

Варданян Сергей Гаспарович

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТИПИРОВАНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОПТИМАЛЬНОЙ ТАКТИКИ
СИСТЕМНОГО ЛЕЧЕНИЯ**

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва–2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Боженко Владимир Константинович**

Официальные оппоненты:

- доктор медицинских наук, профессор **Рожкова Надежда Ивановна**, Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А.Герцена - филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Национальный центр онкологии репродуктивных органов МНИОИ имени П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, заведующая центром

- доктор медицинских наук **Якубовская Марианна Геннадиевна**, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, отдел химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза, заведующая отделом

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук».

Защита состоится « 28 » июня 2021 года в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.081.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации» по адресу: г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 86.

С диссертацией можно ознакомиться на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, адрес сайта www.rncsr.ru

Автореферат разослан « ____ » мая 2021 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Цаллагова З.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

На сегодняшний день рак молочной железы (РМЖ) уверенно занимает лидирующие позиции в структуре онкологических заболеваний среди женского населения [Anastasiadi, 2017; Merino Bonilla, 2017; Odle, 2017], а также является основной причиной смерти у данной категории пациенток. Главными причинами, обуславливающими высокие показатели летальных исходов, остаются прогрессирующие заболевания на разных этапах более чем у половины больных, а также недостаточная эффективность проводимого системного лечения [Carioli, 2017; Vens, 2018].

В настоящее время разнообразие особенностей и течения рака молочной железы объясняется различными биологическими и морфологическими характеристиками опухолевых клеток [Løberg, 2015; Brenner, 2016; Ким, 2019]. Результатами многих исследований было подтверждено, что РМЖ является гетерогенным процессом и объединяет в себе заболевания с различными факторами риска, подходами к лечению, а также показателями выживаемости [Cao, 2016; Harbeck, 2017; Kolak, 2017].

Согласно отечественным и международным рекомендациям выбор терапии и предполагаемый прогноз при раке молочной железы в настоящее время определяются биологическими характеристиками опухоли и осуществляются с учетом ее молекулярных подтипов, к которым относятся люминальный тип А, люминальный тип В (Her2-отрицательный), люминальный тип В (Her2-положительный), Her2-положительный и базальноподобные (трижды негативные) опухоли [Tischkowitz, 2015; Suaifan, 2017]. Для определения молекулярного подтипа РМЖ используется иммуногистохимический метод, с помощью которого в основном опухолевом узле и метастатических очагах оцениваются поверхностная экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестерона, статус рецептора эпидермального фактора роста Her2/neu, а также маркер клеточной пролиферации Ki67 [Nagini, 2017; Russnes, 2017].

Несмотря на то, что классификация на основании иммуногистохимических маркеров получила широкое признание и применение, этот метод имеет свои недостатки. Прежде всего, это обусловлено техническими погрешностями, которые могут быть связаны с возможными нарушениями методологии выполнения исследования, а также с так называемым «субъективным фактором», проявляющимся возможностью неправильной интерпретации полученных результатов. Помимо этого, Cianfrocca M. et.al. продемонстрировали, что только 73% злокачественных образований молочной железы с наличием экспрессии рецептора эстрогена относятся к люминальным А и В подтипам [Cianfrocca, 2004]. В настоящее время активно обсуждается диагностическая ценность маркера клеточной пролиферации Ki67, определяемого методом ИГХ, и его значение в разделении РЭ-позитивных подтипов РМЖ. По рекомендациям St.Gallen от 2013 года необоснованным было признано само пограничное значение уровня Ki67, а уже в 2015 году в 20% случаев серьезному обсуждению подверглась информативность значения Ki67 [Coates, 2015].

Исследованию молекулярных фенотипов в онкологии посвящено большое количество публикаций, в частности, для РМЖ разработано несколько молекулярно-генетических панелей на основе определения экспрессии генов [Song, 2017; Ueno, 2018]. Однако данные панели в большей степени направлены на анализ течения и оценку риска прогрессирования заболевания, и в меньшей несут информацию о чувствительности опухоли к проводимому лечению. Так, используемая в настоящее

время панель Prosigna информативна в отношении возможности идентификации подтипов РМЖ. Определённую сложность также представляет статистическая обработка полученных на основании данной модели данных, что существенно ограничивает ее использование в клинической практике [Vishnoi, 2017].

Все вышесказанное обуславливает необходимость разработки и внедрения новых методов фенотипирования рака молочной железы, что позволит существенно повысить чувствительность и специфичность исследования по сравнению с использованием классической ИГХ модели. В частности, в настоящее время на базе ФГБУ «Российского научного центра рентгенорадиологии» Минздрава России разработана отечественная мультигенная панель, определяемая методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), с включением генов, отвечающих за основные механизмы жизнедеятельности опухолевой клетки: клеточная пролиферация, апоптоз, клеточная дифференцировка и межклеточное взаимодействие [Боженко, 2016].

Степень разработанности темы

Несмотря на распространение иммуногистохимического метода исследования, точное определение ряда молекулярных маркеров у больных раком молочной железы остается актуальной проблемой современной онкологии. В настоящее время изучаются молекулярно-генетические панели на основе экспрессии генов, однако в большинстве случаев их использование направлено на оценку риска прогрессирования заболевания, а не анализ чувствительности опухоли к системному лечению.

В последние годы для этих целей активно идет изучение отечественной мультигенной панели, определяемой методом ПЦР и включающей гены, ответственные за основные механизмы жизнедеятельности опухолевых клеток, что, несомненно, является актуальным научным направлением.

Цель исследования

Изучить клиническую значимость отличий определения фенотипических признаков опухоли на основании морфологических и молекулярно-генетических методов у больных раком молочной железы.

Задачи исследования

1. Сопоставить результаты исследования рецепторов стероидных гормонов (эстрогена и прогестерона), рецептора эпидермального фактора роста Her2/neu и маркера клеточной пролиферации Ki67, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР, у больных раком молочной железы.
2. Проспективно изучить молекулярно-генетический профиль злокачественных опухолей молочной железы с применением мультигенной панели, состоящей из 24 генов и определяемой методом ОТ-ПЦР.
3. Сравнить результаты распределения рака молочной железы на подтипы с использованием метода ОТ-ПЦР с данными иммуногистохимического анализа и оценить их клиническую значимость.
4. Провести сравнительный анализ молекулярного фенотипа первичной опухоли и пораженных регионарных лимфатических узлов у больных раком молочной железы и оценить клиническую значимость выявленных отличий.

