

Національна академія наук України
Міністерство охорони здоров'я України

**МАТРИЦЕЛЮЛЯРНІ ПРОТЕЇНИ ЯК МАРКЕРИ АГРЕСИВНОСТІ
ПЕРЕБІГУ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ
(методичні рекомендації)**

Київ 2023

Національна академія наук України
Міністерство охорони здоров'я України

«УЗГОДЖЕНО»

Голова ГО «Національна асоціація
онкологів України»



В.О. Зуб В.О. Зуб

12 грудня 2023 р.

**МАТРИЦЕЛЮЛЯРНІ ПРОТЕЇНИ ЯК МАРКЕРИ АГРЕСИВНОСТІ
ПЕРЕБІГУ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ
(методичні рекомендації)**

Київ – 2023

Установа-розробник:

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України

Укладачі:

Чехун Василь Федорович, д. мед. н., проф., академік НАН України	(044) 259-01-83
Лук'янова Наталія Юріївна, д. б. н., ст. д.	(044) 257-96-44
Тодор Ігор Миколайович, д. б. н., с. н. с.	(044) 257-96-44
Налескіна Леся Анатоліївна д. мед. н., проф.	(044) 257-96-44
Шепеленко Ірина Віталіївна, к. б. н.	(044) 257-96-44
Борікун Тетяна Вікторівна, к. б. н.	(044) 257-96-44
Задворний Тарас Володимирович, к. б. н.	(044) 257-96-44
Базась Володимир Миколайович, к. мед. н.	(044) 257-96-44
Кунська Любов Миколаївна	(044) 257-96-44
Павлова Анна Олександрівна	(044) 257-96-44
Мушій Олександр Михайлович	(044) 257-96-44

Рецензент:

Литвиненко Олександр Олександрович, д. мед. н., професор, завідувач відділу
радіоіндукованих онкологічних захворювань, ДУ «Національний науковий центр
радіаційної медицини НАМН України»

Рекомендовано:

Вченою радою Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України (протокол № 12 від 13 грудня 2023 р.)

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП.....	6
Матрицелюлярні протеїни як маркери агресивності перебігу раку молочної залози	8
Клінічна характеристика хворих на рак молочної залози.....	9
Дослідження експресії матрицелюлярних протеїнів у тканині раку молочної залози за допомогою імуногістохімічного методу	12
Зв'язок експресії матрицелюлярних білків з клініко-патологічними характеристиками раку молочної залози	12
ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	17

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

PMЗ	—	рак молочної залози
OPN	—	остеопонтин
ON	—	остеонектин
PE	—	рецептор естрогену
РП	—	рецептор прогестерону

ВСТУП

Незважаючи на численні дослідження та вагомі досягнення в галузі онкології, які пов'язані з розширенням знань про біологію та механізми розвитку злоякісних новоутворень, рак залишається найбільш актуальною проблемою сьогодення і розглядається у світі як значний соціально-економічний тягар.

Доведено, що прогноз перебігу пухлинного процесу в значній мірі залежить від своєчасного і, що не менш важливо, точного діагностування, що базується на об'єктивних показниках соматичного стану хворого та на біологічних характеристиках безпосередньо пухлини, таких як проліферативна активність, адгезивні властивості, інвазія, міграція клітин з поширенням в організмі і виникненням рецидивів та метастазів. Метастатичне прогресування раку є однією з головних клінічних проблем у всьому світі і безпосередньо пов'язане із смертністю пацієнтів, особливо це стосується агресивних форм гормонозалежного раку, до яких відноситься рак молочної залози (РМЗ). Як більшість інших солідних пухлин, РМЗ характеризується здатністю до метастазування у віддалені органи (легені, печінка, мозок), проте майже у 90% випадків відбувається метастазування в кістки опорно-рухового апарату, що є найбільш тяжким наслідком прогресування цього захворювання. Оскільки виявлення кісткових метастазів часто відбувається вже на симптоматичній стадії, а наявні біологічні маркери, у тому числі й молекулярні, не виправдовують бажаних очікувань, особливо при прогнозуванні ризику виникнення метастазів, дослідження останніх десятиріч спрямовані на пошуки більш досконалих і одночасно легко відтворюваних, доступних в клінічній практиці, молекулярно-біологічних маркерів прогнозу та оптимізації протипухлинної терапії.

