

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: РЕЦЕПТОРОВ ЭСТРОГЕНОВ И ПРОГЕСТЕРОНА, Her2/neu И Ki67

А.А. ДОЛЖИКОВ¹
Н.З. ПАСЕНОВ²
А.А. КОТЛЯРОВ²

¹*Белгородский
государственный
университет*

e-mail: dolgikov@bsu.edu.ru

²*Белгородский областной
онкологический диспансер*

Исследованы иммунофенотипические свойства 1044 случаев рака молочной железы. Установлена связь рецепторного статуса опухолей и экспрессии белка Her2/neu, наибольшая частота его гиперэкспрессии при полной рецептор-негативности, связь иммунофенотипа опухолевых клеток с возрастом. Пролиферативная активность опухолевых клеток находится в обратной зависимости от содержания рецепторов эстрогенов и прогестерона, с гиперэкспрессией Her2/neu прямая связь пролиферативной активности отсутствует. После неoadьювантной терапии достоверно снижается экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестерона, экспрессия Her2/neu приобретает артефициальный характер.

Ключевые слова: рак молочной железы, рецепторы гормонов, онкомаркеры.

Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место в структуре онкопатологии у женщин [5]. По официальным данным [2] стандартизованный (на 100 000 населения) показатель заболеваемости РМЖ в 2004 году в России составил 63,9 и только в возрастных группах от 15 до 39 лет и старше 70 лет он уступает по частоте раку шейки матки и толстой кишки соответственно.

В последние десятилетия существенно изменились подходы к лечению РМЖ в разных возрастных группах и при разных клинических стадиях, что связано выявлением многих биологических свойств опухолей, установлением их морфологической, иммунофенотипической и генетической гетерогенности [10, 16, 18]. В связи с этим постоянно пересматриваются принципы лечения [8, 16]. Ведущую роль при этом играет полная морфологическая верификация опухоли с определением ее основных биологических свойств, к числу которых относятся уровень экспрессии рецепторов стероидных гормонов, экспрессии маркеров пролиферации, рецепторов факторов роста, выраженность ангиогенеза [1, 4, 17]. Показанная в настоящее время нелинейность и разнообразие взаимосвязей биологических свойств опухолевых клеток РМЖ [6, 15, 18] определяет актуальность их анализа с точки зрения оптимизации тактики индивидуализированного лечения. С другой стороны, неоднозначно воспринимается роль лечебного патоморфоза в возможности адекватной оценки биологических свойств опухолевых клеток, чему в отечественно литературе посвящены единичные исследования [9].

Выполненное нами исследование основано на анализе результатов определения иммуноморфологических свойств опухолей в 1044 отобранных репрезентативных случаях операбельного рака молочной железы за период с апреля 2006 по январь 2007 года. Изучены случаи только инвазивных карцином. В общем числе наблюдений 911 случаев представлены операционным материалом без предшествовавшей химио- и/или лучевой терапии, а также первичными трепанобиоптатами опухолей, в 133 случаях выполнению иммуноморфологического исследования предшествовали 2 – 4 курса неoadьювантной терапии. Наблюдения были разделены на 2 возрастные группы: до 55 лет и старше, отдельно проанализирована группа в возрасте до 35 лет, существенно отличающаяся биологическими свойствами РМЖ [3, 13]. Возраст больных варьировал от 26 до 86 лет (в среднем 56,3 года).

Иммуногистохимически определены уровни экспрессии рецепторов эстрогенов, прогестерона, маркера пролиферации Ki67, белка Her2/neu, являющегося представителем семейства тирозинкиназных рецепторов эпидермального фактора роста. Все исследования выполнены в соответствии с протоколами постановки диагностических реакций с использованием коммерческих диагностических антител фирмы «Dako»: моно-



клональные антитела к рецепторам эстрогенов (клон 1 D5), прогестерона (клон PgR636), белку Ki67 (клон MIB-1), поликлональные антитела к белку Her2/neu. Демаскировка антигенов осуществлялась по протоколу NHER в трис-ЭДТА буфере (pH=9,0) при температуре 95° в течение 40 минут. Использована полимерная система детекции «Biogenex» (USA), в качестве хромогена диаминобензидин.

