165	33,3
LUMB	21	28,4	7	9,4	37	50,0	9	12,2	74	14,9
TNB-	3	16,6	13	72,2	1	5,6	1	5,6	18	3,6
TNB+	20	23,5	32	37,7	8	9,4	25	29,4	85	17,2
HER2	13	13,1	49	49,5	9	9,1	28	28,3	99	20,0
LAHH	6	35,3	5	29,4	5	29,4	1	5,9	17	3,5
LBHH	19	51,4	7	18,9	6	16,2	5	13,5	37	7,5
Σ	119	24,1	116	23,4	172	34,7	88	17,8	495	

Nhận xét: LUMA và B có p53(-)Bcl2(+) cao nhất: 64,3% và 50,0%. Trái lại, TNB-, TNB+ và HER2 chiếm tỷ lệ cao nhất ở p53(+)Bcl2(-): 72,2%, 37,7% và 49,5%. Sự tiên lượng giảm dần: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, HER2, TNB+ và TNB- (p<0,001).

3.1.3. Sự bộc lộ CK18, Bcl2 ở typ lòng ống

Bảng 3.10-11: Tình trạng CK18 và Bcl2 ở typ lòng ống

Dấu ấn		LUMA		LUMB		LAHH		LBHH		Tổng số		p
		n	%	n	%	n	%	n	%	N	%	
CK18	-	2	1,2	3	4,1	1	5,9	6	16,2	12	4,1	0,005
	+	163	98,8	71	95,9	16	94,1	31	83,8	281	95,9	
Bcl2	-	21	12,7	16	21,6	6	35,3	12	32,4	55	18,8	0,007
	+	144	87,3	58	78,4	11	64,7	25	67,6	238	81,2	
Σ		165	56,3	74	25,3	17	5,8	37	12,6	293		

Nhận xét:

- CK18(+): 95,9%, LUMA chiếm tỷ lệ cao nhất: 98,8%, LUMB: 95,9%, LAHH: 94,1% và LBHH: 83,8% (p<0,05).

- Tỷ lệ Bcl2(+): 81,2%, typ LUMA chiếm tỷ lệ cao nhất là 87,3%, typ LUMB là 78,4%, LBHH: 67,6% và LAHH là 64,7% (p<0,05).

3.1.4. Sự bộc lộ CK5/6, CK17, EGFR, p63 ở u bộ ba âm tính

Bảng 3.12-15: Tình trạng CK5/6, EGFR, p63, CK17 ở TNP

Dấu ấn		TNB+		TNB-		Tổng số		p
		n	%	n	%	N	%	
CK5/6	-	59	69,4	18	100,0	77	74,8	0,0066
	+	26	30,6	0	0,0	26	25,2	
CK17	-	39	45,9	18	100,0	57	53,3	0,00003
	+	46	54,1	0	0,0	46	44,7	
EGFR	-	41	48,2	18	100,0	59	57,3	0,00005
	+	44	51,8	0	0,0	44	42,7	
P63	-	47	55,3	18	100,0	65	63,1	0,0004
	+	38	44,7	0	0,0	38	36,9	
Σ		85	82,5	18	17,5	103		

Nhận xét: CK5/6: TNB+ có tỷ lệ CK5/6(+) là 30,6% (p<0,05). CK17: TNB+ (54,1%). EGFR: TNB+ (51,8%). P63: TNB+ (44,7%) (p<0,001).

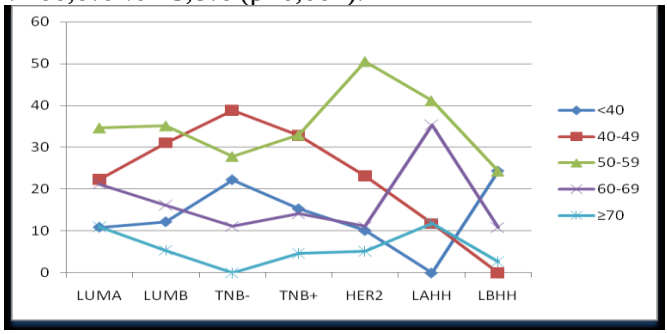
3.2. Mối liên quan giữa typ phân tử và đặc điểm GPB-LS

3.2.1. Mối liên quan typ giữa phân tử với tuổi bệnh nhân

Bảng 3.17: Mối liên quan giữa typ với nhóm tuổi trẻ và già

Tuổi	Trẻ (≤45t)		Già (≥65t)		Tổng số	
	n	%	n	%	N	%
LUMA	39	54,2	33	45,8	72	36,4
LUMB	20	69,0	9	31,0	29	14,8
TNB-	8	100,0	0	0,0	8	4,1
TNB+	27	73,0	10	27,0	37	18,9
HER2	23	74,2	8	25,8	31	15,8
LAHH	0	0,0	4	100,0	4	2,0
LBHH	12	80,0	3	20,0	15	7,6
Σ	129	65,8	67	34,2	196	

Nhận xét: Ở nhóm tuổi trẻ, TNB- chiếm 100,0%. Ở nhóm tuổi già, LAHH và LUMA: 100,0% và 45,8% (p<0,001).



Biểu đồ 3.2: Mối liên quan giữa typ phân tử với nhóm tuổi

Nhận xét: <40 tuổi: TNB- và LBHH (22,2 và 24,3%); ở 40-49 tuổi: TNB- (38,9%); ở 50-59 tuổi: HER2 (50,5%); 60-69 tuổi: LAHH (35,3%) và ≥70 tuổi: LAHH và LUMA (10,9 và 11,8%) (p<0,001).

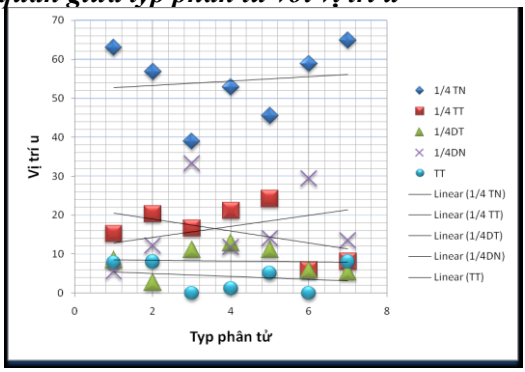
3.2.2. Mối liên quan giữa typ phân tử với kinh nguyệt

Bảng 3.18: Mối liên quan giữa typ phân tử với kinh nguyệt

Kinh nguyệt	Tiền mãn kinh		Sau mãn kinh		Tổng số	
	n	%	n	%	N	%
LUMA	71	43,0	94	57,0	165	33,3
LUMB	38	51,4	36	48,6	74	14,9
TNB-	13	72,2	5	27,8	18	3,6
TNB+	44	51,8	41	48,2	85	17,2
HER2	45	45,5	54	54,5	99	20,0
LAHH	2	11,8	15	88,2	17	3,5
LBHH	26	70,3	11	29,7	37	7,5
Σ	239	48,3	256	51,7	495	

Nhận xét: sau mãn kinh: LUMA và LAHH (57,0 và 88,2%). Tiền mãn kinh: TNB- và LBHH (72,2 và 70,3%). Sự tiên lượng giảm dần: LAHH, LUMA, LUMB, HER2, TNB+, TNB- và LBHH (p<0,001).

3.2.3. Mối liên quan giữa typ phân tử với vị trí u



Biểu đồ 3.3: Typ phân tử và vị trí u

Nhận xét: trên ngoài: LBHH và LUMA (64,9 và 63,0%). Trên trong: HER2 (24,2%). Dưới trong (TNB+: 12,9%, TNB- và HER2: 11,1%). Dưới ngoài: TNB- (33,3%) (p<0,001).

3.2.4. Mối liên quan giữa typ phân tử với giai đoạn TNM

Bảng 3.20: Mối liên quan giữa typ phân tử với giai đoạn TNM

TNM	I		II		III		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%	N	%
LUMA	65	39,4	84	50,9	16	9,7	165	33,3
LUMB	16	21,6	55	74,3	3	4,1	74	14,9
TNB-	1	5,6	11	61,1	6	33,3	18	3,6
TNB+	21	24,7	48	56,5	16	18,8	85	17,2
HER2	12	12,1	60	60,6	27	27,3	99	20,0
LAHH	6	35,3	8	47,0	3	17,7	17	3,5
LBHH	11	29,7	20	54,1	6	16,2	37	7,5
Σ	132	26,7	286	57,8	77	15,5	495	

Nhận xét: GĐ I: LUMA (39,4%). GĐ III: TNB- (33,3%). Sự tiên lượng giảm dần: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, TNB+, HER2 và TNB- (p<0,001).

3.2.5. Mối liên quan giữa typ phân tử với mức độ nguy cơ

Bảng 3.21: Mối liên quan giữa typ phân tử với mức độ nguy cơ

Nguy cơ	Thấp		Trung bình		Cao		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%	N	%
LUMA	19	11,5	110	66,7	36	21,8	165	33,3
LUMB	5	6,8	41	55,4	28	37,8	74	14,9
TNB-	0	0,0	9	50,0	9	50,0	18	3,6
TNB+	2	2,4	46	54,1	37	43,5	85	17,2
HER2	1	1,0	76	76,8	22	22,2	99	20,0
LAHH	0	0,0	14	82,4	3	17,6	17	3,5
LBHH	0	0,0	32	86,5	5	13,5	37	7,5
Σ	27	5,5	328	66,3	140	28,3	495	

Nhận xét: mức nguy cơ thấp: LUMA (11,5%). Mức nguy cơ TB: LBHH, LAHH và HER2 (86,5; 82,4% và 76,8%). Mức nguy cơ cao, TNB- và TNB+ (50,0 và 43,5%). Sự tiên lượng giảm dần: LUMA, LUMB, LBHH, LAHH, HER2, TNB+ và TNB- (p<0,001).

3.2.6. Mối liên quan giữa typ phân tử với nhóm kích thước u

Bảng 3.22: Mối liên quan giữa typ phân tử với nhóm kích thước u

Kích thước	≤2		>2-5		>5		Tổng số		Trung bình
	n	%	n	%	n	%	N	%	
LUMA	95	57,6	64	38,8	6	3,6	165	33,3	2,3±1,2
LUMB	39	52,7	34	45,9	1	1,4	74	14,9	2,5±1,4
TNB-	7	38,9	9	50,0	2	11,1	18	3,6	2,6±1,6
TNB+	42	49,4	40	47,1	3	3,5	85	17,2	
HER2	35	35,4	58	58,5	6	6,1	99	20,0	2,8±1,4
LAHH	11	64,7	6	35,3	0	0,0	17	3,5	2,2±1,8
LBHH	21	56,8	16	43,2	0	0,0	37	7,5	2,1±1,3
Σ	250	50,5	227	45,9	18	3,6	495		

Kích thước u từ 0,3-10,0cm, trung bình là 2,4±1,3cm.

Nhận xét: ở u ≤2cm: LUMA và LAHH (57,6 và 64,7%). U >5cm: TNB- (11,1%), typ HER2: 6,1%. Sự tiên lượng giảm dần: LAHH, LBHH, LUMA, LUMB, TNB+, HER2 và TNB- (p<0,05).

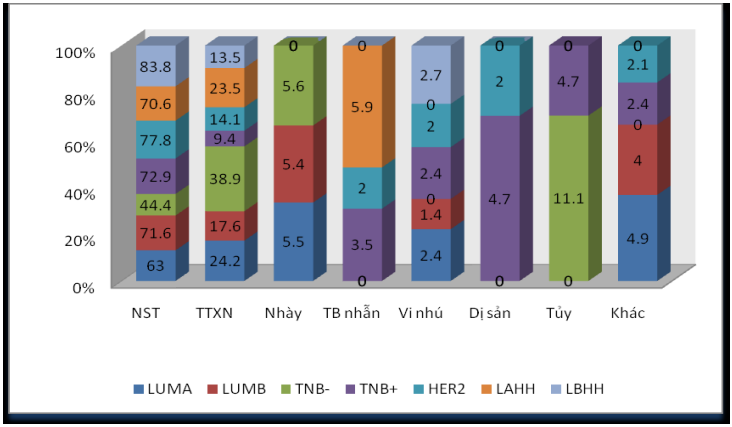
3.2.7. Mối liên quan giữa typ phân tử với tình trạng hạch

Bảng 3.23: Mối liên quan giữa typ phân tử với nhóm hạch

Nhóm hạch	0		1-3		>3		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%	N	%
LUMA	128	77,6	27	16,3	10	6,1	165	33,3
LUMB	47	63,5	23	31,1	4	5,4	74	14,9
TNB-	9	50,0	4	22,2	5	27,8	18	3,6
TNB+	48	56,5	18	21,2	19	22,3	85	17,2
HER2	49	49,5	28	28,3	22	22,2	99	20,0
LAHH	11	64,8	3	17,6	3	17,6	17	3,5
LBHH	21	56,8	11	29,7	5	13,5	37	7,5
Σ	313	63,2	114	23,0	68	13,8	495	

Nhận xét: typ TNB-, TNB+ và HER2 chiếm tỷ lệ cao ở nhóm di căn >3 hạch: 27,8%; 22,4% và 22,3%. Sự tiên lượng giảm dần: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, TNB+, HER2 và TNB- (p<0,001).