Враховуючи зазначене, актуальним є пошук нових маркерів, які самостійно або у комплексі з іншими відомими показниками могли б розширити уявлення про механізми пухлинного росту і стати підґрунтям для оцінки ключових факторів прогресування захворювання.

В цьому аспекті актуальним є дослідження компонентів пухлинного

мікрооточення, які забезпечують біохімічний та біомеханічний сигналінг і привертають все більшу увагу як важливі біологічні фактори прогресування та метастатичної активності РМЗ.

Застосування запропонованого авторами комплексу маркерів пухлинного мікрооточення у вигляді матрицелюлярних білків сприятиме оптимізації та покращенню оцінки агресивності перебігу пухлинного процесу у хворих на РМЗ.

Методичні рекомендації розроблено за результатами досліджень, виконаних у межах державної тематики: “Роль маркерів ремоделювання кісткової тканини у формуванні ступеня злоякісності найбільш розповсюджених гормонозалежних новоутворень” (2019-2023 рр., № державної реєстрації 0118U005468);

Представлені рекомендації розраховані на лікарів-онкологів, зокрема онкомамологів.

Методичні рекомендації із зазначеним спектром матрицелюлярних білків, запропонованих в якості критеріїв оцінки агресивності перебігу пухлинного процесу хворих на РМЗ, видаються в Україні вперше.

Матрицелюлярні протеїни як маркери агресивності перебігу раку молочної залози

Натепер у клінічній практиці для прогнозування перебігу РМЗ та визначення тактики лікування використовують низку молекулярних маркерів та показників. Зокрема, для оцінки агресивності РМЗ прийнято використовувати такі молекулярно-біологічні характеристики новоутворень як експресія рецепторів стероїдних гормонів та епідермального фактору росту (рецептор естрогену (РЕ), рецептор прогестерону (РП) та Her2/neu, відповідно), проліферативна активність (експресія Ki-67) та/або адгезивні властивості (експресія CD24, CD44, E- та N-кадгерини), які розглядаються в комплексі із даними щодо метастатичного ураження, гістологічного типу та ступеня диференціювання пухлини. Проте, застосування в рутинній практиці зазначеного комплексу клініко-лабораторних показників не є достатньо інформативним, навіть у пацієнтів з однаковим ступенем розповсюдженості пухлинного процесу, що часто призводить до хибної оцінки ступеня злоякісності новоутворень та відображається на ефективності терапії хворих на РМЗ.

Накопичені останніми роками дані дозволяють розглядати пухлинне мікрооточення, як ключовий фактор, що бере участь у регуляції процесів проліферації, міграції та інвазії. Важливим білковим компонентом екстрацелюлярного матриксу у складі мікрооточення є матрицелюлярні протеїни, які експресують як пухлинні, так і стромальні клітини. Матрицелюлярні протеїни виконують регуляторну роль в ангіогенезі, імуномодуляції, інфільтрації та проліферації стромальних клітин. Високі рівні експресії деяких матрицелюлярних білків асоціюються із агресивним перебігом пухлинного процесу злоякісних новоутворень різного генезу.

Згідно даних експериментальних та клінічних досліджень останніх років, важливу роль у прогресії РМЗ відіграють такі матрицелюлярні протеїни як остеопонтин (OPN) та остеонектин (ON).

OPN – цитокін-подібний кальцій зв'язуючий, фосфорильований кислий

глікопротеїн, що належить до родини "малих інтегрин-зв'язуючих глікопротеїнів". Він відіграє важливу функціональну роль у багатьох процесах, включно із запаленням, клітинною адгезією, міграцією, диференціюванням, виживанням клітин та апоптозом, а також регуляції мінералізації кісткової тканини. Встановлено, що показники експресії OPN у пухлинній тканині корелюють із прогресією і метастатичною активністю злоякісних новоутворень різного генезу.

