

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ИГХ-БИОМАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ ЛЮМИНАЛЬНЫМ В РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ БЕЗ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ HER2/NEU В ПОСТМЕНОПАУЗЕ

Златник Е.Ю.¹, Ульянова Е.П.¹, Токмаков В.В.¹, Шатова Ю.С.¹, Демидова А.А.², Сагакянц А.Б.¹, Черникова Е.Н.¹, Бакулина С.М.¹, Пушкарева Т.Ф.¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: elena-zlatnik@mail.ru;

² ФГБОУ ВО «РостГМУ» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Учитывая, что рак молочной железы является самой часто встречаемой опухолью у женщин, а также высокую частоту и гетерогенность рака молочной железы люминального В подтипа без гиперэкспрессии Her2/neu, поиск применимых в клинической практике новых биомаркеров его прогноза является актуальной задачей. Целью работы явилось выявление прогностически значимых иммуногистохимических характеристик для больных люминальным В раком молочной железы без гиперэкспрессии Her2/neu в постменопаузе. Исследование выполнено на материале 60 больных, в ткани опухоли которых оценивали экспрессию гормональных, апоптотических, пролиферативных и адгезивных маркеров. Результаты соотнесены с пятилетней выживаемостью больных методом многофакторного регрессионного анализа Кокса. Высокая экспрессия гормональных рецепторов (рецепторы андрогена и прогестерона), bcl2, отсутствие экспрессии mtp53, низкая экспрессия TopII α и Ki-67 прогнозируют высокую выживаемость больных до прогрессирования, экспрессия кадгеринов не продемонстрировала статистически значимого влияния на данный показатель. Парциальная оценка прогностической значимости исследованных факторов позволила выделить наибольшую роль рецепторов андрогенов и TopII α . Таким образом, комплексная оценка экспрессии гормональных факторов, факторов апоптоза и пролиферативной активности позволяет повысить информативность прогноза выживаемости до прогрессирования по результатам у больных раком молочной железы обследованного нами контингента.

Ключевые слова: рак молочной железы, люминальный В подтип, менопауза, ИГХ-маркеры, прогноз, выживаемость.

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF IHC BIOMARKERS FOR ASSESSING THE SURVIVAL OF PATIENTS WITH LUMINAL B BREAST CANCER WITHOUT HER2/NEU OVEREXPRESSION IN POSTMENOPAUSAL WOMEN.

Zlatnik E.Yu.¹, Ulyanova E.P.¹, Tokmakov V.V.¹, Shatova Yu.S.¹, Demidova A.A.², Sagakyants A.B.¹, Chernikova E.N.¹, Bakulina S.M.¹, Pushkareva T.F.¹

¹ FGBU "National Medical Research Center for Oncology" of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, e-mail: elena-zlatnik@mail.ru;

² FSBEI HE Rostov State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don

Given that breast cancer is the most common tumor in women, as well as the high frequency and heterogeneity of breast cancer of the luminal b subtype without hyperexpression of Her2/neu, the search for new biomarkers of its prognosis that are applicable in clinical practice is an urgent task. The aim of the study was to identify prognostically significant immunohistochemical characteristics for patients with luminal b breast cancer without hyperexpression of Her2/neu in postmenopausal women. The study was performed on the material of 60 patients, in whose tumor tissue the expression of hormonal, apoptotic, proliferative and adhesive markers was evaluated. The results were correlated with the five-year survival rate of patients using multivariate Cox regression analysis. High expression of hormone receptors (androgen and progesterone receptors), bcl2, lack of mtp53 expression, low expression of TopII α and Ki-67 predict high survival of patients before progression, cadherin expression has not shown a statistically significant effect on this indicator. Partial assessment of the prognostic significance of the studied factors allowed us to identify the greatest role of androgen receptors and TopII α . Thus, a comprehensive assessment of the expression of hormonal factors, factors of apoptosis and proliferative activity allows us to increase the information content of the prognosis of survival to progression based on the results in patients with breast cancer of the studied group.

Keywords: breast cancer, luminal B subtype, menopause, IHC markers, prognosis, survival rate.

