

Національний інститут раку, Київ

ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ МАРКЕРІВ ПРИ МІСЦЕВО- ПОШИРЕНОМУ РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ



Л.А. Сивак, Н.О. Верьовкіна,
С.А. Лялькін, Н.М. Майданевич,
А.В. Аскольський, М.Ю. Кліманов,
Н.В. Касап

Адреса:
Сивак Любов Андріївна
03022, Київ, вул. Ломоносова, 33/43
Національний інститут раку
E-mail: mklimanov@gmail.com;
lasyvak@gmail.com

Ключові слова: рак грудної залози, мікрооточення пухлини, хіміотерапія.

Традиційно рак грудної залози (РГЗ) не розглядається як типово імуногенна пухлина. Але добре відомо, що РГЗ являє собою гетерогенну суміш різних молекулярних підтипів і що наявність інфільтрації тканини пухлини імункомпетентними клітинами асоційована як з відповіддю на хіміотерапію, так і з виживаністю при певних молекулярних підтипах РГЗ. Попередні результати дослідження показали, що лімфоїдна інфільтрація стромы пухлини у хворих на РГЗ має прогностичне значення, є перспективною для персоналізації терапії та потребує подальшого вивчення.

Рак грудної залози (РГЗ) є надзвичайно розповсюдженою онкологічною патологією. В усьому світі частота РГЗ має тенденцію до зростання. Найвищі показники захворюваності відмічено в економічно розвинутих країнах Європи, США, Канаді та Австралії (75,0–120,0 на 100 тис. населення), найнижчі — в країнах Сходу. За даними Національного канцер-реєстру України, щорічний приріст цієї онкопатології перевищує 2%. Так, у 2012 р. в Україні зареєстровано 17 746 нових випадків захворювання, а загальна кількість померлих жінок від РГЗ становила 7880. Серед причин смерті жінок питома вага РГЗ найбільша і становить 20% [1]. Незважаючи на зростання захворюваності, смертність від РГЗ у низці країн знижується, особливо серед осіб молодого та середнього віку. Так, за даними статистичної бази SEER (Surveillance, Epidemiology and Results) Національного інституту раку США, 5-річна виживаність при локалізованих формах РГЗ сягає 83,4–98,4%, а при метастатичних — 23,3% [13]. Такі результати, перш за все, пов'язані з досягненнями системної терапії РГЗ. Успіхи лікування хворих на РГЗ залежать від ефективності стратегії впливу на типові для РГЗ мішені, такі як рецептори естрогенів та прогестерону, онкопротеїн HER2/neu. Але це не стосується базальноподібного РГЗ, лікування при якому залишається однією з найбільших проблем сучасної онкології. Тричі негативний РГЗ — гетерогенна група пухлин, яка асоційована з різним, найчастіше з несприятливим прогнозом і високим ризиком рецидиву та смерті пацієнта впродовж перших 3–5 років спостереження (Penault-Llorca F., Viale G., 2012). На сьогодні не існує специфічних режимів системної терапії при тричі негативному РГЗ, і системна поліхіміотерапія залишається єдиною

опцією. Незважаючи на негативний прогноз у цілому для групи пацієнтів з тричі негативним РГЗ, існує підгрупа пацієнтів з кращою відповіддю на системну ПХТ та кращим прогнозом, що доводить гетерогенність тричі негативного РГЗ. Попри вражаючі успіхи молекулярної біології, імунології, хімії, фізики, які дозволили розшифрувати базові механізми виникнення злоякісних пухлин, створити ряд принципово нових за механізмом дії протипухлинних препаратів, проблема онкологічних захворювань залишається однією з найактуальніших. Результати лікування пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями незадовільні. Майже завжди в кінцевому підсумку виникає рецидив захворювання з розвитком медикаментозної резистентності.

Отже, існує гостра потреба в нових терапевтичних підходах, які могли б підвищити ефективність лікування цієї прогностично вкрай несприятливої підгрупи хворих.