ON – це багатий на цистеїн кислий секретований протеїн, що належить до кальцій-зв'язуючих глікопротеїнів. Він експресується у кістковій тканині остеобластами та, завдяки здатності до зв'язування з іонами кальцію та молекулами колагену, сприяє процесам мінералізації. Окрім колагену, ON може зв'язуватись і з іншими елементами міжклітинного матриксу, в тому числі. інтегрином та інтегрин-зв'язаною кіназою, що свідчить про участь цього протеїну у процесах перебудови міжклітинного матриксу. При пошкодженнях та запальних процесах ON відіграє важливу роль у регуляції клітинної адгезії (протиадгезивний фактор), проліферації, міграції та ремоделюванні тканин. Загалом, в мінералізованих тканинах ON є найпоширенішим неколагеновим білком.

Отже, визначення матрицелюлярних білків та використання їх в якості критеріїв оцінки агресивності перебігу пухлинного процесу у хворих на РМЗ є актуальним і перспективним напрямком досліджень.

Клінічна характеристика хворих на рак молочної залози

Методичні рекомендації ґрунтуються на аналізі результатів клінічного обстеження і лікування 121 пацієнтки, які знаходились на стаціонарному лікуванні у КНП «Київський міський клінічний онкологічний центр» протягом 2015–2019 рр. і дали інформовану згоду на використання клінічних даних у наукових цілях. Стадію пухлинного процесу визначали згідно з Міжнародною класифікацією пухлин (TNM 8 видання, 2016 р.).

Згідно з даними історій хвороби, усім пацієнткам проведені загальні клінічні, біохімічні, лабораторні обстеження, ультразвукове дослідження органів черевної

порожнини, мамографію, рентгеноскопію органів грудної порожнини, пункційну біопсію пухлин молочної залози за Стандартами діагностики і лікування онкологічних хворих, затверджених Наказом МОЗ України № 396 від 30.06.2015 р. Неоад'ювантну терапію хворим на РМЗ I-II стадій не призначали. Всім пацієнткам проведено хірургічне лікування (квадрантектомія або лампектомія з регіональною лімфодисекцією, радикальна мастектомія за Маденом). В ад'ювантному режимі проводили поліхіміотерапію за схемами: CMF (циклофосфамід + метотрексат + флуороурацил), CAF (циклофосфамід + доксорубіцин + флуороурацил), 4-6 курсів; променеву терапію на післяопераційний рубець та зони регіонарного метастазування у сумарній дозі 42-44 Гр. Хворим із позитивною експресією гормональних рецепторів у видаленій пухлині молочної залози на тривалий час призначали гормональну терапію за прийнятими схемами (тамоксифен, інгібітори ароматази) залежно від індивідуальних клінічних даних. Тривалість подальшого спостереження за пацієнтками становила 63 місяці.

Дослідження експресії OPN та ON для прогнозування агресивності перебігу РМЗ проведено на первинних пухлинах 88 хворих I-II стадій, загальна клінічна характеристика яких подана у Табл. 1.

Таблиця 1. Клініко-патологічна характеристика хворих на РМЗ I-II стадій

Показник	Кількість хворих	
	N	%
Загальна кількість хворих	88	100
Вік хворих (роки)		
Середній	52,5±6,3	
Коливання віку	28-89	
Категорія T за TNM		
T1	31	35,2
T2	57	64,8
Категорія N за TNM		
N0	52	59,1
N1	36	40,9
Ступінь диференціювання		
G1 (високий)	22	25,0
G2 (помірний)	52	59,1
G3 (низький)	14	15,9
Молекулярний підтип		

Люмінальний А	33	37,5
Люмінальний Б	36	40,9
Базальний	19	21,6

Оцінку значення експресії OPN та ON для прогнозування ризику виникнення метастатичного ураження кісток здійснено на матеріалі первинних пухлин 33 хворих на РМЗ II-III стадії, загальна клінічна характеристика яких представлена у Табл. 2.

