

## Трансформация рецепторного статуса в группах пролиферативной активности карцином молочной железы

На сегодняшний день известно, что для решения проблем терапии карцином молочной железы необходимо учитывать ряд прогностических и предсказывающих факторов. Прогностическая ценность индекса клеточной пролиферации (KI-67) является важной для тех опухолей, у которых сложно предсказать клиническое течение болезни только по гистологическим параметрам. Для рака молочной железы индекс клеточной пролиферации является независимым «предсказателем» как общей выживаемости, так и рецидива заболевания [8]. К тому же высокий индекс клеточной пролиферации коррелирует с неблагоприятным клиническим исходом при однофакторном или многофакторном анализе [5, 6, 7, 9].

При исследовании ткани карциномы практически всегда используется определение рецепторов стероидных гормонов эстрогена (ER) и прогестерона (PR), без данных о которых невозможно правильное назначение гормонотерапии [2]. Известно, что в случаях (ER+ PR+), (ER- PR+) и (ER+ PR-) в третьей резистентность к гормонотерапии (тамоксифен) определяется чаще, чем в первых двух. Это объясняется тем, что у больных с «ER+ PR-» выше уровень экспрессии Her-2/neu и EGFR [1].

Her-2/neu – протоонкоген, кодирующий рецептор 2 человеческого эпидермального фактора роста (c-erbB-2) относится к группе рецепторов тирозинкиназы. Гиперэкспрессия этого онкогена наблюдается в 25–30% случаев РМЖ и ассоциируется с плохим прогнозом как при наличии регионарных метастазов, так и при их отсутствии [10].

В настоящее время к широкому клиническому использованию рекомендованы перечисленные выше опухолевые маркеры, а именно: Ki-67, ЭР, ПР, Her-2/neu. Их сочетание дает необходимую информацию о рецепторном статусе опухоли. Остается неясной динамика процессов в опухоли. Изучение зависимости рецепторного статуса от пролиферации осложнено гетерогенностью исследуемых опухолей.

### Материалы и методы исследования

Материал отобранных случаев исследовался гистологическим, иммуногистохимическим, морфометрическими и статистическим методами.

Исследованы 406 карцином молочной железы. Материал для исследования поставлялся из НПЦ «Онкология» Министерства здравоохранения Свердловской области и Городского Маммологического центра на базе ГКБ №40.

Для проведения иммуногистохимических исследований использова-

лись стекла, покрытые полилизинном – POLYSINE SLIDES фирмы (Thermo scientific), Германия). Определение экспрессии Her-2/neu на клетках опухоли осуществлялось с помощью поликлональных антител Polyclonal Rabbit Anti-Human c-erb-2 Oncoprotein (DAKO, Дания), рецепторов Estrogen и Progesterone на ядрах клеток опухоли с помощью моноклональных мышиных антител Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor, Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor (DAKO, Дания). Для определения ядерного индекса пролиферации опухоли также использовались антитела Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen фирмы (DAKO, Дания). Уровень пролиферативной активности оценивали при изучении экспрессии маркера пролиферации клеток – Ki-67. По процентному отношению числа окрашенных ядер клеток карциномы к неокрашенным можно судить о пролиферативной активности исследуемой опухоли. Все иммуногистохимические реакции осуществлялись в автостейнере «ДАКО» (Дания), с использованием буфера Dako Wash Buffer, системы визуализации Dako EnVision+ Dual Link System-HRP, хромогена Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System фирмы (DAKO, Дания).

Оценку реакции осуществляли на роботизированном микроскопе «Zeiss Ymager M» (Германия). Оценка уровней мембранной экспрессии Her-2/neu в опухолевых клетках производилась по шкале от 0 до 3+ [3]. Уровень экспрессии рецепторов Estrogen и Progesterone определялся по шкале от 0 до 8+ [4].

#### Результаты собственных исследований

При обработке данных 406 пациентов в соответствии с экспрессией белка Ki-67 на клетках карциномы были сформированы 3 группы пациентов. В первую группу были определены 248 пациенток (61% исследованных случаев) экспрессирующих Ki-67 менее чем 10% клеток включительно, во второй группе – 82 пациентки (20% случаев) Ki-67 экспрессируется более чем 10% но менее 30% клеток включительно. В третью группу вошло 76 карцином или 19% исследованных случаев, где рецепторы Ki-67 определяется на более чем 30% клеток (Рис. 2). Распределение пациентов с карциномой молочной железы в соответствии с процентом экспрессирующих Ki-67 опухолевых клеток представлено на Рис. 1.

