

Коньшев К.В.^{1,2}, Бриллиант А.А.¹, Сазонов С.В.^{1,2}

Уровень экспрессии Ki67 в ткани первичной опухоли и регионарных метастазов при раке молочной железы

1 - ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, 2 - ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет», г. Екатеринбург

Konyshov K. V., Brilliant A. A., Sazonov S. V.

Ki67 level in primary tumor and locoregional metastases of breast cancer

Резюме

Целью данного исследования были выявление и характеристика различий уровня Ki67 в ткани первичной опухоли и регионарных метастазов у больных раком молочной железы. В исследование вошли 89 пациенток с N+ раком молочной железы, прошедших оперативное лечение и не получавших до операции химио- или радиотерапию. Были сформированы 4 группы в соответствии с уровнем Ki67 в первичном очаге (1 – <20%, 2 – 20-40%, 3 – 40-60%, 4 – 60% и более). Проводилось сравнение уровня экспрессии Ki67 в первичной опухоли и регионарных метастазах в каждом случае во всех группах. Значимость изменений оценивалась при помощи теста Уилкоксона. Значимое увеличение индекса Ki67 в метастазах наблюдалось в первой группе, в остальных изменения оказались недостоверными. В результате исследования обнаружена тенденция к повышению уровня экспрессии Ki67 в регионарных метастазах в тех случаях, когда значение индекса Ki67 ткани первичной опухоли менее 20%.

Ключевые слова: Рак молочной железы, Ki67, регионарные метастазы, первичная опухоль

Summary

The purpose of this study was the identification and characterization of the differences in the level of Ki67 primary tumor tissues and regional metastases in breast cancer patients. The study included 89 patients with N + breast cancer, previous surgery or treated with preoperative chemotherapy or radiotherapy. 4 groups were formed in accordance with the level of Ki67 at source (1 - <20%, 2 - 20-40%, 3 - 40-60%, 4 - 60% or more). Were compared to the expression level of Ki67 in the primary tumor and regional metastases in each case in all groups. The significance of changes was estimated using the Wilcoxon test. A significant increase in the index of Ki67 in metastases was observed in the first group, in other changes were unreliable. The study found a tendency to increase the expression level of Ki67 in regional metastases in cases where the value of the index Ki67 tissue of the primary tumor is less than 20%.

Keywords: Breast cancer, Ki67, regional metastases, the primary tumor

Введение

В России, как и во всем мире, рак молочной железы – ведущая опухолевая патология среди женщин. Снижение смертности и повышение качества жизни пациенток с данным заболеванием является актуальной задачей. Одним из основных направлений ее решения в последние десятилетия является внедрение индивидуализированной терапии, учитывающей молекулярно-биологические характеристики опухоли. При этом для определения чувствительности опухоли к гормональной терапии необходимы сведения о наличии в опухолевых клетках рецепторов к эстрогену и прогестерону, таргетной терапии анти-Her2/неу-препаратами – о наличии этого рецептора, химиотерапии – о значении ин-

декса пролиферативной активности опухолевых клеток Ki67. Эти четыре маркера, определяемые суррогатным иммуногистохимическим (ИГХ) методом, являются общепризнанным и рекомендованным стандартом исследования биопсий первичного рака молочной железы во многих странах [1,2], а их комбинация позволяет отнести опухоль к одному из четырех подтипов, определяющих прогноз и терапевтическую тактику. Предполагается, что иммунофенотип и молекулярный подтип клеток опухоли, оставшихся в организме после операции, не изменяется по сравнению с первичным очагом, а лечение, назначенное на основе исследования первичной опухоли, подействует на них в полной мере.