Люминальный В подтип рака молочной железы составляет до 40% всех случаев злокачественных опухолей этой локализации. Характерными особенностями этого подтипа являются более агрессивное течение и неблагоприятный прогноз, схожий с прогнозом нелюминальных подтипов рака молочной железы (РМЖ). Поиск, анализ и внедрение в клиническую практику новых биомаркеров прогноза люминального В подтипа без гиперэкспрессии Her2/neu является актуальной задачей [1], особенно с учетом имеющихся в литературе данных о неоднородности этого подтипа [2]. Описана значимость гормональных факторов – рецепторы эстрогена (ER), рецепторы прогестерона (PR), рецепторы андрогена (AR), факторов апоптоза (p53, bcl2), ферментов, участвующих в процессах онкогенеза – топоизомеразы II альфа (TopII α), кальций-зависимых белков клеточной адгезии (E- и N-кадгерин), сосудистого фактора роста (VEGF) при различных молекулярно-биологических подтипах РМЖ, обсуждается их прогностическое и предиктивное значение [3-6]. Тем не менее в доступных нам источниках мы не встретили единой согласованной методики на основе иммуногистохимического (ИГХ) исследования для определения и подсчета данных показателей, а также систематизированной оценки этих биологических характеристик опухоли и их прогностической роли при люминальном первично операбельном Her2/neu неэкспрессирующем РМЖ у женщин в постменопаузе. Нами ранее были изучены ИГХ-характеристики опухоли у постменопаузальных больных люминальными РМЖ и выявлено прогностическое значение экспрессии рецепторов андрогенов [7]. В данной работе спектр ИГХ-исследований был расширен и их результаты были соотнесены с пятилетней выживаемостью больных.

Цель исследования: выявление прогностически значимых ИГХ-характеристик для больных люминальным В раком молочной железы без гиперэкспрессии Her2/neu в постменопаузе.

Материал и методы исследования

Под наблюдением находились 60 больных люминальным В без гиперэкспрессии Her2/neu РМЖ, лечившихся и наблюдавшихся в клинике ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России с 2011 по 2017 г. Медиана наблюдения за пациентками составила 48 месяцев. Все женщины находились в состоянии постменопаузы, средний возраст на момент установления диагноза составил 68,3 года. Морфология опухоли у всех пациенток была представлена инфильтративным протоковым раком («инвазивный рак без дополнительных уточнений», 2012 г.), процесс был расценен как pT2N0M0, стадия IIa; диагностика биологического подтипа осуществлялась на основании рекомендаций Панели экспертов St. Gallen (2013) ИГХ-методом. Кроме стандартных ИГХ-биомаркеров для люминального В без гиперэкспрессии

Her2/neu РМЖ (PR, ki-67), панель включала дополнительные (AR, bcl2, mtp53, TopIIa, E- и N-кадгерина).

У всех женщин, вошедших в исследование, экспрессия ER в опухолевой ткани была определена на уровне 50% и выше, поэтому разделение по данному показателю не проводилось и его прогностическое значение не анализировалось. Всем больным выполняли оперативное лечение, адъювантную лучевую терапию в стандартных режимах и дозах согласно клиническим рекомендациям на момент проведения лечения. Адъювантная гормонотерапия проводилась всем больным препаратом «тамоксифен» 20 мг внутрь ежедневно в течение 5 лет. Перед ее началом проводили 6 курсов адъювантной химиотерапии в стандартных терапевтических дозах по FAC схеме (согласно клиническим рекомендациям, действовавшим на момент лечения пациенток). За время наблюдения (5 лет) ни у одной больной не выявлено местного рецидива заболевания, у 15 больных (25%) обнаружены признаки генерализации заболевания, 6 пациенток (10%) с признаками генерализации РМЖ умерли от прогрессирования болезни, 8 пациенток (13,3%) умерли от сопутствующей сердечно-сосудистой патологии.

