

¹Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев²Киевский городской клинический онкологический центр

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ТИПЫ РАКА ГРУДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ОПРЕДЕЛЕННЫЕ НА ОСНОВЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ: КЛИНИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПРОГНОЗ ТЕЧЕНИЯ



И.Б. Щепотин¹, А.С. Зотов¹,
Р.В. Любота¹, Н.Ф. Аникусько²,
И.И. Любота²

Адрес: Любота Роман Викторович
Национальный медицинский университет
имени А.А. Богомольца
03053, Киев, ул. Верховинная, 69
Тел.: (044) 450-82-32
E-mail: lyubota@ukr.net

Ключевые слова: рак грудной железы, молекулярные типы, прогноз течения, клиничко-морфологические особенности.

Рак грудной железы (РГЖ) — неоднородная группа опухолей, которые отличаются этиологией, морфологической картиной, клиническим течением и чувствительностью к проводимому лечению. Целью данного популяционного исследования явилось изучение распространенности, клиничко-морфологических особенностей, общей и безрецидивной выживаемости больных РГЖ в зависимости от молекулярного типа. Обследовано 350 пациенток с РГЖ в возрасте от 23 до 76 лет (средний возраст — $53 \pm 1,7$ года), которые прошли лечение в клинике кафедры онкологии Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца на базе хирургического отделения Киевского городского клинического онкологического центра в 2005–2006 гг. Выявлены статистически значимые различия между молекулярным типом РГЖ и рядом клиничко-морфологических особенностей, а именно: возраст и статус менструальной функции на момент установления диагноза, гистологический тип и степень дифференциации опухоли, а также общая и безрецидивная выживаемость больных.

ВВЕДЕНИЕ

Рак грудной железы (РГЖ) является одним из самых распространенных онкологических заболеваний в Украине. По данным Национального канцер-регистра Украины, стандартизованный показатель заболеваемости РГЖ в 2009 г. составляет 60,5 случая на 100 тыс. женского населения. Хотя заболеваемость злокачественными новообразованиями грудных желез постоянно повышается, смертность от них имеет тенденцию к снижению [1].

РГЖ — это неоднородная группа опухолей, отличающихся по морфологии, клиническому течению и чувствительности к лечению. Однако даже гистологически аналогичные опухоли имеют разную естественную историю, что обусловлено определенной ограниченностью морфологической классификации РГЖ. Исследование экспрессии генов клетками РГЖ и их корреляции с фенотипическими проявлениями позволили выделить ряд биологических подтипов РГЖ, которые определяют естественную историю, клинические, патологические и молекулярные свойства опухоли, а также являются ключевыми факторами, предсказывающими прогноз течения и эффективность системной лекарственной терапии. Использование в повседневной клинической практике

трудоемких и дорогостоящих методик генетического анализа невозможно. Изучение корреляции между экспрессией генов и иммуногистохимическими маркерами в опухоли позволило выделить ряд так называемых молекулярных субтипов РГЖ, определение которых возможно в рутинной клинической практике. На основе иммуногистохимического исследования экспрессии клетками карциномы грудной железы рецепторов к эстрогену и прогестерону (ER и PR), а также рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа (Her2/neu, ErbB2), РГЖ можно классифицировать на 4 молекулярных подтипа, которые отличаются между собой по прогнозу течения и ответом на медикаментозную терапию [2–5]. Молекулярные подтипы РГЖ, которые имеют принципиальное клиническое значение, приведены в табл. 1.

Таблица 1. Иммуногистохимический фенотип молекулярных подтипов РГЖ

Молекулярный подтип	Иммуногистохимический портрет			Частота выявления
	ER	PR	Her2/neu	
Luminal A	+	+	-	56–61%
Luminal B	+	+	+	9–16%
HER2+	-	-	+	8–16%
Triple negative (Basal-like)	-	-	-	8–20%

Выделяют люминальный, HER2+ и трижды негативный (ТН) молекулярные подтипы РГЖ. К люминальным относятся опухоли, экспрессирующие рецепторы к ER и PR, и в зависимости от экспрессии Her2/neu их классифицируют на А (не экспрессируют Her2/neu) и Б (экспрессируют Her2/neu). HER2+ называются опухоли с гиперэкспрессией Her2/neu и отсутствием ER и PR. Опухоли, негативные по 3 выше названным признакам, относятся к ТН (базально-подобному) РГЖ. Установлено, что люминальные типы связаны с менее агрессивным течением и хорошим прогнозом по сравнению с HER2+ и ТН РГЖ [5, 6]. ТН подтип связан с высокой частотой мутации *BRCA1*, агрессивным течением, отсутствием реакции на гормонотерапию и трастузумаб, низкой общей и безрецидивной выживаемостью [5–8].

