

Використання маркера проліферативної активності Ki-67 для аналізу ефективності комплексного лікування хворих з місцево-розповсюдженим раком молочної залози

Ю. В. Думанський¹, О. В. Бондар², О. І. Ткаченко², Є. А. Столярчук³, В. Ю. Єрмаков³

¹Донецький національний медичний університет,

²Одеський національний медичний університет,

³Центр реконструктивної та відновної медицини «Університетська клініка», м. Одеса

Application of marker of proliferative activity Ki-67 for analysis of efficacy in complex treatment of patients, suffering locally-spread mammary gland cancer

Yu. V. Dumanskiy¹, O. V. Bondar², O. I. Tkachenko², E. A. Stoliarchuk³, V. Yu. Ermakov³

¹Donetsk National Medical University,

²Odessa National Medical University,

³Centre of Reconstructive and Restoration Medicine «The University Clinic», Odessa

Реферат

Мета. Використання маркера проліферативної активності Ki-67 для аналізу результатів неoad'ювантної поліхіміотерапії з використанням регіонарних або системних шляхів доставки фармакологічних засобів у хворих з місцево-розповсюдженим раком молочної залози (МР РМЗ).

Матеріали і методи. Ретроспективний аналіз даних 90 пацієток з МР РМЗ, які отримували спеціалізоване комплексне лікування на основі регіонарних та системних шляхів введення препаратів.

Результати. Динаміка проліферативної активності МР РМЗ в результаті неoad'ювантної поліхіміотерапії, про яку судили на основі індексу Ki-67, продемонструвала статистично значущу перевагу на користь регіонарних шляхів введення препаратів порівняно з системними. Детальним дослідженням виявлено кореляцію метастатичного потенціалу пухлини з рівнем Ki-67.

Висновки. За рівнем Ki-67 можна оцінювати проліферативну активність пухлини і в такий спосіб прогнозувати ефект неoad'ювантної поліхіміотерапії та обирати оптимальну тактику комплексного лікування.

Ключові слова: маркер проліферативної активності Ki-67; селективна внутрішньоартеріальна поліхіміотерапія; ендолімфальна поліхіміотерапія; системна поліхіміотерапія; місцево-розповсюджений рак молочної залози.

Abstract

Objective. Application of the proliferative activity marker Ki-67 for analysis of the results of neoadjuvant polychemotherapy, using regional or systemic ways of delivery of pharmacological preparations, for the patients, suffering locally spread mammary gland cancer (LS MGC).

Materials and methods. Retrospective analysis of the data, concerning 90 women-patients, suffering LS MGC, who obtained complex treatment, based on regional and systemic ways of the preparations administration.

Results. Dynamics of proliferative activity of a LS MGC as a result of neoadjuvant polychemotherapy, analyzed by the Ki-67 level determination, have demonstrated a statistically significant advantage of regional ways of the preparation injection, comparing with systemic ways of administration. Correlation of tumoral metastatic potential with level of Ki-67 was revealed, using detailed investigation.

Conclusion. It is possible to estimate tumoral proliferative activity and the neoadjuvant polychemotherapy efficacy, using Ki-67 analysis, and in such a way to select the optimal tactics of complex treatment.

Keywords: marker of proliferative activity Ki-67; selective intraarterial polychemotherapy; endolymphatic polychemotherapy; systemic polychemotherapy; locally-spread mammary gland cancer.

За останні роки рак молочної залози (РМЗ) увійшов до числа найбільш поширених типів раку і став однією з ключових причин смертності і захворюваності серед жінок у розвинених країнах. Епідеміологічний стан захворювання, широкий діапазон наявної діагностичної та терапевтичної інформації пояснюють підвищений інтерес вчених та громадських активістів у сфері охорони здоров'я до питань діагностики та оцінки якості лікування цієї патології [1].

Етіологічна модель РМЗ ґрунтується на класичній ідеї впливу специфічного для кожної хвороби набору екзогенних та ендогенних факторів із сильним зміщенням акценту на генотипову складову, залишаючи тригерну роль екзогенним факторам. Епідеміологічним розподілом сприятливих факторів визначається область підвищеного ризику в західних країнах, що сильно пов'язано з культурними та соціальними характеристиками організації життя і планування сім'ї серед населення розвинених країн.

Медико–економічна доцільність створює передумови для розроблення та впровадження оптимальної лікувальної тактики. Беручи до уваги фізіологічні та морфологічні особливості цільової області, актуальним є розроблення таргетних протипухлинних методів, зокрема, фізичної векторизації хіміотерапевтичного впливу на вогнище місцево–розповсюдженого раку молочної залози (МР РМЗ). У даний час кінцеві цілі поліхіміотерапії (ПХТ) у пацієнтів з МР РМЗ, патогенетичні точки терапевтичного застосування, склад панелі діючих речовин та їх дозування є предметом обговорення [2, 3].