Научная новизна

Впервые проведена сравнительная оценка экспрессии рецепторов стероидных гормонов (эстрогена и прогестерона) и рецептора эпидермального фактора роста Her2/neu методами ИГХ и ОТ-ПЦР у больных раком молочной железы и показана целесообразность дополнительного использования метода ОТ-ПЦР в случаях с низкими и отрицательными значениями данных маркеров, определяемых иммуногистохимическим анализом.

Впервые на основании сопоставления результатов ИГХ исследования маркера клеточной пролиферации Ki67 с данными ОТ-ПЦР продемонстрирована нецелесообразность использования данного параметра в качестве индикатора разделения молекулярных подтипов РМЖ, а также показана необходимость дополнительного применения комплекса показателей пролиферации для более достоверного определения принадлежности опухоли к определённому фенотипу.

Впервые на репрезентативной группе больных проведено проспективное исследование по изучению молекулярно-генетического профиля рака молочной железы с использованием панели из 24 генов (Ki67, STK-15, CCNB1, CCND1, MYC, MYBL2, P16INK4A, PTEN, BIRC5, BCL2, BAG1, TERT, NDRG1, ESR1, PGR, HER2, GRB7, MGB1, MMP11, CTSL2, CD68, GUSB, HPRT1, B2M), определяемых с помощью ОТ-ПЦР, которое показало, что сочетание данного метода со стандартным иммуногистохимическим анализом существенно повышает информативность и точность распределения злокачественных опухолей молочной железы на молекулярные подтипы.

Впервые изучен молекулярно-генетический фенотип первичного опухолевого узла и пораженных регионарных лимфатических узлов у больных раком молочной железы с применением иммуногистохимического исследования и мультигеновой панели, а также показаны отличия, диктующие необходимость выявления дополнительных характеристик опухолевых очагов для назначения адекватного системного лечения данной категории пациентов.

Теоретическая и практическая значимость

Показано, что для более точного и информативного определения статуса рецепторов стероидных гормонов (эстрогена и прогестерона) и статуса Her2/neu у больных раком молочной железы необходимо сочетание иммуногистохимического и ОТ-ПЦР исследований, особенно для категории пациентов с низким уровнем экспрессии данных параметров.

Установлено, что маркер клеточной пролиферации Ki67 не является достаточным критерием для разделения рака молочной железы на Люминальный А и В подтипы, а для более точного соотнесения злокачественной опухоли к молекулярному фенотипу необходимо дополнительное изучение комплекса показателей пролиферации.

Подтверждена возможность распределения рака молочной железы на подтипы с использованием отечественной панели, состоящей из 24 генов (Ki67, STK-15, CCNB1, CCND1, MYC, MYBL2, P16INK4A, PTEN, BIRC5, BCL2, BAG1, TERT, NDRG1, ESR1, PGR, HER2, GRB7, MGB1, MMP11, CTSL2, CD68, GUSB, HPRT1, B2M) и определяемой методом ОТ-ПЦР.

Показана необходимость определения молекулярно-генетических характеристик опухоли в первичном узле и пораженных регионарных лимфатических

узлах, что будет способствовать более точной диагностике и назначению адекватной системной терапии у больных раком молочной железы.

Методология и методы исследования

В исследование включено 358 больных раком молочной железы ($T_{1-3}N_{0-3}M_0$), которым проводились морфологический, иммуногистохимический и молекулярно-генетический анализы операционного материала с исследованием основного опухолевого узла, также у 64 пациенток были проведены исследования метастатических аксиллярных лимфатических узлов.

В ходе работы выполнялась оценка основных молекулярных маркеров рака молочной железы (рецепторы к эстрогену и прогестерону, рецептор эпидермального фактора роста Her2/neu, маркер клеточной пролиферации Ki67) путем их изучения методами ИГХ и ОТ-ПЦР с последующим сравнением результатов исследования. Также проводилось сопоставление молекулярных подтипов первичной опухоли, выявленных на основании данных иммуногистохимического и ОТ-ПЦР исследований.

Осуществлялось сопоставление фенотипов опухолевой ткани первичного узла и метастатических лимфатических узлов с применением методов ИГХ и ОТ-ПЦР. Полученные данные были проанализированы и обработаны корректными методами статистического анализа.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Для более точной оценки рецепторного статуса опухоли (рецепторов стероидных гормонов и эпидермального фактора роста Her2/neu), а также маркера клеточной пролиферации Ki67 у больных раком молочной железы необходимо сочетание стандартного иммуногистохимического исследования с анализом генной экспрессии, определяемой методом ОТ-ПЦР.
2. Сочетание стандартного иммуногистохимического анализа с изучением панели из 24 генов (Ki67, STK-15, CCNB1, CCND1, MYC, MYBL2, P16INK4A, PTEN, BIRC5, BCL2, BAG1, TERT, NDRG1, ESR1, PGR, HER2, GRB7, MGB1, MMP11, CTSL2, CD68, GUSB, HPRT1, B2M), определяемой методом ОТ-ПЦР, существенно повышает информативность и точность распределения злокачественных опухолей молочной железы на подтипы.
3. Для назначения адекватной тактики системного лечения у больных раком молочной железы целесообразно изучение молекулярно-генетических характеристик первичного опухолевого узла и пораженных регионарных лимфатических узлов.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов проведенного исследования подтверждается достаточным количеством вошедших в исследование больных ($n=358$), высоким методологическим уровнем с применением современных высокоинформативных клинических, диагностических, морфологических и молекулярно-генетических методов исследования.

Апробация материалов диссертации

Основные положения диссертации были доложены на Всероссийском Конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая практика:

диагностика, лечение, профилактика» (Москва, 2016); XIII Тихоокеанском медицинском Конгрессе с международным участием (Владивосток, 2016); XXXI International Congress of the IAP and 28th Congress of the ESP (Cologne, Germany, 2016).

