DOI: 10.26435/neoplasm.v11i2.283

И. Е. Седаков[1,2], В. Н. Смирнов[1], А. В. Мотрий[1,2], Т. Л. Скочиляс[1], Я. В. Садрицкая[1], М. О. Мотрий[1]

Многоликий рак молочной железы: от внутриопухолевой гетерогенности до изменения иммунофенотипа опухоли

1. РОЦ Республиканский онкологический центр им. проф. Г. В. Бондаря МЗ ДНР

2. ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького»

Рак молочной железы занимает лидирующие позиции в структуре онкологической заболеваемости среди женского населения. На сегодняшний день для определения тактики лечения необходимо изучение имуногистохимического (ИГХ) статуса опухоли. Однако в процессе лечения возможно изменение уровня экспрессии рецепторов опухоли. В качестве биологических причин могут выступать дрейф генов, селекция клонов клеток, гетерогенность опухоли, а также повреждение генного аппарата клетки внешними агентами: химиопрепаратами, гормонотерапией или таргетными препаратами. В связи с данным биологическим феноменом особую актуальность приобретает изучение ИГХ статуса опухоли на фоне проводимого неоадъювантного лечения для выбора эффективной персонифицированной терапии.

Ключевые слова: рак молочной железы, иммуногистохимическое исследование, гетерогенность опухоли, молекуляно-биологические подтипы, динамики иммунофенотипа.

В структуре онкозаболеваемости среди женщин рак молочной железы (РМЖ) занимает лидирующее положение. Ежегодно в мире регистрируется около 1,7 млн. новых случаев РМЖ, которые составляют социальную и медицинскую проблему в связи с высокой смертностью среди женского населения [1]. Положительный темп прироста заболеваемости раком молочной железы и смертности, связанной с данной патологией, заставляют максимально сконцентрировать внимание на решении этой проблемы.

Сложности, с которыми встречаются онкологи при планировании лечения больных РМЖ, связаны во многом с чрезвычайным многообразием клинических вариантов болезни, затрудняющим установление индивидуального прогноза и выбор метода терапии. Одна из причин указанного разнообразия кроется в гетерогенности самой микроскопической структуры РМЖ [2].

Впервые неоднородность клеток по форме и морфологии в пределах одной опухоли была описана еще Рудольфом Вирховым в XIX веке [3]. Со времен Вирхова представления о феномене внутриопухолевой гетерогенности значительно расширились.

На сегодняшний день под опухолевой гетерогенностью понимают совокупность фенотипических, генетических, эпигенетических и других характеристик, демонстрирующих меж и/или внутриопухолевые различия, и присущих отдельным клеткам или популяциям клеток [4,5]. Механизмы формирования такой неоднородности до конца не известны. Считается, что внутриопухолевое разнообразие развивается либо из-за генетических (эпигенетических) нарушений в самих опухолевых клетках, либо под влиянием опухолевого микроокружения, либо на фоне взаимодействия этих факторов [6].

Наиболее изучена внутриопухолевая гетерогенность при РМЖ. Для опухолей молочной железы описано внутриопухолевое кариотипическое разнообразие, аллельный имбаланс различной природы, а также наличие субпопуляций клеток с различной чувствительностью к терапии [7,8].

Попытки классифицировать РМЖ по клиническим признакам оказались неудачными, поскольку клинические формы заболевания, включая стадию TNM, не всегда коррелируют с отдаленными результатами лечения. Современная онкологическая практика требует не только верификации гистологического диагноза, но и обязательной оценки прогноза течения болезни и предсказания ответа на терапию.

Так, коллегия американских патологов в 1999 г. [9] разработала комплекс прогностических факторов, имеющих принципиальное значение при РМЖ, которые структурированы в три категории по степени клинической значимости и востребованности.

Категория 1: размер опухоли, статус лимфоузлов, гистологическая форма и степень дифференцировки опухоли, рецепторы к эстрогену и прогестерону, количество митотических фигур.

Категория 2: экспрессия эпидермального фактора роста, p53-онкопротеина, маркера пролиферации Ki-67 и наличие инвазии в лимфатические или кровеносные сосуды.

Категория 3: плоидность опухоли, активность ангиогенеза, экспрессия pS2-протеина, bcl-2-онкопротеина, катепсина D, EFGF.

