

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

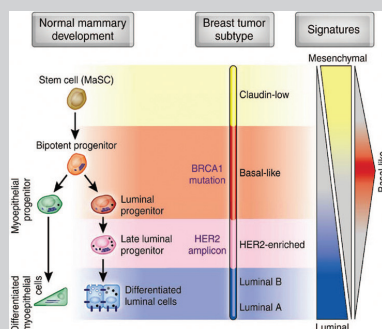
КЛИНИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТРИЖДЫ НЕГАТИВНОГО РАКА ГРУДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ



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

Адрес:

Любота Роман Викторович,
старший лаборант кафедры онкологии
Национального медицинского университета
им. А.А. Богомольца
03053, Киев, ул. Верховинная, 69
E-mail: lyubota@ukr.net
Тел. раб.: +38 (044) 450-82-32



Ключевые слова: рак грудной железы, молекулярные подтипы, трижды негативный рак грудной железы.

Рак грудной железы — гетерогенное заболевание, которое существенно различается по клиническому течению, морфологическому и молекулярному строению и требует различных подходов к диагностике и лечению. Целью настоящего исследования явилось изучение клинических и биологических особенностей трижды негативного рака грудной железы. В исследование включено 259 больных возрастом от 27 до 82 ($55 \pm 1,1$) лет, которые прошли лечение по поводу рака грудной железы в клинике кафедры онкологии Национального медицинского университета им. А.А. Богомольца в 2005 г. В настоящем исследовании получены следующие клинико-биологические особенности трижды негативного рака грудной железы: молодой возраст больных, наличие ожирения, низкая степень дифференцировки опухоли, метастатическое поражение лимфатических узлов независимо от размера опухоли в грудной железе.

ВВЕДЕНИЕ

В начале тысячелетия эмпирические представления онкологов-клиницистов о раке грудной железы (РГЖ) как гетерогенном заболевании получили конкретное морфологическое доказательство.

На основании работ предшественников Charles M. Perou и соавторы в 2000 г. предложили молекулярно-генетическую классификацию РГЖ, основанную на корреляции вариаций набора экспрессируемых генов с результатами лечения. В рамках этого исследования была прослежена зависимость между экспрессией 1753 генов и продолжительностью жизни больных РГЖ и установлено, что влияние на последнюю имеют 264 гена.

Дальнейшими работами этой группы авторов из США и Норвегии были уточнены количество подгрупп РГЖ и их характеристики, что нашло отражение в серии публикаций Therese Sorlie и соавторов (2001–2003) [5, 8, 9]. Техническая сложность и стоимость высокотехнологичных методов анализа множества фрагментов ДНК опухолевых клеток с целью идентификации того или иного генетического набора не позволяет использовать ее в повседневной клинической практике. Современная молекулярно-генетическая классификация, удобная для клинического использования, основывается на иммуногистохимическом анализе операционного материала и предусматривает выделение 4 фенотипов РГЖ табл. 1 [10, 11].

Эта классификация широко используется в последние годы для выбора адекватной тактики лечения и определе-

ния прогноза заболевания. Ее популярность связана с тем, что молекулярные подтипы отображают не только важные различия в этиологии и патогенезе РГЖ, но и особенности клинического течения и исхода заболевания.

Такие результаты иммуногистохимического анализа опухоли, как ER, PR и HER2/neu являются факторами, учитываемыми в планировании адьювантного лечения в рамках Сент-Галленского консенсуса.

Все большее количество публикаций в последние годы посвящается так называемому трижды негативному (triple negative) РГЖ (ТН РГЖ) — фенотипу, характеризующемуся отсутствием экспрессии стероидных рецепторов (эстрогенов и прогестерона) и рецепторов эпидермального фактора роста II типа (Erb-B2/EGFR-2, HER2/neu).

Данный подтип опухоли встречается у 8–20% больных РГЖ, чаще у женщин в пременопаузе [7]. ТН РГЖ развивается из базального эпителия и относится к низкодифференцированным опухолям с высоким митотическим индексом и метастатическим потенциалом; характеризуется агрессивностью течения и отсутствием молекулярных мишеней, воздействие на которые могло бы обеспечить клинический эффект терапии.