Результаты диссертационного исследования доложены на заседании научно-практической конференции и совета по апробациям кандидатских диссертаций ФГБУ «Российского научного центра рентгенорадиологии» Минздрава России 02.07.2018г.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 3 статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии на этапах отбора вошедших в исследование пациенток, проведении этапов хирургического вмешательства и системного лечения, заборе материала на морфологическое и молекулярно-генетическое исследования, оценке результатов исследования, их обработке, интерпретации, а также непосредственная подготовка научных публикаций и написание всех глав диссертации.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 118 страницах машинописного текста и состоит из введения, материала и методов, результатов исследования, заключения, выводов, практических рекомендаций, а также списка литературы. Работа иллюстрирована 26 таблицами и 21 рисунками. Библиографический указатель содержит 227 источников литературы, из них 16 отечественных и 211 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Клиническая характеристика больных

В проспективное исследование было включено 358 больных раком молочной железы, (T₁₋₃N₀₋₃M₀), получивших лечение на базе ФГБУ «Российский Научный Центр Рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации в период с 2015 по 2017 годы. У всех больных проводился молекулярно-генетический анализ операционного материала с исследованием основного опухолевого узла. Также у 64 пациенток был проведен анализ удаленных аксиллярных лимфатических узлов с морфологически подтвержденным наличием метастазов. Исследование было проведено при соблюдении добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ № 2288 от 24.12.1993).

При проведении исследования преобладали пациентки 50 лет и старше – 308 (86%) и находящиеся в состоянии менопаузы – 277 (77%). Средний возраст больных составил 61,22±10,4 лет (от 34 до 81 лет).

По результатам гистологического исследования опухоли молочной железы были представлены инвазивной карциномой неспецифического типа – 174 (48,6%); дольковым раком – 78 (21,8%); смешанным (дольково-протоковым) раком – 77 (21,5%); а также редкими формами – 29 (8,1%). У 38 (10,6%) больных была установлена I степень злокачественности опухоли, у 218 (60,9%) – II степень злокачественности и у 102 (28,5%) пациенток – III степень злокачественности (таблица 1).

Таблица 1 – Распределение больных раком молочной железы в зависимости от возраста, состояние менструальной функции, гистологического типа опухоли и степени ее злокачественности

<i>Критерий оценки</i>	<i>Количество больных</i>	
	<i>абс. ч.</i>	<i>%</i>
Возраст больной		
• моложе 50 лет	50	14,1
• 50 лет и старше	308	85,9
Всего	358	100
Средний возраст	61,22 ±10,4 лет	
Состояние менструальной функции		
сохранена	95	26,5
менопауза	291	83,5
Всего	358	100
Гистологический тип опухоли		
• Инвазивная карцинома неспецифического типа	174	48,6
• Дольковый рак	78	21,8
• Смешанный (протоковый-дольковый)	77	21,5
• Редкие формы	29	8,1
Всего	358	100
Степень злокачественности		
I	38	10,6
II	218	60,9
III	102	28,5
Всего	358	100

В исследовании преобладали больные с метастазами в лимфатические узлы – 194 (54,2) и со IIА стадией опухолевого процесса – 127 (35,5%) (таблица 2).

Всем больным выполнялся хирургический этап лечения в объеме радикальной мастэктомии 175 пациенткам (49%), органосохраняющих операций – 121 (34%), а также подкожной мастэктомии, аксиллярной лимфаденэктомией с одномоментной реконструкцией молочной железы – 62 (17%).

В адьювантном режиме пациенткам РМЖ по показаниям проводились курсы химиотерапии, гормональная и таргетная терапия, а также лучевая терапия.

Таблица 2 – Состояние регионарных лимфатических узлов и стадия опухолевого процесса у больных РМЖ

Критерий оценки	Количество больных	
	абс. ч.	%
Состояние лимфатических узлов		
• N0	164	45,8
• N1	84	23,5
• N2	79	22,1
• N3	31	8,6
Всего	358	100
Стадия опухолевого процесса		
• I (T1N0M0)	76	21,2
• IIА (T1-2N0-1M0)	127	35,5
• IIВ (T2-3N0-1M0)	63	17,6
• IIIА (T1-4N0-3M0)	18	5,0
• IIIВ (T1-4N0-3M0)	52	14,5
• IIIС (T1-4N0-3M0)	22	6,1
Всего	358	100

Методы исследования

На этапе диагностики всем пациенткам проводилось полное клинко-рентгенологическое обследование. Стадирование опухолевого процесса осуществлялось согласно международной классификации по системе TNM (2009). Морфологическое и иммуногистохимическое исследования выполнялись по стандартной методике в патологоанатомическом отделении ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России с учением биопсийного и операционного материалов ткани первичного опухолевого узла, а также всех удаленных лимфатических узлов. Диагноз РМЖ устанавливался согласно «Гистологической классификации опухолей молочной железы» (ВОЗ, 2012). Степень злокачественности опухоли определялась в соответствии с критериями Elston-Ellis.

Иммуногистохимическим методом изучалась экспрессия рецепторов эстрогена (антитела PA0151, клон 6F11, Leica Microsystems), прогестерона (PA0312, клон 16, Leica Microsystems), рецептора эпидермального фактора роста Her2/neu (антитела A0485, Dako, Дания) и маркера клеточной пролиферации Ki67 (антитела PA0118, клон MM1, Leica Microsystems).

Оценка экспрессии рецепторов к половым гормонам проводилась полуколичественным способом по D.C. Alldred et.al. – подсчету подвергалась только ядерная реакция. Положительная экспрессия рецепторов эстрогена и прогестерона оценивалась при суммарном количестве баллов более 3 (>3).

Пролиферативная активность определялась в ядрах опухолевых клеток, экспрессирующих Ki67. Оценка экспрессии рецептора эпидермального фактора роста Her2/neu выполнялась согласно рекомендациям Wolff et.al. с помощью иммуногистохимического метода с учетом только инвазивного компонента опухоли: негативными считались случаи с отсутствием окрашивания или со слабым, прерывистым мембранным окрашиванием (категории 0 и 1+), положительными –

случаи с сильным окрашиванием всей цитоплазматической мембраны более 10% опухолевых клеток (категории 3+).

При слабом до умеренного окрашивания всей цитоплазматической мембраны более 10% опухолевых клеток (категории 2+) всем пациенткам проводился FISH-анализ (флуоресцентная гибридизация *in situ*) по стандартной методике. Положительными считались результаты теста при соотношении среднего количества копий гена *Her2/neu* и среднего числа центромер хромосомы 17 в клетке более 2,2.