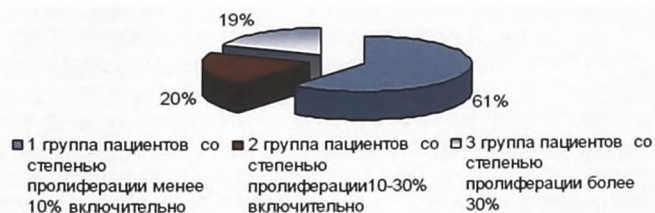


Рисунок 1. Распределение пациентов с карциномой молочной железы в соответствии с процентом клеток, экспрессирующих Ki-67.

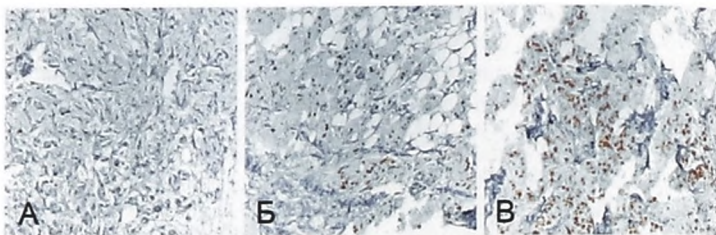


Рисунок 2. Карцинома молочной железы со степенью пролиферации А – 10% опухолевых клеток, Б – 30 % опухолевых клеток, В – 50% опухолевых клеток. X 100. Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер- гематоксилин Майера.

Таким образом, большинство карцином молочной железы имеют низкий уровень пролиферации, то есть до 10% клеток экспрессируют рецепторы белка Ki-67.

Были проведены дополнительные исследования, позволяющие оценить особенности рецепторного профиля опухоли в зависимости от пролиферативной активности клеток карциномы (Табл. 1).

В результате сравнительного анализа 406 карцином, первая группа случаев со степенью пролиферации менее 10% достоверно не отличается по рецепторному статусу от второй группы с более высоким уровнем пролиферации клеток карциномы. В свою очередь вторая (пролиферация от 10%, но менее 30%) и третья группы (индекс пролиферации которой более 30%) экспрессии Ki-67 имеют ряд отличий в своем рецепторном профиле. С увеличением пролиферативной активности клеток карциномы достоверно снижается экспрессия рецепторов стероидных гормонов (Estrogen ресептор, Progesterone ресептор) и повышается экспрессия HER-2/neu (Табл. 1).

В связи с гетерогенностью анализируемых карцином, вошедших в группы пролиферации, было решено провести исследование по группам пролиферации отдельно положительные и отрицательные по экспрессии рецепторов и HER-2 /neu случаи. Обнаружено, что из 406 случаев карцином только 13 (3%) имеют одновременно положительную экспрессию рецепторов Estrogen, Progesterone и HER-2 /neu. При анализе распределения этих случаев по группам пролиферативной активности обнаружено достоверное увеличение экспрессии стероидных рецепторов от первой ко второй и уменьшение к третьей группе пролиферации (Табл. 2). Экспрессия рецепторов HER-2 /neu достоверно по группам пролиферации не отличается. Таким образом, в данной группе опухолей обнаружена другая зависимость изменения уровня экспрессии рецепторов при изменении пролиферативных процессов по сравнению с общим результатом.

Таблица 1  
Рецепторный статус карциномы в группах экспрессии KI-67

Группа экспрессии KI- 67	Среднее значение рецепторного статуса	
1 группа – случаи с низкой степенью пролиферации (менее 10%)	Estrogen receptor	$2,5 \pm 0,17$ P(1-2) >0,05
	Progesterone receptor	$2,2 \pm 0,17$ P(1-2) >0,05
	HER-2 /neu	$1,9 \pm 0,82$ P(1-2) >0,05
2 группа – случаи со средней степенью пролиферации (более 10%, но менее 30% включительно)	Estrogen receptor	$2,3 \pm 0,22$ P(2-3) <0,05
	Progesterone receptor	$2,0 \pm 0,20$ P(2-3) <0,05
	HER-2 /neu	$2,0 \pm 0,9$ P(2-3) <0,05
3 группа – случаи с высокой степенью пролиферации (более 30%)	Estrogen receptor	$1,5 \pm 0,25$ P(3-1) <0,05
	Progesterone receptor	$1,3 \pm 0,24$ P(3-1) <0,05
	HER-2 /neu	$2,8 \pm 1,5$ P(3-1) <0,05

