

## АНАЛИЗ ФЕНОТИПА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЖЕНЩИН, НАХОДЯЩИХСЯ НА ЛЕЧЕНИИ В ОНКОЛОГИЧЕСКОМ ЦЕНТРЕ ХАБАРОВСКА

### THE ANALYSIS OF BREAST CANCER PHENOTYPES IN WOMEN TREATED IN THE CANCER CENTRE OF Khabarovsk

**V. Dubinina  
A. Volkov  
A. Balysheva  
D. Tsekaturonov  
A. Dzyuba**

**Summary.** The huge growth of oncological diseases is observed around the world, especially of hormone-dependent cancers. Despite of the new diagnostic methods appearance and specific target treatment the situation is being became actually the worst. In 2018, 71312 new cases of breast cancer were identified in Russia, which is 89.9 per 100000 female population. The increase in incidence over 10 years is 32.2%. The Mortality was 22295 (31.2%) in Russia in 2018 The depressing situation is the diagnosis of tumors in the late stages. We have analyzed the data of tumors investigations by immunohistochemistry methods all women, who had been getting the treatment as surgery as specific therapy in oncology center of Khabarovsk city. The different morphology types and correlation with proliferating index and receptors status were investigated. The database were being gathered during whole calendar year. The big amount of tissue investigations allow to do certain conclusions now and plan predicting goals in the future. Certain patterns have been identified in the hormonal status of the tumor, which can be useful precisely when prescribing therapy, as well as conclusions about the role of Her/neu receptors and the possibility of prescribing a targeted drug trastuzumab.

**Keywords:** estrogen and progesterone receptors, epidermal growth factor receptor, triple negative tumors, positive and negative responses. prognosis and analysis.

**Дубинина Виктория Васильевна**

К.м.н., доцент, Дальневосточный государственный  
медицинский университет  
vickdoctor@yandex.ru

**Волков Алексей Викторович**

К.м.н., Краевой Онкологический центр  
volkov\_av@kkco.khv.ru

**Балышева Анна Константиновна**

Ординатор, Дальневосточный государственный  
медицинский университет  
anbalysheva@mail.ru

**Цекатунов Дмитрий Анатольевич**

Краевой Онкологический центр  
volkov\_av@kkco.khv.ru

**Дзюба Анна Сергеевна**

Врач-ординатор, ГАОУ ВО Первый МГМУ им.  
И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский  
Университет)  
dzyuba\_anya@list.ru

**Аннотация.** Во всем мире наблюдается рост гормональнозависимых опухолей. Несмотря на появление новых методов диагностики и таргетного лечения ситуация с каждым годом, в том числе, и в нашей стране ухудшается. В 2018 г. в России выявлено 71312 новых случаев РМЖ, что составляет 89,9 на 100000 женского населения. Прирост заболеваемости за 10 лет составляет 32,2%.

Смертность по раку молочной железы в России в 2018 составила 22295 (31,2%). Самая печальная ситуация состоит в диагностировании опухолей на поздних стадиях. В работе проведен анализ иммуногистохимического исследования фенотипа разных морфологических форм опухолей в различных возрастных группах, особенно интересен анализ корреляционных взаимосвязей между индексом пролиферации и задействованным в патогенезе гормональным рецептором, а также изучение трижды негативных опухолей. Исследования проведены в течение календарного года у всех женщин, находящихся на лечении в онкологическом центре города Хабаровска. Выявлены определенные закономерности в гормональном статусе опухоли, которые могут быть полезными именно при назначении терапии, а также сделаны выводы о роли рецепторов Her/neu и возможности назначения таргетного препарата трастузумаба.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, рецепторы эстрогена и прогестерона, тройной негативный рак, прогноз и анализ.