По результатам иммуногистохимического анализа выполнялось распределение больных РМЖ на молекулярно-биологические подтипы согласно рекомендациям RUSSCO от 2019 года.

Молекулярно-генетическое исследование с использованием методов ПЦР выполнялось в научно-исследовательском отделе молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России. У всех пациенток изучался операционный материал основного опухолевого узла (n=358) и метастатических лимфатических узлов (n=64).

Исследование свежеполученного опухолевого материала проводилось в несколько этапов: выделение мРНК из полученной ткани, реакция ОТ-ПЦР и непосредственно проведение РВ-ПЦР. При выделении РНК применялись наборы RNeasy (Qiagen, USA), анализ полученных данных выполнялся по инструкциям, предоставленным производителем. Для проведения реакции ОТ-ПЦР и РВ-ПЦР использовали наборы «ЗАО НПФ ДНК-Технология» также согласно протоколу производителя. В качестве контроля качества проведения исследования дополнительно проводилось изучение образцов ткани без проведения предварительной обратной транскрипции. Для определения амплификации генов применялись приборы «ДТ-322» и «ДТ-964» фирмы «ЗАО НПФ ДНК-Технология».

Определение уровня экспрессии мРНК (относительные единицы) выполнялось по методике, описанной ранее, с использованием 3 генов-хаускипингов. Применяемая в данном анализе панель генов включала оценку экспрессии 21 генов (*Ki67*, *STK-15*, *CCNB1*, *CCND1*, *MYC*, *MYBL2*, *P16INK4A*, *PTEN*, *BIRC5*, *BCL2*, *BAG1*, *TERT*, *NDRG1*, *ESR1*, *PGR*, *HER2*, *GRB7*, *MGB1*, *MMP11*, *CTSL2*, *CD68*) и 3 контрольных генов (*GUSB*, *HPRT1*, *B2M*). Распределение генов на функциональные группы с оценкой основных биологических характеристик опухолевых клеток представлено в таблице 3.

Таблица 3 – Функциональные группы исследуемых генов

<i>Функциональные группы</i>	<i>Исследуемые гены</i>
Контроль пролиферации	KI67, CCND1, MYC, P16 ^{ink4A} , PTEN, MYBL2, STK15, CCNB1
Контроль апоптоза	BIRC5, TERT, BCL2, BAG1, NDRG1
Клеточная дифференцировка/рецепторы	ESR1, PGR, HER2, GRB7, MGB1
Клеточная адгезия	MMP11, CTSL2
Маркер активированных макрофагов	CD68
Контрольные гены	B2M, GUSB, HPRT1

Методы статистической обработки

В данном исследовании статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием пакета программ Statistica 10.0.4. для Windows. Применялись стандартные методы описательной, параметрической и непараметрической статистики, а также многомерный статистический анализ, включающий факторный,

линейный, кластерный и дискриминационный анализ полученных данных. Данные были проверены на нормальное распределение. Полученные данные были логарифмированы, что позволило использовать параметрические критерии для нормального распределения в группах. Если полученные значения распределения отличались от нормального, были использованы непараметрические статистические методы. Использование дискриминантного анализа позволило провести классификацию молекулярно-генетических подтипов. Различие считалось достоверным при $p < 0,05$, т.е. в тех случаях, когда вероятность различия составляла больше 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сопоставление значений молекулярных маркеров у больных раком молочной железы, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР

Рецепторы эстрогена. По результатам иммуногистохимического исследования количество больных с отрицательным статусом рецептора эстрогена составило 76 (20,1%) случаев, положительным – 282 (79,9%). В подгруппе с РЭ-позитивными опухолями преобладали пациенты со значениями 7 и более баллов – 226 (62,6%).

При анализе значений экспрессии рецептора эстрогена с применением метода ОТ-ПЦР был получен широкий диапазон значений экспрессии РЭ в пределах от 0 до несколько тысяч условных единиц, что существенно отличается от результатов иммуногистохимического исследования с максимальными значениями в интервале от 5 до 8 условных единиц. При изучении образцов опухолевой ткани, которая по данным ИГХ-исследования характеризовалась отсутствием экспрессии рецепторов эстрогена (нулевая экспрессия) было получено, что средний уровень экспрессии в этой группе был достоверно ниже, чем в среднем по образцам, однако «ненулевой» уровень определялся в большем количестве случаев. Уровень экспрессии эстрогена более 4 по данным ПЦР («положительный» статус) составил 15%, что практически совпадает с данными клинических оценок по положительному ответу на гормональную терапию для РЭ отрицательных пациентов.

Рецепторы прогестерона. По данным ИГХ-исследования операционного материала количество случаев с отрицательной экспрессией РП составило 127 (35,5%), с положительной – 231 (64,5%). При этом наибольшее количество положительных случаев приходилось на экспрессию рецепторов прогестерона в 8 и 9 баллов (17,6 и 18,7% соответственно). Гистограмма уровней экспрессии рецепторов прогестерона, определяемых методом ОТ-ПЦР, продемонстрировала, что практически для всех РП-отрицательных опухолей, выявленных методом ИГХ, обнаруживаются «ненулевые» уровни экспрессии маркера при проведении ПЦР-исследования.

Корреляционный анализ экспрессии рецептора прогестерона, выявленного методами ИГХ и ОТ-ПЦР, также продемонстрировал схожие закономерности, что и при изучении уровня экспрессии эстрогена. В тоже время, обращает на себя внимание отсутствие «провала» в регистрации уровней экспрессии рецептора прогестерона, определяемых методом ИГХ в диапазоне значений 2-4.

Рецептор эпидермального фактора роста Her2/neu. По результатам иммуногистохимического исследования гиперэкспрессия эпидермального фактора роста Her2/neu (показатели 2+ и 3+) была выявлена у 109 пациентов (30,4% больных),

в то время как отрицательный статус маркера (0 и 1+) обнаруживался у 249 пациентов (69,6%).

При изучении группы образцов опухолевой ткани, у которых на основании данных ИГХ статус Her2/neu определялся как «позитивный» (2+ и 3+), установлено, что при проведении ОТ-ПЦР практически отсутствуют образцы с низким уровнем экспрессии (если дифференцирующий уровень выбрать равным 4, по аналогии с рецепторами эстрогена и прогестерона). При анализе образцов, у которых по данным ИГХ статус Her2 был определен как «отрицательный» (0 и 1+), напротив, более половины имели высокие значения экспрессии мРНК Her2/neu. Проведенный корреляционный анализ продемонстрировал высокое соотношение результатов ИГХ исследования и метода ОТ-ПЦР.