Оценку уровней экспрессии рецепторов стероидных гормонов осуществляли по шкале PharmDx. Экспрессию белка Her2/neu оценивали по общепринятой визуальной шкале с диагностикой гиперэкспрессии (3+) при наличии непрерывного мембранного окрашивания в более чем 10% опухолевых клеток в инвазивном компоненте. Пролиферацию оценивали по относительному числу опухолевых клеток со средней и интенсивной ядерной реакцией на Ki67 с разделением результатов на 3 группы: низкий уровень пролиферации – до 10% Ki67-позитивных клеток, средний – от 10 до 30%, высокий – более 30% Ki67-позитивных клеток. Анализ выполняли на компьютерных изображениях, полученных с использованием микроскопа, оснащенного стандартной видеокамерой «DCM-300», программы «ScopePhoto» и программного комплекса для анализа изображений «WCIF ImageJ» (USA).

Все количественные данные регистрировали и статистически обрабатывали в электронных таблицах MS Excel. Достоверность отличий оценивали с использованием непараметрических критериев Пирсона (χ^2) и Фишера при уровне значимости $p < 0,05$. Вычисляли коэффициент линейной корреляции.

В целом ER-позитивные случаи в группе без неоадьювантной терапии составили 62,7%, PR-позитивные 58,7%. В настоящее время 10% рецептор-позитивных раковых клеток считается достаточным для оценки опухоли как потенциально чувствительной к эндокринной терапии. По этому критерию выделяют три группы: высокочувствительные к эндокринотерапии (экспрессия обоих типов рецепторов), недостаточно чувствительные (низкий уровень экспрессии рецепторов или отсутствие одного из них), нечувствительные (отсутствие рецепторов эстрогенов или прогестерона) [8, 15].

Помимо наличия рецепторов эстрогенов и прогестерона как таковых имеют значение варианты их сочетания. При корреляционном анализе установлена средняя прямая связь между экспрессией рецепторов эстрогенов и прогестерона ($r=0,57$). Выявлена следующая частота сочетаний экспрессии рецепторов: ER+PR+ 51,6%, ER+PR- 11,0%, ER-PR+ 7,0%, ER-PR- 30,4%. Результаты, полученные нами, сопоставимы с имеющимися в литературе данными [10]. По показателю экспрессии рецепторов в клетках рака молочной железы почти половина больных оказывается в группах промежуточного или высокого риска прогрессирования заболевания.

При сопоставлении двух возрастных групп установлено, что у постменопаузальных больных в опухолевых клетках выше частота экспрессии рецепторов эстрогенов (61,1% против 54,4%; $p < 0,05$), тогда как экспрессия рецепторов прогестерона не отличается (54,9% и 53,2%). Данный факт известен в литературе и является основанием для различной лечебной тактики у пре- и постменопаузальных пациенток. Особую группу составляют пациентки в возрасте до 35 лет. Карциномы молочной железы у них отличаются агрессивностью течения и менее благоприятным прогнозом, чем у пациенток более старших возрастных групп [3, 13]. В анализируемом нами материале таких пациенток было 36. Рецепторный статус опухолевых клеток как по отдельности, так и в сочетании у них резко отличался от общей выборки. ER-позитивные случаи составили только 33,3%, PR-позитивные только 36,1%, полный рецепторный позитив (ER+ PR+) наблюдался лишь в 25,0%, а 58,3% составили наблюдения полного рецепторного негатива, относящиеся к категории высокого риска прогрессирования заболевания.

