

Остеопротегерин как прогностический маркер течения рака молочной железы

С.И. Заброта¹, Е.А. Маслокова¹, Л.И. Корытова¹, К.М. Пожариский¹, Г.А. Раскин¹, О.В. Корытов²

¹ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздрава России; Россия, 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 70;

²ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны России; Россия, 195009, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

Контакты: Сергей Иванович Заброта zabrodasergey@yandex.ru

Несмотря на значительный прогресс в исследовании рака молочной железы (РМЖ) с учетом разделения на молекулярные подтипы, механизмы образования метастазов у больных РМЖ остаются до конца не изученными, особенно при наличии благоприятного прогноза. Изучение новых информативных диагностических и прогностических маркеров по-новому представляет современные проблемы патологии РМЖ.

Работа посвящена изучению уровня экспрессии остеопротегерина (OPG) в клетках опухоли у больных РМЖ. В исследование были включены 83 пациентки с местно-распространенным РМЖ (T2–4N0–3M0), получавшие лечение с 2003 по 2010 г. Критериями включения являлись: гистологически подтвержденный диагноз инвазивного РМЖ, возраст старше 18 лет, ECOG 0 или 1. В целях изучения уровня OPG проводилось иммуногистохимическое исследование по стандартному протоколу на срезах биопсийного материала. Антитело к OPG использовалось фирмы GeneTex, было кроличьим поликлональным, разведение 1:1000, инкубация 30 мин; система визуализации – Real EnVision, anti-rabbit (фирма DAKO, Дания). Оценка иммуногистохимического окрашивания осуществлялась путем подсчета числа позитивных клеток относительно общего числа опухолевых клеток. Экспрессия более чем 50 % клеток расценивалась как высокая, менее 50 % – низкая. Среднее значение уровня экспрессии OPG составило 49 %, медиана – 50 %. Минимальное значение – 0 %, максимальное – 90 %. По уровню экспрессии больные были разделены на 2 группы: 1-я – с высокой экспрессией OPG (high) (больше медианы), 2-я – с низкой экспрессией OPG (low) (меньше медианы). В группу OPG (high) вошли 47 пациенток, в группу OPG (low) – 36. При анализе клинико-патологических характеристик больных РМЖ с учетом экспрессии OPG не было отмечено каких-либо достоверных различий в отношении наличия или отсутствия пораженных регионарных лимфатических узлов, категории T и индекса Ki-67. В группе с положительными эстроген-прогестероновыми рецепторами высокие значения OPG встречались достоверно чаще, чем в группе с отрицательными рецепторами ($p < 0,05$). Анализируя продолжительность времени до прогрессирования и общей выживаемости, установлено, что имеет место различие в выживаемости и времени до прогрессирования (возникновения метастазов) у пациентов с низким уровнем OPG по сравнению с аналогичными показателями у больных с высоким OPG.

Ключевые слова: остеопротегерин, рак молочной железы, прогрессирование (метастазы), рецептор-активатор ядерного фактора каппа-В, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В

DOI: 10.17650/1994-4098-2015-1-12-17

Osteoprotegerin as a predictive marker of the course of breast cancer

S.I. Zabroda¹, E.A. Maslyukova¹, L.I. Korytova¹, K.M. Pozharisskiy¹, G.A. Raskin¹, O.V. Korytov²

¹Russian Research Center of Radiology and Surgery Technologies, Ministry of Health of Russia; 70 Leningradskaya St., village Pesochny, Saint-Petersburg, 197758, Russia;

²S.M. Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense of Russia; 6 Akademika Lebedeva St., Saint-Petersburg, 195009, Russia

Despite the considerable progress in research of breast cancer (BC), taking into consideration the division into molecular subtypes, the mechanics of metastasis development in BC patients are not definitely investigated, especially at favorable prognosis. Research of new informative diagnostic and prognostic markers represents the modern problems of BC pathology in a new way.

This paper is devoted to study of osteoprotegerin (OPG) expression levels in tumor cells in BC patients. The study covered 83 female patients with regional BC (T2–4N0–3M0), treated from 2003 to 2010. The inclusion criteria were histologically proved diagnosis of invasive BC, age over 18 y. o., ECOG 0 or 1. In order to study OPG levels, we carried out immune histochemical test, which was carried out according to standard protocol on the sections of biopsy material. The OPG antibody from GeneTex, used in the study, was rabbit polyclonal, dilution 1:1000, incubation time – 30 minutes. Visualization system was Real EnVision, anti-rabbit (by DAKO, Denmark). Immunohistochemical staining was studied by counting of number of positive cells in reference to total number of malignant cells. Expression over 50 % of cells was regarded as high, less than 50 % – as low. Average value of OPG expression level was 49 %, median – 50 %. Minimal value – 0 %, maximum value – 90 %. The patients were divided into 2 groups according their expression levels: Group 1 – OPG (high) expression (more than median), Group 2 – OPG (low) expression (less than median). OPG (high) Group was made by 47 patients, OPG (low) Group – by 36. When analyzing clinical and pathological characteristics of BC patients, taking into consideration OPG expression, there were noticed no reliable differences with respect to availability

or absence of affected regional lymph nodes, category T and Ki-67 indice. The group with positive estrogen-progesteron receptors showed reliably more often the high values of OPG than the group with negative receptors ($p < 0,05$). When analyzing the duration till the progression and overall survival, a difference between the survival and time to progression (rise of metastases) in patients with low OPG levels and the same exponents in patients with high OPG levels was established.