3.2.8. Mối liên quan giữa typ phân tử với typ MBH



Biểu đồ 3.5: typ phân tử và typ MBH

Nhận xét: thể tủy chỉ phân bố ở typ TNB-(11,1%) và TNB+(4,7%); thể dị sản phân bố ở TNB+(2,4%) và HER2 (2,0%) (p<0,001).

3.2.10. Mối liên quan giữa typ phân tử với độ mô học

Bảng 3.25: Mối liên quan giữa typ phân tử với độ mô học

ĐMH	I		II		III		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%	N	%
LUMA	32	19,4	63	38,2	70	42,4	165	33,3
LUMB	10	13,5	36	48,7	28	37,8	74	14,9
TNB-	1	5,6	2	11,1	15	83,3	18	3,6
TNB+	4	4,7	20	23,5	61	71,8	85	17,2
HER2	3	3,0	30	30,3	66	66,7	99	20,0
LAHH	1	5,9	7	41,2	9	52,9	17	3,5
LBHH	3	8,1	16	43,3	18	48,6	37	7,5
Σ	54	10,9	174	35,2	267	53,9	495	

Nhận xét: ĐMH I: LUMA và B: 19,4% và 13,5%. ĐMH III: TNB-, TNB+ và HER2: 83,3%; 71,8% và 66,7%. Sự tiên lượng giảm dần: LUMB, LUMA,LBHH, LAHH, HER2, TNB+ và TNB- (p<0,001).

3.2.11. Mối liên quan giữa typ phân tử với NPI

Bảng 3.26: Mối liên quan giữa typ phân tử với NPI

NPI	<3,4		3,4-5,4		>5,4		Tổng số		Trung bình
	n	%	n	%	n	%	N	%	
LUMA	53	32,1	93	56,4	19	11,5	165	33,3	3,9±1,1
LUMB	14	18,9	48	64,9	12	16,2	74	14,9	4,1±1,1
TNB-	2	11,1	9	50,0	7	38,9	18	3,6	4,8±1,1
TNB+	11	12,9	48	56,5	26	30,6	85	17,2	
HER2	10	10,1	53	53,6	36	36,4	99	20,0	4,9±1,2
LAHH	4	23,5	9	53,0	4	23,5	17	3,5	4,4±1,1
LBHH	12	32,4	15	40,6	10	27,0	37	7,5	4,4±1,2
Σ	106	21,4	275	55,6	114	23,0	495		

Nhận xét: nhóm tiên lượng xấu: typ TNB-, HER2 và TNB+ chiếm tỷ lệ cao là 38,9%; 36,4% và 30,6%. Sự tiên lượng giảm dần: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, TNB+, HER2 và TNB-($p<0,001$).

3.2.12. Mối liên quan giữa typ phân tử với mô đệm lympho

Bảng 3.27: Mối liên quan với giữa typ phân tử mô đệm lympho

XN Lympho	Không		Có		Tổng số	
	n	%	n	%	N	%
LUMA	74	44,8	91	55,2	165	33,3
LUMB	23	31,1	51	68,9	74	14,9
TNB-	4	22,2	14	77,8	18	3,6
TNB+	16	18,8	69	81,2	85	17,2
HER2	20	20,2	79	79,8	99	20,0
LAHH	8	47,1	9	52,9	17	3,5
LBHH	13	35,1	24	64,9	37	7,5
Σ	158	31,9	337	68,1	495	

Nhận xét: nhóm có xâm nhập lympho bào, typ TNB+, HER2 và TNB- chiếm tỷ lệ cao hơn: 81,2%; 79,8% và 77,8% ($p<0,001$).

3.2.13. Mối liên quan giữa typ phân tử với sự hoại tử u

Bảng 3.28: Mối liên quan giữa typ phân tử với sự hoại tử u

Hoại tử u	Không		Có		Tổng số	
	n	%	n	%	N	%
LUMA	147	89,1	18	10,9	165	33,3
LUMB	61	82,4	13	17,6	74	14,9
TNB-	13	72,2	5	27,8	18	3,6
TNB+	61	71,8	24	28,2	85	17,2
HER2	77	77,8	22	22,2	99	20,0
LAHH	16	94,1	1	5,9	17	3,5
LBHH	34	91,9	3	8,1	37	7,5
Σ	409	82,6	86	17,4	495	

Nhận xét: các typ TNB+, TNB- và HER2 đều chiếm tỷ lệ hoại tử u cao, lần lượt là 28,2%; 27,8% và 22,2% (p<0,05).

3.2.14. Mối liên quan giữa typ phân tử-xâm nhập bạch mạch

Bảng 3.29: Mối liên quan giữa typ phân tử và XN bạch mạch

XN bạch mạch	Không		Có		Tổng số	
	N	%	N	%	N	%
LUMA	145	87,9	20	12,1	165	33,3
LUMB	60	81,1	14	18,9	74	14,9
TNB-	13	72,2	5	27,8	18	3,6
TNB+	46	54,1	39	45,9	85	17,2
HER2	67	66,7	32	32,3	99	20,0
LAHH	15	88,2	2	11,8	17	3,5
LBHH	30	81,1	7	18,9	37	7,5
Σ	376	76,0	119	24,0	495	

Nhận xét: TNB+, TNB- và HER2: 45,9; 27,8 và 32,3% (p<0,001).

3.2.15. Mối liên quan giữa typ phân tử với thành phần tại chỗ

Bảng 3.30: Mối liên quan giữa typ phân tử với ung thư tại chỗ

Tại chỗ	Không		Có		Tổng số	
	n	%	n	%	N	%
LUMA	88	53,3	77	46,7	165	33,3
LUMB	33	44,6	41	55,4	74	14,9
TNB-	9	50,0	9	50,0	18	3,6
TNB+	42	49,4	43	50,6	85	17,2
HER2	36	36,4	63	63,6	99	20,0
LAHH	10	58,8	7	41,2	17	3,5
LBHH	18	48,6	19	51,4	37	7,5
Σ	236	47,7	259	52,3	495	

Nhận xét: ung thư tại chỗ, typ HER2: 63,6% (p>0,05).

Chương 4: BÀN LUẬN

4.1. Phân typ phân tử và sự bộc lộ các dấu ấn HMMD, HER2

4.1.1. Phân typ phân tử

Bảng 3.1 cho thấy typ LUMA chiếm tỷ lệ cao nhất 33,3%, typ HER2 (20,0%), typ TNB+ (17,2%), typ LUMB (14,9%), typ LBHH (7,5%), typ TNB- (3,6%) và LAHH (3,5%). Nếu chỉ tính kết quả 3 dấu ấn ER, PR và HER2 thì TNP chiếm tỷ lệ thứ 2 là 20,8%. Khi so sánh với kết quả nghiên cứu của Bhargava, chúng tôi nhận thấy các typ phân tử của chúng tôi cũng có tỷ lệ tương tự tác giả này. Tuy nhiên, tỷ lệ typ HER2 của chúng tôi cao hơn. Qua so sánh kết quả nghiên cứu của chúng tôi, của Bhargava với các tác giả trong và ngoài nước khác cho thấy mặc dù tỷ lệ các typ phân tử có thể khác nhau giữa các tác giả, nhưng một điều dễ nhận thấy rằng typ LUMA có tỷ lệ cao nhất, điều này phù hợp với tỷ lệ ung thư vú xâm nhập bộc lộ cao với thụ thể nội tiết.

4.1.2. Typ phân tử và sự bộc lộ các dấu ấn HMMD, HER2

HER2: Trong nghiên cứu của chúng tôi (bảng 3.5) sự bộc lộ HER2(3+) là 26,7%. Ở HER2(2+), typ TNB- chiếm 27,8%, LUMA: 26,1% và LUMB là 21,6%. Đây chính là các nhóm có kết quả gen HER2 không khuếch đại khi đánh giá bằng FISH. 19,4% HER2(2+) bằng nhuộm HMMD được sử dụng FISH để xác gen HER2 (biểu đồ 3.1), qua đó xác định được 21,9% HER2(2+) có khuếch đại gen HER2. Nhìn chung, tỷ lệ có khuếch đại gen ở nhóm HER2(2+) khác nhau nhiều giữa các nghiên cứu, từ 4,8-75%. Chính vì vậy, nhóm này được coi là nguồn gốc chính của sự khác biệt giữa kết quả HMMD và FISH.

Chỉ số tăng sinh nhân Ki67: Bảng 3.6 cho thấy chỉ số Ki67 TB là 30,3±1,3, chỉ số Ki67 tăng dần từ typ LUMA: 19,5±1,6, LUMB: 21,6±2,9, LAHH và LBHH là 32,1±5,4 và 32,4±3,8, typ HER2 là 38,4±2,9 và typ TNP chiếm tỷ lệ cao nhất là 43,8±3,2. Ở nhóm Ki67 thấp typ LUMA và B chiếm tỷ lệ cao nhất là 58,8% và 55,4%. Ở nhóm Ki67 cao, typ chiếm tỷ lệ cao là TNB-(55,6%), TNB+(55,3%) và HER2(51,5%). Ở nhóm K67 TB, chiếm tỷ lệ cao nhất là typ LAHH: 41,2%. Typ LUMA và B có xu hướng giảm dần từ mức độ Ki67 thấp đến Ki67 cao. Trong khi đó, các typ LAHH và LBHH tăng dần từ mức độ Ki67 thấp tới cao (p=0,0001). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự kết quả của các tác giả trong và ngoài nước. Chúng tôi nhận thấy rằng các typ có tiên lượng tốt như typ LUMA và B xu hướng có chỉ số Ki67 thấp và giảm dần theo mức độ Ki67. Trái lại, các typ có tiên lượng xấu hơn (LAHH, LBHH) hoặc tiên lượng rất xấu như TNB-, TNB+ và HER2 xu hướng có chỉ số Ki67 cao và tăng theo mức độ Ki67. Sơ đồ tiên lượng giảm dần như sau: LUMA, LUMB, LAHH, HER2, LBHH, TNB- và TNB+. Kết quả này phù hợp với nhận định của các nghiên cứu trên thế giới.

Protein gen p53 đột biến: Theo bảng 3.7, ở p53(-), typ LUMA và B có tỷ lệ cao nhất: 75,1% và 62,1%. Tương tự ở p53(+) 1 điểm, các typ LUMA và B cũng chiếm tỷ lệ cao nhất: 10,3% và 9,5%. Trái lại, ở p53(+) 3 điểm các typ TNB-, TNB+, HER2 và LBHH có tỷ lệ cao: 50,0%; 40,0%; 38,4% và 37,9%. Khi p53(+) 2 điểm, các typ LUMA và B cũng chiếm tỷ lệ thấp hơn các typ khác, lần lượt là 6,7% và 13,5% (p=0,0001). Kết quả này phù hợp với nhận định của Sorlie, Haupt và Meijnen. Qua đánh giá sự bộc lộ dấu ấn p53 theo từng typ phân tử cho thấy sơ đồ tiên lượng giảm dần như sau: LUMA, LUMB, LAHH, HER2, LBHH, TNB+ và TNB-.

Protein gen Bcl2: Trong nghiên cứu của chúng tôi (bảng 3.8) cho thấy typ LUMA, B và LAHH, LBHH đều có tỷ lệ Bcl2(+) chiếm tỷ lệ cao, lần lượt là 87,3%, 78,4%, 64,7% và 67,6% (p=0,0001).

Sự bộc lộ của Bcl2 phụ thuộc vào ER và có mối liên quan chặt chẽ giữa Bcl2 và ER trong ung thư vú. Các ung thư vú có ER(-) thường không bộc lộ với Bcl2. Qua đó thấy rằng sự bộc lộ Bcl2 giảm dần theo typ phân tử: LUMA, LUMB, LBHH, LAHH, TNB+, HER2 và TNB-. Trình tự này phù hợp với nhận định trên về mối liên quan giữa Bcl2 và ER trong nghiên cứu của Basu.

P53 và Bcl2: Trong nghiên cứu của chúng tôi (bảng 3.9) cho thấy typ LUMA và B chiếm tỷ lệ p53(-)Bcl2(+) cao nhất là 64,2% và 50,0%, tức là thuộc nhóm tiên lượng tốt. Trái lại, các typ TNB-, TNB+ và HER2 chiếm tỷ lệ cao nhất ở p53(+)Bcl2(-),là 72,2%, 37,6% và 49,5%, tức là thuộc nhóm tiên lượng xấu (p=0,0001). Qua kết so sánh với các tác giả nước ngoài, chúng tôi nhận thấy rằng typ LUMA và B có xu hướng bộc lộ cao ở p53(-)Bcl2(+), tiếp đến là nhóm p53(+)Bcl2(+). Trong khi đó typ TNB-, TNB+, HER2 chiếm tỷ lệ cao ở nhóm p53(+)Bcl2(-), tiếp đến là nhóm p53(-)Bcl2(-) đối với typ TNB+ và HER2 hoặc nhóm p53(+)Bcl2(+) đối với typ TNB-. Kết quả này có thể khái quát sự kết hợp p53 và Bcl2 theo mức độ tiên lượng giảm dần từ tốt đến xấu như sau: p53-Bcl2+ > p53-Bcl2- = p53+Bcl2+ > p53+Bcl2-, tương ứng với tiên lượng giảm dần là LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, HER2, TNB+ và TNB-.