## Введение

**Р**ак молочной железы занимает лидирующую позицию среди онкологических заболеваний, к тому же проблема выявления его на ранней стадии до сих пор остается значимой. По данным разных авторов, частота выявления рака молочной железы на ранних стадиях чрезвычайно низкая [1]. Согласно другим работам в сравнении частоты выявления с интервалом в 5 лет ситуация остается прежней [2]. Заболеваемость и смертность по причине рмж растет при наличии современных методов обследования и таргетных схем терапии. Особо актуальным вопросом становится заболеваемость РМЖ молодых женщин [3]. Протоколы лечения включают препараты, ориентированные на задействованные в патологическом процессе рецепторы к эстрогену, прогестерону и к рецептору эпидермального фактора роста, или HER2. Поэтому иммуногистохимическое исследование на данные рецепторы является обоснованным для назначения таргетной терапии [4]. При этом, если антиэстрогеновые препараты используются в онкологии давно, химерные пришли сравнительно недавно, отличаются высокой стоимостью и необходимы лишь для женщин с позитивным анализом на HER/neu2- рецепторы. Пациенты, у которых опухоли содержат как рецепторы к эстрогену- ER, так и к прогестерону PR, имеют наибольшую вероятность ответа на эндокринную терапию и имеют лучший прогноз, чем те, у которых опухоли не содержат стероидных рецепторов [4]. Согласно литературным данным, большинство успешных ответов на терапию тамоксифеном обусловлено высоким уровнем ER-рецепторов в опухоли, поэтому особенно важна данная диагностика перед назначением эндокринной терапии [5,6].

Антиген, связанный с пролиферацией — Ki67, характеризует прогрессирование опухоли и ее злокачественность, и это еще одно раннее изменение, связанное с процессом опухолевого генеза груди [7]. Прогностические горизонты применения маркера Ki-67 постоянно расширяются. Уточняется и дополняется его значение в предикции результатов лекарственной терапии опухолей. Например, для рака молочной железы, который не отвечает на химиотерапию, повышение Ki-67 является плохим прогностическим маркером. Напротив, в опухолях, реагирующих на химиотерапию, этот эффект не наблюдается, и даже присутствует корреляция увеличения Ki-67 с улучшением прогноза [8].

Исследования, направленные на этот белковый маркер, популярны в ряде стран и напрямую указывают на лучший прогноз у женщин с низким показателем экспрессии этой молекулы [3,5,8]. Хотя в этом вопросе мнения исследователей согласно выполненным работам неоднозначны [3,9].

## Цель исследования

Изучить данные иммуногистохимического исследования с анализом промоутера пролиферации клеток Ki-67, стероидного рецепторного аппарата опухолевых клеток молочной железы и, как показатель ауто/паракринного роста — протоонкогена HER2, кодирующего рецептор эпидермального фактора роста.

Материалы и методы исследования: Иммуногистохимические исследования были выполнены у всех женщин, находящихся на лечении в онкоцентре Хабаровска в 2018 году. Для исследования специфичных маркеров использовали фиксированные в формалине и заключенные в парафин кусочки тканей опухоли, полученные при рутинной патологоанатомической обработке, до специфического таргетного лечения.

Оценка результатов ИГХ окрашивания проводилась с применением светового микроскопа, где оценивается реакция антиген — антитело по характерной окраске. Для всех маркеров были оценены локализацию окрашивания в клетке, интенсивность пероксидазной метки (в области с максимальной экспрессией) и процент окрашенных клеток.

Экспрессию рецепторов ER и PR оценивали по балльной системе, по интенсивности окраски (от 1 до 3 баллов) и доли окрашенных опухолевых клеток.

- ◆ 0 баллов — отсутствие окрашивания;
- ◆ 1 балл — количество окрашенных клеток менее 1%;
- ◆ 2 балла — количество окрашенных клеток от 1 до 10%;
- ◆ 3 балла — количество окрашенных клеток от 11 до 33%;
- ◆ 4 балла — количество окрашенных клеток от 34 до 66%;
- ◆ 5 баллов — количество окрашенных клеток от 67 до 100%.

Для получения IRS (immune reactivity SCORE) суммируют баллы доли окрашенных клеток и интенсивности их окраски. Опухоль считают позитивной по содержанию ER, PR при суммарном балле более или равном 3 (SCORE), или более 1% окрашенных клеток.