Для ответа на этот вопрос уже недостаточно таких данных, как размеры опухолевого узла, гистологический тип опухоли, степень гистологической злокачественности. На данный момент большее количество исследований посвящено второй и третьей категориям прогностических факторов.

Большое значение в диагностике и лечении РМЖ на сегодняшний день имеют биологические маркеры, определяемые непосредственно в опухолевой ткани. Данные маркеры характеризуют индивидуальные особенности опухоли: склонность к инвазии, метастазированию, гормональную чувствительность и т.д.

В этом отношении чрезвычайно важен иммуногистохимический профиль злокачественного новообразования, его морфофункциональная характеристика [10]. Достижения методов молекулярной визуализации, в частности, прочтение и секвенирование генома с помощью техники микрочипов, позволило изучить транскрипционную активность генома раковой клетки и получить индивидуальные экспрессионные профили различных опухолей.

В 2000 г Perou использовал кластерный анализ 465 генов, которые координировались в гибридизационных пробах 8102 мРНК и образовали 5 различных молекулярных подтипов РМЖ. Последние разделились на две подгруппы с положительным статусом рецепторов эстрогенов, формирующих люминальный А и люминальный В подтипы, одну подгруппу с амплификацией гена HER/2-neu (HER/2 позитивная подгруппа) и одну подгруппу базального типа РМЖ, характеризующуюся отсутствием экспрессии рецепторов эстрогенов и второго рецептора эпидермального фактора роста при отсутствии амплификации соответствующих кодирующих генов. Еще одна подгруппа обозначена как неклассифицируемый РМЖ [11].

Это была первая молекулярно-генетическая онкологическая классификация, созданная не на основе клинико-анатомической и морфологической гетерогенности опухолевых клеток, а по признаку их молекулярно-генетической гетерогенности. Последующие анализы, проведенные с помощью геномных, транскриптомных и протеомных методов, выявили еще большую молекулярную гетерогенность РМЖ. К примеру, показана вариабельная экспрессия генов TOP2a, c-myc, CyclinD1, микроРНКв пределах опухоли.

Вся работа клинического онколога начинается с морфологического заключения о природе опухоли и ее биологических характеристиках. Уточнение молекулярно-биологических и патогенетических характеристик РМЖ позволяет ближе подойти к индивидуализации системной терапии и в ряде случаев отказаться от заведомо неэффективного, токсичного и дорогостоящего лечения [12].

Изучение рецепторного статуса клеток РМЖ давно позволило выявить существование двух основных групп опухолей этого органа — эстрогенположительных и эстрогенотрицательных, а внедрение иммуногистохимических методов диагностики позволило превратить определение рецепторов как эстрогенов, так и прогестерона в повседневную, практически доступную процедуру. Вскоре методический арсенал изучения РМЖ был расширен с включением иммуногистохимического изучения экспресии гена Her2/neu и FISH-реакции для установления статуса его амплификации. Последняя характеристика оказалась обязательной для определения показаний к назначению герцептина — моноклонального антитела, связывающего продукт гена Her2/neu на клеточной мембране опухолевых клеток. В конце 90-х гг. XX века в литературе появились сообщения о том, что РМЖ, клетки которого не экспрессируют рецепторы эстрогенов и прогестерона, а также содержат неамплифицированный ген Her2/neu, обладает четкими клиническими особенностями, и это позволило выделить новый вариант РМЖ — так называемый тройной негативный рак [13; 14].

По рекомендациям American Society of Clinical Oncology для определения опухолевых маркеров для рака молочной железы от 2007 года необходимым становится исследование уровня экспрессии эстрогеновых, прогестероновых рецепторов и Her-2/neu.

В 2009 г. была предложена упрощенная суррогатная модель молекулярно-генетической классификации РМЖ, основанная на показателях экспрессии рецепторов эстрогенов (ER), прогестерона (PR), HER2 и уровня пролиферативной активности Ki67. Согласно международным и отечественным рекомендациям в настоящее время выделено 5 биологических подтипов РМЖ: люминальный А (высокодифференцированные раки ER+PR+HER2-Ki67<20%), люминальный В HER2-негативный (низкодифференцированнные раки ER+PR±HER2-Ki67> 20%), люминальный В HER2-позитивный (ER+PR±HER2+Ki67любой), тройной негативный рак (ER-PR-HER2-Ki67любой), не люминальный HER2-позитивный (ER-PR-HER2+ Ki67любой) [15]. Используемая классификация биологических подтипов опухоли неслучайна. В многочисленных исследованиях показано различное прогностическое и предсказывающее значение иммуногистохимических характеристик опухоли при РМЖ.