Селективна внутрішньоартеріальна поліхіміотерапія (СВАПХТ) – один із сучасних методів впливу на перебіг онкологічного процесу.

Схематично суть СВАПХТ полягає у штучному інвазивному контрольованому короткочасному збільшенні пікової концентрації діючих речовин у регіонарній мікроциркуляції шляхом насичення аферентного русла активними молекулами [4]. Цю стратегію реалізують шляхом катетеризації внутрішньої грудної артерії на стороні локалізації пухлини, що супроводжується ізольованою потенційованою перфузією ураженої ділянки хіміотерапевтичними препаратами [5, 6]. Метою є досягнення загальних результатів для всіх таргетних методів: підвищення місцевого впливу і зниження системної токсичної реакції використуваних протипухлинних препаратів.

У контексті первинно неоперабельних форм МР РМЗ на етапі планування лікування важливо розглядати ключову проблему потенційної ефективності запропонованого способу і прогнозувати чутливість пухлини до неoad'ювантного лікування, щоб вибрати метод і шлях уведення хіміотерапевтичних препаратів. Зручним і надійним способом розрахунку майбутнього результату є індекс проліферативної активності пухлинних клітин як непряма характеристика ступеня чутливості до штучного пошкодження. Перспективним вирішенням цього питання є використання імуногістохімічних індикаторів, які корелюють з цитоморфологічними характеристиками клітинної проліферації. Одним із таких індикаторів є маркер Ki–67 [7].

У довгостроковій перспективі вивчення різноманітної панелі та складу конкретних біомаркерів РМЗ дасть змогу здійснити комплексний розрахунок індексу проліферативної активності пухлини, щоб більш точно оцінювати її поточний стан і передбачати ефективність запланованого лікування.

Мета дослідження: визначення ролі імуногістохімічного індикатора Ki–67 для оцінки якості неoad'ювантної ПХТ з використанням регіонарних і системних шляхів доставки фармакологічних препаратів у пацієнок з МР РМЗ та референтного діапазону зазначеного біомаркера, а також розроблення адекватної тактики комплексного передопераційного протипухлинного лікування.

Матеріали і методи дослідження

Дане дослідження базується на ретроспективному аналізі даних 90 карток стаціонарних хворих з МР РМЗ кла-

су Т4а–_DN0–2M0, які отримували спеціалізоване комплексне неoad'ювантне лікування в хірургічних відділеннях Донецького обласного онкологічного центру та Університетської клініки Одеського національного медичного університету з 2012 по 2016 р. Перед включенням пацієнок до протоколу дослідження були отримані їх особисті письмові добровільні згоди на участь у дослідженні відповідно до Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації (протокол №117А засідання Комісії з біоетики Одеського національного медичного університету від 12.05.2017 р.).

Загальна вибірка сформована та стандартизована за віковими та клінічними показниками. Вік хворих коливався в діапазоні від 37 до 76 років та в середньому становив $(47 \pm 6,5)$ року. Усі пацієнтки були всебічно дообстежені щодо органів і систем у повному обсязі, за необхідності консультовані суміжними спеціалістами, адекватно компенсовані за супутніми захворюваннями для проведення багатоетапного процесу спеціалізованого лікування. Індивідуальна програма лікування, яку формували консилиумом за участі хірургів–онкологів, фахівців з хіміотерапевтичного та радіотерапевтичного лікування, базувалася на даних спіральної комп'ютерної та магнітно–резонансної томографії, цифрової мамографії, ультразвукового дослідження молочних залоз, результатах мікроморфологічного та імуногістохімічного дослідження біопсійного матеріалу.

У всіх пацієнок імуногістохімічне дослідження Ki–67 у зразках пухлин проводили паралельно як із рутинними лабораторними та інструментальними дослідженнями, так і з морфологічним дослідженням біопсійних зразків. Проліферативну активність визначали шляхом імуногістохімічного дослідження за допомогою антитіл до Ki–67 (Thermo Fisher Scientific, США). Як мінімальну кількість проліферуючих клітин для оцінки було обрано фракцію 1000 пухлинних клітин, що є мінімальним числом для отримання репрезентативних результатів. Значення Ki–67 виражали як відсоткову частку клітин з позитивним забарвленням. Більшість пацієнтів в усіх групах (60%) мали значення Ki–67 у діапазоні 20 – 30% з медіаною 25%. Таким чином, одна частина хворих мала значення Ki–67 менше 25%, інша – більше 25%. Відповідно до рекомендацій Санкт–Галенського консенсусу встановлювали граничне значення Ki–67 у межах від 15 до 30%. Ми застосували до результатів нашого дослідження дихотомічний поділ і визначили граничне значення Ki–67 25%.