Таблица 2  
Рецепторный статус карциномы в группах экспрессии KI-67 с положительной экспрессией рецепторов и HER-2 /neu

Группа экспрессии KI- 67	Среднее значение рецепторного статуса	
1 группа – случаи с низкой степенью пролиферации (менее 10%)	Estrogen receptor	$3,6 \pm 0,87$ P(1-2) <0,05
	Progesterone receptor	$4,0 \pm 1,3$ P(1-2) <0,05
	HER-2 /neu	$2,3 \pm 0,40$ P(1-2) >0,05
2 группа – случаи со средней степенью пролиферации (более 10%, но менее 30% включительно)	Estrogen receptor	$5,3 \pm 2,27$ P(2-3) <0,05
	Progesterone receptor	$5,0 \pm 1,37$ P(2-3) <0,05
	HER-2 /neu	$2,2 \pm 0,11$ P(2-3) >0,05
3 группа – случаи с высокой степенью пролиферации (более 30%)	Estrogen receptor	$3,9 \pm 1,3$ P(3-1) >0,05
	Progesterone receptor	$4,1 \pm 2,27$ P(3-1) >0,05
	HER-2 /neu	$2,1 \pm 0,10$ P(3-1) >0,05

Следующим этапом исследовали зависимость уровня экспрессии эстрогеновых рецепторов от уровня активности пролиферативных процессов в группе карцином положительных только по Estrogen receptor и отрицательных по Progesterone receptor и HER-2 /neu. Исследовались 60 соответствующих случаев (15% всех карцином). При сравнительном анализе оказалось, что уровень экспрессии Estrogen receptor в первой группе пролиферативной активности достоверно ниже, чем во второй и третьей группах (Табл. 3). Следовательно, при увеличении уровня пролиферации опухолей в них растет экспрессия Estrogen receptor. При сравнении уровней экспрессии Progesterone receptor и HER-2 /neu, в группах исследования достоверных различий не об-

наружено. Стоит отметить, что случаев с высокой степенью пролиферации и максимальной степенью экспрессии Estrogen receptor в 3 раза меньше, чем случаев с низкой пролиферативной активностью.

Таблица 3  
Рецепторный статус карциномы в группах экспрессии KI-67 с положительной экспрессией Estrogen receptor

Группа экспрессии KI-67	Среднее значение рецепторного статуса		
	Estrogen receptor	Процент	Среднее значение ± стандартное отклонение (P-значение)
1 группа – случаи с низкой степенью пролиферации (менее 10%)	Estrogen receptor	45%	$3,5 \pm 0,21$ P(1-2) < 0,05
	Progesterone receptor		$0,01 \pm 0,01$ P(1-2) > 0,05
	HER-2 /neu		$0,3 \pm 0,05$ P(1-2) > 0,05
2 группа – случаи со средней степенью пролиферации (более 10%, но менее 30% включительно)	Estrogen receptor	40%	$4,5 \pm 0,25$ P(2-3) > 0,05
	Progesterone receptor		$0,01 \pm 0,01$ P(2-3) > 0,05
	HER-2 /neu		$0,28 \pm 0,06$ P(2-3) > 0,05
3 группа – случаи с высокой степенью пролиферации (более 30%)	Estrogen receptor	15%	$4,8 \pm 0,44$ P(3-1) < 0,05
	Progesterone receptor		$0,0 \pm 0,0$ P(3-1) > 0,05
	HER-2 /neu		$0,6 \pm 0,04$ P(3-1) > 0,05

При исследовании зависимости уровня экспрессии прогестероновых рецепторов от уровня активности пролиферативных процессов в карциноме молочной железы, положительных только по Progesterone receptor и отрицательных по Estrogen receptor и HER-2 /neu, обнаружено 32 случая, удовлетворяющих этим критериям (8% всех карцином). Не выявлено достоверных различий в экспрессии этих рецепторов по группам, следовательно, уровень экспрессии Progesterone receptor не зависит от пролиферативной активности опухоли (Табл. 4). Экспрессия HER-2 /neu в группах пролиферативной активности не имеет достоверных различий. Экспрессия Estrogen receptor не меняется с увеличением уровня пролиферации опухолей. Число случаев относящихся к 3-й группе с высокой степенью пролиферации в 3 и 6 раз меньше, чем количество карцином во второй и третьей группах экспрессии KI-67 соответственно.