Термин «базальноподобный» (базалиоидный, basal-like) РГЖ, употреблявшийся ранее как синоним ТН РГЖ, как было показано дальнейшими исследованиями, не всегда является таковым. Только 70% ТН РГЖ являются истинно базальноподобными (БП), остальные

30% представляют собой другие фенотипические варианты. Тройной негативный фенотип могут демонстрировать и опухоли с более благоприятным прогнозом — метапластический, аденокისტозный, медуллярный рак и др. Около 5% БП РГЖ экспрессируют ER и PR, а 6–12% — HER2/neu. Если учесть определенную частоту ложноотрицательных результатов при иммуногистохимическом определении стероидных рецепторов, то следует признать, что ТН фенотип является суррогатным (и не идеальным) маркером, который может использоваться для идентификации БП РГЖ с известной долей условности. Проблема поиска более надежных маркеров БП РГЖ остается актуальной и привлекающей пристальное внимание исследователей. В качестве таковых, в дополнение к ТН фенотипу, обсуждаются рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), цитокератины (СК 5/6 и 8/18), с-KIT, NGFR, белки p63, ламинин, остеонектин, виментин и ряд других. Необходимо отметить, что свое название БП фенотип получил благодаря отличительной экспрессии цитокератинов 5/6 и 17, характерной для базального слоя эпителия кожи и выстилки дыхательных путей.

Хотя в большинстве случаев ТН/БП РГЖ имеет спорадический характер, часть этих опухолей связана с мутацией гена *BRCA1*. Около ¼ *BRCA1*-положительных РГЖ имеют БП фенотип, особенно среди молодых пациенток и женщин с наследственным анамнезом РГЖ, с опухолями, экспрессирующими мутантный *p53*. С другой стороны, в исследовании M.J. Kandel и соавторов [4], в когорте из 177 пациентов с ТН РГЖ в 11,3% случаях идентифицирована мутация *BRCA1*. Среди пациенток моложе 40 лет частота выявления мутации *BRCA1* выше и составляет 11–29% [14]. У пациенток моложе 50 лет БП фенотип опухоли повышает риск обнаружения мутации *BRCA1* в 10 раз.

Следующей разновидностью ТН РГЖ является *claudin-low* подтип, получивший название в соответствии с определяющей его особенностью — низкой экспрессией множества генов, кодирующих синтез белков семейства клаудинов (в том числе их типы) [3, 4, 7].

Клаудины были открыты в 1998 г. японскими исследователями из Киотского университета Mikio Furuse и Shoichiro Tsukita и получили свое название от латинского глагола *claudo* (замыкать, сплачивать, закрывать), как отражение их барьерной функции [3]. Описано по меньшей мере 24 белка этого семейства, являющихся молекулами межклеточной адгезии и принимающих участие (наряду с E-кадгеринами) в тесных межклеточных взаимодействиях. Кроме того, в указанных опухолях наблюдается также низкая экспрессия Eгб-B2, ESR1, что с учетом

незначительного числа мишеней для медикаментозного воздействия, подразумевает и низкий ответ на терапию [13].

Стремительно увеличивающееся количество работ, посвященных молекулярной биологии РГЖ, настоятельно требовало упорядочения накопленных данных в более-менее стройную патогенетическую схему. Обоснованным представляется соотношение молекулярных подтипов с этапами дифференцировки эпителиальных клеток грудной железы (рисунок) [6]. Так, опухоли *claudin-low* подтипа являются наименее дифференцированными, имеющими черты сходства со стволовыми клетками грудной железы. Клетки следующего этапа дифференцировки — предшественники люминальных эпителиальных клеток — могут быть источником БП РГЖ. Мутации *BRCA1* могут блокировать последующую дифференцировку и приводить к задержке клеток на этом этапе. Люминальные же подтипы происходят из эпителиоцитов наиболее высокой степени дифференцировки.

Целью настоящего исследования явилось изучение клинических и биологических особенностей ТН РГЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациенты

В исследование включено 259 больных возрастом от 27 до 82 (55±1,1) лет, которые проходили лечение в соответствии с клиническими протоколами лечения РГЖ в клинике кафедры онкологии Национального медицинского университета им. А.А. Богомольца на базе Киевского городского клинического онкологического центра в 2005 г.

У всех больных оценивали следующие данные: стадию заболевания, возраст на момент постановки диагноза, ИМТ, размер, гистологический тип и степень дифференцировки опухоли, а также наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах.