Таким образом были сформированы молекулярно-биологические подтипы, принадлежность к которым, на сегодняшний день, имеет важное прогностическое значение.

РМЖ люминального А типа: частота 30–45%, эстроген-зависимые опухоли. Характерны поздний возраст на момент установления диагноза, высокая степень дифференцировки, низкий пролиферативный индекс. Опухоли этого типа менее агрессивны, характеризуются лучшим прогнозом по сравнению с рецептор-негативным раком. У таких больных существенно снижен риск рецидивов в течение первых 2 лет, выше общая выживаемость [16].

РМЖ люминального В типа: частота 14–18%, эстроген-зависимые агрессивные опухоли. Характерны ранний возраст на момент постановки диагноза, низкая степень дифференцировки, высокий пролиферативный индекс, большой размер опухоли, вовлечение лимфатических узлов. Опухоли этого типа характеризуются значительно худшим прогнозом и большей вероятностью рецидивов по сравнению с другими рецептор-позитивными опухолями [17].

РМЖ трижды негативного типа: частота 27–39%, эстроген-независимые агрессивные опухоли. Характерны ранний возраст установления диагноза, протоковый или метапластический гистологический тип, низкая степень дифференцировки, высокий пролиферативный индекс, большой размер опухоли, вовлечение лимфатических узлов. ТНРМ отличается высокой агрессивностью, большой вероятностью развития местно-распространённых и метастатических форм. Прогноз неблагоприятный независимо от поражения лимфатических узлов, выживаемость в этой группе ниже, чем при РМЖ других молекулярных подтипов, включая Her2-позитивный рак [16].

Her2-позитивный РМЖ: частота 8–15%, эстроген-независимые агрессивные опухоли с высоким пролиферативным индексом. Характерны низкая дифференцировка, больший размер опухоли, вовлечение лимфатических узлов, высокая вероятность негативного исхода заболевания [18].

На практике стандартом является однократное проведение иммуногистохимического исследования опухоли до начала лечения, определение молекулярно-биологического подтипа и выбор соответствующей тактики лечения. Однако нередко фенотип опухоли на разных стадиях ее генеза отличается. Изменение уровня экспрессии рецепторов опухоли может быть настоящим биологическим феноменом или же, к сожалению, результатом ошибочного выполнения исследований. В качестве биологических причин могут выступать дрейф генов, селекцию клонов клеток, гетерогенность опухоли, а также повреждение генного аппарата клетки внешними агентами, например, химиопрепаратами, гормонотерапией или таргетными препаратами.

На сегодняшний день феномен внутриопухолевой гетерогенности рассматривают в рамках двух теорий: опухолевой стволовой клетки (ОКС) и клональной эволюции опухоли. Гипотеза ОКС была выдвинута еще Рудольфом Вирховым в 1858 г. и расширена его приемником Юлием Конгеймом. Согласно гипотезе ОСК, опухолевый рост подобен нормальному физиологическому процессу, но инициируется генетическими нарушениями в стволовой клетке. Интересно, что недавние данные по секвенированию геномов 21 опухоли молочной железы также допускают наличие предкового клона, по характеристикам схожего с ОСК [19]. В 1976 г. Питером Новелом была предложена гипотеза клональной эволюции опухоли, которая объясняла внутриопухолевую гетерогенность генетическими повреждениями соматических клеток. Каждая из теорий, безусловно, имеет право на существование. Особенно важен тот факт, что обе теории предполагают существование клональных субпопуляций в пределах одного новообразования. На основании анализа рецепторного профиля (CD44, CD24, EpCAM) сделано допущение, что опухолевые стволовые, люминальные и базальные клетки опухоли молочной железы могут стохастически трансформироваться друг в друга согласно Марковскому случайному процессу [20].