Данные по корреляционному анализу представлены в таблице 4 и на рисунке 1.

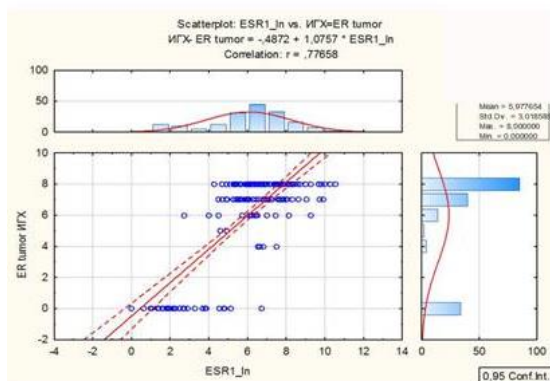
Таблица 4 – Корреляционный анализ между уровнями экспрессии молекулярных маркеров, определяемых методами ИГХ и ПЦР

Иммуногистохимическое исследование молекулярных маркеров	Коэффициент корреляции значение, полученных при ИГХ и ОТ-ПЦР исследованиями	ОТ-ПЦР исследование молекулярных маркеров
ИГХ рецепторов эстрогена в опухоли	<i>ESR1_ln</i>	<i>ESR1</i>
	0,78	0,23
ИГХ рецептора прогестерона в опухоли	<i>PGR_ln</i>	<i>PGR</i>
	0,71	0,37
ИГХ Her2/neu в опухоли	<i>Her2_ln</i>	<i>Her2</i>
	0,532265	0,443758
ИГХ Ki67 в опухоли	<i>Ki67_ln</i>	<i>Ki67</i>
	0,526618	0,523391

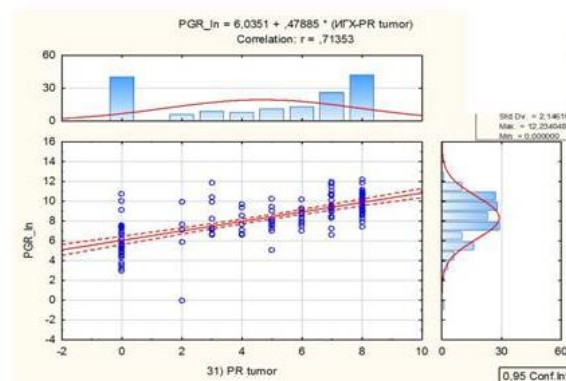
Маркер клеточной пролиферации Ki67. При проведении корреляционного анализа экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki67 обращает на себя внимание тот факт, что в отличие от показателей экспрессии эстрогенов и прогестерона, для которых уровень корреляции для логарифмов значений был существенно выше, для Ki67 коэффициенты корреляции для абсолютного и логарифмированного показателя практически не отличались.

При проведении линейной корреляции между показателями нами было получено уравнение регрессии, что позволяет вычислить уровень экспрессии Ki67, определенный методом ПЦР для дифференциации Люминального А и В фенотипов: $Ki67 = 100,22 + 4,9141 \times (\text{ИГХ Ki-67 опухоль})$.

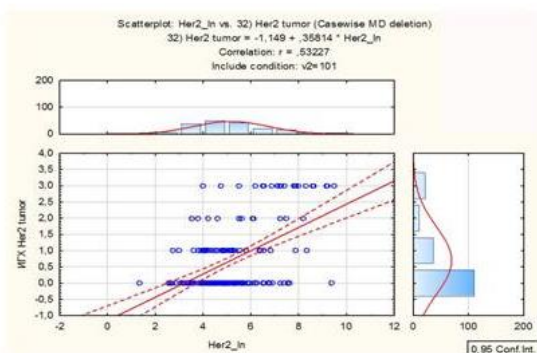
Например, если принять за дискриминирующий уровень величину 17%, то уровень Ki67, определяемый методом ПЦР, будет равен: $Ki67 = 100,22 + 4,9141 * (\text{ИГХ Ki67 опухоль} = 17) = 183,8$.



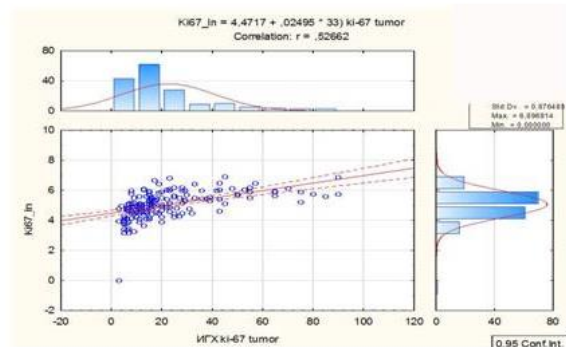
Корреляция уровней экспрессии рецепторов эстрогена, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР



Корреляция уровней экспрессии рецепторов прогестерона, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР



Корреляция уровней экспрессии рецептора эпидермального фактора роста Her2/неу, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР



Корреляция уровней экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki67, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР

Рисунок 1 – Корреляция молекулярных маркеров рака молочной железы, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР

Молекулярное типирование рака молочной железы по результатам ИГХ и ОТ-ПЦР исследований

По результатам проведенного иммуногистохимического анализа осуществлялось молекулярное типирование злокачественных опухолей молочной железы с выделением 5 подтипов. Люминальный тип А был выявлен у 129 (36%) больных; люминальный В (Her2-негативный) у 110 (30,7%); люминальный В (Her2-позитивный) у 49 (13,7%); трижды негативный у 54 (15,1%); Her2-позитивный 16 (4,5%) (таблица 5).

На первом этапе статистической обработки нами применялся кластерный анализ методом К-средних, проводящий группировку образцов по степени их схожести на основании измеренных уровней экспрессии 24 генов. Результаты – средние значения центров групп для 5 выделенных кластеров представлены в таблице 6.