Các dấu ấn lòng ống

CK18: bảng 3.10-11 kết quả cho thấy rằng 95,9% typ lòng ống có CK18(+), trong đó LUMA chiếm tỷ lệ cao nhất là 98,8 (p=0,005).

Qua so sánh với các nghiên cứu trên thế giới, chúng tôi nhận thấy rằng có thể bổ sung dấu ấn này vào chẩn đoán typ lòng ống và sự bộc lộ của CK18 theo typ phân tử có sự giảm dần từ typ LUMA đến typ LBHH (LUMA>LUMB>LAHH>LBHH).

Bcl2: qua bảng 3.10-11 cho thấy rằng Bcl2(+) chiếm 81,2%, typ LUMA chiếm tỷ lệ cao nhất là 87,3% (p=0,007). Chúng tôi nhận thấy rằng có sự bộc lộ Bcl2 giảm dần: LUMA>LUMB>LBHH>LAHH, tương tự CK18.

Qua so sánh với kết quả nghiên cứu của Bertolo, cũng như sự nhận định về Bcl2 của Basu, ngoài vai trò tiên lượng, Bcl2 còn là dấu ấn bổ sung để chẩn đoán typ lòng ống, đặc biệt là LUMA.

Các dấu ấn đáy

103 bệnh nhân ung thư vú TNP được nhuộm HMMD với các dấu ấn đáy để xác định typ TNB+ hoặc TNB- (bảng 3.12-15).

CK5/6(+) typ TNB+ có tỷ lệ CK5/6(+) là 30,6% (p=0,0066). Qua so sánh kết quả nghiên cứu giữa các tác giả trong và ngoài nước chúng tôi nhận thấy tỷ lệ CK5/6(+) là khác nhau giữa các tác giả, tỷ lệ CK5/6(+) ở các nghiên cứu trong nước thấp hơn các nghiên cứu ở nước ngoài. Sự khác nhau này có thể là do kỹ thuật HMMD, kháng thể sử dụng hoặc cách thức cho điểm.

CK17(+) typ TNB+ có tỷ lệ CK17(+) là 54,1% (p=0,00003). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự nghiên cứu của Lakhani, nhưng cao hơn kết quả của Eerola. Theo một số nghiên cứu các CK đáy kết hợp chặt chẽ với nhiều đặc trưng u khác như: ER(-), PR(-), HER2(-), p53(+), ĐMH cao và tuổi.

EGFR typ TNB+ có tỷ lệ EGFR(+) là 51,8% (p=0,00005). Sự bộc lộ EGFR không phải là dấu ấn đặc hiệu của typ dạng đáy như CK5/6, tuy nhiên, khi kết hợp với các dấu ấn khác đủ để xác định typ dạng đáy.

P63 typ TNB+ có tỷ lệ p63(+) là 44,7% (p=0,0004).

Qua so sánh với nghiên cứu của các tác giả trong và ngoài nước cho thấy các dấu ấn CK đáy (CK5/6 và CK17), EGFR, p63 đều có mối liên quan có ý nghĩa thống kê với TNP, chứng tỏ vai trò quan trọng của các dấu ấn này để xác định typ dạng đáy (TNB+).

* Sự bộc lộ dấu ấn HMMD theo các typ phân tử cho thấy mức độ tiên lượng giảm dần như sau: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, HER2, TNB+ và TNB-.

4.2. Typ phân tử và đặc điểm GPB-LS

4.2.1. Typ phân tử và một số đặc điểm lâm sàng

Tuổi mắc bệnh: tuổi mắc bệnh ung thư vú từ 14 đến 87 tuổi, trung bình là 52,2±11,0 tuổi. Theo từng typ phân tử chúng tôi nhận thấy rằng typ LUMA và LAHH có độ tuổi TB cao nhất, các typ TNP và HER2 có độ tuổi mắc bệnh TB trẻ hơn. Qua biểu đồ 3.2 chúng tôi nhận thấy rằng ở nhóm tuổi <40 (rất trẻ), typ TNB- và LBHH là 22,2% và 24,3%. 40-49 tuổi, typ TNB- là 38,9%. 50-59 tuổi, typ HER2 là 50,5%. 60-69, typ LAHH là 35,3% và nhóm ≥70 (rất già), typ LAHH và LUMA là 11,8% và 10,9% (p<0,001). Qua so sánh với kết quả nghiên cứu của các tác giả nước ngoài chúng tôi nhận thấy rằng ở ung thư vú tuổi rất trẻ (<40 tuổi), typ TNP (TNB+ và TNB-) chiếm tỷ lệ cao, trái lại ở tuổi rất già (≥ 70 tuổi) typ LUMA chiếm tỷ lệ cao nhất. Typ LUMB có xu hướng chiếm tỷ lệ cao hơn typ LUMA ở <60 tuổi, tương tự với typ HER2. Typ LBHH

xu hướng chiếm tỷ lệ cao ở nhóm <50 tuổi, trái lại typ LAHH chiếm tỷ lệ cao ở các bệnh nhân ≥50 tuổi.

Ung thư vú tuổi trẻ và tuổi già: bảng 3.17 cho thấy 8 bệnh nhân TNB- (100,0%) đều thuộc nhóm tuổi trẻ và các typ LBHH, HER2, TNB+ đều chiếm tỷ lệ cao (80,0%; 74,2% và 73,0%). Trong khi đó ở nhóm tuổi già, typ LAHH và LUMA chiếm tỷ lệ cao là 100,0% và 45,8% (p=0,0034). Mặc dù tỷ lệ về nhóm tuổi trẻ và tuổi già khác nhau giữa nghiên cứu của chúng tôi với nghiên cứu của Anders, nhưng có sự thống nhất với Conforti là các typ TNB-, TNB+ hoặc HER2 đều chiếm tỷ lệ cao ở nhóm tuổi trẻ, trái lại ở nhóm tuổi già, typ lòng ống chiếm tỷ lệ cao hơn (LAHH>LUMA>LUMB). Các kết quả này cho thấy sự ác tính ở các ung thư vú phụ nữ trẻ.

Kinh nguyệt: Bảng 3.18 chỉ ra rằng ở nhóm sau mãn kinh, typ LUMA và LAHH (57,0% và 88,2%). Ở nhóm tiền mãn kinh, typ TNB- và LBHH (72,2% và 70,3%), TNB+ (51,8%) (p=0,0007). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi và của các tác giả trong và ngoài nước đều nhận thấy rằng typ LUMA hoặc LAHH chiếm tỷ lệ cao hơn các typ khác ở nhóm sau mãn kinh, trái lại ở nhóm tiền mãn kinh, typ TNP chiếm tỷ lệ cao hơn các typ khác. Typ LUMB, LBHH chiếm tỷ lệ cao hơn ở nhóm tiền mãn kinh. Trong khi đó typ HER2 chiếm tỷ lệ cao hơn ở nhóm sau mãn kinh.

Qua đánh giá typ phân tử với tuổi mắc bệnh ung thư vú, tình trạng kinh nguyệt của các nghiên cứu trong và ngoài nước chúng tôi nhận thấy rằng các typ ác tính (TNB-, TNB+, HER2) thường gặp ở nhóm tiền mãn kinh và tuổi trẻ hơn so với các typ có tiên lượng tốt hơn như typ lòng ống. Qua đó chúng tôi thấy sơ đồ tiên lượng giảm dần: LAHH, LUMA, LUMB, HER2, TNB+, TNB- và LBHH.

Vị trí u: Theo biểu đồ 3.3 tỷ lệ các typ phân tử có xu hướng tăng dần ở trên ngoài, typ LBHH và LUMA chiếm tỷ lệ cao nhất: 64,9% và 63,0%. Ở trên trong, typ HER2 chiếm tỷ lệ cao: 24,2%. Các u ở dưới trong, dưới ngoài và trung tâm, các typ phân tử có tỷ lệ xu hướng giảm dần, u HR- chiếm tỷ lệ cao ở dưới trong (TNB+: 12,9%, TNB- và HER2: 11,1%) và ở dưới ngoài chiếm tỷ lệ cao ở typ TNB-: 33,3% và u lòng ống chiếm tỷ lệ cao hơn ở vị trí trung tâm (LUMA: 7,9% và LUMB, LBHH là 8,1%) (p=0,00001).

Giai đoạn TNM: Qua bảng 3.20 cho thấy ở GĐ I, typ LUMA hay gặp: 39,4%. Trái lại, ở GĐ III, typ TNB- chiếm tỷ lệ cao nhất: 33,3%. Ở GĐ II, typ LUMB chiếm tỷ lệ cao nhất: 74,3% (p=0,00001). Mặc dù, có khác nhau về tỷ lệ ở các typ, nhưng kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự nghiên cứu của Bhargava và cs (2010). Nhìn chung, các ung thư vú có HR+ (LUMA, B, LAHH và LBHH) chủ yếu gặp ở GĐ I và II, trong khi đó các ung thư vú HR- (TNB-, TNB+, HER2) chiếm tỷ lệ cao ở GĐ II và III. Qua đánh giá TNM theo từng typ phân tử cho thấy mức độ tiên lượng giảm dần như sau:

LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, TNB+, HER2 và TNB-. Kết quả này phản ánh tính chất ác tính của ung thư vú theo từng typ phân tử.

Mức độ nguy cơ: Bảng 3.21 chỉ ra rằng ở ung thư vú có nguy cơ thấp, typ LUMA chiếm tỷ lệ cao nhất là 11,5%. Trong khi đó ở nhóm nguy cao, các typ TNB- và TNB+ chiếm tỷ lệ cao là 50,0% và 43,5%. Ở nhóm nguy cơ TB, typ LBHH, LAHH và HER2 chiếm tỷ lệ cao là 86,5%; 82,4% và 76,8% (p=0,0001). Nhìn chung, typ LUMA chủ yếu gặp ở nhóm nguy cơ thấp và TB, trong khi đó LUMB, LAHH, LBHH gặp phổ biến ở nhóm nguy cơ TB và cao. Tương tự, các u có HR- cũng chiếm tỷ lệ cao ở nhóm nguy cơ TB và cao, tỷ lệ giảm dần từ typ TNB- đến typ HER2 và TNB+. Qua đánh giá mức độ nguy cơ theo từng typ phân tử cho thấy mức độ tiên lượng giảm dần: LUMA, LUMB, LBHH, LAHH, HER2, TNB+ và TNB.

* Qua đánh giá các thông số LS theo từng typ phân tử, cho thấy sơ đồ tiên lượng như sau: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, HER2, TNB+ và TNB-

4.2.2. Typ phân tử và một số đặc điểm GPB

Kích thước u: Bảng 3.22 cho thấy kích thước khối u từ 0,3-10,0cm, kích thước TB là 2,4±1,3cm. Kích thước u TB ở các typ lòng ống thấp hơn typ TNP hoặc HER2. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Bhargava và Spitale. Chúng tôi thấy rằng typ LUMA và LAHH chiếm tỷ lệ cao ở nhóm u ≤2cm (57,6% và 64,7%). Trái lại, ở nhóm >5cm, typ TNB- chiếm tỷ lệ cao nhất là 11,1%, tiếp đến là typ HER2 chiếm 6,1%. Ở nhóm từ >2-5cm, cao nhất là typ HER2: 58,6% và TNB+ là 47,1% (p=0,048). Qua so sánh với các kết quả nghiên cứu ở nước ngoài, mặc dù tỷ lệ có thể khác nhau giữa các nghiên cứu, nhưng một điểm chung mà chúng tôi nhận thấy rằng các typ lòng ống thường có kích thước u nhỏ hơn các typ khác và typ LUMA chiếm tỷ lệ cao hơn LUMB. Qua đánh giá kích thước u theo từng typ phân tử cho thấy mức độ tiên lượng giảm dần: LAHH, LBHH, LUMA, LUMB, TNB+, HER2 và TNB-.

Tình trạng hạch: Chúng tôi thấy rằng số lượng hạch di căn từ 1-15 hạch, tỷ lệ di căn hạch là 36,8%, TB một bệnh nhân bị di căn 1,3±0,1 hạch. Typ LUMA có số lượng hạch bị căn TB thấp nhất là 0,6±0,1, và cao nhất ở typ TNP và HER2: 1,9±0,3. Qua bảng 3.23 cho thấy typ LUMA đều chiếm tỷ lệ thấp ở cả 2 nhóm di căn hạch là 16,3% và 6,1%. Typ TNB-, TNB+ và HER2 chiếm tỷ lệ di căn hạch cao ở nhóm >3 hạch, là 27,8%; 22,4% và 22,3%. (p=0,00001). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự nghiên cứu của Đoàn Thị Phương Thảo. Từ kết quả nghiên cứu của chúng tôi về sự đánh giá tình trạng hạch theo từng typ phân tử cho thấy mức độ tiên lượng giảm dần như sau: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, TNB+, HER2 và TNB-. Điều này phản ánh thông số hạch là một trong các thông số có vai trò quan trọng trong xác định sự tiên lượng ung thư vú thông qua các typ phân tử.