Для определения антигена HER2/neu оценивали окрашивание мембран клеток, так как антиген относится к трансмембранному белку семейства тирозинкиназ. Оценка производилась по рекомендуемым критериям маркера:

Опухоль оценивается как отрицательная по Her 2/neu- при отсутствии мембранного окрашивания или при окрашивании менее 10% клеток;

- ◆ 1 балл (1+) — при неполном окрашивании мембран у более 10% клеток;
- ◆ 2 балла (2+) — при полной умеренно интенсивной окраске мембран у более 10% клеток;
- ◆ 3 балла (3+) при полном интенсивном окрашивании мембран более 10% клеток.

Her 2 neu (протоонкоген, кодирующий рецептор 2 человеческого эпидермального фактора роста (EGF- ERBB-2). Гиперэкспрессия (увеличенное содержание) этого фактора отмечается в 25–30% случаев рака молочной железы и ассоциируется с плохим прогнозом при наличии метастазов опухоли в регионарных лимфоузлах. Данный фактор определяет чувствительность опухоли к трастузумабу (герцептину) — одному из современных и эффективных препаратов в лечении рака молочной железы.

Пролиферативная активность опухоли оценивалась по антигену Ki-67, выявляемого также по реакции с первичным моноклональным антителом и выражалась как процент Ki-67- положительно окрашенных в коричневый цвет ядер в клетках опухоли:

Индекс пролиферации — это процент клеток с ядерным окрашиванием от общего числа опухолевых клеток. Интенсивность и тип экспрессии маркера не учитывается (перинуклеолярный, нуклеоплазменный, перихромосомный). Подсчет включает в себя не менее 500 опухолевых клеток (в идеале не менее 1000) не менее чем в 3 полях зрения при увеличении  $\times 400$ . В случае гетерогенности опухоли выбирают участки с наибольшей митотической активностью.

Общие характеристики уровня пролиферации для опухолевой ткани различных локализаций:

- ◆ < 10% — низкий уровень;
- ◆ 10–20% — пограничные опухоли;
- ◆ > 20% — высокий.

В лабораториях используют антитела к Ki-67 клонов MIB-1 (для работы с материалом, полученным от человека, крупного рогатого скота, собак, овец и лошадей) и MIB-5 (для работы с материалом, полученным от крыс и других грызунов). Эти структуры показали более высокое сродство к эпитопу антигена Ki-67 в условиях формалиновой фиксации доставляемого материала [4]. Для характеристики опухолей молочной железы была принята более упрощенная классификация процента клеток с экспрессией данного белка [2].

- ◆ высокая пролиферативная активность опухоли соответствует экспрессии Ki-67 в более чем 15% клеток;
- ◆ низкая пролиферативная активность — экспрессии Ki-67 в менее 15% клеток.

Метод ИГХ был выполнен 332 женщинам с раком молочной железы. Все женщины были разделены на исследуемые группы по возрасту, 1 группа — женщины 27–45 лет в количестве 54, 2 группа — женщины 46–60 лет в количестве 102 человека, 3 группа — 61–74 года в количестве 135, и в 4 группу вошли 46 женщин в возрасте от 75 до 87 лет. В каждой группе были оценены рецепторы к эстрогену (ER) и прогестерону (PR), антиген Her2/neu по бальной системе и пролиферативная активность, которая выражена в проценте клеток с экспрессией ядерного трансформатора- белка Ki-67.

### Результаты исследования и их обсуждение

В работе были проанализированы все образцы операционного материала в течение года, и за 2018 год наибольшее количество больных женщин приходится на возраст 61–74 года — это 41%, в возрасте 46–60—31%, в возрасте 27–45 лет это 16,27%, и число женщин старшей возрастной группы соответствовало 13,9% (таблица № 1).

В группе женщин в возрасте от 27 до 45 лет низкодифференцированные опухоли (отрицательные ER и PR) были выявлены у 13 женщин, что соответствует 24% в группе, во II недифференцируемые стероидные рецепторы в опухоли обнаружены у 15 женщин, что соответствует 14,7%, в III группе это 15 женщин и 11,11%, и в IV- самой старшей возрастной группой — 15 женщин и это 32%, что оказалось наивысшим значением среди обследованных.