Теорию клональной эволюции удобно рассмотреть в рамках теории эволюции Чарльза Дарвина, согласно которой наследственная изменчивость является ресурсом для образования новых клеточных субклонов, а естественный отбор — платформойдля выживания приспособленных агрессивных форм. Представление этого процесса в виде модели «эволюционного древа» Ч. Дарвина предполагает, что опухолевый рост подобен растущему дереву, от ствола которого ответвляется множество менее крупных ветвей разного размера, с которыми можно отождествить вновь образующиеся опухолевые субклоны [21]. Таким образом, гетерогенная опухоль рассматривается как динамическая экосистема, состав которой меняется при изменении микроокружения, в том числе под влиянием иммунной системы, гипоксии, терапии и т.д. Следовательно, отнесение опухоли молочной железы к определенному биологическому подтипу проводится на основе характеристик мажорного, то есть, преобладающего субклона опухоли. Применение химиотерапии приведет к уничтожению данного субклона, тем самым, открыв вакантное место для меньшей опухолевой популяции. Иначе любое терапевтическое воздействие приводило бы к уничтожению всей опухоли и полному выздоровлению организма.

К примеру, установлено, что полихимиотерапия с антрациклин-содержащими схемами оказывает наибольший эффект на низкодифференцированные клетки опухоли. Чаще всего это трижды негативный или Her2+ подтип опухоли. Соответственно после полихимиотерапии низкодифференцированный пул клеток (Эр–, Пр–) становится меньшим относительно высокодифференцированных клеток. Опухоль преимущественно становится гормонопозитивной высокодифференцированной, а значит, более чувствительной к гормонотерапии.

Важным является изучение влияния химиотерапии на экспрессию рецепторов в ткани опухоли молочной железы. Согласно одному из исследований в 30% случаев определялось минимальное изменение экспрессии Her-2/neu, а в 10% — полное изменение статуса с положительного на отрицательный [22].

В 2006 году были опубликованы данные научного поиска влияния неоадъювантной терапии на стероидные рецепторы рака. По результатам исследования изменения были выявлены в 25% срезов, из них приблизительно в 48% случаев была выявлена реверсия ER и PR с положительных на отрицательные. Такая тенденция приводила к увеличению общей выживаемости, но не влияла на безрецидивную выживаемость [23].

Г. А. Франк, руководитель Всероссийского центра контроля иммуногистохимических исследований, на наглядных примерах показал цену ошибки при оценке статуса HER2 у пациенток с РМЖ. Так, если у пациентки с люминальным типом В за счет гиперэкспрессииHer-2/neuв процессе лечения произошло полное изменение статусаHER2 с положи-

тельного на отрицательный, без иммуногистохимического мониторинга эта смена подтипа останется не выявленной, что приведет к продолжению анти-Her2-терапии трастузумабом, цена которой на год лечения в Российской Федерации составит около 400 тыс. руб. Как итог, потраченные средства ничего не добавят пациентке, кроме ненужной токсичности. В противоположность этому обратная ситуация –не выявленная смена подтипа на Her2-позитивный — приведет к ухудшению прогноза заболевания, быстрой генерализации опухолевого процесса и упущенному шансу на правильное лечение. Ведь еще с 1987 г. до внедрения анти-Her2-терапии считалось, что амплификация гена Her2 коррелирует с наиболее неблагоприятным прогнозом. Таким образом, контроль иммуногистохимического статуса опухоли в процессе лечения позволит предотвратить необоснованные финансовые траты и определить верную тактику лечения [24].

Эффективность терапии прежде всего зависит от ее правильного выбора. Только дифференцированный и персонифицированный подход к терапии РМЖ позволит достичь положительного эффекта с минимальной токсичностью. Несмотря на появление новых диагностических методик, иммуногистохимическое исследование остается простым, быстрым, удобным в применении и относительно недорогим методом исследования. Каждый новый этап развития опухоли требует повторных иммуногистохимических исследований для определения последующей верной тактики лечения в зависимости от подтипа опухоли.

Список литературы.