Корреляция между иммуногистохимическими маркерами и чувствительностью опухоли к медикаментозному лечению хорошо изучена и лежит в основе клинических рекомендаций по адъювантному лечению РГЖ. Однако количество исследований, в которых бы оценивали взаимосвязь между молекулярными подтипами и клинико-биологическими характеристиками РГЖ, ограничено.

Целью данного популяционного исследования является изучение распространенности, клинико-морфологических особенностей, общей и безреци-

дивной выживаемости больных РГЖ в зависимости от молекулярного портрета.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подбор пациентов

В исследование включено 350 больных РГЖ в возрасте от 23 до 76 лет (средний возраст — $53 \pm 1,7$ года), которые находились на лечении в клинике кафедры онкологии Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца на базе хирургического отделения Киевского городского клинического онкологического центра с 1 января 2005 г. по 31 декабря 2006 г.

У всех пациенток регистрировали возраст на момент установления диагноза, менструальную функцию, определяли размер, гистологический тип и степень дифференциации опухоли, а также наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах (РЛУ).

Размер опухоли оценивали после измерения ее максимального диаметра и классифицировали согласно Международной TNM-классификации (5-е издание, 1997 г.) как T1 (<2 см), T2 (2–5 см), T3 (≥ 5 см). Отсутствие менструаций у больных в течение 1 года до момента установления диагноза расценивалось как менопауза. Гистологический тип и степень дифференциации опухоли определяли в соответствии с национальными стандартами диагностики и лечения злокачественных новообра-

зований, основанных на рекомендациях ведущих международных организаций. Для оценки метастатического поражения РЛУ из послеоперационного материала макроскопически отбирали 10 подопреваемых на наличие метастазов лимфатических узлов, из которых готовили гистологические препараты для микро-скопического изучения.

Молекулярные подтипы РГЖ устанавливали на основании результатов иммуногистохимического исследования экспрессии ER, PR и Her2/neu. Все опухоли разделили на 4 подтипа: люминальный А (Luminal A) — ER+ и/или PR+, Her2/neu-, люминальный Б (Luminal B) — ER+ и/или PR+, Her2/neu+, HER2+ (ER- и PR-, Her2/neu+), ТН (Triple negative) — ER- и PR-, Her2/neu-.

Все больные получили адъювантную системную и лучевую терапию согласно национальным стандартам лечения РГЖ. Однако при гиперэкспрессии Her2/neu ни одна из пациенток, включенных в данное исследование, вальвуантном режиме не получала трастузумаб.

Иммуногистохимическое исследование

С парафиновых блоков готовили срезы толщиной 4–5 микрон, которые помещали на стекла, предварительно обработанные поли-L-лизинем. Затем материал исследовали по общепринятой стандартной методике с использованием следующих антител: ER — клон 1D5, PgR — клон 636, Her2/neu — клон CB11.

Интерпретацию результатов иммуногистохимической реакции проводили с использованием качественной оценки ядерной реакции: отрицательная «-», слабо положительная «+», умеренно положительная «++», выражено положительная «+++» — и количественной системы оценки реакции в процентах окрашенных опухолевых клеток.

При определении экспрессии Her2/neu отмечали выраженность окраски цитоплазматической мембраны: реакция «-», «+» — отсутствие гиперэкспрессии, реакция «+++» — гиперэкспрессия Her2/neu. Наличие гиперэкспрессии Her2/neu в случаях реакции «++» оценивали с помощью метода гибридизации *in situ* с использованием флуоресцентной метки FISH (fluorescence *in situ* hybridization — флуоресцентная *in situ* гибридизация). Исследования проводили в патогистологической лаборатории Киевского городского клинического онкологического центра (заведующая лабораторией — доктор медицинских наук Л.М. Захарцева).