Одним из важнейших биологических и прогностических маркеров РМЖ является экспрессия белка Her2/neu, повышенный уровень которого (гиперэкспрессия; 3+) ассоциируется с неблагоприятным прогнозом. Частота гиперэкспрессии варьирует по разным данным от 10 до 35%, что определяется шкалой оценки [18], но в большинстве рандомизированных исследований она составляет 15-20%. В проанализированном нами материале гиперэкспрессия Her2/neu в группе без неоадьювантной терапии составила в целом 14,5%, не отличаясь в возрастной группе до 55 лет и старше (14,7% и 14,2%). Гиперэкспрессия Her2/neu достоверно чаще имеется в случаях полного рецеп-



торного негатива (до 26,1%). Заслуживает внимания достоверное отличие частоты гиперэкспрессии Her2/neu при двух различных вариантах отсутствия одного из рецепторов стероидных гормонов. В случаях ER- PR+ статуса гиперэкспрессия Her2/neu имела в 2-3 раза чаще, чем при ER+ PR-. Традиционным является мнение, что экспрессия рецепторов прогестерона определяется функциональной активностью рецепторов эстрогенов и прямо ее отражает. Однако имеются данные, что активность рецепторов прогестерона зависит также от сигнальных путей между ростовыми факторами и рецепторами эстрогенов, гиперактивность которых может подавлять синтез рецепторов прогестерона [14]. Нами выше уже отмечено, что линейная корреляционная связь между уровнями рецепторов эстрогенов и прогестерона средняя. В эпидемиологических исследованиях также показано, что уровень содержания рецепторов прогестерона может являться независимым прогностическим фактором [10], в частности, для срока развития рецидива. При PR-статусе опухоли срок наступления рецидива короче, чем при ER-, а при PR+ опухолях рецидив возникает позже, чем при ER+ РМЖ [6]. В группе молодых пациенток (< 35 лет) гиперэкспрессия Her2/neu нами в целом выявлена в 16,7%, а в группе ER- PR- статуса ее частота составила 23,8%.

Достоверным маркером пролиферативной активности клеток является белок Ki67, который экспрессируется начиная с поздней G1 фазы клеточного цикла, в S, G2 и M фазах и, таким образом, позволяет выявлять весь пролиферативный пул опухоли. Считалось, что поскольку эстрогены обладают пролиферативным действием на гормонально-зависимые клетки, в том числе и опухолевые, то высокий уровень рецепторов эстрогенов должен прямо коррелировать с пролиферативной активностью. Однако полученные нами данные свидетельствуют против такой линейной зависимости и указывают на существование более сложных гормональных путей влияния на пролиферацию, по крайней мере, в раке молочной железы. В группах с полностью позитивным рецепторным статусом (ER+ PR+) высокий уровень пролиферативной активности (более 30% Ki67-позитивных клеток) выявлен только в 20%, тогда как низкий уровень выявлен в 60% наблюдений. Напротив, при полном рецепторном негативе (ER- PR-) в 60,9% случаев имелся высокий уровень пролиферации. Коэффициент линейной корреляции между экспрессией рецепторов эстрогенов и Ki67 составил - 0,46; для рецепторов прогестерона данный показатель - 0,40. Таким образом, выявляется обратная корреляционная зависимость между уровнями рецепторов эстрогенов и прогестерона и пролиферативной активностью.

Связь гиперэкспрессии Her2/neu с пролиферацией, определяемой по реакции на Ki67, оказалась незакономерной. Среди случаев с гиперэкспрессией Her2/neu более чем в 70% выявлен высокий индекс Ki67, однако линейной корреляции между данными показателями нет ($r=0,07$).

Г.А. Раскиным и С.В. Петровым [7] также обнаружен более высокий уровень пролиферации в эстроген-рецептор негативных случаях, что авторами расценивается как свидетельство наличия гормонально независимого механизма активации пролиферации опухолевых клеток. Основным кандидатом для этого является онкоген и белок Her2/neu. Однако и в этом случае пути действия на пролиферативную активность клеток не имеют вид прямого каскада, так как гиперэкспрессия Her2/neu приводит к исчезновению на клеточной мембране $\alpha\beta 1$ интегрина и E-кадгерина, что нарушает киназный путь стимуляции деления клеток. Отсутствие прямой связи между гиперэкспрессией Her2/neu и пролиферацией может быть объяснено количественным, а не качественным характером влияния Her2/neu.