Таблиця 2. Клініко-патологічна характеристика хворих на РМЗ II-III стадій

Показник	Кількість хворих	
	N	%
Загальна кількість хворих	33	100
Вік хворих (роки)		
Середній	59,5±7,6	
Коливання віку	34-91	
Категорія T за TNM		
T1	3	9,1
T2	21	63,6
T3	9	27,3
Категорія N за TNM		
N0	6	18,2
N1	27	81,8
Рецидив у вигляді метастазів у кісткову тканину		
M0	15	45,5
M1	18	54,5
Ступінь диференціювання		
G1 (високий)	4	12,1
G2 (помірний)	18	54,5
G3 (низький)	11	33,4
Молекулярний підтип		
Люмінальний А	6	18,2
Люмінальний Б	15	45,5
Базальний	12	36,3

Дослідження експресії матрицелюлярних протеїнів у тканині раку молочної залози за допомогою імуногістохімічного методу

Імуногістохімічне дослідження експресії матрицелюлярних протеїнів у клітинах РМЗ проводили на парафінових зрізах (4-5 мікронів) біопсійного та операційного матеріалу з використанням стандартного стрептавідин—біотин—пероксидазного методу.

Аналіз результатів проводили шляхом підрахунку імунопозитивних клітин (коричневе забарвлення цитоплазми та/або ядер) при збільшенні $\times 100-400$.

Кількісну оцінку експресії досліджених маркерів у тканині РМЗ проводили шляхом підрахунку імунопозитивних клітин за методом H-Score:

$$S = 0 \times N_0 (\%) + 1 \times N_1 (\%) + 2 \times N_2 (\%) + 3 \times N_3 (\%), \text{ де}$$

S – показник «H-Score»,

N_0 – кількість клітин з відсутньою експресією,

N_1+ , N_2+ та N_3+ – кількість клітин з низькою, середньою та високою експресією, відповідно.

Кінцевий результат підрахунку виражали у балах:

від 1 до 100 балів – низький, від 101 до 200 балів – середній та від 201 до 300 балів — високий рівень експресії.

Зв'язок експресії матрицелюлярних білків з клініко-патологічними характеристиками раку молочної залози

Для визначення прогностичного значення та можливості використання матрицелюлярних протеїнів у якості маркерів агресивності перебігу пухлинного процесу проведено імуногістохімічне дослідження рівня експресії OPN та ON в тканині РМЗ.

Аналіз результатів імуногістохімічного дослідження дозволив встановити, що тканина РМЗ характеризується помірними показниками експресії матрицелюлярних білків. Зокрема, рівень експресії OPN та ON у клітинах РМЗ

становили відповідно $176,2 \pm 12,3$ та $184,5 \pm 9,6$ балів H-Score.

Достовірно вищий рівень OPN та ON зафіксовано у тканині РМЗ хворих з метастазами у регіонарних лімфатичних вузлах (Рис. 1). Так, рівень експресії OPN у пухлинній тканині цієї категорії хворих становив $194,3 \pm 12,3$ бали H-Score, що на 25,1% ($p < 0,05$) більше ніж у хворих без метастазів ($155,2 \pm 11,0$ бали H-Score), в той час як рівень експресії ON у тканині РМЗ хворих з метастазами в лімфатичних вузлах був на 17,0% ($p < 0,05$) вищий порівняно із пацієнтами, у яких метастази в регіонарних лімфатичних вузлах були відсутні ($168,5 \pm 7,7$ бали H-Score) і складав $198,6 \pm 8,3$ бали H-Score. Не виявлено залежності показників експресії обох досліджених матрицелюлярних протеїнів від категорії Т за класифікацією TNM (Рис. 1).