Традиційно РГЗ не розглядається як типово імуногенна пухлина. Але багатьма дослідниками доведено, що РГЗ являє собою гетерогенну суміш різних молекулярних підтипів, а наявність інфільтрації тканини пухлини імункомпетентними клітинами асоційовано як з відповіддю на неoad'ювантну поліхіміотерапію [15, 16], так і з виживаністю [4, 8]. У галузі досліджень імунологічних маркерів при РГЗ та тричі негативному і HER2/new гіперекспресуючому РГЗ на сьогодні найбільш перспективними є прогностичні фактори ефективності хіміотерапії. Пізніше Sh. Loi та співавтори (2013, 2014) провели проспективно-ретроспективне дослідження [15, 16], метою якого було підтвердити прогностичну значущість пухлиноінфільтруючих лімфоцитів при вперше виявленому тричі негативному РГЗ, а також оцінити важливість пухлиноінфільтруючих лімфоцитів як предиктивного чинника

при визначенні користі терапії трастузумабом при ранньому РГЗ, за даними FinHER trial. Результати цього дослідження підтвердили статистично достовірний взаємозв'язок між підвищенням лімфоцитарної інфільтрації пухлини та зниженням ризику рецидиву при тричі негативному РГЗ. Так, автори вперше отримали дані, що доводять позитивний взаємозв'язок між високим рівнем інфільтрації пухлини лімфоцитами і ефективністю призначення трастузумабу у пацієнтів із HER2+ пухлинами.

Пухлинне мікрооточення поступово визнається одним із ключових факторів пухлинної прогресії. Розуміння динаміки мікрооточення і введення в клінічну практику методів якісного та кількісного визначення елементів мікрооточення пухлини може дати можливість здійснювати відбір хворих для застосування нових видів лікування, а також для персоналізації терапії.

В аспекті вивчення проблем РГЗ на сьогодні актуальними є дослідження, сфокусовані на з'ясуванні, чому ті чи інші види тричі негативного РГЗ можуть або не можуть індукувати протипухлинну імунну відповідь та яким чином системна терапія змінює мікрооточення пухлини імунокомпетентними клітинами.

Метою даного дослідження було оцінити вплив інфільтрації стромі пухлини лімфоїдними клітинами CD3+, CD4+ і CD8+ та рівня Ki-67 на прогноз та ефективність хіміотерапії при місцевопоширеному РГЗ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проаналізовано результати лікування 25 хворих на місцево-поширений РГЗ ПІВ–ІІІВ стадії. Після верифікації діагнозу РГЗ та виконання стандартного алгоритму обстеження пацієнти отримували неoad'ювантну хіміотерапію за схемою FAC (циклофосфамід 500 мг/м² у 1-й день, флуорOURACILIN 50 мг/м² у 1-й день, флуорOURACILIN 500 мг/м² у 1-й день). Оцінку ефективності терапії проводили після кожних 2 курсів хіміотерапії (згідно з критеріями RECIST 2.0). Після досягнення пухлиною критеріїв резектабельності проведено оперативне лікування. Патоморфологічну відповідь оцінювали у післяопераційному матеріалі за класифікацією D.M. Sataloff (1995) з морфологічним та імуногістохімічним дослідженням післяопераційного матеріалу (ступінь патоморфологічної відповіді на хіміотерапію, індекс проліферативної активності Ki-67, експресія рецепторів ER, PR, HER2/neu та CD3+, CD4+, CD8+ на лімфоїдних клітинах у стромі пухлини). Морфологічне та імуногістохімічне дослідження виконували у науководослідному відділенні патологічної анатомії та гістології Національного

