

О.С. Придко^{1, 2}М.Ф. Рішко^{1, 2}А.В. Русин^{1, 2}¹Ужгородський національний університет, Україна²КНП «Закарпатський протипухлинний центр», Ужгород, Україна

Ключові слова: рак молочної залози, неоад'ювантна гормонотерапія, Ki-67, прогнозування агресивності перебігу пухлинного процесу.

ЗНАЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ КІ-67 ДЛЯ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ МІСЦЕВО-РОЗПОВСЮДЖЕНОГО ГОРМОНОЗАЛЕЖНОГО РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Гормональна терапія є одним з основних методів комплексного лікування хворих на місцево-розповсюджений рак молочної залози (РМЗ). Незважаючи на інтенсивність досліджень, присвячених пошуку маркерів, асоційованих з агресивністю перебігу пухлинного процесу, на сьогодні не існує єдиної точки зору щодо прогностичного значення проліферативної активності новоутворень у пацієнток цієї категорії. **Мета:** дослідити особливості експресії Ki-67 у пухлинних клітинах хворих на гормонозалежний РМЗ, що отримували неоад'ювантну гормональну терапію (НГТ), та з'ясувати значення цього протеїну для прогнозування агресивності перебігу пухлинного процесу. **Об'єкт і методи:** дослідження проведено на клінічному матеріалі 110 пацієнток з РМЗ II–III стадії, які перебували на амбулаторному лікуванні на базі КНП «Закарпатський протипухлинний центр» упродовж 2011–2020 рр. Усі пацієнтки, включені до дослідження, отримували НГТ (тамоксифен або летрозол у монорежимі). Ефективність НГТ оцінювали за даними мамографії та ультразвукової діагностики молочних залоз згідно з критеріями RECIST 1.1. Дослідження експресії Ki-67 у клітинах РМЗ проводили на парафінових зрізах операційного матеріалу з використанням імуногістохімічного методу. Статистичну обробку отриманих результатів виконували за допомогою програми GraphPad Prism v.6.05 з урахуванням характеру розподілу отриманих даних. **Результати:** встановлено, що найчастіше позитивний ефект відзначався при застосуванні летрозолу у неоад'ювантному режимі у порівнянні з використанням тамоксифену (75,0 проти 60,0% випадків). Високі показники експресії Ki-67 у пухлинних клітинах ідентифіковано у пацієнток з резистентними до НГТ новоутвореннями, для яких характерна стабілізація та прогресування пухлинного процесу. Показано, що 3-річна безрецидивна виживаність хворих на гормонозалежний РМЗ, що отримували тамоксифен та летрозол у неоад'ювантному режимі, була вищою за наявності низького рівня експресії Ki-67 у пухлинних клітинах. **Висновок:** обґрунтовано можливість використання показників експресії Ki-67 у пухлинних клітинах для прогнозування агресивності перебігу гормонозалежного РМЗ та планування індивідуалізованої тактики лікування.

Удосконалення підходів до лікування пацієнток з раком молочної залози (РМЗ) є актуальною проблемою у зв'язку з високими показниками захворюваності та збільшенням кількості випадків патології, резистентної до медикаментозної терапії [1–4]. Відомо, що одним з основних методів комплексного лікування при місцево розповсюдженному РМЗ є гормональна терапія, головним завданням якої є зниження продукції естрогенів, нормалізація їх балансу та/або блокування впливу на злоякісно трансформовані клітини [5, 6]. У неоад'ювантному режимі гормональна терапія (НГТ) також рекомендована для пацієнтів з протипоказаннями до хірургічного лікування або хіміотерапії [7, 8]. Лікарськи-

ми засобами, що найчастіше використовуються для антиестрогенової терапії при місцево-розповсюдженному РМЗ, є тамоксифен та ториміфен. Препаратами вибору також є інгібітори ароматази (летрозол, анастрозол) [9, 10]. Багаторічний клінічний досвід вказує на те, що найвища ефективність гормональної терапії (до 80%) спостерігається у випадках, коли пухлинні клітини позитивні за експресією як рецепторів естрогенів (РЕ), так і рецепторів прогестерону (РП). Проте 10–15% випадків РМЗ, позитивних за експресією рецепторів стероїдних гормонів, не є чутливими до гормональних препаратів, що інколи призводить навіть до стимуляції пухлинного росту [11–13].