Typ MBH: Qua biểu đồ 3.5 chúng tôi nhận thấy rằng typ thể tủy chỉ phân bố ở typ TNB-(11,1%) và TNB+(4,7%) và typ dị sản phân bố ở 2 typ phân tử TNB+(2,4%) và HER2(2,0%) (p=0,00001). Qua kết quả trên chúng tôi nhận thấy các typ MBH có tiên lượng xấu như typ thể tủy hoặc typ dị sản đều thuộc TNP hoặc typ HER2. Kết quả này phù hợp với nhận định của một số tác giả nước ngoài.

Độ mô học: Qua bảng 3.25, ở ĐMH I, typ LUMA và B: 19,4% và 13,5%. Trái lại, ở u ĐMH III, các typ TNB-, TNB+ và HER2: 83,3%; 71,8% và 66,7% và thấp nhất là typ LUMA (42,4%) (p=0,0001). Chúng tôi nhận thấy rằng ở ĐMH I, các typ lòng ống có tỷ lệ giảm dần từ typ LUMA đến LBHH, trái lại ở ĐMH III, có xu hướng tăng dần từ typ LUMA đến LBHH và các typ có tiên lượng xấu như TNB-, TNB+, HER2 chủ yếu gặp ở ĐMH III. Qua đánh giá ĐMH theo từng typ phân tử cho thấy mức độ tiên lượng giảm dần như sau: LUMB, LUMA, LBHH, LAHH, HER2, TNB+ và TNB-.

Chỉ số tiên lượng Nottingham (NPI): Bảng 3.26 cho thấy NPI TB là 4,2±1,2, typ LUMA có NPI TB thấp nhất là 3,9±1,1 và cao nhất là HER2 (4,9±1,2). Trong nhóm tiên lượng tốt, LUMA và LBHH: 32,1% và 32,4%. Trong nhóm tiên lượng xấu typ TNB-, HER2 và TNB+ chiếm tỷ lệ cao: 38,9%; 36,4% và 30,6% (p=0,00001). Qua kết đánh giá kết quả NPI TB và các mức NPI với từng typ phân tử và so sánh với quả nghiên cứu của các tác giả trong và ngoài nước, chúng tôi nhận thấy rằng các typ TNB-, TNB+, HER2 chủ yếu gặp ở nhóm tiên lượng TB hoặc xấu. Typ LUMA chiếm tỷ lệ cao hơn LUMB ở nhóm tiên lượng tốt, trái lại ở nhóm tiên lượng TB và xấu, LUMB có tỷ lệ cao hơn LUMA. Qua đánh giá NPI theo từng typ phân tử cho thấy mức độ tiên lượng giảm dần như sau: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, TNB+, HER2 và TNB-.

Sự xâm nhập lympho bào: Bảng 3.27 chỉ ra rằng 68,1% mô u có XN tế bào lympho và typ TNB+, HER2 và TNB- chiếm tỷ lệ cao: 81,2%; 79,8% và 77,8% (p=0,00007). Typ TNB+ chiếm tỷ lệ cao nhất (81,2%) ở nhóm mô đệm có XN lympho, phù hợp với nhận định của Fulford và Livasy.

Hoại tử u: Bảng 3.28 cho thấy 17,4% ung thư vú có hoại tử u, các typ TNB+, TNB- và HER2 đều chiếm tỷ lệ cao: 28,2%; 27,8% và 22,2% và typ lòng ống có sự hoại tử u thấp hơn (p=0,005). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nhận định của Fulford và Livasy. Điều này chứng tỏ hoại tử u cũng là một trong các đặc điểm MBH gợi ý tính chất các tính của khối u.

Xâm nhập bạch mạch: Trong nghiên cứu của chúng tôi (bảng 3.29) cho thấy 24,0% các khối u có XN bạch mạch, các typ TNB+, TNB- và HER2 đều chiếm tỷ lệ cao: 45,9%, 27,8% và 32,3% (p=0,0001). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự nghiên cứu của Cheang, nhưng cao hơn nghiên cứu của Spitale và thấp hơn Van den Eynden.

Thành phần tại chỗ: Qua bảng 3.30 chúng tôi nhận thấy 52,3% ung thư vú có thành phần tại chỗ, typ HER2 chiếm tỷ lệ cao hơn: 63,6% và thấp nhất là typ LAHH là 41,2% (p=0,2050). Kết quả nghiên cứu của chúng khác với nghiên cứu ngoài nước. Nhưng một điều dễ nhận thấy có điểm chung giữa các nghiên cứu đó là các ung thư vú có ER(-) thường có tỷ lệ thành phần tại chỗ cao, nhất là typ HER2.

* Qua đánh giá các thông số GPB theo từng typ phân tử cho thấy mức độ tiên lượng giảm dần như sau: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, TNB+, HER2 và TNB-.

➢ Qua kết hợp 3 sơ đồ tiên lượng của các typ phân tử theo 3 nhóm biến số: HMMD, LS và GPB chúng tôi thấy sơ đồ tiên lượng trong toàn bộ nghiên cứu giảm dần như sau: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, HER2, TNB+ và TNB-. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nhận định của các nghiên cứu khác như của Choi và cs (2010). Tuy nhiên, một số nghiên cứu của Cheang, Choccalingam và Blows nhận thấy rằng typ TNB+ có tiên lượng xấu hơn typ TNB-. Vì vậy, cần có các nghiên cứu sâu về kết quả điều trị và theo dõi sau điều trị ở các bệnh nhân bộ ba âm tính để có thêm cơ sở khoa học để khẳng định chắc chắn điều này.

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu 495 bệnh nhân ung thư vú bằng phương pháp HMMD chúng tôi rút ra các kết luận sau:

1. Typ phân tử và sự bộc lộ các dấu ấn HMMD

- Typ phân tử: Các typ phân tử phổ biến hơn gồm LUMA, HER2, TNB+ và LUMB; các typ có tỷ lệ thấp hơn là LBHH, TNB- và LAHH.

- Typ phân tử và sự bộc lộ các dấu ấn HMMD (p<0,001)

+ Typ lòng ống có tỷ lệ cao ở Ki67 thấp, p53(-) và p53-Bcl2+. Trong đó typ LUMA có tỷ lệ cao hơn typ LUMB ở nhóm ER cao, Bcl2(+), CK18(+), Ki67 thấp, p53(-) và nhóm p53-Bcl2+.

+ Typ TNB+ và TNB-: bộc lộ ở nhóm Ki67 cao, p53(+) 3 điểm, nhóm p53+Bcl2- và bộc lộ thấp với Bcl2.

+ Typ HER2: tương tự TNB+ và TNB-, nhưng với tỷ lệ thấp hơn.

+ Typ LAHH và LBHH: bộc lộ ở nhóm Ki67 trung bình hoặc cao, p53(+) 2-3 điểm và nhóm p53+Bcl2+.

* Tiên lượng của typ phân tử theo HMMD có thứ tự giảm dần như sau: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, HER2, TNB+ và TNB-.

2. Mối liên quan giữa typ phân tử và đặc điểm GPB-LS

2.1. Mối liên quan với đặc điểm lâm sàng (p<0,05)

- Typ lòng ống: typ LUMA có tỷ lệ cao ở nhóm tuổi già, giai đoạn I, nhóm nguy cơ thấp và trung bình. Trong khi typ LUMB hay gặp ở giai đoạn II và ở nhóm nguy cơ trung bình và cao.

- Typ TNB+ và TNB- chủ yếu gặp ở nhóm tuổi trẻ và tiền mãn kinh, nhóm nguy cơ trung bình và cao. Typ TNB+ có tỷ lệ cao ở giai đoạn I và II, trái lại typ TNB- hay gặp ở giai đoạn II và III.

- Typ HER2 chủ yếu gặp ở nhóm tuổi trẻ, <60 tuổi, giai đoạn II và III và ở nhóm nguy cơ trung bình và cao.

- Typ LAHH và LBHH: chỉ gặp ở nhóm nguy cơ trung bình và cao. Typ LAHH có tỷ lệ cao ở giai đoạn I, trái lại typ LBHH hay gặp ở giai đoạn II.

* Tiên lượng của typ phân tử theo đặc điểm LS có thứ tự giảm dần như sau: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, HER2, TNB+ và TNB-

2.2. Mối liên quan với đặc điểm GPB (p<0,05)

- Typ lòng ống: có tỷ lệ cao ở NPI thấp và trung bình; trong đó, typ LUMA có tỷ lệ cao ở NPI thấp, u ≤2cm, ít di căn hạch và ĐMH I; trái lại typ LUMB có tỷ lệ cao ở NPI trung bình, u >2-5cm và ĐMH II.

- Typ TNB+ và TNB-: chủ yếu gặp ở NPI trung bình và cao, di căn >3 hạch, ĐMH cao. Typ TNB- có tỷ lệ cao hơn TNB+ ở ĐMH III, di căn hạch, NPI cao, u >5cm.

- Typ HER2 có tỷ lệ cao nhất ở u >2-5cm và di căn hạch; hay gặp ở ĐMH III, NPI trung bình và cao.

- Typ LAHH và LBHH: có tỷ lệ cao ở NPI thấp và trung bình, ĐMH III. Typ LAHH có tỷ lệ cao ở u ≤2cm, trong khi typ LBHH hay gặp ở u >2-5cm và hay di căn hạch.

* Tiên lượng của typ phân tử theo GPB có thứ tự giảm dần như sau: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, TNB+, HER2 và TNB-.

➢ Mức độ tiên lượng theo từng typ phân tử trong toàn bộ nghiên cứu giảm dần như sau: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, HER2, TNB+ và TNB-.

KIẾN NGHỊ

Bên cạnh áp dụng bảng phân loại MBH cập nhật của WHO, cần áp dụng HMMD để phân typ phân tử ung thư vú theo bảng phân loại phân tử của Bhagarva (2010), bổ sung dấu ấn CK18, Bcl2 và một số dấu ấn đáy trong thực hành thường quy để giúp cho việc lựa chọn phác đồ điều trị bổ trợ thích hợp và tiên lượng chính xác cho bệnh nhân ung thư vú.

ABBREVIATION

AJCC	: American Joint Committee on Cancer
CK	: Cytokeratin
EGFR	: Epithelial growth factor receptor
ER	: Estrogen receptor
FDA	: US Food and Drug Administration
FISH	*:* Fluorescence in situ hybridization
HE	: Hematoxylin-Eosin
hpf	: High power field
HR	: Hormone Receptor
IHC	: Immunohistochemistry
LUMA	: Luminal A
LUMB	: Luminal B
NCH	: National Cancer Hospital
NPI	: Nottingham prognostic index
NST	: No Specific type
cPR	: Complete Pathology Response
PR	: Progesteron receptor
TALs	: Tumor associated lymphocytes
TDLU	: Terminal Ductal Lobular Unit
TEBs	: Tubule End Buds
TILs	: Tumor infiltrating lymphocytes
TNB-	: Triple negative-non-basal
TNB+	: Triple negative-basal
TNM	: Tumor, Node, Metastasis
TNP	: Triple negative phenotyp
WHO	: World Health Organization

INTRODUCTION OF THE THESIS

1. Introduction

Breast cancer is nowadays the most frequent malignant tumor in female and morbidity and mortality continue to increase, despite remarkable progresses in the field of early diagnosis and adjuvant therapy. For decades, the conventional pathologic diagnosis was thought to be the "golden standard" in terms of the microscopic subtype and grading. On the other hand, long-term follow-up of patients with breast cancer have shown that a particular subtype of carcinoma or a specific grade has only a minor impact on prognosis and brings almost any information about the therapeutic strategy. Breast cancer is a clinically heterogeneous disease, and existing histological classifications do not fully capture the varied clinical course of this disease. The different clinical course of patients with clinically and pathologically similar tumors is probably due to molecular differences among these cancers. Many molecular studies have been performed in the last decade for a better understanding of tumor carcinogenesis. Molecular research in the field of BC have increased and provided new insights on biology of breast cancer. They proposed a new intrinsic molecular classification of BC (Luminal A, Luminal B, ErbB2 overexpression, basal-like and normal-like types), based on gene expression analysis on DNA microarrays. Immunohistochemistry has been used as a surrogate for gene expression analysis. We study this thesis named as ***"Studying application of molecular classification in breast cancer by immunohistochemical method"*** at the National Cancer Hospital with following objectives**:**

1. ***To determine the molecular type in breast carcinoma.***
2. ***To evaluate relationship between molecular type with clinico-pathological characteristics.***

2. The new contributions and practical implications of the thesis

We applied IHC method for defining molecular types in breast cancer with standards of Bhagarva (2010), added to CK18, Bcl2 and basal markers. This classification is useful to decide optional adjuvant treatment and prognosis for breast cancer.