Однако это не является бесспорной истиной, и в течение последних 10 лет в разных странах мира регулярно выходят статьи, посвященные вопросам несоответствия ткани метастатической и/или рецидивной опухоли иммуноморфологическим характеристикам ткани первичной опухоли. По данным различных исследователей, расхождение уровня экспрессии рецепторов к эстрогену (ER) между первичным и метастатическим РМЖ составляет 10-54% случаев [3,4,5,6], Her2/neu – в 0-38% случаев [7,8], Ki67 – в 0-39% случаев [9,10]. Также имеются данные о сдвиге молекулярно-генетического подтипа опухоли при метастазировании в сторону более агрессивных подтипов [11]. Значимость указанного несоответствия иммунофенотипов первичной и метастатической опухолевой ткани неясна. В ряде исследований содержится предположение, что отличия ER и Her2/neu статусов метастазов от первичного очага могут быть причиной неэффективности гормональной и анти-Her2/neu-терапии, имеющей место в ряде случаев, когда были проведены адекватные ИГХ-исследования первичной опухоли [12]. Некоторые исследования показывают, что изменение терапии на основе результатов исследования метастазов улучшило прогноз у включенных в исследование пациентов [13]. В ряде работ подобное утверждение считается недоказанным. Большинство исследователей сходятся во мнении, что исследование проблемы несоответствия ИГХ-статусов первичной и метастатической опухоли позволит как выработать клинические рекомендации, повышающие эффективность терапии и точность прогноза, так и открыть некоторые аспекты биологии злокачественных опухолей.

Исследования, посвященные несоответствию индекса Ki67 в ткани первичной опухоли и метастазов РМЖ, представлены в работах не так широко, как исследования особенностей рецепторов к эстрогену и человеческого эпидермальному фактору роста 2 типа. Это связано с более поздним включением исследования пролиферативного статуса в «золотой стандарт» ИГХ-исследования карциномы молочной железы. Однако, поскольку этот маркер имеет высокое прогностическое значение, включен в состав суррогатной панели для определения молекулярно-биологического подтипа РМЖ [1,2] и имеет значение для назначения химиотерапии, его исследования важны, и их количество растет.

Целью данного исследования были выявление и характеристика различий уровня Ki67 в ткани первичной опухоли и местных метастазов у больных раком молочной железы.

Материал и методы

В исследование вошел послеоперационный материал от 89 пациенток, проходивших оперативное лечение по поводу рака молочной железы в отделении онкоматологии Городской клинической больницы №40 и Свердловском областном онкологическом центре в 2011-2014 годах. Все пациентки имели регионарные метастазы и не получали лучевую или химиотерапию до операции.

Из заключенного в парафин материала первичной

опухоли и всех пораженных лимфатических узлов были изготовлены срезы толщиной 4 микрометра, которые депарафинировали с последующим восстановлением антигена в растворе Target retrieval solution (Dako, Дания) с помощью автоматической системы (PTLink, Dako, Дания). Окрашивание производили на иммуноштейнере Dako раствором анти-Ki67 антитела (клон SP6, Spring Bioscience, США).

Оценивали результат путем подсчета количества Ki67-положительных клеток среди всех опухолевых клеток в 3 полях зрения микроскопа (увеличение 400x), выбранных по признаку наибольшей митотической активности. Подсчет производился не менее чем в 500 опухолевых клеток [14].

Все случаи были распределены между 4 группами в зависимости от уровня экспрессии Ki67 в первичном очаге: группа 1 – до 20% (40 человек), группа 2 – от 20 до 40% (28 человек), группа 3 – от 40 до 60% (7 человек), группа 4 – от 60% и выше (14 человек). В каждой группе сопоставлялись доли Ki67-положительных клеток в ткани первичного очага и ткани метастазов. Значимость обнаруженных сдвигов оценивалась при помощи теста Уилкоксона.

Результаты и обсуждение

При сопоставлений уровня экспрессии Ki67 в каждой из групп получены следующие результаты. В первой группе среднее значение Ki67 в первичной опухоли составило 9,9%, в метастазах – 13,3%. Разности между уровнем экспрессии Ki67 в метастазах и первичной опухоли в группе 1 в каждом случае показаны на рисунке 1. Всего в первой группе в 31 случае (77%) произошло изменение уровня пролиферативной активности, в 12 случаях (30%) – в сторону уменьшения и в 19 случаях (47%) – в сторону увеличения. Сдвиг уровня экспрессии Ki67 в данной группе статистически значим ($p < 0,05$).