Останніми роками для прогнозування ефективності гормональної терапії використовують низку молекулярних маркерів, серед яких активно досліджують маркери проліферації злоякісно трансформованих клітин [12]. Універсальним маркером для оцінки проліферативної активності є білок Ki-67 [14, 15]. Антитіла до Ki-67 виявляють проліферувальні клітини, що знаходяться у різних фазах циклу. Це найбільш надійний і чіткий маркер проліферації. Антиген Ki-67, що виявляється відповідними моноклональними антитілами, є протеїном з коротким циклом існування, який руйнується протягом 1,5–2 год. Тому антитіла до Ki-67 виявляють тільки клітини, що діляться. У точці G_0 клітинного циклу білок не виявляється, як і на початку G_1 -фази. Ki-67 з'являється наприкінці фази G_1 , його рівень поступово наростає протягом S-фази і досягає максимуму під час мітозу [16, 17]. Ki-67 є надійним індикатором проліферації практично у всіх злоякісних новоутвореннях людини, у тому числі в тканині РМЗ. На думку деяких авторів, зниження рівня Ki-67 у операційному матеріалі хворих вказує на чутливість РМЗ до медикаментозного лікування, у той час як підвищення експресії цього показника асоціюється з несприятливим перебігом пухлинного процесу [15].

Незважаючи на велику кількість досліджень, присвячених пошуку молекулярних маркерів РМЗ, на сьогодні не існує єдиної точки зору щодо прогностичного значення Ki-67 у хворих на місцево-розповсюджену гормонозалежну форму цієї онкопатології. Враховуючи зазначене, метою роботи було дослідити особливості експресії Ki-67 у пухлинних клітинах хворих на гормонозалежний РМЗ, що отримували НГТ, та з'ясувати значення цього протеїну для прогнозування агресивності перебігу пухлинного процесу.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В основу роботи покладено ретроспективний аналіз безпосередніх та віддалених результатів лікування 110 хворих на місцево-розповсюджений гормонозалежний РМЗ II–III стадії, які перебували на амбулаторному лікуванні на базі КНП «Закарпатський протипухлинний центр» упродовж 2011–2020 рр. і дали інформовану згоду на використання клінічних даних у наукових цілях. Стадію пухлинного процесу визначали згідно з класифікацією TNM (6-те видання, 2009 р.).

Усі хворі, що увійшли до дослідження, отримували НГТ, що включала тамоксифен (20 мг/добу в монорежимі, 2–4 цикли) або летрозол (2,5 мг/добу, 2–4 цикли). Ефективність НГТ оцінювали з кожним циклом (місяцем) за даними мамографії та ультразвукової діагностики молочних залоз згідно з критеріями RECIST 1.1 [18].

Усім пацієнткам проведено хірургічне лікування (квадрант- або лампектомія з регіональною лімфодисекцією, радикальна мастектомія за Маде-

ном). В ад'ювантному режимі проводили поліхімотерапію (ПХТ) у пацієнток з високим ризиком прогресування, за схемами, які стандартно застосовують у хворих на РМЗ: CMF, AC, TC (4–6 курсів). Після операції проводили променеву терапію на післяопераційний рубець, пахвову, парастернальну та надключичну ділянки (апарат «TERAGAM», разова вогнищева доза — 2 Гр, сумарна вогнищева доза — 42–44 Гр). Хворим із позитивною експресією PE у видаленій пухлині на тривалий час призначали гормональну терапію за прийнятими схемами (тамоксифен, інгібітори ароматази) залежно від індивідуальних клінічних даних.

Морфологічні та імуногістохімічні дослідження проведено у відділенні патоморфології КНП «Закарпатський протипухлинний центр». Гістологічний тип видалених пухлин верифікували під час морфологічного дослідження (забарвлення гематоксиліном та еозином) відповідно до Міжнародної гістологічної класифікації Всесвітньої організації охорони здоров'я (2004).