Відповідно до методу доставки хіміопрепаратів до пухлинного осередку в ході неoad'ювантної ПХТ всі пацієнтки були розподілені на три групи. До 1–ї групи включили 22 (24%) пацієнтки з МР РМЗ, для яких як передопераційний курс ПХТ була обрана внутрішньовенна системна поліхіміотерапія (СПХТ): 3 – 4 курси за схемами CAF, CMF або CAMF у дозуванні відповідно до протоколів BSA (body surface area). До 2–ї групи включили 27 (30%) пацієнок, яким з метою зменшення пухлини до розмірів, за яких можливе радикальне хірургічне лікування, прове-

дена ендолімфальна поліхіміотерапія (ЕЛПХТ): 3 – 4 курси за схемами CAF, CMF або CAMF у дозуванні відповідно до протоколів BSA (з внутрішньовенним призначенням доксорубіцину). У 3-й групі 41 (46%) пацієнтка отримала відповідну кількість курсів регіонарної ПХТ шляхом СВАПХТ: 3 – 4 курси за схемами CAF, CMF або CAMF у дозуванні відповідно до протоколів BSA (з внутрішньовенним призначенням доксорубіцину).

Для статистичного аналізу даних використовували статистику динамічних рядів. Для оцінки значущості змін показників застосовували непараметричний тест χ^2 Пірсона.

Результати

У 1-й групі до проведення ПХТ референтні значення Ki-67 становили менше 25% у 12 (55%) пацієнток за середнього значення ($M \pm m$), що дорівнювало ($20,4 \pm 3,7$); більше 25% у 10 (45%) пацієнток, середнє значення дорівнювало ($34,0 \pm 6,8$). У результаті проведення неoad'ювантної СПХТ число пацієнток з низьким рівнем Ki-67 збільшилося до 14, або на 17%, за загального зниження середнього значення показника до ($19,6 \pm 2,2$)% ($p > 0,05$). У пацієнток з високим рівнем Ki-67 його середнє значення становило ($31,6 \pm 6,3$)% ($p > 0,05$).

У 2-й групі до проведення ПХТ рівень Ki-67 у гістологічних зразках менше 25% був у 16 (59%) пацієнток, а середнє значення показника дорівнювало ($19,9 \pm 3,1$); більше 25% – у 11 (41%) пацієнток за його середнього значення ($35,5 \pm 6,9$)%. Після проведення запланованого курсу неoad'ювантної ЕЛПХТ число пацієнток з високим рівнем Ki-67 зменшилося до 9, а середнє значення показника – до ($31,4 \pm 4,3$)% ($p > 0,05$). Отже, середнє значення досліджуваного маркера проліферативної активності становило ($18,2 \pm 2,2$)% ($p > 0,05$) у 18 хворих цієї групи.

У 3-й групі до проведення ПХТ значення Ki-67 у зразках біопсійного матеріалу менше 25% були у 26 (63%) пацієнток, у яких середнє значення показника дорівнювало ($19,8 \pm 2,4$); більше 25% – у 15 (37%) пацієнток, середнє значення показника становило ($34,2 \pm 5,8$)%. У результаті проведення неoad'ювантної СВАПХТ пацієнток з низь-

ким рівнем Ki-67 стало на 5 більше, або на 20%, зі зниженням середнього значення маркера проліферативної активності Ki-67 до ($8,3 \pm 1,3$)% ($p < 0,05$). У пацієнток з високим рівнем Ki-67 його середнє значення становило ($32,5 \pm 4,5$)% ($p > 0,05$) (див. рисунок).

Застосовавши непараметричний тест χ^2 Пірсона, ми визначили статистично значущу перевагу результатів лікування пацієнток 3-ї групи за динамікою зниження середнього значення Ki-67 у пацієнток з його низьким рівнем у порівнянні з результатами лікування пацієнток 1-ї ($\chi^2 = 5,181$, $p = 0,023$ з критичними значеннями 3,841 і 0,05 відповідно) та 2-ї ($\chi^2 = 4,421$, $p = 0,036$ з критичними значеннями 3,841 і 0,05 відповідно) груп.

Середня тривалість життя пацієнток 1-ї групи становила ($2,6 \pm 0,4$) року, трирічна виживаність – 41% (9 пацієнток). У 12 (55%) пацієнток було досягнуто статусу можливого радикального оперативного лікування. Віддалені метастази в період 36 міс після оперативного лікування виявлені у 4 (18%) хворих.