Из 406 случаев инфильтративной карциномы 129 (32%) одновременно экспрессируют Estrogen receptor, Progesterone receptor и отрицательны по HER-2 /neu. При исследовании зависимости уровня экспрессии стероидных рецепторов от уровня активности пролиферативных процессов карциномы в этой группе карцином не обнаружено достоверных отличий при изменении пролиферативной активности опухолей (Табл. 5). Наибольшее количество исследованных карцином относится к 1 первой группе пролиферативной активности. С увеличением пролиферативных процессов в опухоли уменьшает количество случаев с положительными Estrogen и Progesterone receptor. Ко-

личество случаев уменьшается с увеличением пролиферативной активности от первой группы к третьей в 4 раза.

Таблица 4  
Рецепторный статус карциномы в группах экспрессии KI-67 с положительной экспрессией Progesterone receptor

Группа экспрессии KI- 67	Среднее значение рецепторного статуса		
	1 группа – случаи с низкой степенью пролиферации (менее 10%)	Estrogen receptor	
Progesterone receptor		60%	4,3 ± 0,29 P(1-2) >0,05
HER-2 /neu		0,01 ± 0,002 P(1-2) >0,05	
2 группа – случаи со средней степенью пролиферации (более 10%, но менее 30% включительно)	Estrogen receptor		0,04 ± 0,04 P(2-3) >0,05
	Progesterone receptor	30%	4,3 ± 0,42 P(2-3) >0,05
	HER-2 /neu		0,09 ± 0,06 P(2-3) >0,05
3 группа – случаи с высокой степенью пролиферации (более 30%)	Estrogen receptor		0,0 ± 0,0 P(3-1) >0,05
	Progesterone receptor	10%	3,85 ± 0,76 P(3-1) >0,05
	HER-2 /neu		0,57 ± 0,20 P(3-1) >0,05

Таблица 5  
Рецепторный статус карциномы в группах экспрессии KI-67 с положительной экспрессией рецепторов Estrogen и Progesterone

Группа экспрессии KI- 67	Среднее значение рецепторного статуса		
	1 группа – случаи с низкой степенью пролиферации (менее 10%)	Estrogen receptor	
Progesterone receptor		48%	4,8 ± 0,15 P(1-2) >0,05
HER-2 /neu		0,24 ± 0,03 P(1-2) >0,05	
2 группа – случаи со средней степенью пролиферации (более 10%, но менее 30% включительно)	Estrogen receptor		4,8 ± 0,16 P(2-3) >0,05
	Progesterone receptor	39%	4,9 ± 0,17 P(2-3) >0,05
	HER-2 /neu		0,24 ± 0,04 P(2-3) >0,05
3 группа – случаи с высокой степенью пролиферации (более 30%)	Estrogen receptor		5,05 ± 0,33 P(3-1) >0,05
	Progesterone receptor	13%	5,3 ± 0,27 P(3-1) >0,05
	HER-2 /neu		0,2 ± 0,07 P(3-1) >0,05

В группу карцином, экспрессирующих HER-2 /neu рецепторы (2+ и 3+ случаи) и отрицательных по Estrogen и Progesterone receptor, вошел 41 случай (10% всех карцином). Половина всех исследованных случаев вошли во вто-

рую группу экспрессии KI-67 и имеют средний уровень пролиферации. Достоверных различий экспрессии HER-2 /neu по группам пролиферации не обнаружено, следовательно, уровень экспрессии HER-2 /neu не зависит от пролиферативной активности опухоли (Табл. 6).