Імуногістохімічне дослідження Ki-67 у клітинах РМЗ проводили на операційному матеріалі. У якості первинних антитіл використовували моноклональні антитіла, які є специфічними до Ki-67 (клон MIB-1, Dako Cytomation, Данія). Для детекції реакції використовували систему візуалізації Dako (EnVision Detection Systems, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse, Denmark). Експресію Ki-67 оцінювали напівкількісним методом. Кінцевий результат обчислення виражали у відсотках: до 30% — низька, більше 30% — висока експресія Ki-67.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми медико-біологічної статистики GraphPad Prism v.6.05 (GraphPad Software Inc., США). Аналіз спряженості ознак проводили з використанням методу Хі-квадрат. Дані представлені у вигляді відсоткового співвідношення для відносних величин. Вживаність хворих аналізували за методом Каплана — Мейєра, достовірність між кривими — за log-rank test. Достовірними вважали розбіжності за $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Залежно від схеми НГТ учасниць дослідження було розподілено на 2 групи: 1-шу групу становили 50 хворих, що отримували тамоксифен, 2-гу групу — 60 пацієнток, яких лікували летрозолом.

Загальну клінічну характеристику хворих наведено в табл. 1. Як видно з наведених даних, хворі обох груп були практично одного віку; більшість — з менопаузою. У 1-й групі вік коливався в межах 46–79 років (середній — $54,2 \pm 3,9$ року), в 2-й групі — $52,4 \pm 5,4$ року з інтервалом 48–78 років. За гістологічною будовою переважав інфільтративний протоковий РМЗ (72 та 75% відповідно) помірного ступеня диференціювання (76,0 та 70,0%, відповідно). У всіх пацієнток відмічали РМЗ, позитивний за експресією рецепторів стероїдних гормонів.

Таблиця 1

Клініко-патологічна характеристика хворих на РМЗ

Показники	1-ша група		2-га група	
	Кількість хворих		Кількість хворих	
	n	%	n	%
Загальна кількість хворих	50	100,0	60	100,0
Середній вік, роки	54,2 ± 3,9		52,4 ± 5,4	
Коливання віку	46–79		48–78	
Менструальна функція збережена	10	20,0	14	23,3
Менопауза	40	80,0	46	76,7
Стадія				
II	33	66,0	43	71,7
III	17	34,0	17	28,3
Наявність метастазів у регіонарні лімфатичні вузли				
N0	8	16,0	10	16,6
N1–N3	42	84,0	50	83,4
Гістологічний тип новоутворення				
Інфільтративний протоковий рак	36	72,0	45	75,0
Інфільтративний дольковий рак	14	28,0	15	25,0
Ступінь диференціювання				
G1 (високий)	6	12,0	9	15,0
G2 (помірний)	38	76,0	42	70,0
G3 (низький)	6	12,0	9	15,0
Експресія рецепторів стероїдних гормонів				
PE	50	100,0	60	100,0
RP	50	100,0	60	100,0

Частка хворих на РМЗ II та III стадії у 1-й групі становила 66,0 та 34,0%; у 2-й групі — 71,7 та 28,3% відповідно. Проведене до початку лікування комплексне обстеження (рентгенологічне, ультразвукове, лабораторне) виявило у 84,0 та 83,4% пацієнток 1-ї та 2-ї груп, відповідно, метастази (N1–3) у регіонарні лімфатичні вузли.

Залежно від ступеня вираженості клінічного ефекту НГТ (згідно з критеріями RECIST) хворих кожної групи було розподілено на 2 підгрупи. У 1-шу увійшли 75 хворих на РМЗ, які продемонстрували позитивну відповідь на НГТ (повну регресію пухлини відзначено у 4, часткову — у 71 хворої), у 2-гу — 35 жінок з пухлинами, резистентними до проведеного лікування, серед яких у 29 хворих відмічена стабілізація росту пухлини, а у 6 виявлено прогресування пухлинного процесу на фоні НГТ (табл. 2).

Встановлено, що незалежно від механізму дії гормонального препарату у хворих обох досліджених груп, що отримували НГТ, відзначався позитивний ефект, проте ефективність летрозолу була вищою ($\chi^2 = 10,920$, $p < 0,05$). Відносна кількість випадків з частковою регресією пухлини у групах пацієнток, що отримували як тамоксифен, так і летрозол, становила 60,0 та 68,3% відповідно, у 6,7% пацієнток відзначено повну регресію пухлини після лікування летрозолом (табл. 2). Відсутність ефекту від проведеної НГТ спостерігали у 40,0% хворих, що отримували тамоксифен (стабілізація та прогресування пухлинного процесу у 28,0 та 12% досліджених відповідно), та у 25,0% пацієнток, що лікувалися летрозолом (стабілізація) (див. табл. 2).