інституту раку. Визначали безрецидивну та загальну виживаність. Математичну обробку здійснювали з використанням пакета Statistica 10.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Визначено, що повну або виражену патоморфологічну відповідь одержано у 12 (48%) пацієнток, частковий патоморфоз — у 13 (52%). Високий рівень експресії CD4+ на лімфоїдних клітинах у стромі пухлини визначено у 11 (44%) хворих, низький — у 14 (56%). У 7 (28%) пацієнток виявлено високий рівень експресії CD8+ на лімфоїдних клітинах у стромі пухлини, низький — у 18 (72%). Залежно від рівня експресії CD4+ і CD8+ на лімфоїдних клітинах пухлини учасниць дослідження було розподілено на дві групи: 1-ша група — з високим рівнем експресії CD4+ і CD8+, 2-га — з низьким рівнем відповідно. Визначено, що ступінь лікувального патоморфозу достовірно асоціювався з маркером проліферативної активності Ki-67 та рівнем інфільтрації пухлини клітинами CD8+ ($p=0,02$ та $p=0,04$ відповідно). Так, у групі пацієнток із частковим та незначним лікувальним патоморфозом у резидуальній пухлині виявлено високий рівень експресії Ki-67 та низький рівень інфільтрації стромі резидуальної пухлини лімфоїдними клітинами CD8+. Високий рівень інфільтрації пухлини лімфоїдними клітинами CD4+ був асоційований з високим ризиком недосягнення патоморфологічної ремісії (OR=2,3). Медіана безрецидивної виживаності на момент оцінки результатів становила $17 \pm 9,2$ міс (4–35 міс). Довший безрецидивний період асоціювався з високим рівнем CD8+ лімфоцитів у стромі резидуальної пухлини ($r=0,53$, $p=0,075$); короткий — з високим рівнем Ki-67 ($r=0,37$, $p<0,1$). У групі з високим рівнем Ki-67 та вираженою інфільтрацією лімфоїдними клітинами CD8+ відмічали тенденцію до погіршення загальної виживаності ($p=0,05$). При збільшенні інфільтрації стромі резидуальної пухлини лімфоїдними клітинами CD4+ та CD8+ виявлено кращі показники загальної виживаності ($r=0,39$, $p=0,03$). Наші дані збігаються з результатами, отриманими на основі ретроспективних аналізів великих клінічних випробувань. Так, група дослідників [11] оцінювала роль лімфоцитів, що інфільтрують пухлину, як незалежного фактора, який прогнозує відповідь пухлини на неoad'ювантну терапію при РГЗ. Отримані результати дозволили авторам виділити підгрупу пухлин грудної залози, яка характеризувалася наявністю лімфоцитарної інфільтрації пухлини та краще вираженою відповіддю на неoad'ювантну ПХТ. Нами визначено, у групі пацієнтів з високим рівнем інфільтрації стромі резидуальної пухлини клітинами CD4+ (OR=14,6) та високим

рівнем Ki-67 ризик смерті підвищувався (OR=7,7). Останнім часом дослідники поступово визнають, що саме мікрооточення є одним з ключових факторів як пухлинної прогресії, так і резистентності до лікарських засобів [19]. У недавньому дослідженні, проведеному H.R. Ali та співавторами (2014) [4], отримано дані, які дозволяють більш точно виділити імуногенні підтипи РГЗ. Спільними зусиллями кількох робочих груп вивчено такі імунні маркери лімфоцитів, як CD8 і FOXP3 на 12 439 зразках РГЗ. У результаті дослідження виявлено, що наявність CD8+ Т-клітин у тканині пухлини грудної залози пов'язана зі зниженням ризику смерті від РГЗ на 28% в підгрупі естроген-рецептор (ER)-негативних пухлин ($n=2402$). У підгрупі ER+/HER2+ пухлин ($n=483$) виявлено аналогічний результат. У цій підгрупі відзначалося зниження смертності від РГЗ на 27% за наявності інфільтрації CD8+ Т-клітин у тканині пухлини. У підгрупі ER+ пухлин ($n=5956$) не виявлено відмінностей показників виживаності залежно від CD8+ інфільтрації пухлини, а прогностична значущість FOXP3 клітин авторами не доведена [4]. Дані останніх фундаментальних та клінічних досліджень вказують на важливість позаклітинних факторів, а особливо протипухлинної імунної відповіді, які опосередковують цитотоксичну дію хіміотерапевтичних препаратів та променевої терапії [5, 22, 27]. Протипухлинні препарати, такі як антрацикліни, оксалиплатин, таксани, циклофосфамід, можуть індукувати імуногенну загибель клітин, що в свою чергу стимулює протипухлинну імунну відповідь. Трастузумаб може індукувати антитілозалежну клітиноасоційовану цитотоксичність. Механізм імуногенної загибелі пухлинних клітин реалізується шляхом вивільнення біологічно активних речовин, таких як HMGB1 протеїн. Під час загибелі клітини під впливом хіміотерапевтичних засобів або променевої терапії HMGB1 протеїн вивільняється та зв'язується з толл-подібними рецепторами (TLR4 та TLR2) на дендритних клітинах стромі пухлини та стимулює дозрівання антигенпрезентуючих клітин та активацію протипухлинної імунної відповіді, що позначається на ефективності лікування та тривалості життя пацієнтів [5, 22, 27].