Во второй группе среднее значение Ki67 в первичной опухоли составило 26,1%, в метастазах – 26,8%. Разности между уровнем экспрессии Ki67 в метастазах и первичной опухоли в каждом случае в группе 2 представлены на рисунке 2. Всего во второй группе сдвиг произошел в 26 случаях (93%), из них в сторону уменьшения в 14 случаях (50%), в сторону увеличения – в 12 случаях (43%). Наблюдаемые изменения не имели статистической значимости.

В третьей группе среднее значение индекса Ki67 в ткани первичной опухоли составило 42,9%, в ткани метастазов – 38,2%. Разности между уровнем экспрессии Ki67 в метастазах и первичной опухоли в каждом случае в группе 3 продемонстрированы на рисунке 3. В этой группе сдвиг произошел во всех случаях, из них в 5 (71%) в сторону уменьшения и в 2 (29%) – в сторону увеличения. Наблюдаемый сдвиг не подтвержден статистически.

В четвертой группе среднее значение индекса Ki67 в ткани первичной опухоли составило 70,0%, в ткани метастазов – 57,5%. Разности между уровнем экспрессии Ki67 в метастазах и первичной опухоли в каждом случае в группе 4 показаны на рисунке 4. В данной группе сдвиг

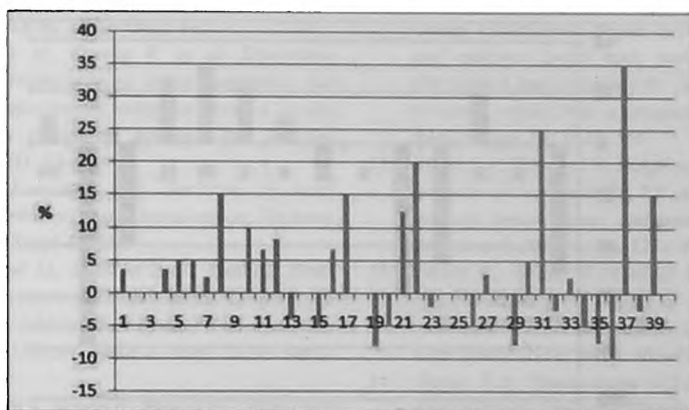


Рисунок 1. Разность уровней экспрессии Ki67 в ткани метастатической и основной опухоли в группе 1.

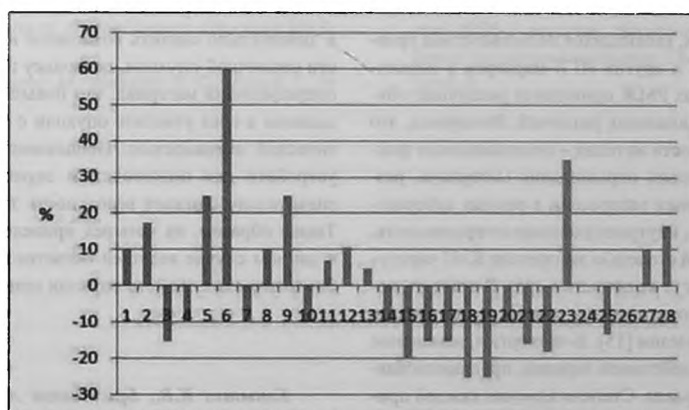


Рисунок 2. Разность уровней экспрессии Ki67 в ткани метастатической и основной опухоли в группе 2.