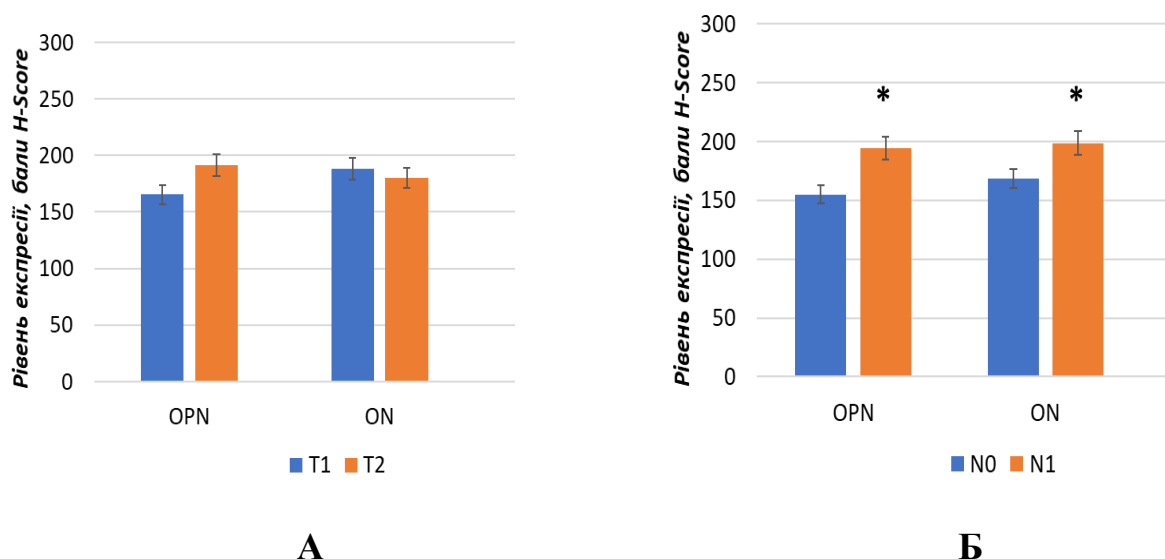


Рис. 1. Залежність показників експресії матрицелюлярних маркерів у тканині РМЗ від категорій Т (А) та N (Б) за TNM-класифікацією.

Примітка. * – достовірність різниці по відношенню до групи порівняння ($p < 0,05$)

Достовірно вищі рівні експресії OPN та ON також ідентифіковано у тканині низькодиференційованого РМЗ порівняно з пухлинами помірного та високого ступеня диференціювання. Так, рівні експресії OPN та ON у хворих на РМЗ із пухлинами низького ступеня диференціювання становили $195,0 \pm 12,3$ та $215,2 \pm 9,7$ балів H-Score відповідно та були на 25,0% ($p < 0,05$) та 31,0% ($p < 0,05$) вище у

порівнянні із аналогічними показниками у пацієток із високодиференційованими пухлинами (Рис. 2).

Встановлено, що у пацієток з РМЗ базального молекулярного підтипу рівні експресії OPN та ON у пухлинній тканині були більшими на 12% та 13,4% ($198,0 \pm 10,6$ та $205,6 \pm 8,8$ балів H-Score) ніж при люмінальному Б молекулярному підтипі ($174,3 \pm 9,6$ та $178,3 \pm 9,3$ балів H-Score, відповідно), та на 22,5% та 17,2% відповідно вищими порівняно з тканиною люмінального А підтипу ($153,6 \pm 12,2$ та $170,4 \pm 9,5$ балів H-Score).

