

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Е.С. Герштейн, Н.Е. Кушлинский
ГУРОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

Биологические (тканевые, клеточные, молекулярные) маркеры определяются непосредственно в опухолевой ткани и характеризуют индивидуальные особенности опухоли, специфику ее «поведения» и регуляции [2]. Количество показателей, рассматривающихся в качестве потенциальных биомаркеров, увеличивается лавинообразно, что отражает быстрый прогресс в области изучения механизмов регуляции пролиферации и дифференцировки опухолевых клеток. При раке молочной железы (РМЖ) определение любого молекулярного маркера в принципе может преследовать две практические задачи: 1) выявление группы риска, требующей дополнительного лечения или более тщательного наблюдения, среди больных с ранними стадиями, не подлежащих адъювантной терапии по клиническим и другим лабораторным показаниям; 2) оценка чувствительности к определенным видам терапии и(или) индивидуализация схем адъювантного лечения больных с распространенным процессом. Еще одним аспектом практического использования результатов изучения молекулярно-биологических характеристик РМЖ может быть разработка новых препаратов, направленно воздействующих на исследуемые белки (или гены) и блокирующих регулируемые ими процессы.

В связи с тем, что, как уже отмечалось, количество потенциально значимых биомаркеров очень велико, необходимы четкие критерии, позволяющие рекомендовать каждый конкретный показатель для практического применения. Основные условия включения маркера в схему обследования больного и использования результатов его определения для выбора лечения следующие [9]: 1) его включение должно приводить к более благоприятным результатам лечения — увеличению безрецидивной или общей выживаемости, улучшению качества жизни и(или) снижению стоимости; 2) эти преимущества должны иметь I уровень доказательности (ASCO) — доказательства получены либо в специальном масштабном рандомизированном проспективном исследовании, либо в результате мета-анализа значительного числа относительно небольших исследований; 3) необходимы стандартизованные воспроизводимые методы с четко обозначенными критериями, а также наличие внутрен-

них и внешних программ контроля качества. В связи с этим количество биомаркеров, реально используемых и рекомендуемых международными организациями для обследования больных РМЖ, весьма ограничено.

Рецепторы стероидных гормонов — критерий чувствительности к эндокринной терапии. Одним из первых вошедших в практику лечения больных РМЖ показателей, относящихся к категории биологических маркеров, были рецепторы стероидных гормонов — белки, специфически и избирательно связывающие соответствующие стероиды после их проникновения в клетку и опосредующие, таким образом, их биологические эффекты. Сначала обратили внимание на рецепторы эстрогенов (РЭ), несколько позднее стали определять также рецепторы прогестерона (РП). Присутствие РЭ в первичной опухоли молочной железы свидетельствует о ее потенциальной чувствительности к лечебным мероприятиям, направленным на удаление источника эстрогенов из организма или на противодействие их эффектам. РП представляет интерес как молекулярный маркер РМЖ не только потому, что он является первым необходимым звеном реакции клетки на прогестины и определяет ее чувствительность к соответствующим препаратам, но и потому, что его синтез в клетках РМЖ индуцируется эстрогенами. Таким образом, наличие РП может свидетельствовать о том, что РЭ, по крайней мере частично, функционально активны. Адъювантная эндокринная терапия наиболее эффективна у больных РМЖ с положительным рецепторным статусом: ее эффективность составляет около 10% при РЭ-отрицательных опухолях, примерно 50% — при РЭ-положительных опухолях и около 75% — при опухолях, содержащих одновременно РЭ и РП.

Известно также, что опухоли молочной железы, содержащие оба или хотя бы один из рецепторов стероидных гормонов, имеют более благоприятное течение и послеоперационный прогноз у больных с такими опухолями, независимо от проводимого адъювантного лечения, лучше, чем у больных с рецепторотрицательными опухолями. Однако различия в выживаемости не очень велики, поэтому наиболее важной в практическом отношении областью использова-

ния результатов определения РЭ и РП является отбор больных, чувствительных к эндокринной терапии. Практическое значение определения РЭ и РП для назначения эндокринной терапии подтверждено мета-анализом, включавшим 37 тыс больных операбельным РМЖ, участвовавших в 55 рандомизированных исследованиях [9].