После неоадьювантной терапии результаты иммуногистохимических исследований отличаются высокой частотой артефактов и сложных для оценки картин. Исследованная нами группа после лечения представлена 133 наблюдениями. После неоадьювантной терапии происходит статистически значимое снижение числа рецептор-позитивных случаев и еще более значимое увеличение частоты полного рецепторного негатива. Типичными для умеренной и выраженной степеней лечебного патоморфоза являются артефакты в виде цитоплазматической реакции на рецепторы гормонов, фрагментарной мембранной и диффузной, или в виде пятен цитоплазматической реакции на Her2/neu, которые оценке не подлежат и делают результаты исследования



неадекватными. Более того, после неоадьювантной терапии увеличилась частота выявления гиперэкспрессии Her2/neu, составившая в среднем 20,7%, и в большей степени она возросла в возрастной группе до 55 лет (24%; в группе старше 55 лет – 17,9%). Однако результаты, полученные при сравнении разнородных групп, совпали с данными, полученными при исследовании до и после терапии у одних и тех же пациенток, только в отношении изменений рецепторного статуса. Таких наблюдений у нас имелось 19. Изменения экспрессии Her2/neu следующие: в 5 случаях она снизилась, в 10 осталась неизменной, в 4 повысилась, но из них истинным повышением следует считать только 3 наблюдения, в которых выявлена гиперэкспрессия онкобелка. В последних опубликованных в литературе данных [9], основанных также на небольших сериях наблюдений (29 пациентов) аналогично указывается на преимущественное отсутствие изменений Her2/neu статуса рака молочной железы после неоадьювантной терапии и равнозначность повышения и понижения уровня экспрессии Her2/neu.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы.

1. Зависимость экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона не является линейно детерминированной, а находится под влиянием других факторов, в частности Her2/neu.

2. В возрасте до 35 лет наблюдается наиболее неблагоприятный иммунофенотип, характеризующийся преобладанием рецептор-отрицательности, которая более чем в половине случаев полная, а также относительно высокой частотой гиперэкспрессии Her2/neu, особенно при ER- PR- рецепторном статусе.

3. Связь между содержанием рецепторов эстрогенов, прогестерона и пролиферативной активностью опухолевых клеток имеет обратный характер. Высокая пролиферативная активность достоверно чаще наблюдается при полном рецептор-отрицательном статусе. Зависимость между уровнем пролиферативной активности и гиперэкспрессией Her2/neu разнонаправленная и вероятнее определяется взаимодействием промежуточных механизмов регуляции клеточного цикла.

4. После неоадьювантной терапии в опухолевых клетках рака молочной железы происходит значимое снижение экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона. Экспрессия Her2/neu приобретает артефициальный характер и меняется закономерно.

Литература

1. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Тканевые маркеры как факторы прогноза при раке молочной железы // Практическая онкология / Под ред. С.А. Тюляндина, В.М. Моисеенко. – СПб.: Центр ТОММ, 2004. – С. 41 – 50.
2. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Заболеваемость злокачественными новообразованиями населения России и стран СНГ в 2004 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина, 2006. – т. 17. – № 3 (прил.). – С. 45 – 77.
3. Дамения А.О., Туркевич Е.А., Семиглазов В.Ф. и др. Биологические особенности опухоли у больных раком молочной железы моложе 35 лет // Вопр. онкологии. – 2007. – Т. 53. – № 6. – С. 674 – 676.
4. Ермилова В.Д. роль современной патоморфологии в характеристике рака молочной железы // Практик. Онкология. – 2002. – Т. 3. – № 1. – С. 15 – 20.
5. Иванов В.Г. Эпидемиологические факторы риска, ранняя диагностика рака молочной железы // Практическая онкология / Под ред. С.А. Тюляндина, В.М. Моисеенко. – СПб.: Центр ТОММ, 2004. – С. 15 – 21.
6. Поддубная И.В., Комов Д.В., Колядина И.В. и др. Влияние рецепторного статуса первичной опухоли на срок наступления локальных рецидивов рака молочной железы // Материалы XI Российского онкологического конгресса. – М., 2007. – С. 161.
7. Раскин Г.А., Петров С.В. Влияние сверхэкспрессии Her2 на пролиферацию в раке молочной железы // Вопр. онкологии. – 2007. – Прил. 1. – С. 22- 23.
8. Семиглазов В.Ф. Современные стандарты лечения рака молочной железы (по материалам X Международной конференции по раку молочной железы в Сант-Галлене, 2007) // Материалы XI Российского онкологического конгресса. – М., 2007. – С. 16 – 20.
9. Фролов А.С., Шайдоров М.В., Ермаков В.Е. и др. Влияние неоадьювантной химиотерапии на ИГХ-статус опухоли при раке молочной железы Материалы XI Российского онкологического конгресса. – М., 2007. – С. 166.
10. Bardou V-J., Arpino G., Elledge R.M. et al. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two