Показатели общей выживаемости, выживаемости до прогрессирования, опухоль-специфической выживаемости за 5 лет наблюдения оценивали методом Каплана-Мейера [8]. Для проведения многофакторного регрессионного анализа Кокса биомаркеры объединяли в следующие комплексы: 1) экспрессия в опухолевой ткани PR и AR; 2) экспрессия факторов апоптоза bcl2 и mtp53; 3) экспрессия факторов пролиферативной активности Ki-67 и TopIIa; 4) экспрессия факторов адгезии E- и N-кадгерина. Данный вид анализа позволяет построить прогностическую модель для временных параметров наступления события, например летального исхода, а также предсказать вероятность наступления события в определенный момент времени для различных значений нескольких предикторных факторов. Такой анализ дает информацию о степени влияния на исход каждого из факторов по величине β -стандартизированного регрессионного коэффициента и его статистической ошибке и об эффекте взаимодействия этих переменных между собой. Факторы, влияющие на исход, принято называть факторами риска, независимыми или объясняющими переменными, а сам исход – зависимой переменной отклика или эффектом. В качестве исходов рассматривали общую выживаемость, выживаемость до прогрессирования РМЖ и опухоль-специфическую выживаемость. При проведении регрессионного анализа статистическую значимость совместного влияния факторов оценивали по критерию χ^2 и уровню значимости p. Оценку надежности регрессионной модели для прогноза результативного признака по определенному показателю проводили по статистике Вальда. Чем выше значение статистики Вальда, тем выше статистическая значимость участия предиктора в величине исхода.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты представлены в таблицах 1, 2 и на рисунках 1-3.

Как видно из таблицы 1, не выявлено зависимости как общей, так и опухоль-специфической пятилетней выживаемости больных от исследованных ИГХ-характеристик: расчетный критерий χ^2 не превышал критического значения, уровень значимости p был выше 0,05. Однако такая зависимость установлена при оценке выживаемости до прогрессирования РМЖ для показателей экспрессии гормональных рецепторов - PR и AR ($\chi^2=15,11$, $p=0,0005$), факторов апоптоза – bcl2 и mtp53 ($\chi^2=15,30$, $p=0,00048$), факторов пролиферации – Ki-67 и TopII α ($\chi^2=11,35$, $p = 0,0034$). Экспрессия E- и N-кадгерина не показала статистически значимого влияния на выживаемость.

Таблица 1

Оценка влияния комплекса экспрессированных в опухолевой ткани факторов на выживаемость больных РМЖ

Выживаемость	Модель	Факторы, включенные в модель	$\chi^2_{\text{расч}}$	P
Общая	1	PR, AR	0,929	$p = 0,628$
	2	bcl2, mtp53	1,68	$p = 0,430$
	3	Ki-67, TopII α	0,70	$p = 0,703$
	4	E- кадгерин, N-кадгерин	3,78	$p = 0,150$
опухоль-специфическая	1	PR, AR	2,657	$p = 0,264$
	2	bcl2, mtp53	3,697	$p = 0,157$
	3	Ki-67, TopII α	1,354	$p = 0,378$
	4	E-кадгерин, N-кадгерин	1,188	$p = 0,113$
до прогрессирования РМЖ	1	PR, AR	15,11	$p = 0,0005$
	2	bcl2, mtp53	15,30	$p = 0,00048$
	3	Ki-67, TopII α	11,35	$p = 0,0034$
	4	E-кадгерин, N-кадгерин	3,31	$p = 0,191$

Примечание: 1 – гормональные факторы; 2 – факторы апоптоза; 3 – факторы пролиферации; 4 – факторы адгезии.

Поскольку только показатель выживаемости до прогрессирования продемонстрировал статистически значимую зависимость от исследованных ИГХ-биомаркеров, он был проанализирован более подробно с оценкой парциального значения маркеров, характеризующих гормональную, апоптотическую и пролиферативную активность (табл. 2). При этом значения исследуемых маркеров ранжировали на низкий и высокий уровень.

Чем выше стандартизированный коэффициент регрессии отдельного показателя, тем выше его степень парциального частного влияния на результативный признак или эффект, который в данном случае представлен выживаемостью до прогрессирования болезни. Как видно из таблицы 2, значимость экспрессии AR превышала степень влияния экспрессии PR на изучаемый эффект. Отрицательное значение коэффициента регрессии свидетельствовало

об обратной связи: чем ниже экспрессия гормональных факторов, тем выше вероятность прогрессирования заболевания и наоборот.