В настоящее время в различных клиниках и лабораториях используется 3 относительно равнозначных метода определения рецепторного статуса РМЖ: радиолигандный — оценка связывающей способности рецепторов в цитозолях опухолей, иммуоферментный — определение концентрации иммунореактивного рецепторного белка в тех же цитозолях и иммуногистохимический — специфическое окрашивание срезов опухоли с помощью антител к рецепторным белкам. Преимуществом первых 2 методов является их количественный характер, позволяющий объективизировать критерии оценки рецепторного статуса. Радиолигандный метод позволяет также оценить и функциональную активность рецептора на одной из первых стадий его взаимодействия с гормоном, что делает прогноз гормоночувствительности более надежным, чем при определении иммунореактивных белков [7]. С другой стороны, иммуногистохимический метод, хотя и носит относительно субъективный полуколичественный характер, имеет важное достоинство, заключающееся в том, что при окрашивании срезов можно четко определить принадлежность рецепторов именно опухолевым клеткам, что практически невозможно при использовании биохимических методов. Кроме того, этот метод позволяет работать с архивным материалом — парафиновыми блоками и даже готовыми стеклами, что делает его единственно возможным вариантом в случаях, когда необходимость исследования рецепторов стероидных гормонов возникла или была осознана спустя длительное время после операции. Совпадение результатов определения рецепторного статуса РМЖ всеми 3 методами составляет в среднем 80—85%.

Факторы роста и их рецепторы — показатель способности опухоли к саморегулируемому росту. Поскольку резистентность к эндокринной терапии может наблюдаться с самого начала даже у РЭ- и РП-положительных опухолей или развиваться позднее по мере прогрессирования болезни, рецепторный статус оказался необходимым, но не всегда достаточным показателем гормоночувствительности РМЖ. В связи с этим постоянно ведется поиск дополнительных критериев, характеризующих их функциональную активность и влияние других регуляторных факторов на биологическое поведение РМЖ. К числу важнейших регуляторов подобного типа относятся полипеп-

тидные факторы, продуцируемые опухолевыми клетками и другими компонентами опухолевой ткани (фибробластами, инфильтрирующими опухоль макрофагами и лимфоцитами, эндотелиоцитами) и стимулирующие рост клеток-продуцентов (аутокринный механизм) или соседних клеток (паракринный механизм).

Многими исследователями, в том числе и в нашей лаборатории, было показано, что наличие в опухоли молочной железы рецепторов эпидермального фактора роста (РЭФР), особенно при отсутствии рецепторов стероидных гормонов, свидетельствует о неблагоприятном прогнозе заболевания даже на ранних стадиях и о резистентности к эндокринной терапии [1, 4]. Тем не менее из-за неоднозначности результатов, полученных разными авторами, ни один из показателей, характеризующих чувствительность РМЖ к ауто/паракринным регуляторам, не вошел пока в рутинную клиническую практику. Можно ожидать, однако, что в ближайшее время интерес к исследованию РЭФР при РМЖ вновь возрастет в связи с тем, что на стадию клинических испытаний вышли препараты, специфически воздействующие на РЭФР [8], — моноклональные антитела к рецептору (цетуксимаб) и ингибиторы внутренней тирозинкиназы РЭФР, реализующей первый этап передачи митогенного сигнала (например, иресса).

Следует отметить, что до последнего времени «золотым стандартом» при исследовании РЭФР считалось радиолигандное определение в мембранной фракции тканей с использованием ¹²⁵I, меченного ЭФР, и разделением на гидроксилатаптите, однако все большее значение приобретает и иммуногистохимический метод, прежде всего вследствие его удобства и большей безопасности.

HER2/neu — мишень для специфической терапии. Определенный прорыв в области практического использования маркеров, связанных с РЭФР-зависимой регуляцией роста РМЖ, произошел после появления герцептина, представляющего собой гуманизированные антитела к HER2/neu — одному из тирозинкиназных рецепторов семейства erbB, к которому принадлежит и РЭФР [11]. Это одна из важнейших систем передачи митогенного сигнала в клетке. Помимо структуры, рецепторы семейства erbB различаются по относительной специфичности и сродству к различным общим лигандам (активирующим факторам). Основной особенностью всех рецепторных тирозинкиназ являются трансмембранная локализация и необходимость во взаимодействии с соответствующим лигандом для реализации киназной активности и последующих биологических эффектов. После активации в результа-

те связывания лигандов и димеризации внутренняя тирозинкиназа рецепторов активируется и приобретает способность фосфорилировать как сам рецептор, так и другие клеточные белки. Рецепторы семейства ErbB могут образовывать как гомо-, так и гетеродимеры, при этом во многих случаях наиболее активными являются гетероструктуры с участием рецептора HER2/neu — уникального представителя рассматриваемого семейства, который, не имея собственного лиганда и не взаимодействуя ни с одним из известных факторов роста, активирующих родственные рецепторы, является тем не менее ключевым звеном передачи митогенных сигналов всех ЭФР-подобных пептидов и необходим для успешного функционирования всей системы.