Статистический анализ

Статистическую достоверность различий между клинико-биологическими особенностями молекулярных типов РГЖ оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (analysis

Таблица 2. Клинико-биологические характеристики молекулярных подтипов РГЖ

Характеристика опухоли	Всего n=350 (100%)	Luminal A n=201 (57,5%)	Luminal B n=31 (9%)	HER2+ n=26 (7%)	Triple negative n=92 (26,5%)	p
Стадия заболевания						0,82516
I стадия (T1N0M0)	140 (40%)	83 (41%)	13 (42%)	9 (35%)	35 (38%)	
IIA стадия (TisN1M0, T1N1M0, T2N0M0)	119 (34%)	63 (31,5%)	10 (32%)	9 (35%)	37 (40%)	
IIB стадия (T2N1M0, T3N0M0)	91 (26%)	55 (27,5%)	8 (26%)	8 (30%)	20 (22%)	
Возраст на момент установления диагноза						0,01335
<40 лет	16 (5%)	9 (4,5%)	3 (10%)	0	4 (4%)	
40–49 лет	93 (27%)	46 (23%)	7 (22,5%)	9 (34,5%)	31 (34%)	
50–59 лет	129 (37%)	83 (41%)	7 (22,5%)	8 (31%)	31 (34%)	
60–69 лет	85 (24%)	48 (24%)	10 (32%)	6 (23%)	21 (23%)	
70 и более лет	27 (8%)	15 (7,5%)	4 (13%)	3 (11,5%)	5 (5%)	
Менструальная функция						0,03014
Пременопауза	139 (40%)	74 (37%)	10 (32%)	11 (42%)	44 (48%)	
Менопауза	211 (60%)	127 (63%)	21 (68%)	15 (58%)	48 (52%)	
Размер опухоли						0,1525
<2 см	184 (52%)	109 (54%)	17 (55%)	10 (38%)	48 (52%)	
2–5 см	160 (46%)	87 (43%)	14 (45%)	16 (62%)	43 (47%)	
>5 см	6 (2%)	5 (3%)	0	0	1 (1%)	
Гистологический тип						0,04012
Дольковый	57 (16%)	38 (19%)	2 (6,5%)	2 (8%)	15 (16%)	
Протоковый	254 (73%)	141 (70%)	26 (84%)	24 (92%)	63 (69%)	
Смешанный*	19 (5%)	12 (6%)	1 (3%)	0	6 (6%)	
Другие**	20 (6%)	10 (5%)	2 (6,5%)	0	8 (9%)	
Степень дифференциации опухоли						0,04236
G1	17 (5%)	10 (5%)	2 (7%)	1 (4%)	4 (5%)	
G2	275 (78%)	165 (82%)	27 (86%)	21 (80%)	62 (67%)	
G3	58 (17%)	26 (13%)	2 (7%)	4 (16%)	26 (28%)	
Статус РЛУ						0,53607
Нет метастазов	214 (61%)	125 (62%)	18 (58%)	15 (58%)	56 (61%)	
Метастазы в ЛУ	136 (39%)	76 (38%)	13 (42%)	11 (42%)	36 (39%)	

Примечания: *дольково-протоковая карцинома; **слизистая, медулярная, папиллярная карцинома.

of variance — ANOVA). Различия считали статистически достоверными при уровне значимости (p) <0,05.

Общую и безрецидивную выживаемость определяли с помощью метода Каплана — Мейера.

Все статистические расчеты проводили с помощью программы MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного исследования всех больных на основе данных иммуногистохимического исследования экспрессии ER, PR и Her2/neu разделили на 4 группы: люминальный А — 152 (57,5%) пациентки, ТН — 49 (26,5%), люминальный Б — 28 (9%) и HER2+ — 15 (7%) женщин.

Клинико-биологические характеристики различных молекулярных типов РГЖ представлены в табл. 2.

Статистически значимой достоверности различий в стадии заболевания между исследуемыми группами не выявлено, что свидетельствует об однородном распределении больных в группах по данному критерию.

Частота выявления различных молекулярных подтипов РГЖ статистически достоверно зависит от следующих клинико-морфологических характеристик: возраста и менструальной функции на момент установления диагноза, гистологического типа и степени диф-

ференциации опухоли. У больных в возрасте 40–49 лет достоверно чаще диагностируют HER2+ и ТН подтипы РГЖ (34,5 и 34% случаев соответственно). Почти у половины пациенток (48%) с ТН молекулярным типом диагноз установлен в менопаузе. У больных, которые на момент диагностирования находились в менопаузе, чаще других встречается люминальный А (63%) и люминальный Б (68%) типы РГЖ.

