



Патолого-анатомическое отделение ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

Сазонов Сергей Владимирович

Заведующий отделением,
заведующий кафедрой гистологии, цитологии, эмбриологии
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ,
д.м.н., профессор

*Сазонов С.В., Бриллиант А.А.,
Бриллиант Ю.М.*

СТАНДАРТ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Институт медицинских клеточных технологий,
Екатеринбург, Российская Федерация;
Уральский государственный медицинский университет,
Екатеринбург, Российская Федерация

Рак молочной железы считается одной из наиболее распространенных опухолей и самой частой причиной смерти от онкологических заболеваний среди женщин в экономически развитых странах [1]. Прогноз рака молочной железы зависит от биологических особенности опухоли — гистологического типа, степени злокачественности, экспрессии рецепторов гормонов и факторов роста (HER-2), а также других молекулярных характеристик опухоли [2, 3]. Считается, что степень пролиферации ткани карциномы молочной железы также имеет важное прогностическое и предсказывающее значение.

Неконтролируемая пролиферация в опухоли может быть обнаружена несколькими способами. Например, подсчетом фигур митоза в клетках опухоли, включения меченных нуклеотидов в ДНК с последующей оценкой в проточном цитометре. Тем не менее, наиболее широко практикуется исследование пролиферативной активности, определяемой иммуногистохимическим методом [4]. Основным маркером для определения уровня пролиферации является KI-67.

Белок был тщательно изучен и легко определяется в настоящее время. KI-67 впервые был обнаружен Гердесом и соавторами в 1991 г. как ядерный негистонный белок. В 1993 г. была найдена последовательность генов, кодирующих данный белок. Было показано, что микроинъекции антител, направленных против мышиного KI-67 приводят к снижению скорости деления клеток [5]. Аналогичные результаты были получены введением человеческих антител белка KI-67. Эти данные убедительно свидетельствуют о том, что данный белок играет существенную роль в клеточной пролиферации [6].

Известно, что экспрессия KI-67 меняется в пределах всего клеточного цикла. Уровень белка считается низким в течении G1 и ранней S фазе, и возрастает до максимума к митозу. В анафазе и телофазе экспрессия KI-67 значительно снижается. Это доказывает тот факт, что белок является точным маркером роста клеточной фракции [4].

В рутинной клинической работе, Ki-67 широко исследуется в ткани рака молочной железы и используется в качестве дополнительного фактора для принятия решений по стратегии адъювантной терапии [1].

Несмотря на большое количество исследований, проведенных в области изучения KI-67, на сегодняшний день существует проблема стандартизации методик и методов оценки, необходимых для интеграции биомаркера в длительное прогнозирование исхода заболевания и эффективности химиотерапии.

Считается, что пациенты с высоким индексом пролиферации опухоли имеют худший прогноз выживаемости и риска метастазирования по сравнению с пациентами с низким уровнем KI-67 опухоли [7]. Однако такой критерий, как высокий и низкий уровень KI-67 неодинаково оценивается исследователями разных лабораторий. Так, M. Abubakar и соавт. показали, что пациенты с уровнем экспрессии KI-67 более 12% в клетках опухоли молочной железы имеют плохой 10-летний прогноз выживаемости. Этот показатель был статистически значим для ER-позитивных случаев и не подтверждался для ER-негативных случаев рака молочной железы [8]. В другой работе были проанализированы данные из клинического опухолевого регистра университета г. Регенсбург (Германия). Исследование включало 3658 случаев, в каждом из которых определялся KI-67. Пограничное значение индекса пролиферации было взято за 15%. Было показано, что пятилетняя выживаемость у пациентов с индексом пролиферации менее 15% составила 89,3%, тогда как у пациентов с индексом пролифера-

ции более 45% выживаемость составила 82,8%, что достоверно ниже аналогичного показателя пациентов первой группы [9].

Во многих других исследованиях также было показано прогностическое значение индекса KI-67. Однако почти все проводимые исследования были ретроспективны, многие из них включали гетерогенные группы пациентов, при лечении которых применялись различные методы терапии, при этом в некоторых случаях не вся проводимая терапия была внесена в протокол исследования. Изучение экспрессии KI-67 проводилось различными методами, а граница для обозначения «положительных» и «отрицательных» или «высоких» и «низких» значений KI-67 значительно различались. В результате, комитет Американского общества клинической онкологии (ASCO) определил, что доказательств, подтверждающих клиническую значимость индекса KI-67 недостаточно для того, чтобы рекомендовать использование этого маркера для прогнозирования у пациентов с недавно диагностированным раком молочной железы в рутинной практике. Однако позже международная группа по изучению рака молочной железы (Breast Cancer Working Group by RTOG foundation) опубликовала доклад, основанный на межлабораторных исследованиях и доказывающий валидность данного маркера в клинической практике при его определении иммуногистохимическим методом. Была подчеркнута роль данного маркера в предсказывании влияния химиотерапии в лечении рака молочной железы [10].