1. Любченко Л. Н., Батенева Е. И. Медико-генетическое консультирование и ДНК-диагностика при наследственной предрасположенности к раку молочной железы и раку яичников.— М.: ИГ РОНЦ, 2014.— 75 с.
2. Tavassoli F.A., Devilee D. Pathology and genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs.— IARC Press: Lyon, 2003.— P. 10–103
3. Virchow R. Cellular Pathology as Based upon Physiological and Pathological Histology. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1863.
4. 4.Michor, F., and Polyak, K. 2010 Cancer Prev. Res. (Phila), 3, 1361–1364.2.
5. Visvader, J.E. 2011 Nature, 469, 314–322.
6. Nassar, A., Radhakrishnan, A., Cabrero, I.A., Cotsonis, G.A., and Cohen, C. (2010) Appl. Immunohistochem. Mol.Morphol., 18, 433–441
7. Fujii, H., Marsh, C., Cairns, P., Sidransky, D., andGabrielson, E. (1996) Cancer Res., 56, 1493–1497.24.
8. Heppner, G.H., and Miller, B.E. (1983) Cancer MetastasisRev., 2, 5–23
9. Prognostic factors in Breast cancer / M.d. Fitzgibbons et al. // arch. pathol. lab. Med.— 2000.— Vol. 124.— p. 966–978.
10. Колядина, И. В. Локальные рецидивы первичнооперабельного рака молочной железы: дис. … канд. мед. наук / И. В. Колядина.— М., 2002.— С. 4–5.
11. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. ProcNatlAcadSci U S A. 2001;98:10869–74.
12. Семиглазов В. Ф. идр. Неоадьювантнаятаргетная терапия рака молочной железы // Эффективная фармакотерапия.— 2013.— № 6.— С. 12–16.
13. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry / Bauer K. R., Brown M., Cress R. D., Parise C. A., Caggiano V. // Cancer.— 2007.— Vol. 109, N9.— P. 1721–1728.
14. Nishimura R., Arima N. Is triple negative a prognostic factor in breast cancer? // Breast Cancer.— 2008.— Vol. 15, N4.— P. 303–308
15. Клинические рекомендации по профилактике, диагностике и лечению больных раком молочной железы/Ассоциация онкологов России; Коллектив авторов, ИГ РОНЦ 2014 г., стр. 1–46; www.oncology.ru.
16. Parker J. S., Mullins M., Cheang M. C. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes // J. Clin. Oncol.— 2009.— Vol. 27.— P. 1160–1167.
17. Cheang M. C., Chia S. K., Vodue D. et al. Ki67 index, Her2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer // J. Natl. Cancer. Inst.— 2009.— Vol. 101.— P. 736–750.
18. Theillet C. What do we learn from Her2-positive breast cancer genomic profiles // Breast Cancer Res.— 2010.— Vol. 12, N3.— P. 107.
19. Ng C.K., Pemberton H. N., Reis-Filho J. S. Breast cancer intratumor genetic heterogeneity: causes and implications.Expert Rev Anticancer Ther. 2012 Aug;12(8):1021–1032. doi: 10.1586/era.12.85.
20. Denison TA, Bae YH (2012) Tumor heterogeneity and its implication for drug delivery. J Control Release 164:187–191
21. Fisher R., Pusztai L., and Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics.Br J Cancer. 2013 Feb 19; 108(3): 479–485.
22. Skalova H., Dundr P., Povysil C. Changes in HER2 status after neoadjuvant treatment of breast cancer / 2011 ASCO Annual Meeting // J ClinOncol, 2011.— Vol. 29.— Abstr 11110.
23. Tacca O., Penault-Llorca F., Abrial C. Neoadjuvant chemotherapy (NCT) in 710 patients for operable breast cancer: Variation changing in hormonal receptors (HR) status / 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings // Journal of Clinical Oncology, 2006.— Part I. Vol. 24, No. 18S (June 20 Supplement).— P. 673.
24. И.В. Колядина, Г. А. Франк, И. В. Поддубная, Ю. Ю. Андреева, Л. Э. Завалишина. Контроль качества иммуногистохимических исследований в России: вчера, сегодня, завтра… Современная онкология, 2017г, № 4 том 20.

I.E. Sedakov [1,2], V.N. Smirnov [1], A.V. Motrii[1,2], T.L. Skochilyas [1], Ya.V. Sadritskaya [1], M.O. Motrii [1]

Many-sided breast cancer: from intratumoral heterogeneity to changes in the immunophenotype of the tumor

1 G.V. Bondar Republican Cancer Centre.

2. M. Gorky Donetsk National Medical University.

Breast cancer occupies a leading position in the structure of cancer incidence among the female population. To date, to determine the tactics of treatment, it is necessary to study the immunohistochemical (IHC) of tumor status. However, in the course of treatment, the expression level of tumor receptors may change. Biological causes may include gene drift, selection of cell clones, tumor heterogeneity, and damage to the cell's genetic apparatus by external agents: chemotherapy drugs, hormone therapy, or targeted drugs. In connection with this biological phenomenon, the study of the IHC of tumor status against the background of neoadjuvant treatment to select an effective personalized therapy is of particular relevance.

Key words: breast cancer, immunohistochemical research, tumor heterogeneity, molecular biological subtypes, immunophenotype dynamics.