Таблица 2

Оценка парциального влияния факторов на выживаемость больных РМЖ до прогрессирования заболевания

Факторы		Стандартизированный β -регрессионный коэффициент	Exp(B)	Wald статистика	p
Гормональные	Экспрессия PR	-1,01±0,63	0,21	5,80	0,016
	Экспрессия AR	-1,22±0,34	0,29	12,87	0,0003
Апоптотические	Экспрессия bcl2	-0,32±0,017	0,96	3,47	0,062
	Экспрессия mt p53	0,23±0,012	1,1	3,88	0,048
Пролиферативные	Экспрессия TopII α	1,49±0,93	4,45	3,57	0,049
	Экспрессия Ki-67	0,64±0,043	1,9	3,42	0,051

При сравнительном анализе гормональных показателей для экспрессии AR статистика Вальда была выше, чем для экспрессии PR, следовательно, надежность прогноза обеспечивалась в большей мере по величине экспрессии рецепторов к андрогенам. Поскольку величина Exp(B), отражающая кратность изменения риска наступления исхода при повышении изучаемых показателей на единицу измерения, для гормональных факторов оказалась ниже нуля, то при повышении экспрессии PR либо экспрессии AR вероятность наступления прогрессирования заболевания снижалась на 79% и на 71% соответственно. Коэффициент корреляции между ковариантами, описывающий тесноту связи между гормональными факторами, имел высокое значение и составил 0,43.

Модуль регрессионного анализа Кокса позволил смоделировать выживаемость до прогрессирования при различных величинах экспрессии гормональных факторов (рис. 1).

Как следует из рисунка 1, низкие уровни экспрессии PR и AR в операционных образцах позволяют дать неблагоприятный прогноз по выживаемости до прогрессирования у больных РМЖ (рис. 1А), и благоприятный – при высоком уровне экспрессии PR и AR (рис. 1Б). В первом случае прогнозировалась 86% выживаемость до прогрессирования через 30 мес. после операции, а во втором – 99%. Через 60 мес. при низкой экспрессии рецепторов гормонов выживаемость до прогрессирования прогнозировалась 59%, при высокой экспрессии – 96,1%.

При анализе факторов, характеризующих апоптоз, судя по модальному значению стандартизованного β -регрессионного коэффициента, значению Exp(B), сила влияния на наступление результативного исхода у двух изучаемых факторов – экспрессии bcl2 и mtp53 -

была сходной, а направленность влияния – различной (табл. 2). При отсутствии экспрессии *bcl2* и положительной экспрессии *tp53* прогрессирование заболевания происходило раньше. Эта же закономерность прослеживалась на соответствующих смоделированных графиках (рис. 2). Коэффициент корреляции между уровнями экспрессии *bcl2* и *tp53* при ковариантном анализе был высоким и составил 0,42.