Также статистически значимые различия между иммуногистохимическими подтипами наблюдали при различных гистологических типах и степени дифференциации опухоли. Дольковые карциномы чаще диагностировали при люминальном А (19%) и ТН (16%) типах. Протоковый РГЖ регистрировали в 84 и 92% случаев HER2+ и люминального Б молекулярных подтипах соответственно. Дольково-протоковую, слизистую, медуллярную и папиллярную карциному одинаково часто выявляют при люминальных и ТН типах РГЖ, однако в данном исследовании не зафиксировано ни одного случая вышеперечисленных гистологических вариантов при типе HER2+. В исследуемых группах высокодифференцированные (G1) опухоли определяют с одинаковой частотой. Умереннодифференцированные (G2) карциномы грудной железы характерны для люминального А (82%) и Б (86%), а также HER2+ (80%) типов. У 28% пациенток

из группы ТН РГЖ выявлены низкодифференцированные (G3) опухоли.

Статистически достоверной взаимосвязи между иммуногистохимическим фенотипом РГЖ и размером первичной опухоли, а также статусом РЛУ не установлено, что наряду со стадией заболевания свидетельствует о равномерном распределении больных в исследуемых группах по этим показателям.

Результаты анализа 5-летней общей и безрецидивной выживаемости пациенток с различными молекулярными типами РГЖ представлены на рис. 1 и 2, а также в табл. 3 и 4 соответственно.

Таблица 3. Общая выживаемость пациенток в зависимости от молекулярного типа РГЖ

Молекулярный тип РГЖ	Общая выживаемость больных (годы)				
	1	2	3	4	5
Luminal A	99%	95%	92%	80%	74%
Luminal B	100%	100%	92%	83%	58%
HER2+	100%	71%	57%	57%	57%
Triple negative	98%	90%	86%	69%	60%

Таблица 4. Безрецидивная выживаемость пациенток в зависимости от молекулярного типа РГЖ

Молекулярный тип РГЖ	Безрецидивная выживаемость больных (годы)				
	1	2	3	4	5
Luminal A	95%	84%	79%	66%	62%
Luminal B	100%	83%	67%	58%	42%
HER2+	85%	57%	57%	57%	57%
Triple negative	95%	81%	69%	57%	45%

Общая выживаемость наиболее высокая у пациенток с люминальным А (74%) типом РГЖ, а наиболее низкая — при HER2+ и люминальном Б (58 и 57% соответственно).

5-летняя безрецидивная выживаемость хуже у больных люминальным Б и ТН РГЖ (42 и 45% соответственно) по сравнению с пациентками с люминальным А иммуногистохимическим подтипом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты настоящего исследования подтверждают вариабельность РГЖ, которая заключается в наличии различных молекулярных типов данной нозологической формы. Разделение РГЖ на биологические подтипы, которые имеют собственную естественную историю, находит все большее применение в повседневной клинической практике, так как позволяют определить прогноз течения заболевания и являются ключевым фактором для выбора тактики системной медикаментозной терапии [6]. Тем не менее классификация на молекулярные типы не заменяет, а скорее дополняет важные традиционные прогностические критерии, такие как возраст и состояние менструальной функции на момент установления диагноза, размер и степень дифференциации опухоли, наличие метастазов в РЛУ, а также выявление сопутствующей патологии.