Также в 2013 году на конференции в Сант-Галлене был принят документ, рекомендовавший определение KI-67 в Люминальных А и В подтипах рака молочной железы. Большинство специалистов по исследованию рака молочной железы проголосовали за включение маркера в панель для учета применения адьювантной химиотерапии в отдельных случаях [11].

Для того чтобы стандартизировать процедуру исследования пролиферации в опухоли, ученые из группы NordiQC на протяжении последних лет проводят исследования результатов иммуногистохимического (ИГХ) анализа маркера пролиферации KI-67. NordiQC — это профессиональная научная организация, политически и экономически независимая. Целью контроля качества NordiQC является повышение уровня ИГХ исследования и расширение его клинического использования путем организации схем ИГХ тестирования и повышения их качества за счет предоставления примеров рекомендуемых протоколов, тканей, которые можно использовать как контроль в ИГХ

исследовании и другой необходимой информации, включая описания эпитопов и параметров технического протокола. Всего было проведено 5 протоколов исследования KI-67 с 2001 по 2016 год.

Последний этап контроля NordiQC проходил в 2016 году.

Было предложено 9 образцов для исследования, указанных в таблице 1.

Таблица 1

Образцы для исследования NordiQC для контроля качества ИГХ окрашивания KI-67 в 2016 году

№	Материал	Ki67 индекс пролиферации
1.	Клеточная линия 1. Horizon Discovery	80–90%
2.	Клеточная линия 2. Horizon Discovery	70–80%
3.	Клеточная линия 3. Horizon Discovery	80–90%
4.	Поджелудочная железа	<1% эпителиальных клеток экзокринных желез и протоков
5.	Печень	<1% гепатоцитов
6.	Миндалины	80–90% В-клеток герминального центра
7.	Протоковая карцинома молочной железы	20–30%
8.	Протоковая карцинома молочной железы	70–80%
9.	Протоковая карцинома молочной железы	5–10%

В результате проведенной экспертизы, из 409 лабораторий, участвующих в тестировании, 380 получили оценку «оптимально» или «хорошо» (таб. 2), что говорит о постепенном, заметном повышении качества исследований KI-67 с 2001 года с 71 до 93%.

В результате тестирования антитела mAb клоны BS4, GM001, K2, MIB-1, UMAB107 и mAb клоны 30-9, а также SP6 рекомендованы к использованию для оценки экспрессии KI-67. Лучший результат показали готовые к употреблению тест-системы клонов MIB-1, Dako и 30-9, Ventana, причем использование RTU mAb клон 30-9 (Ventana) привело к получению 99% оптимальных оценок. Показано, что при их применении наиболее важно правильно подобрать режим демаскировки и разведение. Протокол для использования RTU mAb клон 30-9 (Ventana) выглядит следующим образом: инкубация с антителом — 16 мин., демаскировка с CC1 64 мин., система детекции UltraView. Система Dako RTU IR626/IS626, основанная на применении антитела клон mAb MIB-1 показала 91% положительных оценок при ее использовании для ИГХ исследования на KI-67. Протокол для исследо-

вания выглядит следующим образом: инкубация с первичными антителами 20 мин., демаскировка — TRS Low pH 6.1 на 20 мин., система детекции EnVision FLEX. Применение системы Leica RTU PA0230, основанной на использовании антитела mAb клон K2 продемонстрировало положительный результат у 100% лабораторий. Протокол для указанной системы подразумевает инкубацию с антителами 15 мин., демаскировку 20 мин., Refine в качестве системы детекции.

Таблица 2

Результаты тестирования ИГХ окрашивания KI-67 в 2016 году

Концентрированные антитела	Кол-во	Производитель	оптимально	хорошо	погранично	плохо	Соотношение (оптимально или хорошо)	Соотношение (оптимально или хорошо) при правильном протоколе исследования
mAb clone BS4	1	Nordic Biosite	1	0	0	0	-	-
mAb clone GM001	1	Genemed	1	0	0	0	-	-
mAb clone K2	2	Zytomed	2	1	0	0	-	-
	1	Leica/Novocastra						
mAb clone MIB-1	12	Agilent/Dako	72	36	13	2	88%	90%
	2	VWR/Immunologic						
	1							
mAb clone UMAB107	7	ZSBio	2	4	1	0	86%	80%
rmAb clone SP6	7	Thermo/Neomarkers Cell	17	5	1	0	96%	95%
	5	Marque Biocare						
	3	Spring Bioscience						
	3	Zytomed						
	3	Master Diagnostica						
	1	Diagnostic						
	1	Biosystems						
pAb RB-1510	1	Thermo/Neomarkers	1	0	0	0	-	-
Готовые к употреблению антитела								
mAb clone GM001 60-0040-7	1	Genemed	1	0	0	0	-	-
mAb clone K2 PA0230	4	Leica/Novocastra	2	2	0	0	-	-
mAb clone Ki88 AM370	1	Biogenex	0	1	0	0	-	-