Key words: osteoprotegerin, breast cancer, progression (metastases), receptor activator for nuclear factor kappa-B, receptor activator for nuclear factor kappa-B ligand

Введение

Открытие белков рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В (RANK), остеопротегерина (OPG), лиганда RANK (RANKL) в конце 1990-х годов, изучение их роли в ремоделировании нормальной костной ткани привели впоследствии к пониманию механизма формирования костных метастазов злокачественных опухолей. Однако молекулярные механизмы метастатического поражения скелета остаются до настоящего времени недостаточно изученными. У больных раком молочной железы (РМЖ) костные метастазы встречаются в 65–75 % случаев [1]. В последние годы важность изучения этих белков, в частности их роли в регулировании метаболизма костей, значительно увеличилась. Кости – ткань со сложной структурой, что позволяет ей выполнять несколько механических и метаболических функций. В целях поддержания этих функций в организме костная ткань находится в состоянии постоянного ремоделирования. Во время этого процесса остеокласты деминерализуют и подвергают резорбции «старые кости», а остеобласты, в свою очередь, формируют новую костную ткань [2].

Молекулярно-биологические исследования привели к более глубокому пониманию механизмов работы белков, участвующих в резорбции костной ткани. Этот процесс контролируется системой из 3 ключевых белков: RANK, RANKL и «приманивающего» рецептора OPG [3].

RANKL активирует RANK на поверхности остеокластов и их предшественников, что приводит к увеличению пула этих клеток и усилению резорбции кости. OPG является секретируемым рецептором, связывающим RANKL и блокирующим его функцию, и таким образом оказывающим негативное воздействие на резорбцию [4]. RANKL и OPG экспрессируются остеобластами и стромальными клетками костного мозга, причем баланс между двумя этими факторами находится под контролем множества цитокинов [5] (рис. 1, 2).

Изменения в соотношении RANKL/RANK/OPG регистрировались в спектре различных заболеваний костной системы, характеризующихся чрезмерной активностью остеокластов, в том числе остеопороза, ревматоидного артрита и метастазов в кости у больных РМЖ, раком предстательной железы и у пациентов с миеломной болезнью. RANKL/RANK/OPG-система не ограничивается костной тканью, а наблюдается также и в других органах, в том числе в молоч-

ной железе, легких, головном мозге, почках и хрящах. Кроме того, система RANKL/RANK/OPG является дисрегулятором в опухолях, таких как РМЖ, злокачественные новообразования костей, множественная миелома, хондробластома, нейробластома и плоскоклеточный рак [2].

Несмотря на значительный прогресс в исследовании РМЖ с учетом разделения на молекулярные подтипы, механизмы образования метастазов у больных РМЖ остаются до конца не изученными, особенно при наличии благоприятного прогноза. Изучение

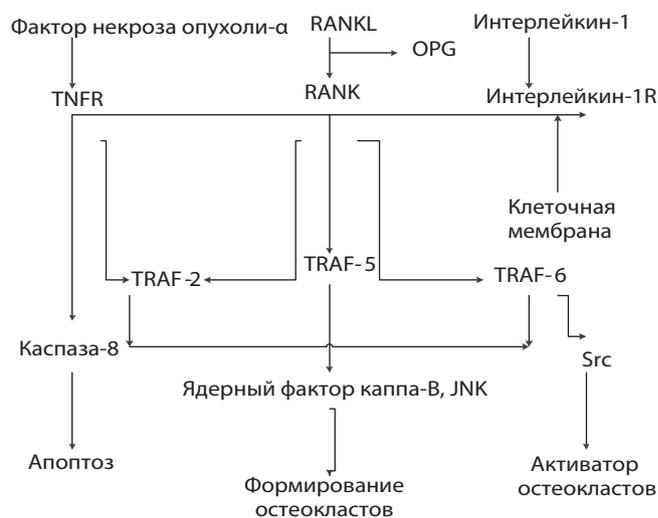


Рис. 1. Схематическое изображение связывания сигнальных путей RANK–RANKL; указание ингибирования RANK–RANKL-путей, связанных с OPG