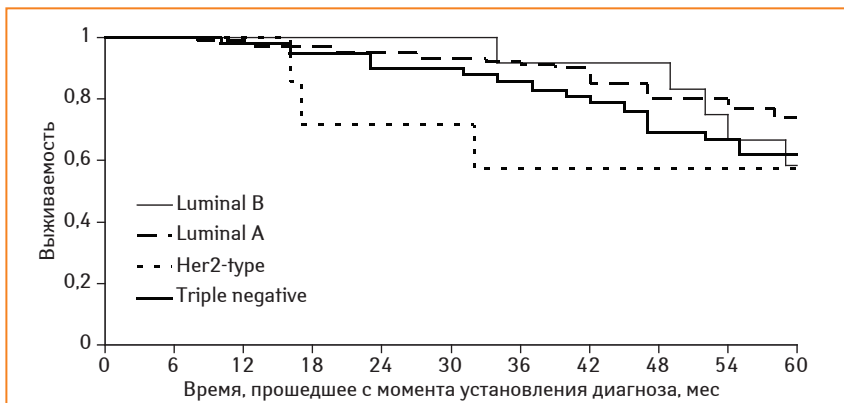


Рис. 1. Общая выживаемость пациенток в зависимости от молекулярного типа РГЖ

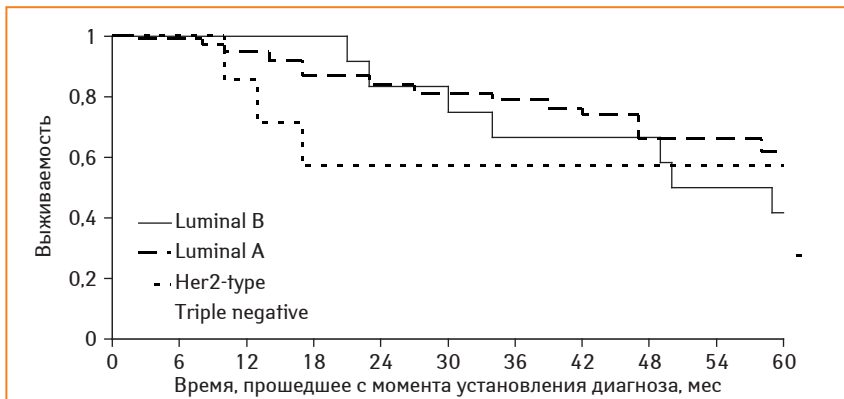


Рис. 2. Безрецидивная выживаемость пациенток в зависимости от молекулярного типа РГЖ

Определение молекулярных типов РГЖ на основе иммуногистохимической оценки экспрессии ER, PR и Her2/neu является недорогим и достаточно информативным, но вместе с тем упрощенным методом диагностики. Благодаря внедрению новых маркеров молекулярная классификация претерпевает изменения, что позволяет повысить ее прогностическую достоверность. Так, например, при высокой митотической активности клеток (Ki-67 >14%) опухоли с люминальным А фенотипом, согласно рекомендациям Сент-Галленского конгресса по лечению РГЖ (2011 г.), отнесены к люминальному Б Her2/neu-негативному молекулярному подтипу. Необходимость выделения люминального Б Her2/neu-негативного типа РГЖ продиктована особенностями естественной истории этих опухолей, которая больше сходна с естественной историей люминальных Б, чем люминальных А опухолей. Поэтому пациенткам с ER+ и/или PR+, Her2/neu- РГЖ при высокой митотической активности опухоли, которая определяет плохой прогноз течения заболевания, перед назначением антигормональной терапии показано проведение адьювантной полихимиотерапии [9].

Полученные в данном популяционном исследовании результаты свидетельствуют о том, что частота выявления различных молекулярных типов РГЖ, определенных на основе иммуногистохимической оценки экспрессии ER, PR и Her2/neu, неодинакова. Чаще всего встречается

люминальный А (57,5%) молекулярный подтип РГЖ, вторым по частоте является ТН (26,5%), потом люминальный Б (9%) и HER2+ (7%) типы.

Люминальный А иммуногистохимический тип РГЖ в большинстве случаев диагностируют у пациенток после 50 лет, которые находятся в менопаузе. Данный вариант РГЖ чаще других характеризуется дольчатым гистологическим типом и умеренной степенью дифференциации опухоли. 5-летняя общая и безрецидивная выживаемость больных с этим молекулярным типом РГЖ наиболее высокая и составляет 74 и 62% соответственно.

ТН РГЖ чаще выявляют у больных в возрасте от 40 до 60 лет независимо от состояния менструальной функции, для него характерен дольчатый гистологическим тип в 16% случаев, и в 28% данные опухоли являются низкодифференцированными. По сравнению с люминальным А типом у больных ТН РГЖ 5-летняя общая и безрецидивная выживаемость ниже и составляет 60 и 45% соответственно.

Люминальный Б молекулярный тип, как и люминальный А, чаще диагностируют у женщин после 50 лет, которые находятся в постменопаузе. Более чем в 80% случаев это умереннодифференцированная протоковая карцинома. У пациенток с люминальным Б РГЖ — наименьшая 5-летняя общая и безрецидивная выживаемость и составляет 58 и 42% соответственно.