Концентрированные антитела	Кол-во	Производитель	оптимально	хорошо	погранично	плохо	Соотношение (оптимально или хорошо)	Соотношение (оптимально или хорошо) при правильном протоколе исследования
mAb MIB-1 IR626/IS626	65	Agilent/Dako	34	25	5	1	91%	94%
mAb MIB-1 GA626	31	Agilent/Dako	25	5	1	0	97%	100%
mAb clone MIB-1 AM297	1	Biogenex	1	0	0	0	-	-
mAb clone MM1 PA0118	9	Leica/Novocastra	0	8	1	0	-	-
mAb clone MX006 MAB-0672	1	Maixin	0	1	0	0	-	-
rmAb clone SP6 275R	4	Cell Marque	2	1	1	0	-	-
rmAb clone SP6 PRM 325	1	Biocare	0	1	0	0	-	-
rmAb clone SP6 MAD-000310QD	1	Master Diagnostica	0	1	0	0	-	-
rmAb clone 30.9 790-4286	13 1	Roche/Ventana	121	9	1	0	99%	100%
Total	40 9		282	100	24	3	-	
Proportion			69%	24%	6%	1%	93%	

Система визуализации, как показали результаты тестирования, не оказывает значимого влияния на результат. Тем не менее, выявлено, что антитело MIB-1 плохо сочетается с системой Leica, Bond IHC system.

Интактная ткань миндалина рекомендована в качестве позитивного контроля для исследования KI-67, при этом уровень экспрессии клетками светлой зоны герминативного центра KI-67 должен быть низким. Поскольку высокий уровень пролиферации легко оценивается большинством лабораторий, в данном тестировании был сделан акцент на выявление низкого уровня экспрессии в указанной ткани. Именно эта особенность ткани миндалина позволяет демонстрировать хорошо откалиброванный протокол.

Ткань печени или поджелудочной железы с экспрессией KI-67 менее 1% можно считать отрицательным контролем.

Клетки одного из предложенных образцов карциномы молочной железы имели уровень пролиферативной активности 20–30%, который, в соответствии с рекомендациями St. Gallen – 2017, считается «высоким». Но в случае оценки экспрессии уровня KI-67 в этом образце ткани менее 20%, результат интерпретируется как «низкий» уровень экспрессии. Именно такой ложноположительный результат получили 78% лабораторий, не справившихся с тестированием. Слабая окраска наравне с выраженным фоновым окрашиванием, «испорченной» морфологией препарата приводила к отрицательной оценке исследователями предлагаемого теста.

Критерием для оптимального результата ИГХ окрашивания являются: сильное устойчивое окрашивание 80–90% герминативных b-клеточных центров как в светлой, так и в темной зонах миндаины, сильная устойчивая окраска ядер единичных клеток эпителия поджелудочной железы, сильная устойчивая окраска в соответствии с правильными пропорциями ядер клеток карциномы молочной железы, ядерная окраска единичных гепатоцитов (менее 1%). При окрашивании не должно быть окрашенного фона и цитоплазматической реакции [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Семиглазов В.Ф., Палтуев Р.М., Семиглазова Т.Ю. и соавт. Клинические рекомендации по диагностике и лечению рака молочной железы. Санкт-Петербург: АБВ-пресс; 2013.
2. Бондарева В.А., Шпонька И.С. Значение прогностических маркеров опухолевой прогрессии KI-67 и P53 в опухолях молочной железы. Морфология. 2007; 1(1):40-44.
3. Невожай В.И., Мюллер Е.С. Иммуногистохимическое исследование рецепторов стероидных гормонов при раке молочной железы. Тихоокеанский медицинский журнал. 2007; 4:79-80.
4. Радюкова И.М., Друк И.В., Нечаева Г.И., Кореннова О.Ю., Резников А.С., Меркулов В.Н. Перспективы применения статинов при раке молочной железы. Сибирский онкологический журнал. 2012; 2: 73-78.
5. Penault-Llorca F., Cayre A., Mishellany F.B., Amat S., Feillel V., Le Bouedec G., Ferrière J.-P., De Latour M., Chollet P. Induction chemotherapy for breast carcinoma: predictive markers and relation with outcome. Int J Oncol. 2003; 22(6):1319–1325.
6. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the

unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182(3):311-22.

7. de Azambuja E., Cardoso F., de Castro G., et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12155 patients. *Br J Cancer.* 2007; 96(10):1504–1513.

8. Abubakar M., Orr N., Daley F. Prognostic value of automated KI67 scoring in breast cancer: a centralised evaluation of 8088 patients from 10 study groups. *Breast Cancer Research:* 201618:104

9. Inwald E.C., Klinkhammer-Schalke M., Hofstädter F., et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 Jun; 139(2):539-52.

10. Dowsett M., Nielsen T.O., A'Hern R., et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst.* 2011; 103:1656–1664.

11. Untch M., Gerber B., Harbeck N., et al. 13th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2013: Primary Therapy of Early Breast Cancer Evidence, Controversies, Consensus. *Breast Care* 03/2013: in press

12. Dowsett M., Nielsen T.O., A'Hern R., et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J. Natl. Cancer Inst.* 2011; 22:1656-64.