Середня тривалість життя пацієнток 2-ї групи становила ($2,9 \pm 0,2$) року, а 15 (56%) пацієнток цієї групи пережили трирічний післяопераційний період. У 7 (26%) хворих статус пухлини було визначено як резектабельний. Протягом трирічного періоду після оперативного лікування метастазування спостерігали у 6 (22%) пацієнток.

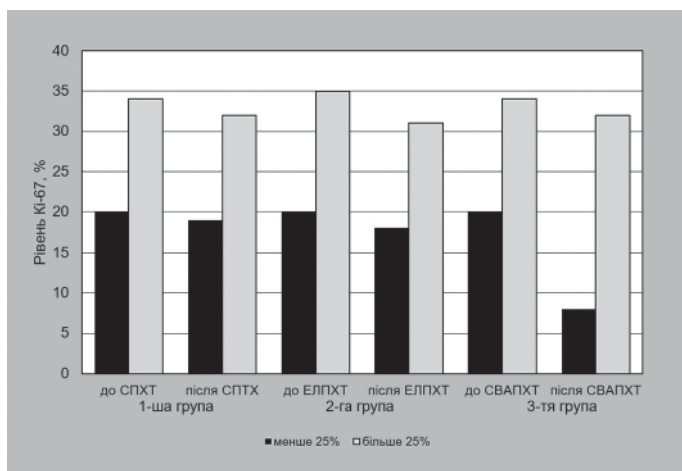
Середня тривалість життя пацієнток 3-ї групи становила ($3,8 \pm 0,1$) року, трирічна виживаність – 66% (27 хворих). У 26 (63%) хворих стало можливим виконання оперативного втручання в радикальному обсязі. У період 36 міс після оперативного лікування у 2 (5%) пацієнток спостерігали віддалені метастази.

Виявлено чіткий кореляційний зв'язок між метастатичним потенціалом пухлини і рівнем Ki-67 ($p = 0,002$).

Обговорення

Відомо, що більшість онкологічних патологій ініціюється або через екзогенне й ендогенне пошкодження структури дезоксирибонуклеїнової кислоти, або через пошкодження репараційної системи з подальшим утворенням і накопиченням негативних мутацій у ключових генах, що призводить до набуття функцій та морфологічних особливостей автономного росту [6]. Подальшу біологічну поведінку кожної майбутньої пухлини (швидкість росту, ризик метастазування, а також клінічний перебіг і наслідки захворювання) визначають якісні і кількісні зміни в генетичному апараті. Незалежною цілісною характеристикою утвореного фенотипу пухлини є її проліферативна активність, важлива особливість – вона чітко корелює зі ступенем злоякісності новоутворення. Таким чином, цей показник має два важливих клінічних значення: прогностичне (визначає клінічний перебіг захворювання та метастатичний ризик) і описове (непряма характеристика поточного стану пухлини та її зміни у відповідь на лікування) [7].

Відомі різні підходи до оцінки проліферативної активності пухлини: оптична мікроскопія, електронна мі-



Порівняння груп хворих до і після ПХТ, проведеної різними методами, за рівнем Ki-67.

кроскопія та імуногістохімічні методи: прямий (використання мічених нуклеотидів) і непрямий (визначення специфічних антигенів).

Завданням нашого дослідження є вдосконалення методу оцінки ефективності лікування хворих з МР РМЗ шляхом вивчення проліферативної активності пухлинних клітин за допомогою лабораторно діагностованого антигену Ki-67, визначення його референтних значень. Це дає змогу прогнозувати чутливість новоутворення до неoad'ювантної ПХТ та, на нашу думку, адекватно визначати тактику лікування таких хворих.

Ядерний антиген Ki-67, вперше описаний J. Gerdes і співавторами [8], є димерною молекулою, що складається з двох поліпептидних ланцюгів із загальною молекулярною масою 358 694 Da і довжиною 3256 амінокислот, кодованих геном MKi-67, розташованим у людини на короткому плечі 10-ї хромосоми.

Під час інтерфази білок визначається виключно в нуклеотидному матриксі (НМ), пов'язаному з хромосомами. В активних фазах клітинного циклу (G1, S, G2 і M) відбувається дисоціація НМ і нуклеїнових кислот, експресія білка і його вміст в цитоплазмі зростають, особливо коли клітина прогресує через синтетичну стадію; у фазі G0 відбувається їх зменшення. Функція Ki-67 остаточно невідома, але визнається його чіткий зв'язок з проліферативною активністю клітин. Отже, Ki-67 є надійним маркером інтенсивності клітинного поділу [9].