Таблица 5 – Распределение больных раком молочной железы на молекулярные подтипы на основании данных ИГХ исследования

Критерий оценки	Количество больных	
	абс. ч.	%
Люминальный тип А	129	36,0
Люминальный В (Her2-негативный)	110	30,7
Люминальный В (Her2-позитивный)	49	13,7
Her2-позитивный рак	16	4,5
Трижды негативный рак	54	15,1
Всего	358	100

Таблица 6 – Результаты кластерного анализа (метод К-средних) по распределению образцов на 5 групп на основании анализа экспрессии 24 генов

	1	2	3	4	5
1	0,00000	5,64342	2,64256	2,42323	1,76574
2	2,23421	0,00000	4,06545	2,87632	4,16567
3	1,37232	2,02563	0,00000	1,54334	1,98234
4	1,48673	1,43567	1,23432	0,00000	1,34534
5	1,13345	2,00645	1,54232	1,32423	0,000000

Дополнительная проверка данных кластерного анализа результатами дискриминантного анализа показала высокие показатели точности распределения образцов опухолевой ткани к заданным ранее подгруппам (суммарный процент классификаций 93,8). Наиболее высокие показатели отмечались для групп 2 и 3 (95 и 100% соответственно); меньшие в подгруппе 4 (81%) (таблица 7).

Таблица 7 – Данные классификации на основании дискриминантного анализа по 24 исследованным генам, на 5 групп, образованных методом К-средних

	%	$G_{1:1}$	$G_{2:2}$	$G_{3:3}$	$G_{4:4}$	$G_{5:5}$
$G_{1:1}$	88,6364	39	1	2	0	2
$G_{2:2}$	95,1220	0	39	1	0	1
$G_{3:3}$	100,0000	0	0	117	0	0
$G_{4:4}$	81,8182	0	0	4	36	4
$G_{5:5}$	93,4783	0	0	5	1	86
<i>Всего</i>	93,7870	39	40	129	37	93

На основании кластерного анализа среднего уровня показателей экспрессии 4 генов (Ki67, ESR, PGR, Her2) определялась принадлежность опухоли к классическим фенотипам (рисунок 2).

С учетом данных, полученных при анализе уровня экспрессии четырех генов (Ki67, ESR, PGR, Her2) проводилась ассоциация между номером класса и «классическим» молекулярным фенотипом: №1 – трижды негативный, №2 – Her2

позитивный, №3 – Люминальный В Her2-позитивный, №4 – Люминальный А, №5 – Люминальный В Her2-негативный.

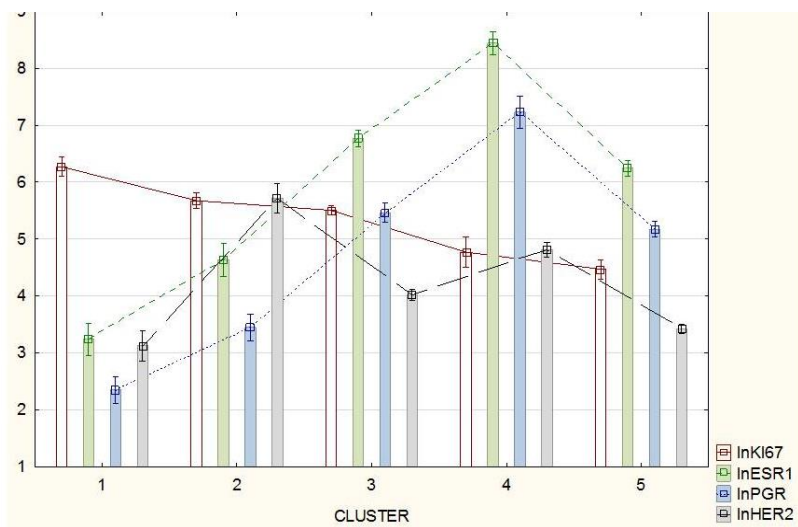


Рисунок 2 – Уровень экспрессии показателей Ki67, ESR, PGR, Her2 в 5 фенотипах опухоли, выделенных методом классификации K-средних

Также была проанализирована значимость исследуемых генов для классификации, при этом, обращает внимание, что Ki67 не вносил значимого вклада в дифференцирующую модель, а наибольший же вклад осуществлялся за счет генов BIRC5, ESR1, PGR, HER2, GRB7, MGB1, MMP11 и TERT, а также BCL2, MYBL2, MYC и STK15. На рисунке 3 представлены результаты исследования ряда генов в зависимости от молекулярно-биологического фенотипа опухоли.

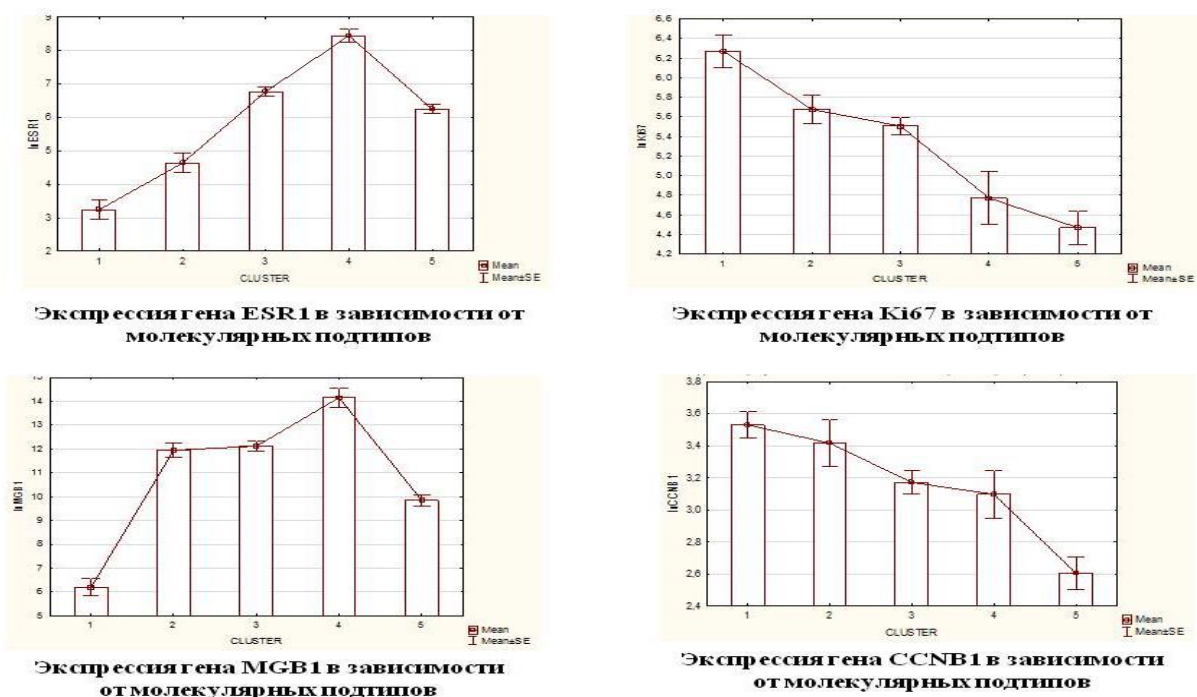


Рисунок 3 – Экспрессия генов ESR1, Ki67, MGB1, CCNB1 в зависимости от молекулярных подтипов рака молочной железы