Таблиця 2

Ефективність НГТ у хворих на РМЗ

Схема лікування	Кількість хворих, n (%)			
	Ступінь вираженості клінічного ефекту НГТ (за критеріями RECIST)			
	Повна регресія	Часткова регресія	Стабілізація	Прогресування
Тамоксифен (n = 50)	0	30 (60,0)	14 (28,0)	6 (12,0)
Летрозол (n = 60)	4 (6,7)	41 (68,3)	15 (25,0)	0*

Примітка: * $p < 0,05$ порівняно з хворими, що отримували тамоксифен.

Було проаналізовано зв'язок між рівнем Ki-67 в пухлинних клітинах РМЗ та клінічним ефектом НГТ. Як видно з даних, наведених на рис. 1, у більшості (63,3%) пухлин хворих, які продемонстрували відповідь на лікування тамоксифеном, визначено низький рівень експресії Ki-67. У групі пацієнтів, що отримували летрозол, позитивна відповідь на терапію також асоціювалася з низьким рівнем експресії Ki-67 (у 75% випадків, як за повної, так і у разі часткової регресії пухлинного процесу). Найбільшу кількість випадків РМЗ з високим рівнем експресії Ki-67 зареєстровано у групі хворих зі стабілізацією та прогресуванням пухлинного процесу, що отримували НГТ тамоксифеном (78,5 та 83,3% відповідно), у той час як у групі пацієнтів з відсутністю відповіді на терапію летрозолом (стабілізація росту пухлини) кількість випадків РМЗ з високим рівнем Ki-67 була достовірно меншою (56,0%, $p < 0,05$).

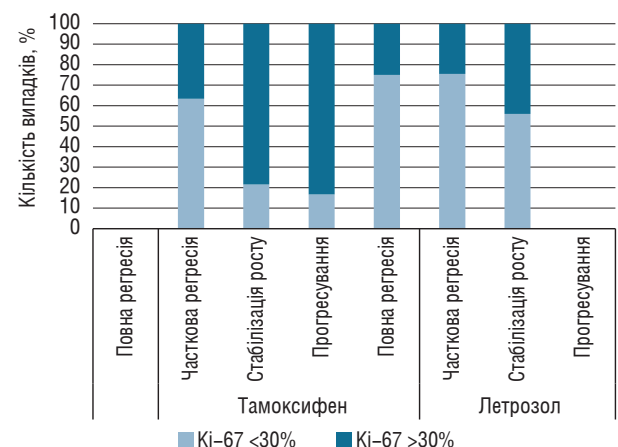


Рис. 1. Зв'язок експресії Ki-67 у пухлинних клітинах хворих на гормонозалежний РМЗ залежно від клінічного ефекту НГТ

Враховуючи отримані дані щодо зв'язку експресії Ki-67 із чутливістю гормонозалежного РМЗ до НГТ, проаналізовано виживаність хворих з урахуванням рівня експресії зазначеного білка у пухлинних клітинах. Як свідчать дані, представлені на рис. 2, безрецидивна виживаність пацієнток із РМЗ, що отримували тамоксифен або летрозол у неoad'ювантному режимі, була вищою за наявності низького рівня експресії Ki-67 у пухлинних клітинах. Рецидиви захворювання у пацієнток, що отримували тамоксифен або летрозол, за високої експресії Ki-67 у пухлинних клітинах визначали на 14 ($p < 0,05$) та 12% ($p < 0,05$) частіше, ніж у хворих з низькою проліферативною активністю РМЗ.

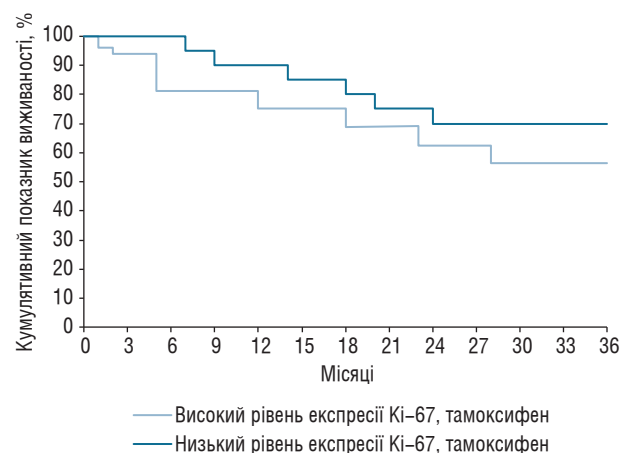


Рис. 2. Безрецидивна виживаність (за Капланом — Мейс-ром) хворих на гормонозалежний РМЗ залежно від рівня експресії Ki-67 у пухлинній тканині (застосовували log-rank тест ($p < 0,05$))