3. Structure of thesis

This thesis is composed of 141 pages (excluding appendices and referrences): 4 chapters. The outline of the thesis consists of Introduction (2 pages), Overview (37 pages), Meterial and methodology (16 pages), Result (35 pages), Discussion (48 pages), Conclusions (2 pages) and Recommendations (1 pages), 31 tables, 5 charts, 5 Figure, 7 photos, and uses 134 reference documents (9 Vietnamese and 125 English documents).

Chapter 1: OVERVIEW

1.1. MaSCs and Molecular type

Comparative molecular studies of the epithelial gene expression signatures established for the different mammary epithelial populations with those representing the cancer subtypes have suggested that distinct cells of origin may give rise to the different subtypes. The MaSC/basal signature is most closely aligned with the expression profile of the claudin-low subtype, while the luminal progenitor signature is closest to that of the basal-like subtype. Moreover, ALDH +ER luminal progenitor cells in human breast tissue exhibit a signature that most strongly correlates with the basal-like subtype. The cells of origin for the remaining subtypes (luminal A, luminal B, and HER2-positive), however, remain elusive. Although the luminal A profile was most concordant with the signature of mature luminal cells, it is presumed that a small progenitor subset within this population is the likely target.

1.2. Molecular classification of breast cancer

1.2.1. History of Molecular Classification

Perou et al. studied the patterns of genetic expression in the epithelial cells of the gland in breast cancer. With the use of cDNA microarray, the feasibility and usefulness of this method to study variations in the genetic pattern of cancer expression is supported. By using a hierarchical cluster, it is possible to differentiate genomic signatures in breast cancer similar to those found in lymphocytes and in epithelial, adipose and stromal cells. They also propose a new system of molecular classification of breast cancer based on a method of hierarchical clustering. In 2002, van't Veer et al. performed a study on the prediction of genetic profiling and its clinical results in breast cancer, proposing this method for selection of patients who may benefit from chemotherapy. In 2003, Sorlie et al. refined this molecular classification.

1.2.4. Molecular Classification by surrogated IHC

Breast cancer is divided into two groups based on the presence of genetic expression of ER, which has been observed as the major discriminating factor of molecular subtype. This genetic expression profile revealed three ER+ subtypes: luminal A, B, and C, although the stability of this last subgroup is still unclear. ER− comprises HER2, basal type and normal type. This last subgroup may represent only an extension of the expression profile between HER2 and basal type. It is important to determine if a new factor brings greater prognostic and predictive information compared with those already established.

Characterization and classification of breast cancer by IHC to analyze patterns of protein expression, which is correlated with microarray classification, has been suggested. Carey et al., using five IHC markers (ER, PR, HER2neu, HER1 and CK5/6), refined this classification. This method represents a feasible alternative because half of the cases of breast cancer occur in countries where analysis of prognostic factors needs to be economical, easy and reproducible.

1.2.5. Molecular subtypes

1.2.5.1. Luminal Subtypes

Luminal subtypes express hormonal receptors and have a pattern that agrees with the luminal epithelial component of the mammary gland. They express luminal CK 8/18, ER and genes associated with its activation such as LIV1 and CCND1. Less than 20% of luminal tumors have a p53 mutation and frequently are grade 1. Two subtypes exist: luminal A and luminal B. Luminal A has a high expression of genes related to ER and low expression of genes related to cellular proliferation compared with luminal B. Subtype luminal A also demonstrated high expression of ER genes.

Luminal A (56–61%). Based on the molecular profile, all cases with pure lobular carcinoma *in situ* are luminal A. Consecutively, large majority of invasive lobular cancer have a profile characteristic for luminal A.

Luminal type B (9–16%) tumors could present a more aggressive phenotype, including high tumor grade.

Clinical Characteristics: Subtype luminal A is the most frequent, corresponding to 67% of the tumors. Carey et al. found a difference in the presentation of molecular subtypes and demonstrated that the basal subtype was most frequent in African-American women (33.9% vs. 21.2%, $p = 0.0003$) and in premenopausal women (30.3% vs. 21.9%, $p = 0.02$).

Response to Treatment: Luminal subtypes show good prognosis; however, luminal B subtypes have a poorer prognosis than luminal A due to the variation in treatment response. These subtypes are treated with hormone therapy. Various studies have reported that ER+ tumors have little response to conventional chemotherapy. It has been demonstrated that patients with ER−tumors have more complete pathological responses to neoadjuvant chemotherapy than ER+ tumors. Luminal tumors have a 6% complete pathological response (cPR) to preoperative chemotherapy based on paclitaxel followed by 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide vs. a 45% cPR in basal and HER2+ subtypes.

1.2.5.2. Subtype HER2

Subtype HER2 by microarray refers to a large group of ER− tumors identified by genetic expression. The majority of the tumors that are HER2+ by IHC or FISH could fall within the HER2 subtype by microarray. However, other HER2+ tumors exist by IHC or FISH. Tumors that are subtype HER2 are characterized by overexpression of other genes within the ERBB2 amplicon such as GRB7. Similar to basal subtype tumors, HER2 subtypes have a high proportion of p53 mutations (40−80%) and are usually grade 3 (p = 0.0002). HER2 type (8–16%) is frequently associated with DCIS, many cases are less differentiated and are characterized by poor prognosis.

Clinical Characteristics: No association has been demonstrated between subtype HER2 with regard to age, race, or any other risk factor. Although HER2 and basal -like are grouped within the ER− category, clinical differences have been demonstrated between them.

Treatment Response: Overexpression of HER2 in tumor cells implies a poor prognosis. It also demonstrates the highest sensitivity to neoadjuvant chemotherapy based on anthracyclines and taxanes, finding cPR significantly higher than the luminal types (45% vs. 6%; p <0.001). As with the basal subtype, the poor prognosis of HER2 originates in its high risk of early relapse. Basal and HER2 subtypes, which represent the majority of ER− cancers, will benefit more with the advances in chemotherapy. Different from basal subtype, HER2 has target molecular agents: monoclonal antibody antiHER2 and trastuzumab. The effectiveness of trastuzumab in metastatic breast cancer and the marked reduction in relapse of HER2+ tumors when combined with chemotherapy are the basis to affirm that tumor control is possible with therapy directed at isolated targets.

1.2.5.3. Basal Subtype

Triple negative phenotype includes all breast cancers that lack ER, PR and HER2 expression and represent 10 to 17% of all breast carcinomas, and 96.8% of them are of histological grade 3. From the practical point of view, it is important to remember that triple negative is not equivalent to basallike carcinoma. Basal subtype is named due to its pattern of expression that is similar to basal epithelial cells and normal myoepithelial cells of mammary tissue. This similarity is a product of the lack of ER expression and related genes, low expression of HER2, intense expression of CKs 5/6 and 17, and the gene expression related with cellular proliferation. A simple panel of five antibodies could identify this subtype. It has been defined by IHC as ER−, PR−, HER2−

and CK5/6 or HER1(+). Ribeiro et al. demonstrated that normal luminal cells exist that express CKs 5/6, which act as stem cells. These cells undergoing malignant transformation originate the basal phenotype of breast cancer. These tumors tend to be very aggressive, high grade and with p53 mutation.

Clinical Characteristics: The prevalence of triple negative tumors is 23% in patients under the age of 40, 16% for patients aged 40–49, and 11% for patients over 50 years. Of the triple negative tumors, 80 to 90% are of basal subtype by microarray. The majority of women with BRCA1 mutation generally develop this subtype. Carey et al. reported a 20% incidence of this subtype, and it was more frequently found in premenopausal African-American women (39%) compared with postmenopausal African-American women (14%) or women of any age who are not African-American (16%, $p = 0.0001$). These tumors also have less effect of lymph nodes according to the size of the tumor in comparison with the other subtypes and, although they demonstrate greater frequency of cPR, they present with a worse prognosis.

Response to Treatment: Various studies have demonstrated the poor prognosis of this subtype. Premenopausal AfricanAmerican women have twice the risk of developing this subtype than any other group. This high proportion is linked to the poor prognosis that these women experience. It is still not clear if this prognosis is due to a lack of therapeutic options or to an inherent aggressiveness. However, these tumors present high sensitivity to chemotherapy.

1.2.5.4. Luminal HER2 hybrid subtype

LAHH and LBHH tumors (likely class luminal C) account for approximately 9% of all breast tumors. Morphologically, they are moderately differentiated tumors and predominantly of the ductal, NST. However, some pleomorphic lobular carcinomas also fall into these groups if they are HER2 positive. Average PR expression is generally higher in LAHH tumors compared to LBHH tumors. Some LBHH tumors may show a certain degree of apocrine differentiation.

1.3.2. IHC application for molecular classification

Although IHC method is less sensitive than gene analysis, but Molecular types are classified by surrogated IHC.

Luminal: Luminal subtypes express hormonal receptors and have a pattern that agrees with the luminal epithelial component of the mammary gland. They express luminal CK 8/18, ER and genes associated with its activation such as LIV1 and CCND1.

HER2: Subtype HER2 by microarray refers to a large group of ER− tumors (low expression of ER and related genes) identified by genetic expression. The majority of the tumors that are HER2+ by IHC or FISH could fall within the HER2 subtype by microarray

Triple negative phenotype lack ER, PR and HER2 expression, but intense express of CK5/6 and 17, other basal markers and the gene expression related with cellular proliferation.

LAHH&LBHH: immunophenotype are similar to luminal and HER2.

Chapter 2: METERIAL AND METHOD

2.1. Subjects of study

From January 2012 to June 2014, 495 women who were diagnosed as invasive breast carcinoma, were treated as mastectomy at the National Cancer Hospital**.**

2.1.1. Selecting Criteria

- Patients was treated for the first time at the NCH (enough data).
- Treated by mastectomy and lymph node resection.
- Primary cancer and non-neoadjuvant.
- Specimens, blocks are enough qualify to study.

2.1.2. Exclusion criteria

- The cases don't meet above selective criteria that will be excluded.
- Other cancers look like in situ, recurrent or secondary/male cancer.

2.2. Methods

2.2.1. Design of study: The descriptive cross-sectional observation

2.2.2. Research content

- Molecular classification and IHC expression: ER, PR, HER2, Ki-67, p53, p63, CK5/6, CK17, CK18, Bcl2 and EGFR.
- Clinico-pathological variants: age, menopausal, site, TNM stage, risk, histopathological type and grade, NPI, lymph node, size, lymph-vascular invasion, lymphocytic stroma, necrosis, in situ cancer**.**

2.2.3. The study procedures

Collect the breast cancer specimen, slides are stained by H-E and IHC at in the Pathology Department of NCH or CREDCA. Determining histopathological type, grading, characteristics and IHC results: the slides are examinized by two independent pathologists. If cases are unclear, they will be discussed with pathologists of the Pathology Department of National Cancer Hospital. To determine histopathological types are according to the WHO-2012. To classify molecular types according to the Bhargava standard. Clinical characteristics are collected from clinical records.

2.2.4. Data analysis: Study data was analysed by SPSS program version 10.0.

Chapter 3: RESULTS

3.1. Molecular classification of breast cancer

3.1.1. Distribution of molecular type

Table 3.1: Distribution of molecular type

		N		%	
LUMA		165		33.3	
LUMB		74		14.9	
TNP	Non-basal - like	103	18	20.8	3.6
	Basal - like		85		17.2
HER2		99		20.0	
LAHH		17		3.5	
LBHH		37		7.5	
Total		495		100.0	

LUMA is the most common (33.3%), followed by HER2 (20.0%), TNB+: 17.2%, LUMB (14.9%), other types are less common.

3.2. Molecular classification and IHC markers, HER2

Table 3.5: HER2 expression

HER2	0/1+		2+		3+		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%	N	%
LUMA	122	73.9	43	26.1	0	0.0	165	33.3
LUMB	58	78.4	16	21.6	0	0.0	74	14.9
TNB-	13	72.2	5	27.8	0	0.0	18	3.6
TNB+	74	87.1	11	12.9	0	0.0	85	17.2
HER2	0	0.0	14	14.1	85	85.9	99	20.0
LAHH	0	0.0	2	11.8	15	88.2	17	3.5
LBHH	0	0.0	5	13.5	32	86.5	37	7.5
Σ	267	53.9	96	19.4	132	26.7	495	

HER2(3+): 26.7%. In HER2(2+), type TNB- is the most common: 27.8%, type LUMA: 26,1% and LUMB: 21.6% (p<0.001).