Оценка выраженности позитивных результатов по рецепторам гормонов выявила недостоверные значения ( $p > 0,05$ ) в группах, но с тенденцией к увеличению обоих показателей с возрастом, что соответствовало уровню ER/PR в группах: в первой группе-I:  $4,86 \pm 0,6/5,35 \pm 0,2$ , во второй группе-II:  $5,34 \pm 0,4/5,30 \pm 0,30$ , в третьей —III:  $6,41 \pm 1,2/5,93 \pm 1,23$ , в четвертой-IV:  $7,01 \pm 0,9/6,87 \pm 1,45$  соответственно.

По данным ведущих исследований мира от 70% до 80% случаев рака молочной железы являются ER-положительными. Существует корреляция между наличием ER, типом и степенью карциномы, и, поскольку нормальная грудь должна экспрессировать ER (степень в зависимости от возраста женщины), она может действовать как внутренний положительный контроль.

Поэтому важно оценить интенсивность окрашивания и процент клеток с эстрогеновым рецептором для получения части данных по прогнозированию ответа и определению точек отсечения, в том числе и по определению метастазов; чем выше оценка, тем более вероятен ответ

Таблица 1. Результаты исследования.

Признак	Всего	Группа I 27–45	Группа II 46–60	Группа III 61–74	Группа IV 74–87
PMЖ абс %	332 100	54 16,27	102 31	135 41	46 13,9
ER+ абс .%	7 2,1%	2 3:7	-	4 2,96	1 2,2
PR+, абс %	13 3,9%	3 5,5	1 0,98	8 5,9	1 2,2
ER+ PR+ абс %.	167 56,3	9 16,7	60 58,8	74 54,8	16 34,8
ER- PR- абс %.	58 17,5	13 24,1	15 14,7	15 11,1	15 32,6
ER значения PR значения	5,64±1,3 5,98±0,2	4,86±0,6 5,35±0,2	5,34±0,4 5,30±0,30	6,41±1,2 5,93±1,23	7,01±0,9 6,87±1,4
HER/neu II абс %	38 11,45	11 20,4	12 11,8	13 9,6	2 4,4
Тройной негативный	49 14,8%	13 22,2	14 13,8	11 8,2	11 26,8%*
Ki-67. Абс %	206 62	40 74,1'	68 66,7	73 54,01	25 54,4
Ki-67 значения		37,23±13,17	29,45±14,2	26,23±15,9	26,15±13,9

[10] и имеются доказательства того, что даже низкие оценки могут предсказать благоприятный ответ на адъювантное лечение [11,12].

Также спорным является роль прогестеронового рецептора в этиологии рака молочной железы. По мнению большинства авторов, рецептор прогестерона (PR) индуцируется эстрогеном и, следовательно, является маркером функционирующей ER. Некоторые исследователи обнаружили, что статус прогестерона имеет большую силу, чем статус ER, при прогнозировании заболевания. От 55% до 65% случаев рака молочной железы, вероятно, будут положительными для PR, причем две трети ER α-положительных случаев экспрессируют его [5]. PR также будет присутствовать в ткани нормальной молочной железы. Степень реактивности при раке может быть похожа или меньше, чем ER. Кроме того, небольшая доля (< 5%) рака молочной железы является PR-положительным, ER рецептор отрицательным [7]. В нашем исследовании получен аналогичный процент женщин с идентифицированным прогестероновым рецептором при отрицательном рецепторе эстрогена и составил всего 2,1% от всех женщин. И положительный рецептор эстрогена при отрицательном PR статусе выявлен у 3,9% женщин.

При анализе частоты выявления рецептора эпидермального фактора роста выявлена следующая картина. В первой группе положительный антиген выявлен у 11 женщин, что соответствовало 20,37%, во второй у 12 женщин или 11,8%, в третьей HER2/neu был идентифици-

рован у 13 женщин или 9,63%, и у старшей возрастной группы он выявлен всего у 2 женщин, что соответствовало 4,35%. Таким образом, выявлена прямая слабая корреляция ( $r=0,45$ ) зависимости позитивного рецептора от возраста — наибольший процент выявлен в группе женщин 27–45 лет.