Блокирование HER2/neu может существенно замедлить или остановить рост опухолей, зависимых от подобных стимулов, однако эффективное использование биологически активных препаратов предусматривает предварительную оценку индивидуальной чувствительности больных к данному виду лечения. При применении герцептина общепринятым и наиболее адекватным методом оценки чувствительности является использование иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания опухолевых тканей на белок HER2/neu с последующей оценкой амплификации гена *c-erbB-2* методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) [16]. Как правило, менее дорогостоящее ИГХ-исследование проводится в качестве предварительного общего скрининга, а FISH используется в спорных случаях, когда ИГХ-метод не дает четко положительного или четко отрицательного ответа. Подобный подход хорошо зарекомендовал себя в лечении больных РМЖ, позволяя обеспечить максимальную эффективность лечения герцептином, избежав при этом неоправданных затрат на обследование.

Что касается прогностического значения гиперэкспрессии или амплификации гена *c-erbB-2*, то, несмотря на гигантский материал (к настоящему времени в разных лабораториях мира обследовано более 12 тыс больных РМЖ), единого мнения о прогностической ценности HER2/neu пока нет. Некоторые авторы отмечают его неблагоприятное влияние на безрецидивную выживаемость больных с ранними стадиями РМЖ, другие не находят достоверной взаимосвязи этих показателей [15]. Есть данные о том, что опухоли с амплифицированным геном HER2/neu слабо реагируют на эндокринную терапию, но чувствительны к последующей химиотерапии [13]. Считается также, что больным с HER2/neu-положительными опухолями следует рекомендовать более интенсивные режимы хи-

миотерапии, чем больным с опухолями, не имеющими повышенной экспрессии этого онкогена.

Наличие у HER-2/neu как внутриклеточной, так и экстраклеточной части приводит к тому, что в процессе димеризации возможны деградация молекулы рецептора и миграция его внешнего домена в межклеточную среду. Эта особенность и легла в основу разработки иммуноферментных систем для определения растворимого HER-2/neu в сыворотке или в плазме крови. Уже опубликованы результаты, свидетельствующие о перспективности этого направления [12], в первую очередь, для мониторинга эффективности лечения герцептином, тем не менее признается необходимость дальнейшего набора материала и выработки четких количественных критериев.

Система активации плазминогена — показатель метастатического потенциала РМЖ. Одно из фундаментальных свойств злокачественных опухолей — способность к метастазированию и инвазии. Важнейшим биохимическим механизмом этих процессов является разрушение окружающей базальной мембраны и внеклеточного матрикса ассоциированными с опухолью протеазами, центральное место в котором занимает протеолитический каскад активации плазминогена в опухолевой ткани [3, 10]. В многоступенчатой цепочке протеаз, ведущей к разрушению внеклеточного матрикса, ключевую позицию занимает активатор плазминогена урокиназного типа (uPA). Важную роль играет также находящийся на поверхности клеток рецептор uPA, поскольку при связывании с ним способность uPA активировать плазминоген увеличивается. В целом процесс образования плазмина представляет собой циклическую амплификацию, регулируемую по механизму обратной связи. Помимо uPA, в нем участвует также активатор тканевого типа (tPA), однако его роль при развитии опухолей, по-видимому, противоположна и сводится к разрушению опухолевых клеток и защите окружающих тканей. Активность uPA и tPA подавляется 2 белковыми ингибиторами, принадлежащими к семейству серпинов, — PAI-1 и PAI-2. Считается, что при опухолевом росте они также играют разную роль: PAI-1 защищает опухолевые клетки от саморазрушения, а PAI-2 тормозит протеолитические процессы во внеклеточном матриксе. Различные компоненты системы активации плазминогена в ткани РМЖ могут находиться как на самих опухолевых клетках, так и на фибробластах стромы, инфильтрирующих опухоль лимфоцитах и макрофагах, эндотелиальных клетках, поэтому можно считать, что процесс активации плазминогена носит преимущественно паракринный характер.