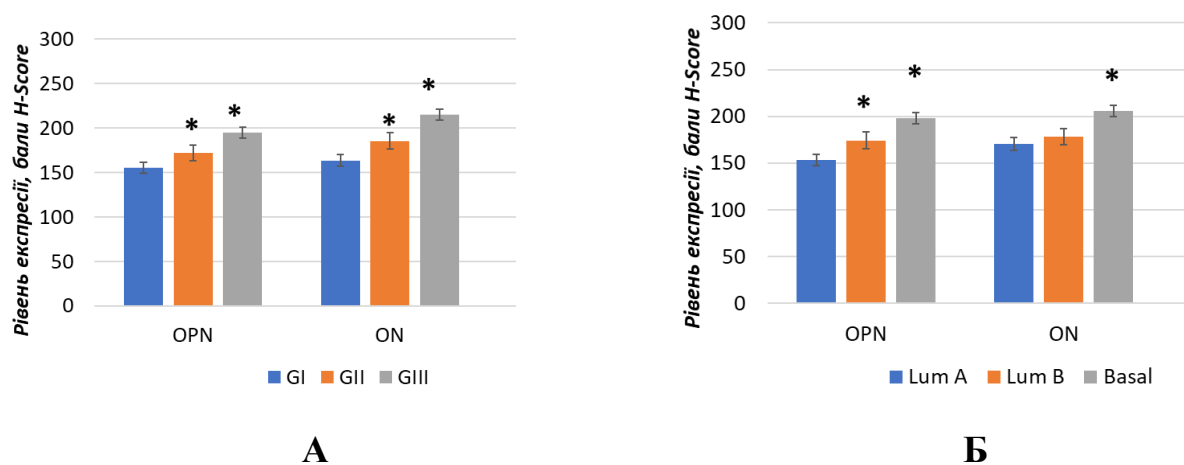


Рис. 2. Залежність показників експресії матрицелюлярних маркерів у тканині РМЗ від ступеня диференціювання новоутворень (А) та молекулярного підтипу (Б). *Примітка.* * – достовірність різниці по відношенню до групи порівняння ($p < 0,05$)

Отже, на підставі аналізу показників експресії OPN та ON у тканині РМЗ залежно від основних клініко-патологічних характеристик пухлинного процесу визначено зв'язки із наявністю метастазів в регіонарних лімфатичних вузлах, ступенем диференціювання та молекулярним підтипом новоутворень.

Дослідження зв'язку експресії матрицелюлярних протеїнів із ризиком віддаленого метастазування РМЗ дозволило встановити той факт, що у пухлинній тканині хворих, у яких протягом 3 років розвинулись метастази у кістки скелету рівні експресії OPN та ON становили $194,0 \pm 12,3$ і $198,6 \pm 8,3$ балів H-Score, що на 30% і 50% вище порівняно з новоутвореннями пацієток з місцево поширеним РМЗ (Табл. 3.).

Таблиця 3. Асоціація матрицелюлярних маркерів у пухлинній тканині хворих на РМЗ із ризиком виникнення віддалених метастазів

	Рівень експресії, H-Score	
OPN	M0	149,2±9,5
	M1	194,0±12,3*
ON	M0	132,4±7,8
	M1	198,6±8,3*

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно із хворими без віддалених метастазів

Враховуючи отримані дані щодо зв'язку експресії ON та OPN з такими показниками агресивності пухлинного процесу як стадія, наявність метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів та молекулярний підтип новоутворень, проаналізовано загальну 5-річну виживаність хворих на РМЗ з урахуванням показників експресії зазначених матрицелюлярних маркерів у пухлинній тканині.

Як видно з даних, наведених на Рис. 3, пацієнтки із високими значеннями експресії OPN у тканині РМЗ мали на 20,1% достовірно нижчі ($p=0,0474$) показники загальної виживаності порівняно із хворими з низькими рівнями експресії OPN.

Статистично значущої різниці у показниках загальної 5-річної виживаності хворих на РМЗ залежно від експресії ON у пухлинній тканині не виявлено.