Індекс проліферативної активності має різні референтні значення для різних сценаріїв онкологічної патології. На підставі імуногістохімічного діагностичного тесту на виявлення РМЗ виділяють такі типи пухлин: низькоагресивна – рівень Ki-67 менше 25%, агресивна – більше 25%, високоагресивна – більше 50% [10].

За оцінкою динаміки рівня Ki-67 СВАПХТ є більш ефективним методом неoad'ювантного лікування хворих з первинними неоперабельними формами РМЗ і має кращі результати з точки зору інгібування та реверсії прогресування росту пухлини порівняно з системним підходом. За отриманими результатами дослідження автори пропонують проводити аналіз регресії проліферативної активності пухлини на підставі змін рівня Ki-67 для визначення ефективності проведеного лікування. Даний спосіб може бути ефективно використаний для оцінки біологічних властивостей пухлини, прогнозування перебігу захворювання (сприятливого або несприятливого) і вибору оптимальної тактики неoad'ювантної ПХТ (регіонарної або системної) в рамках комплексного проти-пухлинного лікування.

Висновки

1. Ki-67 є перспективним маркером для оцінки проліферативної активності пухлини у разі розроблення спеціалізованих онкологічних програм з урахуванням індивідуальних особливостей організму пацієнтки та біохімічного профілю пухлини, щоб уникнути неефективних уніфікованих методів лікування на основі емпіричного підходу.

2. За референтних значень рівня Ki-67 менше 25% СВАПХТ є більш ефективним методом неoad'ювантного лікування пацієнток з МР РМЗ і має кращі результати інгібування і реверсії прогресування росту пухлини.

Підтвердження

Фінансування. Власним коштом.

Внесок кожного автора. Думанський Ю. В. – концепція і дизайн дослідження; Бондар О. В. – збір та опрацювання матеріалів; Ткаченко О. І. – аналіз опрацьованих результатів; Столярчук Є. А., Єрмаков В. Ю. – написання тексту.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Згода на публікацію. Всі автори дали згоду на публікацію цього рукопису.

References

1. Yamauchi H, Woodward WA, ValeroV, Alvarez RH, Lucci A, Buchholz TA, et al. Inflammatory Breast Cancer: What We Know and What We Need to Learn. *Oncologist*. 2012;17(7):891–9. doi: 10.1634/theoncologist.2012–0039.
2. Wirtz HS, Buist DSM, Gralow JR, Barlow WE, Gray Sh, Chubak J, et al. Frequent Antibiotic Use and Second Breast Cancer Events. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22(9):1588–99. doi: 10.1158/1055–9965.EPI–13–0454.
3. Ording AG, Garne JP, Nyström PMW, Cronin–Fenton D, Tarp M, Sørensen HT, et al. Hospital Recorded Morbidity and Breast Cancer Incidence: A Nationwide Population–Based Case–Control Study. *PLoS One*. 2012;7(10):e47329. doi: 10.1371/journal.pone.0047329.
4. Landercasper J, Bailey L, Buras R, Clifford E, Degnim AC, Thanasoulis L, et al. The American Society of Breast Surgeons and Quality Payment Programs: Ranking, Defining, and Benchmarking More Than 1 Million Patient Quality Measure Encounters *Ann Surg Oncol*. 2017;24(10):3093–106. doi: 10.1245/s10434–017–5940–1.
5. Greenlee H, DuPont–Reyes MJ, BalneavesLG, Carlson LE, Cohen MR, Deng G, et al. Clinical practice guidelines on the evidence–based use of integrative therapies during and following breast cancer treatment. *CA Cancer J Clin*. May 2017;67(3):194–232. doi: 10.3322/caac.21397.
6. Picon–Ruiz M, Morata–Tarifa C, Valle–Goffin JJ, Friedman ER, Slingerland JM. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(5):378–97. doi: 10.3322/caac.21405.
7. Sueishi M, Takagi M, Yoneda Y. The forkhead–associated domain of Ki–67 antigen interacts with the novel kinesin–like protein Hklp2. *J Biol Chem*. 2000; 275:28888–92. doi: 10.1074/jbc.M003879200.
8. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983;31:13–20. doi: 10.1002/ijc.2910310104.
9. Viale G, Regan MM, Mastropasqua MG, Maffini F, Maiorano E, Colleoni M, et al. Predictive value of tumor Ki–67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node–negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;100(3): 207–12. doi: 10.1093/jnci/djm289.
10. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki–67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncology*. 2010;11(2):174–83. doi: 10.1016/S1470–2045(09)70262–1.

Надійшла 02.06.19