Соотношение результатов типирования рака молочной железы, определяемых иммуногистохимическим и ОТ-ПЦР методами исследования

На основании проведенных исследований проводился сравнительный анализ результатов распределения рака молочной железы на подтипы, определяемые методами ИГХ и ОТ-ПЦР (таблица 8).

По данным таблицы 8 суммарный процент совпадений составил 71,9%. Следует отметить, что наибольшие показатели соответствия отмечались в подгруппе трижды негативного рака – 90,1%, а также Her2-позитивного рака молочной железы – 75,0%, что, вероятно, обусловлено удовлетворительным определением низких уровней экспрессии Ki67, Her2neu и рецепторов гормонов методами ИГХ, а также проведением дополнительных методов диагностики (методы гибридизации in situ) в случаях сомнительной экспрессии рецептора эпидермального фактора роста (2+) в случаях трижды негативного РМЖ.

Таблица 8 – Сопоставление результатов типирования рака молочной железы с использованием ИГХ и ОТ-ПЦР исследований

	%	Люм А	Люм В Her2 негат	Люм В Her2 позит	Her2-поз	Трижды негативный
Люм А	65,1	75	29	4	0	0
Люм В Her2 нег	67,4	26	62	4	0	0
Люм В Her2 поз	62,1	10	12	36	0	0
Her2-поз	75	0	1	3	12	0
Тройной негативный	90,1	0	1	2	2	49
Всего	71,9	111	105	49	14	49

Следует также обратить внимание, что основные ошибки связаны с дискриминацией люминальных фенотипов, процент правильной классификации колебался в пределах от 62,1 до 67,4%. Можно предположить, что полученные в данном случае низкие значения обусловлены недостаточной эффективностью и субъективизацией оценки при проведении ИГХ исследований. Полученные результаты заслуживают особого внимания в связи с тем, что данные подтипы имеют разное клиническое течение, а также объем системного лечения, что, несомненно, требует применения дополнительных современных молекулярных методов.

Анализ молекулярного фенотипа в первичном опухолевом узле и пораженных регионарных лимфатических узлах у больных раком молочной железы

Результаты морфологического и иммуногистохимического исследований операционного материала с распределением больных в зависимости от молекулярного подтипа опухоли и вовлеченных в процесс регионарных лимфатических узлов представлены в таблице 9. По результатам исследования

преобладали больные с люминальным А и Люминальным В Her2-негативным подтипами (46,8 и 23,4% соответственно).

Проведено исследование и сравнение молекулярных фенотипов основного опухолевого и пораженных регионарных лимфатических узлов, по результатам которого в 59% случаев молекулярный фенотип пораженного лимфоузла соответствовал фенотипу основной опухоли, однако в 40,6% случаев (26 из исследованных 64 лимфоузлов) молекулярный фенотип лимфоузла был отличен от первичной опухоли (таблица 10). Наиболее часто отмечались различия в Люминальных А и Люминальных В подтипах (46,8 и 23,4: соответственно).

Таблица 9 – Распределение молекулярного подтипа РМЖ в исследованных регионарных лимфатических узлах

<i>Молекулярный подтип</i>	<i>Всего (абс.ч/%)</i>
Люминальный А	30 (46,8%)
Люминальный В Her2-негативный	15 (23,4%)
Люминальный В Her2-позитивный	4 (6,3%)
Трижды негативный	11 (17,2%)
Her2-позитивный	4 (6,3%)
Всего	64 (100%)

Таблица 10 – Сравнение молекулярных фенотипов при раке молочной железы, определенных методом ПЦР в первичной опухоли и в метастатических регионарных лимфоузлах

<i>Изменение фенотипа в метастазе</i>		
Всего проанализировано	64	100%
Увеличение злокачественности	19	29,7%
Снижение злокачественности	7	10,9%
Всего измененных фенотипов	26	40,6%

Изменения фенотипов в метастатических лимфатических узлах были представлены следующими вариантами:

- Основная опухоль (Люминальный А) – метастатический лимфоузел (Люминальный В Her2-отрицательный подтип) – 23,4% (56,1% от всех измененных фенотипов лимфоузлов);
- Основная опухоль (Люминальный В Her2-отрицательный) – метастатический лимфоузел (Трижды негативный) – 4,7% (12,2% от всех измененных фенотипов лимфоузлов);
- Основная опухоль (Люминальный В Her2-отрицательный) – метастатический лимфоузел (Люминальный А) – 6,25% (14,6% от всех измененных фенотипов лимфоузлов);

- Основная опухоль (Her2-позитивный) – метастатический лимфоузел (Люминальный В Her2-позитивный) – 4,7% (12,2% от всех измененных фенотипов лимфоузлов).

Изменения молекулярного фенотипа опухоли в метастазе по сравнению с первичной опухолью по результатам ИГХ исследования наблюдались в 13 из 64 проанализированных случаев, что составило 20,3%. Изменения также касались в основном люминальных фенотипов. Первоначальный Люминальный А фенотип изменился на Люминальный В в 7 случаях (53,8% от всех измененных фенотипов лимфоузлов), Люминальный В Her2-негативный на Люминальный А в 4 случаях (30,8% от всех измененных фенотипов лимфоузлов), в 1 случае (7,7% от всех измененных фенотипов лимфоузлов) Люминальный В Her2-негативный изменился на Люминальный В Her2-позитивный подтип и в 1 случае Люминальный А изменился на трижды негативный рак фенотип (7,7% от всех измененных фенотипов лимфоузлов). Проведенный анализ показал, что увеличение злокачественности при использовании метода ИГХ составило 12,5% от всех исследованных опухолей.