Размер опухоли оценивали после измерения ее максимального диаметра и классифицировали как Т1 (<2 см), Т2 (2–5 см),

или Т3 (≥5 см). Индекс массы тела (ИМТ) рассчитывали по формуле:

$$I = m/h^2,$$

где: *m* — масса тела в килограммах, *h* — рост в метрах.

Согласно этим подсчетам больных распределили в соответствии с критериями ВОЗ: <25 — нормальная или дефицит массы тела; от 25 до 29,9 — избыточная масса тела; ≥30 — ожирение.

Исследование рецепторного статуса

Материал для патогистологического исследования был получен во время оперативного вмешательства. Приготовление препаратов осуществляли по методике, описанной в наших предыдущих публикациях [2]. Интерпретацию результатов иммуногистохимической реакции проводили с использованием качественной оценки ядерной реакции — отрицательная «-», слабо положительная «+», умеренно положительная «++», сильно положительная «+++» — и количественной системы оценки реакций в процентах окрашенных опухолевых клеток.

При оценке экспрессии Her-2/neu отмечали выраженность окрашивания цитоплазматической базальной мембраны: реакция «-», «+» — отсутствие гиперэкспрессии, реакция «+++» — гиперэкспрессия Her-2/neu. Оценку гиперэкспрессии Her2/neu в случаях реакции «++» проводили с помощью метода гибридизации *in situ* при использовании флуоресцентной метки FISH (флуоресцентная *in situ* гибридизация). Исследования проводили в патогистологической лаборатории Киевского городского клинического онкологического центра (зав. лабораторией — д-р мед. наук Захарцева).

Статистический анализ

Для оценки результатов исследования использовали программу MS Excel. После проверки данных на нормальность распределения использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и анализ таблиц сопряженности вида 2×К. Различия между сравниваемыми группами считались достоверными при уровне значимости (p) меньше 0,05 [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Всех больных разделили на 2 группы: ТН РГЖ и НТН РГЖ. К группе ТН РГЖ отнесли 54 пациентки с ТН РГЖ, а в группу НТН РГЖ — 205 больных с другими молекулярными подтипами РГЖ (не трижды негативный).

Распределение больных в зависимости от стадии заболевания представлено в табл. 2.

Различия между исследуемыми группами статистически не достоверны, что свидетельствует в пользу равномерного распределения больных по стадии заболевания.

В табл. 3 представлены результаты распределения больных в зависимости от молекулярного подтипа РГЖ и ИМТ.

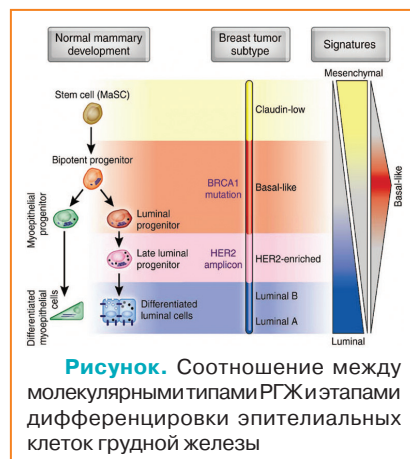


Рисунок. Соотношение между молекулярными типами РГЖ и этапами дифференцировки эпителиальных клеток грудной железы

Таблица 1 Иммуногистохимический фенотип молекулярных подтипов РГЖ

Молекулярный фенотип	Иммуногистохимический портрет					Встречаемость
	ER*	PR*	HER2/neu*	CK 5/6*	EGFR*	
Luminal A	+	+	-	-	-	56–61%
Luminal B	+	+	+	-	-	9–16%
Her2-positive	-	-	+	-	-	8–16%
Basal-like (Triple negative)	-	-	-	+	+	8–20%

*ER – рецепторы к эстрогенам; PR – рецепторы к прогестерону; HER2/neu – рецепторы эпидермального фактора роста II типа; CK – цитокератин; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста.