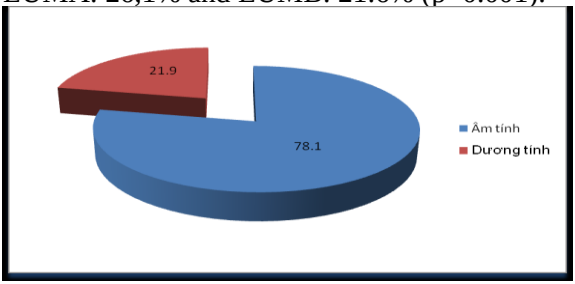


Chart 3.1: HER2(2+) and FISH

21.9% HER2(2+)/IHC amplifies HER2 gene.

Table 3.6: Ki67 expression

Ki67	Low		Moderate		High		Total		Average
	n	%	n	%	n	%	N	%	
LUMA	97	58.8	34	20.6	34	20.6	165	33.3	19.5±1.6
LUMB	41	55.4	17	23.0	16	21.6	74	14.9	21.6±2.9
TNB-	6	33.3	2	11.1	10	55.6	18	3.6	43.8±3.2
TNB+	23	27.1	15	17.6	47	55.3	85	17.2	
HER2	27	27.3	21	21.2	51	51.5	99	20.0	38.4±2.9
LAHH	3	17.6	7	41.2	7	41.2	17	3.5	32.1±5.4
LBHH	9	24.3	9	24.3	19	51.4	37	7.5	32.4±3.8
	206	41.6	105	21.2	184	37.2	495		

In Ki67 low: LUMA & B: 58.8 and 55.4%. In contrast, Ki67 high: TNB- (55.6%), TNB+ (55.3%), HER2(51.5%) & LBHH (51.4%). Prognosis: LUMA, LUMB, LAHH, HER2, LBHH, TNB- and TNB+ ($p<0.001$).

Table 3.7: p53 expression

p53	0		1		2		3		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%
LUMA	124	75.1	17	10.3	11	6.7	13	7.9	165	33.3
LUMB	46	62.1	7	9.5	10	13.5	11	14.9	74	14.9
TNB-	2	11.1	0	0.0	7	38.9	9	50.0	18	3.6
TNB+	32	37.7	4	4.7	15	17.6	34	40.0	85	17.2
HER2	37	37.4	1	1.0	23	23.2	38	38.4	99	20.0
LAHH	6	35.3	1	5.9	5	29.4	5	29.4	17	3.5
LBHH	11	29.7	1	2.7	11	29.7	14	37.9	37	7.5
Σ	258	52.1	31	6.3	82	16.6	124	25.0	495	

Type TNB-, TNB+, HER2 & LBHH with p53(+) 3 score are the most common: 50.0%; 40.0%; 38.4% and 37.9%. Prognosis: LUMA, LUMB, LAHH, HER2, LBHH, TNB+ and TNB- ($p<0.001$).

Table 3.8: Bcl2 expression

Bcl-2	Negative		Positive		Total	
	n	%	n	%	N	%
LUMA	21	12.7	144	87.3	165	33.3
LUMB	16	21.6	58	78.4	74	14.9
TNB-	14	77.8	4	22.2	18	3.6
TNB+	58	68.2	27	31.8	85	17.2
HER2	76	76.8	23	23.2	99	20.0
LAHH	6	35.3	11	64.7	17	3.5
LBHH	12	32.4	25	67.6	37	7.5
Σ	203	41.0	292	59.0	495	

Type LUMA, B and LAHH, LBHH with Bcl2(+) are the highest: 87.3%; 78.4%; 64.7% and 67.6%. Prognosis: LUMA, LUMB, LBHH, LAHH, TNB+, HER2 and TNB- ($p<0.001$).

Table 3.9: lộ p53-Bcl2 expression

P53,Bcl2	(+)(+)		(+)(-)		(-)(+)		(-)(-)		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%
LUMA	37	22.4	3	1.8	106	64.3	19	11.5	165	33.3
LUMB	21	28.4	7	9.4	37	50.0	9	12.2	74	14.9
TNB-	3	16.6	13	72.2	1	5.6	1	5.6	18	3.6
TNB+	20	23.5	32	37.7	8	9.4	25	29.4	85	17.2
HER2	13	13.1	49	49.5	9	9.1	28	28.3	99	20.0
LAHH	6	35.3	5	29.4	5	29.4	1	5.9	17	3.5
LBHH	19	51.4	7	18.9	6	16.2	5	13.5	37	7.5
Σ	119	24.1	116	23.4	172	34.7	88	17.8	495	

Type LUMA & B with p53(-)Bcl2(+) is the highest: 64.3% and 50.0%. In contrast, TNB-, TNB+ & HER2 are the most common in p53(+)Bcl2(-): 72.2%, 37.7% and 49.5%. Prognosis: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, HER2, TNB+ and TNB- ($p<0.001$).

3.1.3. CK18, Bcl2 expresion in Luminal type

Table 3.10-11: CK18 and Bcl2 expression

Marker		LUMA		LUMB		LAHH		LBHH		Total		p
		n	%	n	%	n	%	n	%	N	%	
CK18	-	2	1.2	3	4.1	1	5.9	6	16.2	12	4.1	0.005
	+	163	98.8	71	95.9	16	94.1	31	83.8	281	95.9	
Bcl2	-	21	12.7	16	21.6	6	35.3	12	32.4	55	18.8	0.007
	+	144	87.3	58	78.4	11	64.7	25	67.6	238	81.2	
Σ		165	56.3	74	25.3	17	5.8	37	12.6	293		

- CK18(+): 95.9%, LUMA is the highest (98.8%), LUMB: 95.9%, LAHH: 94.1% and LBHH: 83.8% ($p<0.05$).

- Bcl2(+): 81,2%, type LUMA is the highest (87.3%), type LUMB is 78.4%, LBHH: 67.6% and LAHH: 64.7% ($p<0.05$).

3.1.4. CK5/6, CK17, EGFR and p63 expresion in TNP

Table 3.12-15 : CK5/6, CK17, EGFR, p63 expression

Marker		TNB+		TNB-		Total		p
		n	%	n	%	N	%	
CK5/6	-	59	69.4	18	100.0	77	74.8	0.0066
	+	26	30.6	0	0.0	26	25.2	
CK17	-	39	45.9	18	100.0	57	53.3	0.00003
	+	46	54.1	0	0.0	46	44.7	
EGFR	-	41	48.2	18	100.0	59	57.3	0.00005
	+	44	51.8	0	0.0	44	42.7	
P63	-	47	55.3	18	100.0	65	63.1	0.0004
	+	38	44.7	0	0.0	38	36.9	
Σ		85	82.5	18	17.5	103		

CK5/6: TNB+ with CK5/6(+) is 30.6% ($p<0.05$). CK17: TNB+ (54.1%). EGFR: TNB+ (51.8%). P63: TNB+ (44.7%) ($p<0.001$).

3.2. Relationship between molecular type and clinico-path characteristics

3.2.1. Relationship between molecular type and age

Table 3.17: Younger and Elder

Age	Young (≤45 y-o)		Old (≥65 y-o)		Total	
	n	%	n	%	N	%
LUMA	39	54.2	33	45.8	72	36.4
LUMB	20	69.0	9	31.0	29	14.8
TNB-	8	100.0	0	0.0	8	4.1
TNB+	27	73.0	10	27.0	37	18.9
HER2	23	74.2	8	25.8	31	15.8
LAHH	0	0.0	4	100.0	4	2.0
LBHH	12	80.0	3	20.0	15	7.6
Σ	129	65.8	67	34.2	196	

In younger group, TNB- is 100.0%. In elder group, LAHH & LUMA: 100.0% and 45.8% (p<0.001).

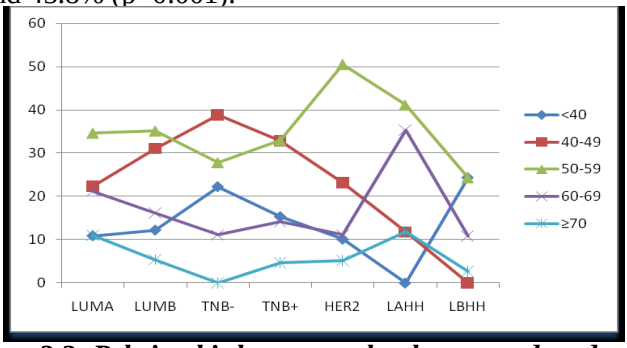


Chart 3.2: Relationship between molecular type and aged group

<40 y-o: TNB- & LBHH (22.2 vs 24.3%); 40-49 y-o: TNB- (38.9%); 50-59 y-o: HER2 (50.5%); 60-69 y-o: LAHH (35.3%) and ≥70 y-o: LAHH & LUMA (10.9 and 11.8%) (p<0.001).

3.2.2. Relationship between molecular type and menopausal status

Table 3.18: Relationship between molecular type and menopausal status

Menopausal	Pre-		Post-		Total	
	n	%	n	%	N	%
LUMA	71	43.0	94	57.0	165	33.3
LUMB	38	51.4	36	48.6	74	14.9
TNB-	13	72.2	5	27.8	18	3.6
TNB+	44	51.8	41	48.2	85	17.2
HER2	45	45.5	54	54.5	99	20.0
LAHH	2	11.8	15	88.2	17	3.5
LBHH	26	70.3	11	29.7	37	7.5
Σ	239	48.3	256	51.7	495	

In post-menopausal: LUMA & LAHH (57.0 vs 88.2%). In pre-menopausal: TNB- & LBHH (72.2 vs 70.3%). Prognosis: LAHH, LUMA, LUMB, HER2, TNB+, TNB- and LBHH (p<0.001).

3.2.3. Relationship between molecular type and site

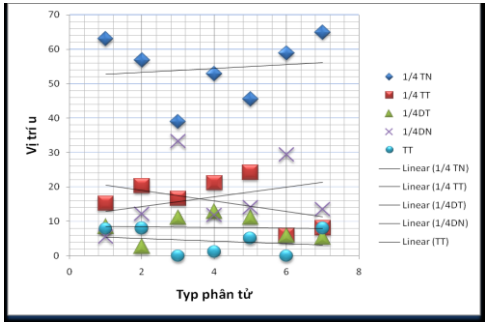


Chart 3.3: Molecular type and site

Upper outer quadrant: LBHH & LUMA (64.9 vs 63.0%). Upper Inner quadrant: HER2 (24.2%). Lower Inner quadrant (TNB+: 12.9%, TNB- vs HER2: 11.1%). Lower outer quadrant: TNB- (33.3%) (p<0.001).

3.2.4. Relationship between molecular type and TNM stage

Table 3.20: Relationship between molecular type and TNM stage

TNM	I		II		III		Total	
	n	%	n	%	n	%	N	%
LUMA	65	39.4	84	50.9	16	9.7	165	33.3
LUMB	16	21.6	55	74.3	3	4.1	74	14.9
TNB-	1	5.6	11	61.1	6	33.3	18	3.6
TNB+	21	24.7	48	56.5	16	18.8	85	17.2
HER2	12	12.1	60	60.6	27	27.3	99	20.0
LAHH	6	35.3	8	47.0	3	17.7	17	3.5
LBHH	11	29.7	20	54.1	6	16.2	37	7.5
Σ	132	26.7	286	57.8	77	15.5	495	

Stage I: LUMA (39.4%). Stage III: TNB- (33.3%). Prognosis: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, TNB+, HER2 and TNB- (p<0.001).

3.2.5. Relationship between molecular type and risk

Table 3.21: Relationship between molecular type and risk

Risk	Low		Moderate		High		Total	
	n	%	n	%	n	%	N	%
LUMA	19	11.5	110	66.7	36	21.8	165	33.3
LUMB	5	6.8	41	55.4	28	37.8	74	14.9
TNB-	0	0.0	9	50.0	9	50.0	18	3.6
TNB+	2	2.4	46	54.1	37	43.5	85	17.2
HER2	1	1.0	76	76.8	22	22.2	99	20.0
LAHH	0	0.0	14	82.4	3	17.6	17	3.5
LBHH	0	0.0	32	86.5	5	13.5	37	7.5
Σ	27	5.5	328	66.3	140	28.3	495	

Low risk: LUMA (11.5%). Moderate risk: LBHH, LAHH & HER2 (86.5, 82,4 and 76.8%). High risk, TNB- & TNB+ (50.0 and 43.5%). Prognosis: LUMA, LUMB, LBHH, LAHH, HER2, TNB+ and TNB- ($p<0.001$).

3.2.6. Relationship between molecular type and size

Table 3.22: Relationship between molecular type and size

Size	≤2		>2-5		>5		Total		Average
	n	%	n	%	n	%	N	%	
LUMA	95	57.6	64	38.8	6	3.6	165	33.3	2.3±1.2
LUMB	39	52.7	34	45.9	1	1.4	74	14.9	2.5±1.4
TNB-	7	38.9	9	50.0	2	11.1	18	3.6	2.6±1.6
TNB+	42	49.4	40	47.1	3	3.5	85	17.2	
HER2	35	35.4	58	58.5	6	6.1	99	20.0	2.8±1.4
LAHH	11	64.7	6	35.3	0	0.0	17	3.5	2.2±1.8
LBHH	21	56.8	16	43.2	0	0.0	37	7.5	2.1±1.3
Σ	250	50.5	227	45.9	18	3.6	495		

Size ranges from 0.3-10.0cm, medium: 2.4±1.3cm.