Уровень и соотношение экспрессии компонентов системы активации плазминогена в опухолевой ткани могут служить показателем метастатической и инвазивной активности опухоли, являясь вследствие этого биологически значимым фактором прогноза при злокачественных опухолях или показателем риска малигнизации доброкачественных новообразований. В достаточно репрезентативных и многочисленных исследованиях продемонстрирована высокая прогностическая значимость uPA и PAI-1 при РМЖ: риск рецидивирования или метастазирования даже при ранних стадиях заболевания возрастает в 1,5–3 раза, если уровень этих белков превышает определенные пороговые значения. Многофакторный анализ свидетельствует о том, что они являются независимыми факторами прогноза. В связи с этим определение uPA или PAI-1 может быть рекомендовано у больных с ранними стадиями РМЖ для выделения подгрупп с повышенным риском рецидивирования и(или) метастазирования, требующих более интенсивного лечения.

Наиболее адекватным методом оценки уровня экспрессии компонентов системы активации плазминогена в настоящее время считается количественное иммуноферментное определение концентрации этих белков в цитозолях тканей [6]. К сожалению, единые пороговые значения пока не установлены, хотя уже проводятся международные кооперированные исследования в этом направлении.

Фактор роста эндотелия сосудов — показатель активности неоангиогенеза. В последние годы большое внимание уделяется проблеме неоангиогенеза (формирования новых сосудов) в злокачественных опухолях. Уже не вызывает сомнения тот факт, что опухоль не может развиваться и расти без образования в ней разветвленной сети капилляров, обеспечивающих снабжение клеток кислородом и питательными веществами. Изучение молекулярных механизмов ангиогенеза позволило перейти от микроскопической оценки плотности сосудов в опухолевой ткани к исследованию конкретных молекул, участвующих в регуляции образования и роста новых сосудов. Важнейшим положительным регулятором ангиогенеза бесспорно является фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor — VEGF) [3]. Доказано, в частности, что VEGF играет ключевую роль в неоангиогенезе при РМЖ.

Результаты ряда ретроспективных клинических исследований свидетельствуют о том, что экспрессия VEGF при РМЖ имеет существенное значение для прогноза заболевания, а также влияет на чувствительность опухолей к гормо-

нальному и лекарственному лечению. Его высокий уровень свидетельствует о неблагоприятном прогнозе как при раннем, так и при распространенном РМЖ. Кроме того, в настоящее время активно создаются и исследуются новые препараты с антиангиогенными свойствами, и оценка активности VEGF-зависимого ангиогенеза может стать основой для их целенаправленного применения [14].

Попытки использовать показатели содержания VEGF в крови (как в сыворотке, так и в плазме) в качестве адекватной замены тканевой экспрессии этого белка при оценке активности ангиогенеза в РМЖ и прогнозировании исхода заболевания и(или) эффективности терапии до настоящего времени большого успеха не имели.

Таким образом, благодаря успехам биохимии, молекулярной биологии и биотехнологии в настоящее время в арсенале исследователей и клиницистов имеется огромное количество биологически значимых показателей, которые могут помочь в прогнозе раннего РМЖ и выборе адъювантной терапии при распространенном процессе. Тем не менее большинство молекулярных маркеров пока еще прочно не вошли в рутинную практику, что определяется высокой стоимостью подобных исследований и сложностью интерпретации данных одновременного анализа многих прогностических факторов. Для клинического использования международными организациями в настоящее время рекомендовано лишь несколько из них, эффективность и полезность которых имеют достаточно высокий уровень доказательности, а именно: 1) определение РЭ и РП у всех первичных больных для решения вопроса о целесообразности назначения эндокринной терапии; 2) оценка экспрессии (амплификации гена) HER2/neu у больных распространенным раком, если планируется лечение герцептином; 3) рассматривается также возможность определения опухолевой концентрации PAI-1 и/или uPA для выявления группы с повышенным риском рецидивирования и метастазирования среди больных с ранними стадиями процесса.

С появлением новых высокопроизводительных технологий, позволяющих одновременно в очень небольшом образце определять несколько десятков или даже тысяч показателей, особенно актуальными становятся выбор оптимального набора информативных тестов, который позволил бы при минимальной стоимости обследования обеспечить максимальную эффективность лечения каждого больного, а также разработка адекватного алгоритма интерпретации результатов этого комплексного анализа.