Таблица 2 Распределение больных в зависимости от стадии РГЖ

Группы обследованных	Стадия заболевания					Всего
	I стадия (T1N0M0)	IIA стадия (TisN1M0, T1N1M0, T2N0M0)	IIБ стадия (T2N1M0, T3N0M0)	IIIA стадия (TisN2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0, T3N2M0)	IIБ стадия (T4N0M0, T4N1M0, T4N2M0)	
ТН РГЖ	12 22%	25 46%	15 28%	1 2%	1 2%	54 100%
НТН РГЖ	60 29%	70 34%	65 32%	6 3%	4 2%	205 100%

Таблица 3 Разделение больных в зависимости от молекулярного подтипа первичной опухоли и ИМТ

ИМТ (кг/м ²)	Молекулярный подтип РГЖ				Всего
	Luminal A (ER+, PR+, Her2/neu-)	Luminal B (ER+, PR+, Her2/neu+)	Her2-positive (ER-, PR-, Her2/neu+)	Triple negative (ER-, PR-, Her2/neu-)	
До 25	52 67%	11 14%	6 7,50%	9 11,50%	78 100%
25–29,99	63 68%	7 7,50%	4 4%	19 20,50%	93 100%
Более 30	51 58%	7 8%	4 4,50%	26 29,50%	88 100%
Всего	166 64%	25 9,50%	14 5,50%	54 21%	259 100%

Таблица 4 Однофакторный анализ клинико-биологических особенностей РГЖ

Клинико-биологические факторы	ТН РГЖ		НТН РГЖ		p
	n	%	n	%	
Возраст на момент постановки диагноза					
До 50 лет	23	42,5	54	26	<0,05
50–69 лет	26	48	121	59	
70 и более лет	5	9,5	30	15	
Индекс массы тела (кг/м²)					
Менее 25	9	17	69	34	<0,05
25–29,99	19	35	74	36	
Более 30	26	48	62	30	
Размер опухоли					
До 2 см	23	42,5	84	41	>0,05
2–5 см	29	54	113	55	
Более 5 см	2	3,5	8	4	
Степень дифференцировки опухоли					
G1	4	7,5	10	5	<0,01
G2	23	42,5	160	78	
G3, G4	27	50	35	17	
Статус регионарных лимфоузлов					
Метастазы в лимфоузлах отсутствуют	28	52	109	53	>0,05
Метастазы в лимфоузлах	26	48	96	47	
Гистологический тип опухоли					
Протоковый	34	63	145	71	>0,05
Дольковый	9	17	42	20	
Смешанный (дольковый/протоковый)	4	7	11	5,5	
Другие*	7	13	7	3,5	

*слизистая, медуллярная и папиллярная карциномы.

Среди всех больных РГЖ у 20,5% пациенток с избыточной массой тела диагностируют ТН молекулярный подтип, а среди женщин с ожирением эта цифра достигает 29,5%.

Однофакторный анализ клинико-биологических особенностей РГЖ у исследуемых больных представлен в табл. 4.

В обеих группах размер и морфологический тип опухоли, а также наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах статистически достоверно не отличались. ТН молекулярный подтип РГЖ

диагностируют у женщин до 50 лет в 42,5% случаев против 26% — среди пациенток из группы НТН РГЖ. Ожирение выявлено у 48% больных ТН РГЖ и у 30% пациенток с другими молекулярными подтипами РГЖ. В группе ТН РГЖ в 50% случаев выявлена низкая (G3, G4) дифференцировка опухоли, а в группе НТН РГЖ такие опухоли встречаются только у 17% больных.

Данные о наличии метастазов в регионарных лимфоузлах в зависимости от размера опухоли представлены в табл. 5.

Таблица 5 Размер опухоли при наличии метастазов в регионарных лимфатических узлах

Размер опухоли	ТН РГЖ	НТН РГЖ	Всего
T1 (до 2 см)	11/23 48%	23/84 27%	34/107 32%
T2 (2–5 см)	14/29 48%	67/113 59%	81/142 57%
T3 (более 5 см)	1/2 50%	6/8 75%	7/9 70%
Всего	26/54 48%	96/205 47%	122/259 47%

У больных с ТН РГЖ метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов встречается в 48% случаев независимо от размера опухоли. А у пациенток из НТН РГЖ группа частота выявления метастазов в регионарных лимфоузлах прямо пропорциональна размеру опухоли.

Выводы

У больных РГЖ с избыточной массой тела и ожирением наиболее частой формой является люминальный А подтип; на долю ТН РГЖ приходится 20,5 и 29,5% от общего числа этих пациенток (второй по частоте подтип РГЖ).