Tumor ≤2cm: LUMA & LAHH (57.6 and 64.7%). Tumor >5cm: TNB- (11.1%), type HER2: 6.1%. Prognosis: LAHH, LBHH, LUMA, LUMB, TNB+, HER2 and TNB- ($p<0.05$).

3.2.7. Relationship between molecular type and node status

Table 3.23: Relationship between molecular type and node status

Node	0		1-3		>3		Total	
	n	%	n	%	n	%	N	%
LUMA	128	77.6	27	16.3	10	6.1	165	33.3
LUMB	47	63.5	23	31.1	4	5.4	74	14.9
TNB-	9	50.0	4	22.2	5	27.8	18	3.6
TNB+	48	56.5	18	21.2	19	22.3	85	17.2
HER2	49	49.5	28	28.3	22	22.2	99	20.0
LAHH	11	64.8	3	17.6	3	17.6	17	3.5
LBHH	21	56.8	11	29.7	5	13.5	37	7.5
Σ	313	63.2	114	23.0	68	13.8	495	

Type TNB-, TNB+ & HER2 is higher in positive node group up 3: 27.8%; 22.4% and 22.3%. Prognosis: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, TNB+, HER2 and TNB- (p<0.001).

3.2.8. Relationship between molecular type and pathological type

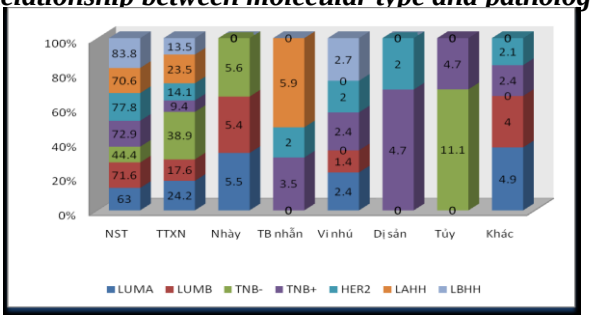


Chart 3.5: Molecular type and pathological type

Medullary type only contributes in TNB-(11.1%) and TNB+(4.7%); metaplastic type is met in TNB+(2.4%) and HER2 (2.0%) (p<0.001).

3.2.10. Relationship between molecular type and grade

Table 3.25: molecular type and grade

Grade	I		II		III		Total	
	n	%	n	%	n	%	N	%
LUMA	32	19.4	63	38.2	70	42.4	165	33.3
LUMB	10	13.5	36	48.7	28	37.8	74	14.9
TNB-	1	5.6	2	11.1	15	83.3	18	3.6
TNB+	4	4.7	20	23.5	61	71.8	85	17.2
HER2	3	3.0	30	30.3	66	66.7	99	20.0
LAHH	1	5.9	7	41.2	9	52.9	17	3.5
LBHH	3	8.1	16	43.3	18	48.6	37	7.5
Σ	54	10.9	174	35.2	267	53.9	495	

Grade I: LUMA & B: 19.4% and 13.5%. Grade III: TNB-, TNB+ & HER2: 83.3%; 71.8% and 66.7%. Prognosis: LUMB, LUMA, LBHH, LAHH, HER2, TNB+ and TNB- ($p<0.001$).

3.2.11. Relationship between molecular type and NPI

Table 3.26: molecular type and NPI

NPI	<3.4		3.4-5.4		>5.4		Total		Average
	n	%	n	%	n	%	N	%	
LUMA	53	32.1	93	56.4	19	11.5	165	33.3	3.9±1.1
LUMB	14	18.9	48	64.9	12	16.2	74	14.9	4.1±1.1
TNB-	2	11.1	9	50.0	7	38.9	18	3.6	4.8±1.1
TNB+	11	12.9	48	56.5	26	30.6	85	17.2	
HER2	10	10.1	53	53.6	36	36.4	99	20.0	4.9±1.2
LAHH	4	23.5	9	53.0	4	23.5	17	3.5	4.4±1.1
LBHH	12	32.4	15	40.6	10	27.0	37	7.5	4.4±1.2
Σ	106	21.4	275	55.6	114	23.0	495		

Poor NPI: type TNB-, HER2 & TNB+ are higher incidence: 38.9%; 36.4% and 30.6%. Prognosis: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, TNB+, HER2 and TNB-($p<0.001$).

3.2.12. Relationship between molecular type and lympho stroma

Table 3.27: Molecular type and lympho stroma

Lympho	Abcent		Precent		Total	
	n	%	n	%	N	%
LUMA	74	44.8	91	55.2	165	33.3
LUMB	23	31.1	51	68.9	74	14.9
TNB-	4	22.2	14	77.8	18	3.6
TNB+	16	18.8	69	81.2	85	17.2
HER2	20	20.2	79	79.8	99	20.0
LAHH	8	47.1	9	52.9	17	3.5
LBHH	13	35.1	24	64.9	37	7.5
Σ	158	31.9	337	68.1	495	

Present of lymphocytic stroma, type TNB+, HER2 & TNB- are higher incidence: 81.2%; 79.8% & 77.8% ($p<0.001$).

3.2.13. Relationship between molecular type and necrosis

Table 3.28: Molecular type and necrosis

Necrosis	Abcent		Precent		Total	
	n	%	n	%	N	%
LUMA	147	89.1	18	10.9	165	33.3
LUMB	61	82.4	13	17.6	74	14.9
TNB-	13	72.2	5	27.8	18	3.6
TNB+	61	71.8	24	28.2	85	17.2
HER2	77	77.8	22	22.2	99	20.0
LAHH	16	94.1	1	5.9	17	3.5
LBHH	34	91.9	3	8.1	37	7.5
Σ	409	82.6	86	17.4	495	

Type TNB+, TNB- & HER2 are seen necrosis with higher rate: 28.2%; 27.8% and 22.2%, respectively (p<0.05).

3.2.14. Relationship between molecular type and lymphovascular invasion

Table 3.29: Molecular type and lymphovascular invasion

Lymphovascular	Abcent		Precent		Total	
	n	%	n	%	N	%
LUMA	145	87.9	20	12.1	165	33.3
LUMB	60	81.1	14	18.9	74	14.9
TNB-	13	72.2	5	27.8	18	3.6
TNB+	46	54.1	39	45.9	85	17.2
HER2	67	66.7	32	32.3	99	20.0
LAHH	15	88.2	2	11.8	17	3.5
LBHH	30	81.1	7	18.9	37	7.5
Σ	376	76.0	119	24.0	495	

Type TNB+, TNB- and HER2 infiltrate in lymphovascular with higher rate: 45.9; 27,8 and 32.3%, rêpctively (p<0.001).

3.2.15. Relationship between molecular type and in situ cancer

Table 3.30: Molecular type and in situ cancer

Insitu	Abcent		Precent		Total	
	n	%	n	%	N	%
LUMA	88	53.3	77	46.7	165	33.3
LUMB	33	44.6	41	55.4	74	14.9
TNB-	9	50.0	9	50.0	18	3.6
TNB+	42	49.4	43	50.6	85	17.2
HER2	36	36.4	63	63.6	99	20.0
LAHH	10	58.8	7	41.2	17	3.5
LBHH	18	48.6	19	51.4	37	7.5
Σ	236	47.7	259	52.3	495	

Carcinoma in situ is seen higher rate in type HER2: 63.6% (p>0.05).

Chapter 4: DISCUSSION

4.1. Molecular classification and IHC markers, HER2

4.1.1. Molecular classification

Table 3.1 shows that LUMA is the most common (33.3%), followed by HER2 (20.0%), basal - like (TNB+): 17.2%, LUMB (14.9%), LBHH (7.5%). Typ TNB- & LAHH are less common (3.6 and 3.4%). If 3 IHC markes - ER, PR & HER2 are stained, TNP is the second as 20.8%. Comparing Bhargava's results with us, incidence of molecular types are similar. However, type HER2 is higher in my study. Comparation of other investigation, ratio of molecular type are different, but type LUMA is

highest that correspond with major invasive breast carcinoma expressing hormone receptor.

4.1.2 Molecular classification and IHC markers, HER2

HER2: (table 3,5) HER2 overexpression is 26.7%. In HER2 equivocal, TNB- is 27.8%, LUMA: 26.1% and LUMB: 21.6%. In these types, HER2 gen is non-amplication by FISH. Chart 3.1 shows that 19.4% HER2 equivocal / IHC is evaluated by FISH, in which HER2 equivocal amplify as 21.9%. In general, amplification of HER2 equivocal is different from other investigation, ranging from 4.8 to 75%. Thus, HER2 equivocal is a cause for differentiation between IHC and FISH.

Ki67: Table 3,6 shows average Ki67 index: 30.3±1.3 in which, it is increasingly, LUMA: 19.5±1.6, LUMB: 21.6±2.9, LAHH and LBHH 32.1±5.4 & 32.4±3.8, HER2: 38.4±2.9, finally, TNP: 43.8±3.2. In low Ki67, LUMA & B types accounts for highest percentage (58.8% & 55.4%). In high Ki67, types are the most common as TNB-(55.6%), TNB+(55.3%) and HER2(51.5%). In moderate Ki67, LAHH is the most common: 41.2%. LUMA & B tend to decrease from low to high Ki67; in contrast LAHH and LBHH increase from low to high Ki67 (p=0.0001). Our results are similar to one's inboard and outboard researches. We found that well-prognostic molecular types (LUMA, B) tend to express in low Ki67; in contrast, moderate, poor-prognostic molecular types (LAHH, LBHH or TNB-, TNB+ and HER2) are expressed in high Ki67. Molecular prognosis related to Ki67 are decreased as: LUMA, LUMB, LAHH, HER2, LBHH, TNB- and TNB+. This result is correspondant to foreign researches.

P53: (table 3,7), in p53(-) or p53(+) 1 point, LUMA & B are the most common (75.1% & 62.1%) and (10.3% & 9,5%), respectively. In contrast, p53(+) 3 point, TNB-, TNB+, HER2 and LBHH account for high percentage: 50.0%, 40.0%, 38.4% & 37.9%, respectively. P53(+) 2 point, LUMA & B are lower than other types (6.7% & 13.5%), respectively (p=0.0001). Our results are correspodant to Sorlie, Haupt and Meijnen researches. Molecular prognosis related to p53 are decreased as: LUMA, LUMB, LAHH, HER2, LBHH, TNB+, TNB-.

Bcl2: Results are shown in table 3,8, type LUMA, B & LAHH, LBHH expressed in Bcl2 with higher rate: 87.3%, 78.4%, 64.7% and 67.6%, respectively (p=0.0001).

Bcl2 expression depends on ER and Bcl2 & ER are closely related in breast cancer. Bcl2 is almost negative in breast cancer with ER(-). Molecular prognosis related to Bcl2 are decreased as: LUMA, LUMB, LBHH, LAHH, TNB+, HER2 and TNB-. This prognosis is correspondant to realtion between Bcl2 and ER in Basu's study.

P53 & Bcl2: (table 3,9) LUMA and B are the most common in p53(-)Bcl2(+) group: 64.2% & 50.0%, this is a well prognosis. In contrast,

TNB-, TNB+ & HER2 are the most common in p53(+)Bcl2(-) group, (72.2%, 37.6% and 49.5%) (p=0.0001). By comparing with global investagations, we found that LUMA & B tend to express in p53(-)Bcl2(+) group, next to p53(+)Bcl2(+) group. In contrast, TNB-, TNB+ and HER2 are always expressed in p53(+)Bcl2(-), next to p53(-)Bcl2(-) for typ TNB+ & HER2 or p53(+)Bcl2(+) for TNB-. These results can summarize the combination of p53 & Bcl2 by prognosis as: p53-Bcl2+ > p53-Bcl2- = p53+Bcl2+ > p53+Bcl2-, corresponding to molecular prognosis related to p53&Bcl2 group are decreased as: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, HER2, TNB+ and TNB-.

Luminal markers

CK18: (table 3,10-11) showing as major of luminal is expressed in CK18 (95.9%), in which, LUMA is the most common (98.8%) (p=0.005). By comparing with global investagations, we think that CK18 is added to IHC panel for luminal diagnosis; CK18 expression is decreased from LUMA, LUMB, LAHH to LBHH.

Bcl2: (table 3,10-11), Bcl2(+) is 81.2%, LUMA is the most common (87.3%) (p=0.007). We found that Bcl2 expression is decreased from: LUMA, LUMB, LBHH to LAHH, this result is similar to CK18. By comparing with Bertolo researcher and Bcl2 evaluation of Basu, in addition of prognosis, Bcl2 is added to IHC panel for luminal diagnosis, especially LUMA type.

Basal markers

103 TNP breast cancers are stained by basal markers for definition of TNB+ or TNB- (table 3,12-15).

CK5/6(+) TNB+ is expressed in CK5/6 as 30.6% (p=0.0066). By comparing with global investagations, we found that CK5/6 expression is different among authors, CK5/6 expression, inboard studies are lower than outboard studies. This difference is explained by IHC technics, antidody or score method.