HER2+ тип, как и ТН, чаще возникает у пациенток в возрасте от 40 до 60 лет

независимо от статуса менструальной функции, практически всегда является умереннодифференцированной карциномой. 5-летняя общая и безрецидивная выживаемость одинаковая и составляет 57%.

Итак, наиболее благоприятным молекулярным подтипом РГЖ с точки зрения прогноза течения является люминальный А. Неблагоприятное клиническое течение люминального Б и HER2+ типов, возможно, связано с отсутствием терапии трастузумабом.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бюллетень Национального канцер-регистра № 12. «Рак в Україні, 2009–2010», Киев: 2011.
2. Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B. et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797): 747–752.
3. Sorlie T., Perou C.M., Tibshirani R. et al. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 19(98): 10869–10874.
4. Sorlie T., Tibshirani R., Parker J. et al. (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 14(100): 8418–8423.
5. Sotiriou C., Neo S.Y., McShane L.M. et al. (2003) Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 18(100): 10393–10398.
6. Carey L.A., Perou C.M., Livasy C.A. et al. (2006) Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 21(295): 2492–2502.
7. Foulkes W.D., Stefansson I.M., Chappuis P.O. et al. (2003) Germline *BRCA1* mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 19(95): 1482–1485.
8. Liu H., Fan Q., Zhang Z. et al. (2008) Basal-HER2 phenotype shows poorer survival than basal-like phenotype in hormone receptor-negative invasive breast cancers. *Hum. Pathol.*, 2(39): 167–174.
9. Goldhirsch A., Wood W.C., Coates A.S. et al. (2011) Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann. Oncol.*, 8(22): 1736–1747.

Молекулярні типи раку грудної залози, визначені на основі імуногістохімічних маркерів: клініко-біологічні особливості та прогноз перебігу

I.Б. Щепотін¹, О.С. Зотов¹, Р.В. Любота¹, М.Ф. Анікуско²,
I.I. Любота²

¹Національний медичний університет імені О.О. Богомольця,
Київ
²Київський міський клінічний онкологічний центр

Резюме. Рак грудної залози — неоднорідна група пухлин, які відрізняються етіологією, морфологічною картиною, клінічним перебігом і чутливістю до проведеного лікування. Метою даного популяційного дослідження було вивчення поширеності, клініко-морфологічних особливостей, загальної та безрецидивної виживаності хворих на РГЖ залежно від молекулярного типу. Обстежено 350 пацієнток із РГЖ у віці від 23 до 76 років (середній вік — 53±1,7 року), які проходили лікування в клініці кафедри онкології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця на базі хірургічного відділення Київського міського клінічного онкологічного центру в 2005–2006 рр. Виявлено статистично значущі відмінності між молекулярним типом РГЖ та клініко-морфологічними особливостями, а саме: вік і статус менструальної функції на момент встановлення діагнозу, гистологічний тип і ступінь диференціювання пухлини, а також загальна та безрецидивна виживаність хворих.

Ключові слова: рак грудної залози, молекулярні типи, прогноз перебігу, клініко-морфологічні особливості.

Molecular types of breast cancer, established on the basis of immunohistochemical markers: clinical and biological characteristics and prognosis

I.B. Schepotin¹, A.S. Zotov¹, R.V. Liubota¹, N.F. Anikusko²,
I.I. Liubota²

¹A.A. Bogomolets National Medical University, Kyiv
²Kyiv municipal clinical oncological centre

Summary. Breast cancer (BC) is heterogeneous group of tumors that has different etiology, morphological pattern, clinical course and sensitivity to the treatment. The aim of this study was to investigate population prevalence, clinical and morphological features, general and disease-free survival of patients BC depending on the molecular type. The study involved 350 patients with BC aged 23 to 76 years (mean age 53±1,7 years.) They were treated in the clinic of the Department of Oncology A.A. Bogomolets National Medical University, based on the surgical department of the Kyiv City Clinical Cancer Center in 2005–2006 years. A statistically significant difference between type BC molecular and morphological features, namely age and status of menstrual function at the time of diagnosis, histological type and degree of tumor differentiation, as well as general and disease-free survival of patients.

Key words: breast cancer, molecular types, prognosis, clinical and morphological features.