Среди больных ТН РГЖ ожирение встречается на 18% чаще, чем в группе НТН РГЖ.

Статистически достоверных различий между исследуемыми группами в зависимости от стадии заболевания, размера и гистологического типа опухоли, а также наличия метастазов в регионарных лимфоузлах не получено.

Низкая степень дифференцировки опухоли (G3, G4) на 33% чаще встречается при ТН РГЖ.

Метастазы в регионарные лимфоузлы при ТН РГЖ встречаются почти у половины пациенток и не зависят от размера опухоли в грудной железе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. (2002) Статистика в науке и бизнесе. К.: МОРИОН, 195–207.
2. Щепотин И.Б., Зотов А.С., Люботя И.И., Люботя Р.В., Зайчук В.В., Захарцева Л.М. (2010) Факторы риска развития местных рецидивов инвазивного рака грудной железы. Онкология, 4(12): 347–350.
3. Furuse M., Fujita K., Hiragi T., Fujimoto K., Tsukita S. (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. J. Cell Biol., 7(141): 1539–1550.
4. Kandel M.J., Stadler Z., Masciari S. et al. (2006) Prevalence of BRCA1 mutations in triple negative breast cancer (BC). J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 24. (Abstr 508).
5. Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B. et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. Nature, 406: 747–752.
6. Prat A., Perou C.M. (2009) Mammary development meets cancer genomics. Nat Med., 15: 842–844.
7. Rouzier R., Perou C., Symmans W. et al. (2005) Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. Clin. Cancer Res., 11: 5678–85.
8. 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, 98: 10869–10874.
9. 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, 100: 8418–8423.
10. 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, 100: 10393–10398.
11. Tang P., Skinner K.A., Hicks D.G. (2009) Molecular classification of breast carcinomas by immunohistochemical analysis: are we ready? Diagn Mol Pathol., 18: 125–132.

12. Tischkowitz M., Brunet J.S., Begin L.R. et al. (2007) Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer*, 1(7): 134.

13. Voduc D., Cheang M.C., Prat A. et al. (2011) The other triple-negative breast cancer: Immunohistochemical and clinicopathologic characterization of the Claudin-low subtype. *J Clin Oncol.*, 29. (suppl; abstr 1129).

14. Young S., Pilarski R., Donenberg T. et al. (2009) The prevalence of BRCA mutations among young women with triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*, 1(9): 86–91.

Клініко-біологічні особливості тричі негативного раку грудної залози

I.B. Шепотін¹, O.C. Зотов¹, P.V. Любота¹, M.Ф. Анікусько², I.I. Любота²

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

Резюме. Рак грудної залози — гетерогенне захворювання, яке істотно розрізняється за клінічним перебігом, морфологічною та молекулярною будовою і вимагає різних підходів до діагностики та лікування. Метою цього дослідження було вивчення клінічних та біологічних особливостей тричі негативного раку грудної залози. У дослідження включено 259 хворих віком від 27 до 82 ($55 \pm 1,1$) років, які проходили лікування з приводу раку грудної залози у клініці кафедри онкології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця в 2005 р. У ході цього дослідження отримано такі клінічно-біологічні особливості тричі негативного раку грудної залози: молодий вік хворих, наявність ожиріння, низький ступінь диференціювання пухлини, метастатичне ураження лімфатичних вузлів незалежно від розміру пухлини в молочній залозі.

Ключові слова: рак грудної залози, молекулярні підтипи, тричі негативний рак грудної залози.

Clinical and biological features of triple negative breast cancer

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

¹National medical university named after A.A. Bogomolets, Kiev
²Kiev municipal clinical oncological centre, Kiev

Summary. Breast cancer — a heterogeneous disease, which differs significantly in clinical course, morphology and molecular structure, and requires a different approach to diagnosis and treatment. The purpose of this study was to investigate the clinical and biological characteristics of triple-negative breast cancer. The study included 259 patients, aged from 27 to 82 ($55 \pm 1,1$) years of age who were treated for breast cancer in clinical oncology department of the National Medical University named after A.A. Bogomolets in 2005. In the present study, the following clinical and biologic features of triple-negative breast cancer: a young patient age, obesity, poor tumor differentiation, lymph node metastases regardless of tumor size in the breast.

Key words: breast cancer, molecular subtypes, triple-negative breast cancer.