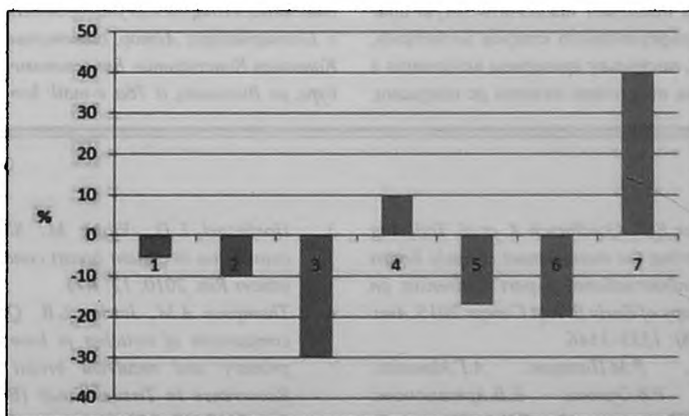


Рисунок 3. Разность уровней экспрессии Ki67 в ткани метастатической и основной опухоли в группе 3.

произошел в 12 случаях (86%), из них в стороны уменьшения и увеличения – по 6 случаев (43%). Наблюдаемый сдвиг не подтвержден статистически.

Заключение

В данном исследовании освещены закономерности изменения уровня экспрессии маркера проли-

феративной активности Ki67 при метастазировании рака молочной железы в местные лимфатические узлы. Статистически подтверждено увеличение уровня пролиферативной активности в метастазах в группе с индексом Ki67 в ткани первичной опухоли менее 20%. В других группах существование сдвига не доказано.

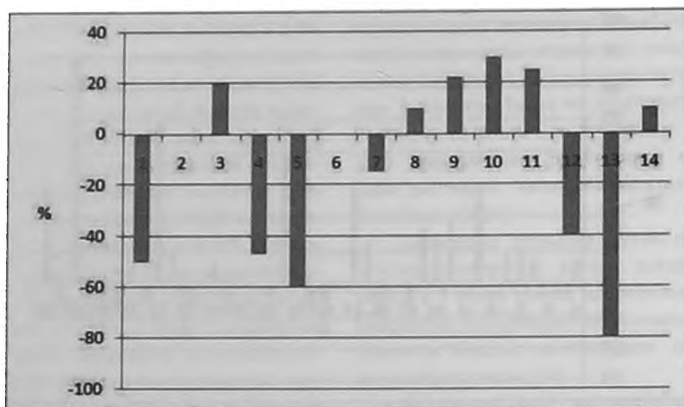


Рисунок 4. Разность уровней экспрессии Ki67 в ткани метастатической и основной опухоли в группе 4.

В исследованиях, касающихся несоответствия уровней экспрессии Ki67 и других ИГХ-маркеров в первичном очаге и метастазах РМЖ приводятся различные объяснения причин наблюдаемых различий. Во-первых, это технические особенности методик – неоптимальные фиксации, проводка, условия окрашивания материала, различные критерии оценки экспрессии в разных лабораториях и т.п. Во-вторых, внутриопухолевая гетерогенность, когда участки с разной степенью экспрессии Ki67 чередуются, и некоторые могут не попасть в срез. В-третьих, истинное изменение биологических параметров опухоли в процессе развития болезни [15]. В-четвертых, изменение свойств опухоли под действием терапии, предшествовавшей получению материала. Степень влияния каждой причины на результаты исследований неясны, и в настоящее время нельзя исключить ни одну из них. Дизайн проведенного исследования позволяет исключить такую причину изменения пролиферативного статуса метастазов, как действие терапии, поскольку критерием включения в исследование являлось отсутствие лечения до операции,

и значительно снизить возможное влияние гетерогенности первичной опухоли, поскольку использовался только операционный материал, что повышало вероятность попадания в срез участков опухоли с максимальной митотической активностью. Использование автоматических устройств для подготовки и окрашивания препаратов значительно снижает вероятность технической ошибки. Таким образом, из четырех приведенных выше причин в данном случае ведущей остается истинное изменение биологических свойств опухоли при метастазировании. ■

Коньшев К.В., Бриллиант А.А., к.м.н., Сазонов С.В., д.м.н., проф., ГБУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку – Коньшев Константин Вячеславович, 620137, Екатеринбург, ул. Вилонова, д. 76а, e-mail: kon-konyshhev@yandex.ru