Таким чином, отримані дані підтверджують переваги використання летрозолу у неоад'ювантному режимі у порівнянні з тамоксифеном для лікування пацієток з гормонозалежним РМЗ. Виявлено зв'язок експресії Ki-67 із чутливістю гормонозалежного РМЗ до НГТ тамоксифеном та летрозолом, а також з показниками безрецидивної виживаності хворих, що вказує на перспективність його використання для прогнозування агресивності перебігу пухлинного процесу.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено гетерогенність відповіді гормонозалежного РМЗ на гормональні препарати з різним механізмом дії у неоад'ювантному режимі. Більшу кількість випадків гормонозалежного РМЗ з позитивною відповіддю на НГТ зафіксовано під час використання летрозолу у порівнянні із застосуванням тамоксифену (75,0 проти 60,0%).

2. Доведено зв'язок рівня експресії Ki-67 із чутливістю гормонозалежного РМЗ до НГТ. Високі показники Ki-67 у пухлинних клітинах зареєстровано у хворих із резистентними до тамоксифену або летрозолу новоутвореннями, для яких характерна стабілізація та прогресування пухлинного процесу.

3. Визначено, що 3-річна безрецидивна виживаність хворих, що отримували тамоксифен або летрозол у неоад'ювантному режимі, була достовірно вищою за низького рівня експресії Ki-67 у пухлинних клітинах.

4. Обґрунтовано можливість використання показників експресії Ki-67 у пухлинних клітинах для прогнозування агресивності перебігу гормонозалежного РМЗ та планування індивідуалізованої тактики лікування.

Дослідження проведено у рамках виконання науково-дослідної роботи «Персоніфікація терапії у пацієнтів зі злоякісними пухлинами», номер державної реєстрації 0121U108116, термін виконання — 2021—2025 рр.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Intl J Cancer* 2021; **149** (4): 778–89. doi: 10.1002/ijc.33588.
2. Hanker AB, Sudhan DR, Arteaga CL. Overcoming endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 2020; **37** (4): 496–513. doi: 10.1016/j.ccell.2020.03.009.
3. Szostakowska M, Trębińska-Stryjewska A, Grzybowska EA, *et al.* Resistance to endocrine therapy in breast cancer: molecular mechanisms and future goals. *Breast Cancer Res Treat* 2019; **173** (3): 489–97. doi: 10.1007/s10549-018-5023-4.
4. Tang Y, Wang Y, Kiani MF, *et al.* Classification, treatment strategy, and associated drug resistance in breast cancer. *Clin breast cancer* 2016; **16** (5): 335–43. doi: 10.1016/j.clbc.2016.05.012.
5. Diaby V, Tawk R, Sanogo V, *et al.* A review of systematic reviews of the cost-effectiveness of hormone therapy, chemotherapy, and targeted therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015; **151** (1): 27–40. doi: 10.1007/s10549-015-3383-6.
6. Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: a review. *JAMA* 2019; **321** (3): 288–300. doi: 10.1001/jama.2018.19323.
7. Spring LM, Gupta A, Reynolds KL, *et al.* Neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncology* 2016; **2** (11): 1477–86. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.1897.
8. Barchiesi G, Mazzotta M, Krasniqi E, *et al.* Neoadjuvant endocrine therapy in breast cancer: current knowledge and future perspectives. *Int J Mol Sci* 2020; **21** (10): 3528. doi: 10.3390/ijms21103528.
9. Ali S, Rasool M, Chaoudhry H, *et al.* Molecular mechanisms and mode of tamoxifen resistance in breast cancer. *Bioinformation* 2016; **12** (3): 135. doi: 10.6026/97320630012135.
10. Manna S, Holz MK. Tamoxifen action in ER-negative breast cancer. *Signal transduction insights* 2016; **5**: STI-S29901. doi: 10.4137/STI.S29901.
11. Hilton HN, Clarke CL, Graham JD. Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer development. *Mol Cell Endocrinol* 2018; **466**: 2–14. doi: 10.1016/j.mce.2017.08.011.
12. Regan MM, Pagani O, Francis PA, *et al.* Predictive value and clinical utility of centrally assessed ER, PgR, and Ki-67 to select adjuvant endocrine therapy for premenopausal women with hormone receptor-positive, HER2-negative early breast cancer: TEXT and SOFT trials. *Breast Cancer Res Treat* 2015; **154**(2): 275–86. doi: 10.1007/s10549-015-3612-z.
13. Iqbal BM, Buch A. Hormone receptor (ER, PR, HER2/neu) status and proliferation index marker (Ki-67) in breast cancers: Their onco-pathological correlation, shortcomings and future trends. *Med J Dr. DY Patil University* 2016; **9**(6): 674. doi: 10.4103/0975-2870.194180.
14. Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, *et al.* (2019). Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clin Chimica Acta*; **491**: 39–45. doi: 10.1016/j.cca.2019.01.011.
15. Alco GUL, Bozdogan A, Selamoglu D, *et al.* Clinical and histopathological factors associated with Ki-67 expression in breast cancer patients. *Oncol letters* 2015; **9**(3): 1046–54. doi: 10.3892/ol.2015.2852.
16. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma* 2018; **127**(2): 175–86. doi: 10.1016/j.tibs.2018.08.004.
17. Sobiecki M, Mrouj K, Colinge J, *et al.* Cell-cycle regulation accounts for variability in Ki-67 expression levels. *Cancer Res* 2017; **77**(10): 2722–34. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0707.
18. Mukherjee P, Sharma S, Sheikh ZA, *et al.* Correlation of clinico-pathologic and radiologic parameters of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Indian J Cancer* 2014; **51** (1): 25–9. doi: 10.4103/0019-509X.134610.