ВИСНОВКИ

1. Досліджено, що загальна ефективність лікування мала прямий кореляційний зв'язок з маркером проліферативної активності Ki-67 та рівнем інфільтрації пухлини клітинами CD8+ ($r=5,68$; $p=0,02$ та $r=4,51$; $p=0,04$ відповідно).

2. Визначено, що довший безрецидивний період асоціювався з високим рівнем CD8+ лімфоцитів у стромі резидуальної пухлини ($r=0,53$, $p=0,075$);

короткий — з високим рівнем Ki-67 ($r=0,37$, $p<0,1$).

3. Встановлено, що у хворих з високим рівнем Ki-67 та інфільтрацією стромы резидуальної пухлини лімфоїдними клітинами CD8⁺ відмічали тенденцію до погіршення загальної виживаності.

4. Виявлено, що лімфоїдна інфільтрація стромы резидуальної пухлини CD4⁺ та CD8⁺ лімфоїдними клітинами мала пряму кореляційну асоціацію з показниками виживаності ($r=0,39$, $p=0,03$).

5. Таким чином, попередні результати дослідження показали, що лімфоїдна інфільтрація стромы пухлини у хворих на РГЗ має прогностичне значення, є перспективною для персоналізації терапії та потребує подальшого вивчення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ТА РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Федоренко З.П., Михайлович Ю.Й., Гулак Л.О. та ін. (2015) Рак в Україні, 2012–2013. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюл. Нац. канцер-реєстру України, 15. 101 с.
2. Заридзе Д.Г. (2004) Канцерогенез. Медицина, Москва: 474–479.
3. Осинский С.П. (2012) Микроокружение опухолевых клеток и опухолевая прогрессия. Здоров'я України. Темат. номер: онкологія: 34–36.
4. Ali H.R., Provenzano E., Dawson S.-J. et al. (2014) Association between CD8⁺ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. *Ann. Oncol.*, 25 (8): 1536–1543.

5. Andre F., Dieci M., Dubsy P. et al. (2012) Molecular pathways: involvement of immune pathways in the therapeutic response and outcome in breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 19(1): 28–33.
6. Coulie P., van den Eynde B., van der Bruggen P., Boon T. (2014) Tumor antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Oncol.*, 14(2): 135–146.
7. Crisitiello C. (2012) Tumor-associated antigens in breast cancer. *Breast Care*, 7: 262–266.
8. De Nardo D., Brennan D., Rexhepaj E. et al. (2011) Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discovery*, 1(1): 54–67.
9. Denkert C., Darb-Esfahani S., Loibl S. et al. (2011) Anti-cancer immune response mechanisms in neoadjuvant and targeted therapy. *Semin. Immunopathol.*, 33: 341–351.
10. Denkert C., von Minckwitz G., Brase J.C. et al. (2014) Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in HER2-positive and triple-negative primary breast cancer. *J. Clin. Oncol.* doi:10.1200/JCO.2014.58.1967.
11. Denkert C., Loibl S., Noske A. et al. (2010) Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 28 (1): 105–113.
12. Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57–70.
13. Howlader N., Noone F., Krapcho M. et al. (2013) SEER cancer statistics review, 1975–2010 (http://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2010).
14. Fang H., DeClerck Y.A. (2013) Targeting the tumor microenvironment: from understanding pathways to effective clinical trials. *Cancer Res.*, 73 (16): 4965–4977.
15. Loi S., Sirtaine N., Plette F. et al. (2013) Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J. Clin. Oncol.*, 31 (7): 860–867.
16. Loi S., Michiels S., Saigado R. et al. (2014) Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann. Oncol.*, 25(8): 1544–1550.