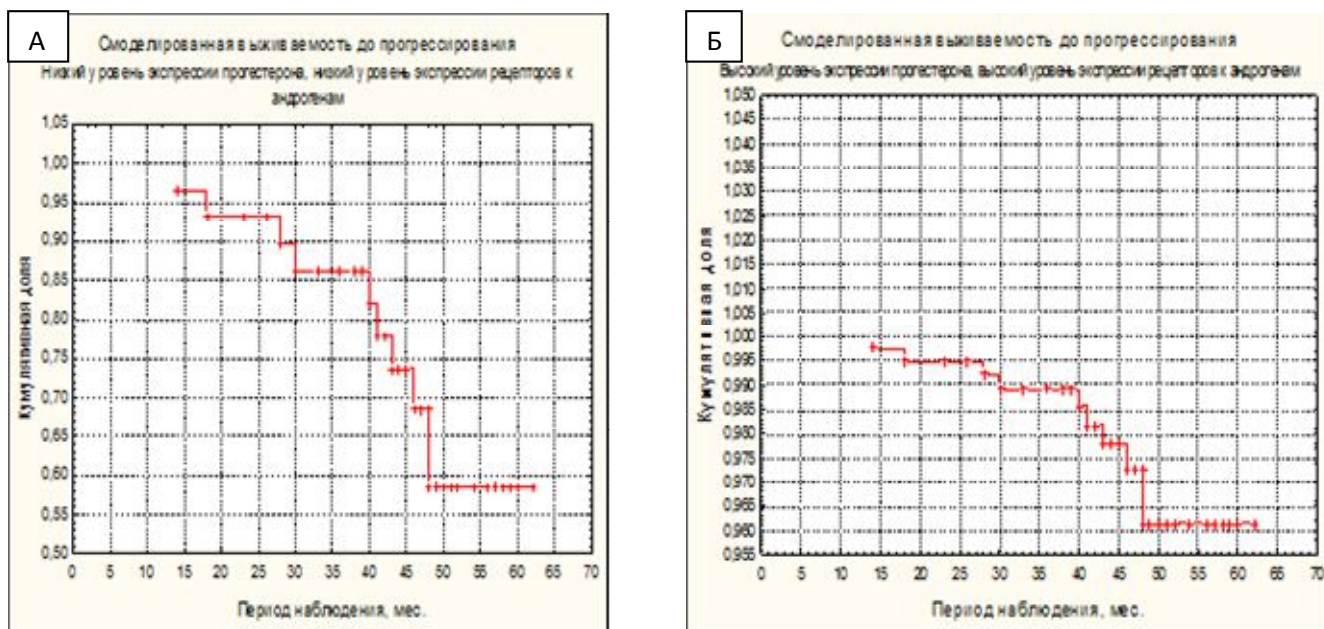


Рис. 1. Смоделированный график выживаемости до прогрессирования болезни у больных РМЖ: А – при низком уровне экспрессии PR и низком уровне экспрессии AR; Б – при высоком уровне экспрессии PR и высоком уровне экспрессии AR

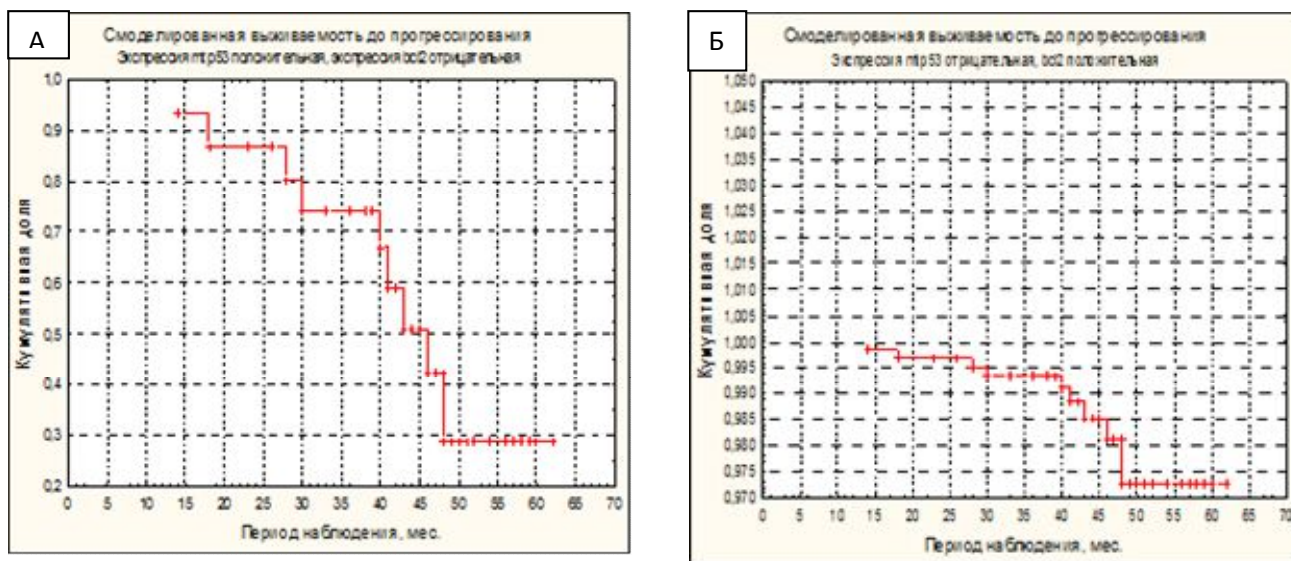


Рис. 2. Смоделированный график выживаемости до прогрессирования болезни у больных РМЖ: А – при высоком уровне экспрессии *tp53* и отсутствии экспрессии *bcl2*; Б – при отсутствии экспрессии *tp53* и высоком уровне экспрессии *bcl2*