SIGNIFICANCE OF KI-67 EXPRESSION FOR PREDICTING THE COURSE OF LOCALLY DIFFUSED HORMONE-DEPENDENT BREAST CANCER

O.S. Pridko^{1,2}, M.F. Rishko^{1,2}, A.V. Rusyn^{1,2}

¹Uzhhorod National University

²MNE «Transcarpathian Antitumor Center»,
Uzhhorod, Ukraine

Summary. Hormonal therapy is one of the main methods of comprehensive treatment for patients with locally advanced breast cancer (BC). Despite the intensity of studies devoted to the search for markers associated with the aggressiveness of the tumor process, today there is no unified point of view regarding the prognostic value of the proliferative activity of neoplasms in patients of this category. **Aim:** to investigate the features of Ki-67 expression in tumor cells of patients with hormone-dependent breast cancer who received neoadjuvant hormone therapy (NGT), and to find out the significance of this protein for predicting the aggressiveness of the tumor process. **Object and methods:** the study was conducted on the clinical material of 110 patients with stage II-III breast cancer who were receiving inpatient treatment at the Transcarpathian Antitumor Center during 2011–2020. All patients included in the study received NGT (tamoxifen or letrozole in mono-mode). The effectiveness of NGT was evaluated according to the data of mammography and ultrasound diagnosis of mammary glands according to RECIST 1.1 criteria. The study of Ki-67 expression in breast cancer cells

was performed on paraffin sections of surgical material using the immunohistochemical method. Statistical processing of the obtained results was performed using the GraphPad Prism v.6.05 program, considering the nature of the distribution of the obtained data. **Results:** it was discovered that a positive effect was most often determined with the use of letrozole in the neoadjuvant regimen compared with the use of tamoxifen (75.0 vs. 60.0% of cases). High levels of Ki-67 expression in tumor cells were identified in patients with NGT-resistant neoplasms, which are characterized by stabilization and progression of the tumor process. It was shown that the 3-year recurrence-free survival of patients with hormone-dependent breast cancer treated with tamoxifen and letrozole in the neoadjuvant regimen was higher in the presence of a low level of expression of Ki-67 in tumor cells. **Conclusion:** it has been substantiated that the possibility of using Ki-67 expression indicators in tumor cells for predicting the aggressiveness of the course of hormone-dependent breast cancer and planning individualized treatment tactics.

Key words: breast cancer, neoadjuvant hormone therapy, Ki-67, predicting the aggressiveness of the tumor process.

Адреса для листування:

Придко О.С.

88000, Ужгород, вул. Бродяковича, 2

Ужгородський національний університет

E-mail: kaf-oncology@uzhnu.edu.ua

Одержано: 21.07.2022