Оценка пролиферативной активности выявила следующую картину-во всех возрастных группах средний показатель пролиферирующих клеток достоверно не различался и был равен: 37,23±13,17; 29,45±14,2; 26,23±15,9; 26,15±13,9, но сравнивая абсолютное число женщин с нормальным и повышенным числом клеток по маркеру Ki-67 получилась следующая ситуация: высокая пролиферативная активность зафиксирована у 40 женщин из 54 и это соответствовало 74% в первой, у 68–66,67% во второй, у 73–54,01% в третьей и 25–54,35% в четвертой группе. То есть, в более молодом организме при ускоренном метаболизме наблюдается усиление пролиферативной активности клеток, что соответственно ухудшает прогноз и требует незамедлительного таргетного лечения.

Анализируя данные по возрастному признаку выявлено, что процент обнаружения дифференцируемых опухолей не коррелирует ( $r=-0,0012$ ) с возрастом, но активность пролиферативного процесса снижается с возрастом ( $r=-0,72$ ).

Пролиферативную активность оценивали так же в группах, и далее в зависимости от морфологической

характеристики опухоли для анализа экспрессии рецепторов и пролиферации.

В нашем исследовании получены следующие параллели: высокий уровень антигена Ki-67 был зафиксирован в опухолях низкодифференцированных, с отрицательным значением как прогестероновых, так и эстрогеновых рецепторов и, наоборот, низкий уровень этого белка соответствовал позитивным по ER и PR –рецепторам опухолям. В литературе найдены работы с оппозитной точкой зрения, полученные данные в одних из них говорят о низкодифференцируемых опухолях и высоком индексе пролиферации [8], в других, наоборот, о опухолях с позитивными рецепторами к эстрогену и прогестерону и повышены маркеров пролиферации [7].

Что касается гиперэкспрессии Her/ neu 2 рецептора и значений белка Ki 67 –получено среднее значение маркера пролиферации  $37,75 \pm 12,62$  в сравнении при тройных негативных опухолях (отрицательные рецепторы к эстрогену, прогестерону, и Her/neu2 значение Ki 67 соответствовало  $49,12 \pm 15,8$ , при этом тройной негативный рак выявлен у 49 пациентов от общей группы, что соответствовало 14,8%, по возрастным исследуемым группам это соответствовало — 13 человек (22,2%) в группе 27–45 лет, 14 (13,8%) человек в группе 46–60; 11 женщин (8,2%) возраста 61–74 и 11 человек (26,8%) в старшей возрастной группе 75–87 лет, из чего следует, что самая неблагоприятная ситуация в плане прогноза и отвечаемости на терапию наблюдается именно у пожилых. При этом морфологически тройной негативный рак был представлен большим процентом протоковой формы инвазивного рака высокой степени злокачественности — это 65,8% от общего числа тройных негативных опухолей.

Возможности прогноза и предикта ответа на лечение в отношении индекса пролиферации постоянно расши-

ряются, в нашем исследовании наиболее часто высокие значения этого антигена выявлены при протоковых формах инвазивного рака. Особую значимость этот маркер приобрел при патоморфологическом исследовании опухолей молочной железы для выделения так называемых подтипов — гормон-позитивных люминальных опухолей определяется на основании индекса Ki-67: подтип А (Ki-67 < 20%) и подтип В (Ki-67 ≥ 20%), что в нашем исследовании соответствовало явному преобладанию люминального В подтипа. Это 211 женщин из 332. Увеличивается количество клеток, экспрессирующих как ER, так и PR рецепторы в период перименопаузы. Имеются некоторые данные, показывающие, что экспрессия ER снижается при таких поражениях, как атипичная гиперплазия протоков и DCIS по сравнению с таковой в нормальном грудном эпителии. В нашей работе выявлена сильная корреляция между морфологическим субстратом, индексом высокой пролиферативной активности у трижды негативных опухолей.

## Заключение

Резюмируем, абсолютное число женщин с положительно выявленным рецептором HER2/ neu за год для того, чтобы учитывать необходимое количество приобретаемого таргетного препарата — в 2018 году это всего 38 женщин.