При отсутствии экспрессии bcl2 и положительной экспрессии mtp53 в операционных образцах опухолевой ткани через 30 мес. после операции выживаемость до прогрессирования прогнозировалась 72% (рис. 2А), а при отсутствии экспрессии mtp53 и высоком уровне экспрессии bcl2 – 99,4% (рис. 2Б). Через 60 мес. эти значения прогнозировались на уровне 29% и 97,4% соответственно (рис. 2).

Между факторами пролиферативной активности по влиянию на выживаемость до прогрессирования болезни была установлена тесная связь – коэффициент корреляции составил 0,84. При рассмотрении их парциального влияния отмечено, что высокий уровень экспрессии TopIIα и Ki-67 в опухолевой ткани повышал риск прогрессирования заболевания соответственно в 4,45 и 1,9 раза. Стандартизированный β-регрессионный коэффициент для экспрессии TopIIα был выше, чем для экспрессии Ki-67 (табл. 2), что свидетельствовало о большем доле участия в паре двух пролиферативных факторов именно TopIIα в отношении прогноза прогрессирования заболевания.

При высокой экспрессии двух пролиферативных факторов TopIIα и Ki-67 выживаемость до прогрессирования снижалась. Так, при низкой экспрессии TopIIα и Ki-67 в операционных образцах опухолевой ткани через 30 мес. после операции выживаемость до прогрессирования прогнозировалась 98% (рис. 3А), а при высоком уровне экспрессии TopIIα и Ki-67 – 71% (рис. 3Б). Через 60 мес. после операции при низкой экспрессии TopIIα и Ki-67 выживаемость до прогрессирования прогнозировалась 93% (рис. 3А), а при высоком уровне экспрессии TopIIα и Ki-67 – 31% (рис. 3Б).