17. Mahmoud Sh., Paish E., Powe D. G. et al. (2011) Tumor-infiltrating CD8 lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 29(15): 1949–1955.
18. Mahmoud S.M., Paish E.C., Powe D.G. et al. (2011) An evaluation of the clinical significance of FOXP3⁺ infiltrating cells in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 127: 99–108.
19. Tsai M.-J., Chang W.-A., Huang M.-S. Kuo P.-L. (2014) Tumor microenvironment: a new treatment target for cancer. *ISRN Biochemistry*, Article ID 351959.
20. Park S., Jiang Z., Mortenson E.D. et al. (2010) The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity. *Cancer Cell*, 18: 160–170.
21. Ruffell B., Au A., Rugo H.S. et al. (2012) Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109: 2796–2801.
22. Shiao S., Ganesan A., Rugo H., Coussens L. (2011) Immune microenvironment in solid tumors: new targets for therapy. *Genes Dev.*, 25: 2559–2572.
23. Shigeoka M., Urakawa N., Nakamura T. et al. (2013) Tumor associated macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.*, 104(8): 1112–1119.
24. Sikov W.M., Berry D.A., Perou C.M. et al. (2015) Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J. Clin. Oncol.*, 33(1): 13–21.
25. Stagg J., Allard B. (2013) Immunotherapeutic approaches in triple negative breast cancer: latest research and clinical prospects. *Ther. Adv. Med. Oncol.*, 5(3): 169–181.
26. von Minckwitz G., Schneeweiss A., Loibl S. et al. (2014) Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): A randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.*, 15(7): 747–756.
27. Zitvogel L., Tesniere A., Kroemer G. (2006) Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.*, 6: 715–727.
28. Zitvogel L., Kepp O., Kroemer G. (2011) Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 8: 151–160.

Прогностическое значение биологических маркеров при местно-распространенном раке грудной железы

Л.А. Сивак, Н.О. Веревкина, С.А. Лялкин, Н.М. Майданевич, А.В. Аскольский, М.Ю. Климанов, Н.В. Касап

Национальный институт рака, Киев

Резюме. Традиционно рак грудной железы (РГЖ) не рассматривается как типично иммуногенная опухоль. Тем не менее хорошо известно, что РГЖ представляет собой гетерогенную смесь различных молекулярных подтипов и что наличие инфильтрации ткани опухоли иммунокомпетентными клетками ассоциировано как с ответом опухоли на химиотерапию, так и с выживаемостью при определенных молекулярных подтипах РГЖ. Предварительные результаты исследования показали, что лимфоидная инфильтрация опухоли у больных РГЖ имеет прогностическое значение, является перспективным маркером для индивидуализации терапии и требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: рак грудной железы, микроокружение опухоли, химиотерапия.

Prognostic and predictive value of the biological markers in locally advanced breast cancer

L.A. Syvak, N.O. Verovkina, S.A. Lyalkin, N.M. Majdaneych, A.V. Askolsky, M.Y. Klimanov, N.V. Kasap

National Cancer Institute, Kyiv

Summary. Traditionally, breast cancer has not been considered as a typical immunogenic tumor type. Nevertheless, it is well known that breast cancer is a heterogeneous mixture of different molecular subtypes and infiltration of tumor tissue by immunocompetent cells is associated with response to chemotherapy and survival in a certain molecular subtypes of breast cancer. Preliminary results of the study indicate that, immune markers, should be used to stratify risk groups prognostically unfavorable types of breast cancer as well as use as a factor in predicting the effectiveness therapy and chemotherapy.

Key words: breast cancer, tumor microenvironment, chemotherapy.