Таким образом, выполненные молекулярно-генетические исследования фенотипа продемонстрировали высокий процент расхождения между молекулярными характеристиками основного опухолевого узла и регионарных лимфатических узлов – 41%, тогда как при сравнении этих же показателей методом ИГХ наблюдалось изменение только в 20,3% случаев.

Если в 11% случаев, когда изменение фенотипа на основании молекулярно-генетического исследования происходит в сторону уменьшения злокачественности, отсутствие данных о молекулярном подтипе метастаза в лимфоузлы может не оказывать существенного влияния на выбор тактики лечения, то в 28%, когда метастатический узел имеет более высокую степень злокачественности, пациенты могут получать недостаточное лечение, а отсутствие данных о молекулярном фенотипе пораженных лимфоузлов может являться критическим фактором.

Полученные результаты свидетельствует о необходимости выполнения дополнительных исследований молекулярного фенотипа в метастазах с привлечение молекулярно-генетических методов для оптимизации системного лечения у больных раком молочной железы.

Выводы

1. При низких показателях экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона (менее 4 баллов) и рецептора эпидермального фактора роста Her2/neu (значения 0 и 1+), определяемых иммуногистохимическим методом, целесообразно проведение дополнительных исследований количественными молекулярно-генетическими методами для снижения частоты ложно отрицательных результатов у больных раком молочной железы при определении молекулярного подтипа
2. Дифференцирование Люминальных А и В подтипов рака молочной железы на основании оценки уровня экспрессии Ki67 методом ИГХ вносит основные ошибки в определении истинного молекулярного фенотипа, что требует внедрения дополнительных молекулярно-генетических методов оценки на основании анализа экспрессионных профилей опухоли.
3. Сопоставление результатов типирования рака молочной железы, определяемых данными иммуногистохимического и ОТ-ПЦР исследований (совпадение в 71,9%) диктует необходимость совокупного учета параметров для повышения информативности и точности распределения злокачественных опухолей на подтипы.
4. Анализ молекулярного фенотипа ткани первичной опухоли и метастазах опухоли в регионарные лимфатические узлы, определяемого путем изучения профиля экспрессии комплекса генов методом количественного ПЦР, выявил несоответствие в 40,6% случаев, что может служить основанием для рекомендации проведения такого исследования для планирования более эффективного системного лечения больных раком молочной железы.

Практические рекомендации

1. Пациентам раком молочной железы для более точной оценки рецепторного статуса опухоли (рецепторов стероидных гормонов и эпидермального фактора роста Her2/neu), а также маркера клеточной пролиферации Ki67 необходимо сочетание стандартного иммуногистохимического исследования с анализом генной экспрессии, определяемой методом ОТ-ПЦР.
2. Больным раком молочной железы для оптимального распределения опухолей на подтипы целесообразно сочетание стандартного иммуногистохимического анализа с изучением экспрессионных панелей, например панели, используемой в данном исследовании и состоящей из 24 генов, определяемых методом ОТ-ПЦР.
3. Для назначения адекватной тактики системного лечения у больных раком молочной железы целесообразно изучение молекулярно-генетических характеристик первичного опухолевого узла и пораженных регионарных лимфатических узлов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Сравнение иммуногистохимического и ПЦР метода определения уровня экспрессии Ki67 в ткани рака молочной железы / В.В. Кометова, В.К. Боженко, С.Г. Варданян, Т.М. Кулинич, В.В. Родионов, Е.А. Кудинова // Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России. – 2018. – Т. 18, №3. – С. 52 – 68.
2. Возможности типирования рака молочной железы с использованием методики ОТ-ПЦР / И.Д. Троценко, Е.А. Кудинова, С.Г. Варданян, М.В. Захаренко, В.А. Солодкий, М.В. Макарова // Сибирский онкологический журнал. – 2019. – Т. 18, №5. – С. 61 – 67.
3. Сопоставительный анализ молекулярно-генетических характеристик первичного опухолевого очага и метастатических лимфатических узлов при раке молочной железы / И.Д. Троценко, Е.А. Кудинова, С.Г. Варданян, М.В. Захаренко, В.А. Солодкий, М.В. Макарова // Сибирский научный медицинский журнал. – 2019. – Т. 39, №5. – С. 68 – 75.

Список сокращений и условных обозначений

ИГХ	–	иммуногистохимическое исследование
ОТ-ПЦР	–	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
РМЖ	–	рак молочной железы
РП	–	рецепторы прогестерона
РЭ	–	рецепторы эстрогенов
BIRC5	–	Vaculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing (бакуловирусный ингибитор ответа апоптозных повторов сурвивин) 5 5
BCL2	–	B-cell lymphoma 2 (ген В-клеточной лимфомы 2)
BAG1	–	BCL2-Associated Athanogene (BCL2-ассоциированный анатоген)
CCNB1	–	cyclin B1 (циклин B1)
CCND1	–	cyclinD1 (циклинD1)
CTSL2	–	Cathepsin L2 (ген, регулирующий активность катепсина L2)
CD68	–	Cluster of Differentiation 68 (кластер дифференцировки 68)
ESR1	–	Estrogen receptor (1 ген экспрессии рецепторов эстрогена)
GRB7	–	Growth factor receptor-bound protein 7 (ген рецептор-связанного фактора роста 7)
HER2	–	Human epidermal growth factor receptor 2 (рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2)
HMGB1	–	High-mobility group protein B1 (ген экспрессии маммоглобина)
NDRG1	–	N-Myc Downstream Regulated (N-Мус-подавляющий ген)
MKI67	–	Marker of proliferation Ki-67 (маркер клеточной пролиферации Ki-67)
MYC	–	MYC proto-oncogene (протоонкоген MYC)
MYBL2	–	Myeloblastosis oncogene-like 2 (онкоген миелобластога 2 типа)
MMP11	–	Matrix metalloproteinase 11 (ген матричной металлопептидазы 11)
P16INK4A	–	Cyclin-dependend kinase inhibitor (ген-регулятор, циклин-зависимого ингибитора киназы 4 А)
PTEN	–	phosphatase and tensin homolog (гомолог фосфатазы и тензина)
PGR	–	Progesterone receptor (ген экспрессии рецепторов прогестерона STK-15)
TERT	–	Telomerase reverse transcriptase (ген обратной транскриптазы)