Литература:

1. Coates A.S., Winer E.P., Goldhirsch A. et al. Tailoring therapies - improving the management of early breast cancer: St GallenInternational Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann. Oncol.* 2015; 26(8): 1533–1546.
2. В.Ф.Семизлазов., Р.М.Палтуев, А.Г.Манихас, В.А.Горбунова, Р.В.Орлова, Е.В.Артамонова, Н.С.Бесова, К.М.Пожарисский, А.Г.Кудайбергенова, В.Н.Гриневич, Н.А.Савёлов, С.В. Сазонов, И.В. Высоцкая, В.П.Летягин, В.Г.Черенков, К.П. Лактионов, И.Д.Бубликов, Л.И.Корытова, Е.А.Маслюкова, Т.Ю.Семизлазова, В.Б.Карахан, Е.С.Половников, Д.М.Белов, Д.Р.Насхлеташвили, Г.А.Дашян, А.А.Параконная. Клинические рекомендации РООМ по диагностике и лечению рака молочной железы. Санкт-Петербург, Издательский дом «АБВ-пресс», 2015, 504 с.
3. Hoefnagel L.D., Vijver M., Slooten H.J. Receptor conversion in distant breast cancer metastases. *Breast cancer Res.* 2010; 12: R75.
4. Thompson A.M., Jordan L.B., Quinlan P. Prospective comparison of switches in biomarker status between primary and recurrent breast cancer: the Breast Recurrence In Tissues Study (BRITS). *Breast cancer Res.* 2010; 12: R92.
5. Коньшев К.В., Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Экспрессия гормональных рецепторов клетками регионарных метастазов и первичного очага при раке молочной железы. *Уральский медицинский журнал.* 2014; (2): 48–50.
6. Коньшев К.В., Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Изменение экспрессии рецепторов к эстрогену клетками карциномы молочной железы при регионарном метастазировании. *Вестник Уральской медицинской*

- академической науки. 2015; 53(2): 4–6.
7. Arihiro K., Oda M., Ogawa K. et al. Discordant HER2 status between primary breast carcinoma and recurrent/metastatic tumors using fluorescence in situ hybridization on cytological samples. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2013; 43(1): 55–62.
 8. Sazonov S.V., Konyshov K.V. Her2/neu in local metastases and primary focus of breast cancer. *Virchows Arch.* 2015; 467(Suppl 1): S55.
 9. Falck A.K., Fernö M., Bendahl P.-O., Rydén L. Does Analysis of Biomarkers in Tumor Cells in Lymph Node Metastases Give Additional Prognostic Information in Primary Breast Cancer. *World J. Surg.* 2010; 34(7): 1434–1441.
 10. Ibrahim T., Farolfi A., Scarpi E., Mercatali L. Hormonal receptor, human epidermal growth factor receptor-2, and Ki67 discordance between primary breast cancer and paired metastases: clinical impact. *Oncology* 2013; 84(3): 150–157.
 11. Falck A.-K., Fernö M., Bendahl P.-O., Rydén L. St Gallen molecular subtypes in primary breast cancer and matched lymph node metastases - aspects on distribution and prognosis for patients with luminal A tumours: results from a prospective randomised trial. *BMC Cancer* 2013; 13: 558.
 12. Aitken S.J., Thomas J.S., Langdon S.P. et al. Quantitative analysis of changes in ER, PR and HER2 expression in primary breast cancer and paired nodal metastases. *Ann. Oncol.* 2010; 21(6): 1254–61.
 13. Amir E., Miller N., Geddie W. et al. Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30(6): 587–92.
 14. Франк Г.А., Завалишина Л.Э., Пожариский К.М. Рак молочной железы. Практическое руководство для врачей. М: Практическая медицина; 2014.
 15. Pusztai L., Viale G., Kelly C.M., Hudis C.A. Estrogen and HER-2 receptor discordance between primary breast cancer and metastasis. *Oncologist* 2010; 15(11): 1164–8.