1. Герштейн Е.С., Андросова Л.А., Летягин В.П., Кушлинский Н.Е. Клиническое значение рецепторов эпидермального фактора роста у больных распространенным раком молочной железы: результаты 6-летнего наблюдения // Вестник Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН. — 2000. — №1. — С. 27—33.
2. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Тканевые маркеры как факторы прогноза при раке молочной железы. Практическая онкология: избранные лекции / Под ред. С.А. Тюляндина и В.М. Моисенко. — С.-Петербург: Центр ТОММ, 2004. — С. 41—50.
3. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Клинические перспективы исследования системы активации плазминогена при раке молочной железы // Вестник Российской академии медицинских наук. — 1999. — №8. — С. 58—61.
4. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С. Рецепторы эпидермального фактора роста при раке молочной железы: от эксперимента к клинике // Бюлл. эксп. биол. мед. — 1998. — Т.129. — С. 485—496.
5. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С. Роль фактора роста эндотелия сосудов при раке молочной железы // Бюлл. эксп. биол. мед. — 2002. — Т.133. — С. 521—528.
6. Benraad Th.J., Geurts-Moespot J., Grondal-Hansen J. et al. Immunoassays (ELISA) of urokinase-type plasminogen activator (uPA): report of an EORTC/BIOMED-1 Workshop // Eur. J. Cancer. — 1996. — Vol. 32A(8). — P. 1371—1381.
7. Chrapusta S.J., Giermek J., Pienkowski T. Long-term survival in primary breast cancer: correlation with estrogen and progesterone receptor assay results and adjuvant tamoxifen therapy // Med. Sci. Monit. — 2004. — Vol.10. — P. 577—586.
8. Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor // Clin. Cancer Res. — 2001. — Vol. 7(10). — P. 2958—2970.
9. Duffy M.J. Evidence for the clinical use of tumour markers // Ann. Clin. Biochem. — 2004. — Vol.41. — P. 370—377.
10. Duffy M.J., Duggan C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualized management of patients with cancer // Clin. Biochem. — 2004. — Vol. 37. — P. 541—548.
11. De Laurentiis M., Canello G., Zinno L. et al. Targeting HER2 as a therapeutic strategy for breast cancer: a paradigmatic shift of drug development in oncology // Ann. Oncol. — 2005. — Vol. 16 (Suppl 4). — P. 7—13.
12. Fornier M.N., Seidman A.D., Schwartz M.K. et al. Serum HER2 extracellular domain in metastatic breast cancer patients treated with weekly trastuzumab and paclitaxel: association with HER2 status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and with response rate // Ann. Oncol. — 2005. — Vol. 16. — P. 234—239.
13. Hamilton A., Piccart M. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: a review of the literature on HER-2, p53 and BCL-2 // Ann. Oncol. — 2000. — Vol. 11(6). — P. 647—663.
14. Harris A.L. Anti-angiogenesis therapy and strategies for integrating it with adjuvant therapy // Recent Results Cancer Res. — 1998. — Vol. 152. — P. 341—352.
15. Kaptain S., Tan L.K., Chen B. Her-2/neu and breast cancer // Diagn. Mol. Pathol. — 2001. — Vol. 10(3). — P. 139—152.
16. Wang S., Saboorian M.H., Frenkel E. et al. Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridisation assays // J. Clin. Pathol. — 2000. — Vol. 53(5). — P. 374—381.

П Р А В И Л А Д Л Я А В Т О Р О В

1. Статьи, направляемые в журнал «Маммология», должны быть представлены на дискете или CD-носителях (электронная версия) с распечаткой на бумаге (в 2 экз., через 2 интервала, шрифт — 14 пунктов; Times New Roman).
2. В выходных данных следует указать: название статьи, фамилию и инициалы всех авторов, название учреждения, город. Необходимо приложить рекомендацию руководителя учреждения, а в конце статьи — контактные телефоны и Ф.И.О. автора для связи.
3. Объем лекции и обзора литературы не должен превышать 10—12 стр., оригинальной статьи — до 8 стр. Список литературы — соответственно до 15 и 10 источников.
4. Если статья сопровождается рисунками и таблицами, обязательны ссылки на них в тексте. Электронный вариант рисунков должен быть выполнен в формате TIFF, JPG, CMYK, 300 dpi. Векторные иллюстрации — в формате EPS Adobe Illustrator 7.0—10.0. Каждая таблица должна быть пронумерована, в примечании к таблице расшифровываются все сокращения. Рисунки должны быть пронумерованы. На рисунке указываются: «верх», «низ», элементы рисунка — «а», «б» и т.д. Все сокращения и обозначения расшифровываются в подписи.
5. Список литературы приводится в алфавитном порядке (сначала работы, опубликованные на русском языке, затем — на иностранных): Ф.И.О. авторов, название книги или статьи, название журнала, год издания, том и номер выпуска, страницы. Цифровые ссылки в тексте на цитируемую литературу должны соответствовать порядковому номеру источника.
6. Буквенные сокращения в тексте допускаются только после полной расшифровки понятия.
7. Редакция оставляет за собой право сокращать и редактировать статьи.

Наш журнал приглашает авторов к активному сотрудничеству!