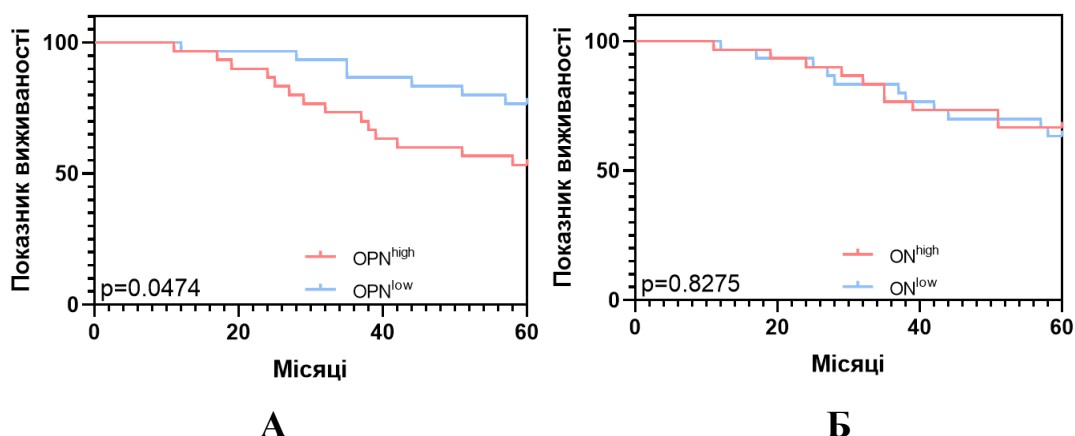


Рис. 3. Загальна 5-річна виживаність хворих на РМЗ в залежності від рівня експресії остеопонтину (А) та остеонектину (Б) у пухлинній тканині .

ВИСНОВКИ

1. Впровадження запропонованого комплексу маркерів пухлинного мікрооточення у вигляді матрицелюлярних білків (остеопонтин та остеонектин) у діагностичну та прогностичну практику сприятиме якісному покращенню процесу оцінки агресивності перебігу пухлинного процесу у хворих на РМЗ та дозволить підвищити ефективність їх лікування.

2. Зафіксовано зростання експресії ON та OPN у тканині РМЗ хворих із метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів (на 17,0% та 25,1% відповідно), базального молекулярного підтипу (на 17,2% та 22,5% відповідно) та низького ступеня диференціювання (на 31,0% та 25,0% відповідно) порівняно із пухлинною тканиною пацієнтів з негативним статусом регіонарних метастазів, люмінального підтипу та високого ступеня диференціювання.

3. У хворих на РМЗ, у яких протягом 3 років діагностовано розвиток віддалених метастазів у кістки скелету показники експресії OPN та ON у пухлинній тканині є достовірно більшими (на 30,0% та 50,0%, відповідно) порівняно із новоутвореннями у пацієнток без відділених метастазів.

4. Загальна 5-річна виживаність хворих на РМЗ є достовірно меншою (на 20,1%) за наявності високого рівня експресії OPN у пухлинній тканині

5. Застосування комплексу матрицелюлярних білків (остеопонтин та остеонектин) в якості прогностичних маркерів перебігу РМЗ сприятиме можливості підвищення виживаності на 7,9% та покращанню якості життя пацієнток на 12%.

ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ferlay J., Ervik M., Lam F., et al. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, accessed [11/06/2021].
2. Wu, X., Li, F., Dang, L., et al. (2020). RANKL/RANK System-Based Mechanism for Breast Cancer Bone Metastasis and Related Therapeutic Strategies. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 76. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00076>
3. Monteran, L., Ershaid, N., Sabah, I., et al. (2020). Bone metastasis is associated with acquisition of mesenchymal phenotype and immune suppression in a model of spontaneous breast cancer metastasis. *Scientific reports*, 10(1), 13838. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70788-3>
4. Ney, J. T., Fehm, T., Juhasz-Boess, I., et al. (2012). RANK, RANKL and OPG Expression in Breast Cancer - Influence on Osseous Metastasis. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 72(5), 385–391. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1298276>
5. Elfar, G. A., Ebrahim, M. A., Elsherbiny, N. M., et al. (2017). Validity of Osteoprotegerin and Receptor Activator of NF- κ B Ligand for the Detection of Bone Metastasis in Breast Cancer. *Oncology research*, 25(4), 641–650. <https://doi.org/10.3727/096504016X14768398678750>
6. Chiechi A., Guise Th.A. (2016). Pathobiology of Osteolytic and Osteoblastic Bone Metastases. *Metastatic Bone Disease*, 15-35. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5662-9_2