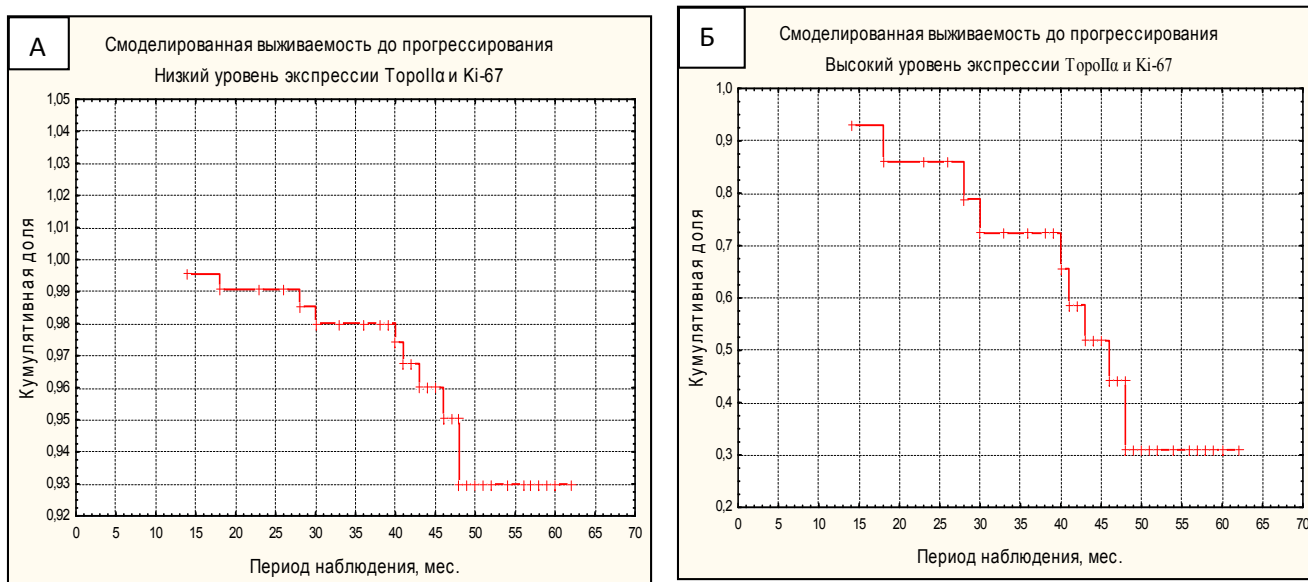


Рис. 3. Смоделированный график выживаемости до прогрессирования болезни у больных РМЖ при разных уровнях экспрессии TopIIα и Ki-67 в операционных образцах у больных РМЖ: А – при низком уровне экспрессии; Б – при высоком уровне экспрессии

Заключение

Таким образом, установлено, что у больных первично операбельным люминальным В раком молочной железы без гиперэкспрессии Her2/neu в постменопаузе комплексное определение в опухолевых операционных образцах ткани экспрессии гормональных факторов (PR, AR), факторов апоптоза (bcl2, mtp53), факторов пролиферации (Ki-67, TopII α) перспективно при оценке выживаемости до прогрессирования и позволяет повысить информативность прогноза выживаемости до прогрессирования. При обследовании таких больных представляется целесообразным дополнить стандартную ИГХ-панель указанными маркерами.

Список литературы

1. Tang, P. Immunohistochemical Surrogates for Molecular Classification of Breast Carcinoma: A 2015 Update / P. Tang, G.M. Tse. Arch. Pathol. Lab. Med. 2016. V. 140 (8). P. 806-814. DOI: 10.5858/arpa.2015-0133-RA.
2. Bediaga N.G., Beristain E., Calvo B., Viguri M.A., Gutierrez-Corres B., Rezola R., Ruiz-Diaz I., Guerra I., de Pancorbo M.M. Luminal B breast cancer subtype displays a dicotomic epigenetic pattern. Springerplus. 2016. V. 14. Is. 5. P. 623. DOI: 10.1186/s40064-016-2235-0.
3. О.И. Кит, Ю.С. Шатова, И.А. Новикова, Л.Ю. Владимирова, Е.П. Ульянова, Е.А. Комова, Э.Э. Кечеджиева Экспрессия p53 и bcl2 при различных подтипах рака молочной железы // Фундаментальные исследования. 2014. № 10-1. С. 85-88.
4. Seong M.K., Lee J.Y., Byeon J., Sohn Y.J., Seol H., Lee J.K., Kim E.K., Kim H.A., Noh W.C. Bcl-2 is a highly significant prognostic marker of hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2015. V. 150(1). P. 141-148. DOI: 10.1007/s10549-015-3305-7.
5. Shigematsu H., Ozaki S., Yasui D., Yamamoto H., Zaito J., Taniyama D., Saitou A., Kuraoka K., Hirata T., Taniyama K. Overexpression of topoisomerase II alpha protein is a factor for poor prognosis in patients with luminal B breast cancer. Oncotarget. 2018. V. 9(42). P. 26701-26710. DOI: 10.18632/oncotarget.25468.
6. Yang L., Wang X.W., Zhu L.P., Wang H.L., Wang B., Zhao Q., Wang X.Y. Significance and prognosis of epithelial-cadherin expression in invasive breast carcinoma. Oncol. Lett. 2018. V. 16 (2). P. 1659-1665.
7. Кит О.И., Ю.С. Шатова, В.В. Токмаков, И.А. Новикова, Е.П. Ульянова, Е.Ю. Златник Уровень экспрессии рецепторов андрогенов в опухолевой ткани и его прогностическое значение при люминальном первично-операбельном раке молочной железы без

гиперэкспрессии Her2/neu у женщин в постменопаузе // Казанский мед.журнал. 2019. Т. 100, №1. С. 112–116. DOI: 10.17816/KMJ2019-112.

8. Румянцев П.О., Саенко В.А., Румянцева У.В., Чекин С.Ю. Статистические методы анализа в клинической практике. Часть II. Анализ выживаемости и многомерная статистика // Проблемы эндокринологии. 2009. Т. 55, № 6. С. 48-58.