Таким образом, получены убедительные данные о ряде закономерных изменений при типировании злокачественных опухолей молочной железы, такие как зависимость пролиферативного роста опухоли от возраста, наличие позитивных проонкогенов Her/neu в небольшом количестве случаев, а маркер пролиферации был выявлен в наивысшем показателе в зависимости от возраста. Увеличивается количество клеток, экспрессирующих как ER, так и PR рецепторы в период перименопаузы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Федоров В.Э., Чебуркаева М.Ю. Распространенность и факторы риска рака молочной железы // *Фундаментальные исследования*. 2015. № 1 (часть 2). С. 414–419.
2. Дубинина В.В., Дзюба А.С., Балышева А.К. Анализ случаев рака молочной железы в сравнении 2013 и 2018 годов в поликлинике // *Сборник «Современные проблемы науки и образования»*. 2020. № 18. С. 36.
3. Сулейманова Д.М., Жолдыбай Ж.Ж. Рак молочной железы у молодых женщин. Адаптированные рекомендации по лучевому обследованию // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2021. № 3. С. 46–52.
4. Круминь Ю.С. Клиническая значимость изменений рецепторного статуса в рецидивных и метастатических опухолях у больных раком молочной железы. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Москва, 2021. 24 с.
5. Mohamed Rogab H., Nervana S. Assessment of Ki-67 as a potential biomarker in patients with breast cancer/ *Journal of genetic engineering and biotechnology* // vol. 16, issue 2. December 2018. P. 479–484. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687157X18300209#>
6. Завалишина Л.Э., Франк Г.А. Морфологическое исследование HER2 статуса. Методика и атлас. М.: Media Medica, 2006. № 24. URL: [https://www.rmj.ru/articles/onkologiya/Morfologicheskoe\\_testirovanie\\_HER2statusa\\_pri\\_rake\\_molochnoy\\_ghezy/](https://www.rmj.ru/articles/onkologiya/Morfologicheskoe_testirovanie_HER2statusa_pri_rake_molochnoy_ghezy/)
7. G. Monteleone Functional role of estrogen receptors during aging and their involvement in inflammatory processes. 2011. Università degli Studi di Milan. URL: <http://hdl.handle.net/2434/150266>.

8. Hosein Kamranzadeh, Reza Manouchehri Ardekani and Nasrollah Maleki. Association between Ki-67 expression and clinicopathological features in prognosis of breast cancer: A retrospective cohort study. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6521610/> (30.09.2019).
9. Megan A Healey, Kelly A Hirko, [...], and Aditi Hazra/ Assessment of Ki67 expression for breast cancer subtype classification and prognosis in the Nurses' Health Study // <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6995281/> (30.09.2019).
10. Adrian L, Rosemary A. Walker. Immunohistochemistry and Breast Cancer Diagnosis, Therapy and Prognosis., University of Leiceste, Harris, Imperial Cancer Research Fund. 2016. URL: <http://danskpatologi.org/wp-content/uploads/2016/04/5-Breast-Cancer-immunohistochemistry.pdf> (03.11.2020).
11. Anderson E, Martin Dunitz. The use of steroid receptors in predicting response to hormonal therapy. In: Walker RA, editor. Prognostic and Predictive Factors in Breast Cancer. London. 2003. P. 135–146.
12. Adrian L, Rosemary A. Walker. Immunohistochemistry and Breast Cancer Diagnosis, Therapy and Prognosis., University of Leiceste, Harris, Imperial Cancer Research Fund. 2016. URL: <http://danskpatologi.org/wp-content/uploads/2016/04/5-Breast-Cancer-immunohistochemistry.pdf> (03.11.2020)

© Дубинина Виктория Васильевна ( vickdoctor@yandex.ru ), Волков Алексей Викторович ( volkov\_av@kkco.khv.ru ),  
 Балышева Анна Константиновна ( anbalysheva@mail.ru ), Цекатунов Дмитрий Анатольевич ( volkov\_av@kkco.khv.ru ),  
 Дзюба Анна Сергеевна ( dzyuba\_anya@list.ru ).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Первый МГМУ им. И.М. Сеченова