Таблица 6  
Рецепторный статус карциномы в группах экспрессии KI-67 с положительной экспрессией рецепторов HER-2 /neu

Группа экспрессии KI- 67	Среднее значение рецепторного статуса	
1 группа – случаи с низкой степенью пролиферации (менее 10%)	HER-2 /neu 23%	2,4±0,11 P(1-2) >0,05
2 группа – случаи со средней степенью пролиферации (более 10%, но менее 30% включительно)	HER-2 /neu 54%	2,5±0,07 P(2-3) >0,05
3 группа – случаи с высокой степенью пролиферации (более 30%)	HER-2 /neu 23%	2,3±0,1 P(3-1) >0,05

Было проведено дополнительное исследование, позволяющее изучить распределение случаев с отрицательной экспрессией рецепторов Estrogen, Progesterone и HER-2 /neu по группам пролиферации. В результате анализа 64 (16%) случаев выяснилось, что к группам с низкой и средней степенью пролиферации относятся 25% и 28% исследуемых случаев соответственно. Наибольшее число карцином оказалось в третьей группе, с высокой степенью пролиферации (44%) случаев.

#### Заключение

Таким образом, распределение по группам пролиферации всех случаев показало, что с увеличением пролиферативной активности клеток карциномы достоверно снижается экспрессия рецепторов стероидных гормонов (Estrogen ресептор, Progesterone ресептор) и повышается экспрессия HER-2/ neu. Проанализировав полученные данные, можно сделать вывод, что общее, не учитывающее гетерогенность свойств опухолей, входящих в выборку, исследование может быть использовано для оценки рецепторного профиля инфильтративных карцином молочной железы с учетом ряда ограничений. Обнаружено, что в 32% случаев клетки карцином молочной железы экспрессируют только стероидные рецепторы. Всего 3% случаев являются положительными одновременно по экспрессии Estrogen receptor, Progesterone receptor и HER-2/neu.

Дифференцированный подход в исследовании рецепторного статуса по группам пролиферации опухоли показал, что при увеличении уровня экс-

прессии Estrogen рецептор, достоверно растет количество опухолей с высокой пролиферативной активностью. Не обнаружено достоверных различий в экспрессии Progesterone рецептор при изменении уровня пролиферации в опухоли. Кроме того выяснено, что большинство положительных по экспрессии Estrogen и Progesterone рецептор (стероидных рецепторов) случаев относятся к группе с низкой степенью пролиферации. При исследовании экспрессии HER-2 /neu также не обнаружено достоверных различий по группам пролиферативной активности. Группа со средней степенью пролиферации включает в себя в два раза больше случаев карцином (с положительной экспрессией HER-2/neu).

#### Литература

1. Гарин А.М. Эндокринная терапия и гормонозависимые опухоли. М. Тверь: Три-ада, 2005. 240 с.
2. Глузман Д.Ф., Скляренко Л.М., Надгорная В.А., Крячок И.А. Диагностическая иммуноцитохимия опухолей. Киев : Морнион, 2003. 156 с.
3. Bilous M., Dowsett M., Isola J., Lebeau A., Moreno A., et al. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines // *Mol Pathol*. 2003. №16. P. 82-173.
4. Elledge R.M., Green S., Pugh R., Allred D.C., Clark G.M., Hill J., et al. Estrogen receptor (ER) and Progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immunohistochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. // *Int J Cancer*. 2000. № 89. P. 7-11.
5. Gonzalez-Vela M.C., Garijo M.F., Fernandez F., Val-Bernal J.F. MIB1 proliferation index in breast infiltrating carcinoma: comparison with other proliferative markers and association with new biological prognostic factors. // *Histol Histopathol*. 2001. №16. P. 399-406.
6. Jansen R.L. MIB-1 labeling index is an independent prognostic marker in primary breast cancer. // *Br J Cancer*. 1998. № 78. P. 460.
7. Jones S., Clark G., Koleszar S., et al. Low proliferative rate of invasive node-negative breast cancer Predicts for a favorable outcome: a prospective evaluation of 669 patients. // *Breast Cancer*. 2001. №1. P. 310-314.
8. Penault-Llorca F., Cayre A., Bouchet Mishellany F. et al. Induction chemotherapy for breast carcinoma: predictive markers and relation with outcome. // *Int J Oncol* 2003. № 22. P 25-1319.
9. Scholzen T. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. // *J Cell Physiol*. 2000. № 182. P 311.
10. Tandon A.K. et al. Her-2neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. // *J Clin Oncol*. 1992. № 9. P 599-605.