CK17(+)TNB+ is expressed in CK17 as 54.1% (p=0.00003). Our results are similar to Lakhani, but higher than Eerola. Following to other researches, basal CKs are associated with cancer breast characteristics as: ER(-), PR(-), HER2(-), p53(+), grade high and age.

EGFR TNB+ is expressed in EGFR as 51.8% (p=0.00005). EGFR expression is not the most specific marker for definition of basal type, however, combination of EGFR and other basal markers are enough to define basal type.

P63 TNB+ is expressed in p63 as 44.7% (p=0.0004). By comparing with other investigaters, we found that basal CKs (CK5/6 & CK17), EGFR, p63 is significantly related to TNP; that is demonstrated important role of basal markers to define basal type (TNB+).

* Molecular prognosis related to IHC are decreased as: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, HER2, TNB+, TNB-.

4.2 Relationship between molecular type and clinico-path characteristics

4.2.1 Relationship between molecular type and clinical characteristics

Age: Breast cancer patients range from 14 to 87 Y-O, mean 52.2±11.0. Average age of LUMA & LAHH are highest, in TNP & HER2, average age is younger. Chart 3,2 shows that in less 40 Y-O (youngest), TNB- & LBHH are more common as 22.2% & 24.3%. From 40-49 Y-O, TNB- is also more common: 38.9%. From 50-59 Y-O, HER2 is 50.5%. However, from 60-69 Y-O, LAHH is more common as 35.3% and from ≥70 Y-O (eldest), LAHH & LUMA are the most common as 11.8% & 10.9% (p<0.001). By comparing with other investigaters, we found that youngest group (<40 Y-O), TNP (TNB+ và TNB-) account for higher percentage, in contrast, eldest group (≥70 Y-O) LUMA is more common. LUMB is the same HER2 and more percentage than LUMA in <60 Y-O group. LBHH is more common in <50 Y-O, in contrast, LAHH account for higher percentage in ≥50 Y-O.

Young and old: (table 3,17), all TNB- (100,0%) belongs to young group and LBHH, HER2, TNB+ account for higher percentage in this group (80.0%, 74.2% & 73.0%). While, All LAHH and major of LUMA belong to old group (100.0% & 45.8%) (p=0.0034). Although, our results are different with Anders'investigation, but Conforti and we found TNB-, TNB+ or HER2 often account for higher percentage in young group, in contrast, luminal types are more common in old group (LAHH>LUMA>LUMB). This definition desmontrated more malignant in young women.

Menopausal status: table 3,18 shows LUMA and LAHH are common in post-menopausal (57.0% & 88.2%). In pre-menopausal, TNB- & LBHH are more common (72.2% & 70.3%), TNB+ is 51.8% (p=0.0007). Our results and others also found LUMA or LAHH account for higher percentage in post-menopausal, in contrast, TNP are more common in pre-menopausal. LUMB, LBHH are common in pre-menopausal, while HER2 is common in post-menopausal.

By comparing with other investagations, we found TNB-, TNB+, HER2 (poor-prognosis) are more common in pre-menopausal and young than luminal types (well-prognosis). Molecular prognosis related to age, menopausal status are decreased as: LAHH, LUMA, LUMB, HER2, TNB+, TNB-, LBHH.

Site: chart 3,3 shows all molecular types tend to increase in upper outer quadrant, LBHH & LUMA are the most common: 64.9% & 63.0%. In upper inner quadrant, HER2 accounts for higher percentage: 24.2%. In

lower inner quadrant and central, all molecular types tend to decrease. HR(-) tumors are more common in lower inner quadrant (TNB+: 12.9%, both TNB- and HER2: 11.1%) and in lower outer quadrant, TNB- is 33.3%. In central breast, luminal type are more common (LUMA: 7.9%, both LUMB & LBHH: 8.1%) (p=0.00001).

TNM stage: (table 3,20) in stage I, LUMA is the most common as 39.4%. In contrast, stage III, TNB- accounts for highest rate: 33.3%. In stage II, LUMB is the most common as 74.3% (p=0.00001). Although, there are different rate, but our results are similar to Bhargava et al (2010). In general, HR+ breast cancer (LUMA, B, LAHH and LBHH) are almost seen in low stage (stage I & II), while HR- tumor (TNB-, TNB+, HER2) are more common in stage GĐ II & III. Molecular prognosis related to TNM are decreased as: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, TNB+, HER2 and TNB-. This result desmontrated in malignant relating to molecular types.

Risk: (table 3,21) in low risk, LUMA is the most common as 11.5%. However, TNB- and TNB+ are more common in high risk: 50.0% and 43.5%. In moderate risk, LBHH, LAHH and HER2 account for high rate: 86.5%, 82.4% & 76.8%, respectively (p=0.0001). In general, LUMA is common in low or moderate risk, while LUMB, LAHH, LBHH are common in moderate or high risk. Similarly, HR- tumors also account for high rate in moderate or high risk. Molecular prognosis related to risk are decreased as: LUMA, LUMB, LBHH, LAHH, HER2, TNB+ and TNB-.

* Molecular prognosis related to clinical characteristics are decreased as: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, HER2, TNB+ and TNB-

4.2.2 Relationship between molecular type and pathology characteristics

Tumor size: (table 3,22) tumor size range from 0.3 to 10.0cm, mean 2.4±1.3cm. Mean size, luminal types are smaller than HR- tumors. Our results are correspondant to Bhargava and Spitale 's researches. We found that LUMA and LAHH are more common in ≤2cm (57.6% & 64.7%). In contrast, >5cm, TNB- is the most common (11.1%), next to HER2 (6.1%). >2-5cm, HER2 is the most common: 58.6% next to TNB+ (47.1%) (p=0.048). By comparing with foreign researches, although there are different results, but luminal type is smaller in size than other types and LUMA accounts for higher rate than LUMB. Molecular prognosis related to tumor size are decreased as: LAHH, LBHH, LUMA, LUMB, TNB+, HER2 and TNB-.

Node status: metastasized nodes are ranged from 1 to 15, mean 1.3±0.1. LUMA is the lowest in mean node: 0.6±0.1 and both TNP and HER2 are the highest: 1.9±0.3. In table 3,23, LUMA is low rate in both two metastasized nodal groups (16.3% & 6.1%, respectively). TNB-, TNB+ and HER2 account for high ratio in >3 metastasized nodal group (27.8%, 22.4% and

22.3%, respectively (p=0.00001). Our results are the same to Doan Thi Phuong Thao's research. Molecular prognosis related to node status IHC are decreased as: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, TNB+, HER2 and TNB-. This contributes to define node role as important prognostic factor by molecular type.

Histological type: chart 3,5, medullary type is only seen in TNB- (11.1%) and TNB+ (4.7%) and metaplasia type is seen in TNB+ (2.4%) and HER2 (2.0%) (p=0.00001). We find that our results are simillary to other studies.

Grade: (table 3,25), in grade I, LUMA and B are more common, as: 19.4% & 13.5%. In contrast, in grade III, TNB-, TNB+ and HER2 the most common, as: 83.3%, 71.8% & 66.7%, while LUMA is less common (42.4%) (p=0.0001). We found that luminal tumor tend to decrease (LUMA to LBHH) in grade I and poor-prognosis types (TNB-, TNB+, HER2) are almost seen in grade III. Molecular prognosis related to grade are decreased as: LUMB, LUMA, LBHH, LAHH, HER2, TNB+ and TNB-.

NPI: Table 3,26 shows the average NPI is 4.2±1.2, LUMA is lowest in mean (3.9±1.1) and HER2 is highest (4.9±1.2). In well-prognosis group, LUMA and LBHH are more common: 32.1% & 32.4%. In contrast, poor-prognosis, TNB-, HER2 and TNB+ account for high rate (38.9%, 36.4% & 30.6% (p=0.00001). By comparing with other results, we found TNB-, TNB+ and HER2 are almost seen in moderate or poor-prognosis. LUMA is higher than LUMB in well-prognosis, in contrast, LUMB is higher than LUMA in moderate or poor-prognosis. Molecular prognosis related to NPI are decreased as: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, TNB+, HER2 and TNB-.

Lymphocytic Invasion: (Table 3,27) Lymphocytic stroma is 68.1% and TNB+, HER2 & TNB- are more common: 81.2%, 79.8% & 77.8% (p=0.00007). TNB+, lymphocytic stroma is the most common (81.2%). It is correspondant to Fulford and Livasy 's evaluation.

Necrosis: Table 3,28 shows necrosis is 17.4%; TNB+, TNB- & HER2 are high (28.2%, 27.8% & 22.2%). Luminal type is less necrosis (p=0.005). Our results is similar to Fulford and Livasy. Tumor necrosis is desmonstrated as a malignant feature in morphology.

Lymphovascular invasion: (table 3,29) Lymphovascular invasion is seen in 24.0%, TNB+, TNB- and HER2 account for high rate as: 45.9%, 27.8% & 32,3% (p=0.0001). Our result is similar to Cheang, but it is higher than Spitale and lower than Van den Eynden.

Carcinoma in situ: (table 3,30) carcinoma in situ is 52.3%. HER2 is more common: 63.6% and LAHH is lower (41.2%) (p=0.2050). In

general, ER(-) tumors are often associated by in situ cancer component, especially HER2.

* Molecular prognosis related to pathological characteristic are decreased as: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, TNB+, HER2 and TNB-.

➢ Molecular prognosis related to IHC, clinic-pathological characteristic are decreased as: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, HER2, TNB+ and TNB-. Our results are similar to others. However, Cheang, Choccalingam and Blows show TNB+ is poorer than TNB-. But Choi et al (2010) found TNB- is poorer than TNB+. This result is similar to our result. So, larger investigations of TNP are made to supply scientific data for defining this result.

CONCLUSION

By studying 495 breast cancer cases by IHC staining, we concluded:

1. Molecular type and immunohistochemical expression

- Molecular type: Molecular types are more common as: LUMA, HER2, TNB+ and LUMB; molecular types are less common as: LBHH, TNB- và LAHH.

- Molecular type and immunohistochemical expression ($p<0.001$)

+ Luminal type account for the higher percentage in Ki67 low, p53(-) and p53-Bcl2+; in which, LUMA is more common than LUMB in ER high expression, Bcl2(+), CK18(+), Ki67 low, p53(-) and p53-Bcl2+.

+ TNB+ and TNB- types are expressed in Ki67 high, p53(+) 3 point, p53+Bcl2- group and less expression in Bcl2.

+ HER2 type: is similar to TNB+ and TNB- types, but accounts for lower percentage.

+ LAHH and LBHH types: are majority expressed in Ki67 moderate or high, p53(+) 2-3 point and p53+Bcl2+ group.

* Molecular prognosis related to IHC are decreased as: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, HER2, TNB+ and TNB-.

2. Regarding the relationship between molecular type with clinico-pathological characteristics

2.1 Molecular type and clinical characteristics ($p<0.05$)

- Luminal type: LUMA accounts for the higher percentage in elder group, stage I, risk low and moderate, while LUMB is more common in stage II, risk moderate and high.

- TNB+ and TNB- types are majority seen in younger group, pre-menopausal status, risk moderate and high. TNB+ type accounts for

higher percentage in stage I, II; in contrast, TNB- type is more common in stage II, III.
- HER2 type is majority seen in younger group, lower 60 Y-O, stage II & III, and risk moderate and high.
- LAHH and LBHH type: are only seen in risk moderate and high. LAHH type accounts for the high percentage in stage I; in contrast, LBHH is more common in stage II.
* Molecular prognosis related to clinical characteristics are decreased as: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, HER2, TNB+ and TNB-.

2.2 Molecular type and pathological characteristics ($p<0.05$)

- Luminal type: account for the high percentage in NPI low and moderate; in which, LUMA type is more common in NPI low, ≤2cm in sise, grade I and low nodal status; in contrast, LUMB is more common in NPI moderate, >2-5cm in size, and grade II.
- TNB+ and TNB- types: are commonly seen in NPI moderate and high, higher grade, up 3 metastazed nodes. TNB- type accounts for the higher percentage than TNB+ in grade III, metastazed node, NPI high and >5cm in size.
- HER2 type is the most common in >2-5cm in size and metastazed node; it accounts for the high rate in grade III, NPI moderate and high.
- LAHH and LBHH types: are commonly seen in NPI low and moderate, grade III. LAHH type is more common in ≤2cm in sise, while LBHH accounts for the high percentage in 2-5cm in size and high nodal status.
* Molecular prognosis related to pathological characteristics are decreased as: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, TNB+, HER2 and TNB-.

Total prognosis are decreased as: LUMA, LUMB, LAHH, LBHH, HER2, TNB+ and TNB-.

RECOMMENDATION

By using routinely updated histopathology classification of WHO, we have to apply IHC method for defining molecular types in breast cancer with standards of Bhagarva (2010), added to CK18, Bcl2 and basal markers. This classification is useful to decide optional adjuvant treatment and prognosis for breast cancer.