- large breast cancer databases // *J. of Clin. Oncol.* – 2003. – Vol. 21. – N 10. – P. 1973 – 1979.
11. Cipollini G., Tomassi S., Paradiso A. et al. Genetic alterations in hereditary breast cancer // *Ann. of Oncol.* – 2004. – Vol. 15. – P. i7 – i13.
 12. Colleoni M., Minchella I., Mazzarol G. et al. Response to primary chemotherapy in breast cancer patients with tumors not expressing estrogen and progesterone receptors // *Ann. of Oncol.* – 2000. – Vol. 11. – P. 1057 – 1059.
 13. Colleoni M., Rotmensz N., Robertson C. et al. Very young women (<35 years) with operable breast cancer: features of disease at presentation // *Ann. of Oncol.* – 2002. – Vol. 13. – P. 273 – 279.
 14. Cui X., Schiff R., Arpino G. et al. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy // *J. of Clin. Oncol.* – Vol. 23. – N 30. – P. 7721 – 7735.
 15. Goldhirsch A., Glack J. H., Gelber R.D. et al. Meeting highlights: International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005 // *Ann. of Oncol.* – 2005. – Vol. 16. – P. 1569 – 1583.
 16. Hilakivi-Clarke L. Estrogen, BRCA1, and breast cancer // *Cancer res.* – 2000. – Vol. 15. – P. 49993 – 5001.
 17. La Castagnetta, Traina A., Liquoru M. et al. Quantitative image analysis of estrogen and progesterone receptors as a prognostic tool for selecting breast cancer patients for therapy // *Anal. Quant. Cytol. Histol.* – 1999. – Vol. 21. – N 1. – P. 59 – 62.
 18. Wolff A.C., Hammond E.H., Schwartz J.N. et al. American society of clinical oncology/College of American pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer // *J. of Clin. Oncol.* – 2007. – Vol. 25. – N 1. – P. 1 – 28.

ANALYSIS OF EXPRESSION OF THE MAJOR BIOLOGICAL MARKERS OF THE BREAST CANCER: RECEPTORS OF ESTROGENS AND PROGESTERONE, HER2/NEU AND KI67

A.A. DOLZHIKOV¹
N. Z. PASENOV²
A.A. KOTLYAROV²

¹*Belgorod State University*
e-mail:dolzhikov@bsu.edu.ru

²*Belgorod regional oncology
dispanser*

Immunophenotypic features of 1044 cases of breast cancer were examined. The relationship between receptor status and Her/2 neu expression, high rate of overexpression associated with full receptor-negative status, age dependence of immunophenotype were established. The proliferation of cells is characterized by reverse links with estrogen and progesterone receptors content; there are no direct links between Her2/neu overexpression and proliferation of tumor cells. After chemotherapy the level of estrogen and progesterone receptors decreases, Her2/neu expression is characterized by artificial type of reaction.

Key words: breast cancer, hormone receptors, oncomarkers