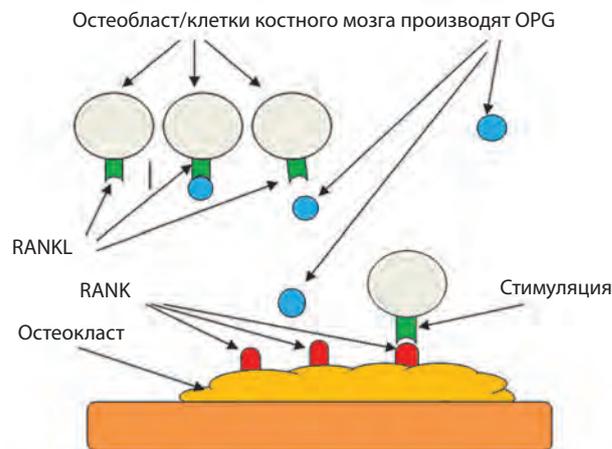


Рис. 2. Схематическое представление OPG–RANK–RANKL-пути

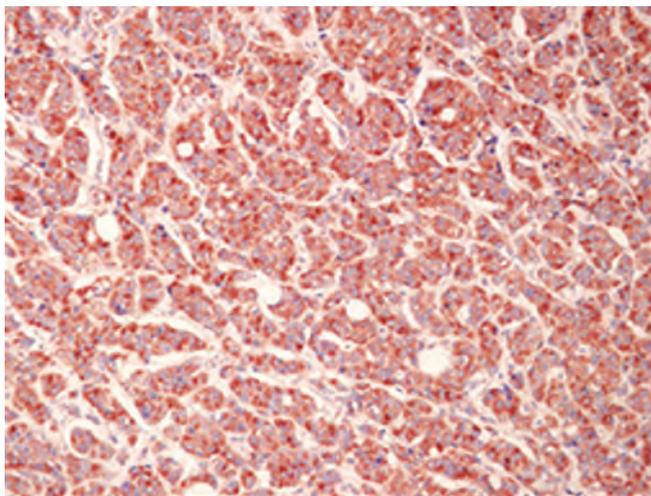


Рис. 3. Положительная экспрессия OPG: 90 % позитивных клеток относительно общего числа опухолевых клеток

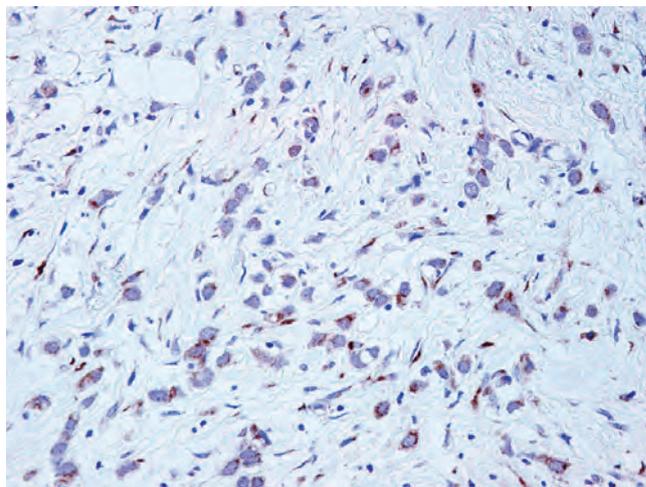


Рис. 5. Положительная экспрессия OPG: 50 % позитивных клеток относительно общего числа опухолевых клеток

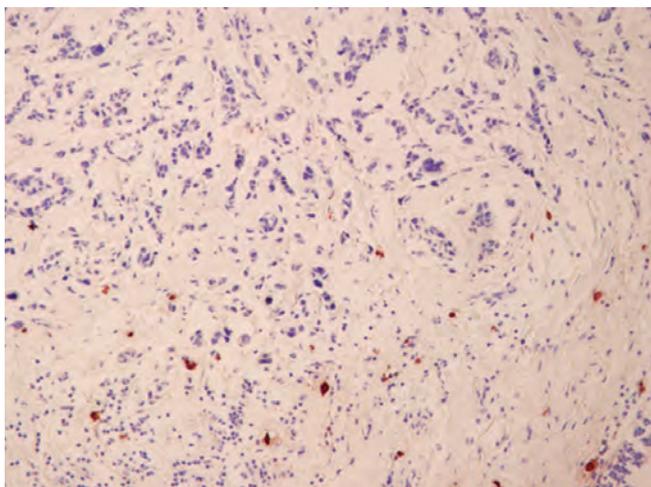


Рис. 4. Отрицательная экспрессия OPG: 0 % позитивных клеток относительно общего числа опухолевых клеток

новых информативных диагностических и прогностических маркеров по-новому представляет современные проблемы патологии РМЖ.

Цель работы – исследование влияния степени экспрессии OPG в опухолевых клетках на время до прогрессирования (возникновение метастазов) и выживаемость больных РМЖ с иммуногистохимическими особенностями опухоли.

Материалы и методы

В настоящей работе был исследован уровень экспрессии OPG в биопсийном материале у больных РМЖ. Авторы оценили и сравнили уровень экспрессии OPG с рядом известных морфологических и иммуногистохимических факторов.

В исследование были включены 83 пациентки с местно-распространенным РМЖ (T2–4N0–3M0), получавшие лечение с 2003 по 2010 г. Критериями включения являлись: гистологически подтвержденный

диагноз инвазивного РМЖ, возраст старше 18 лет, ECOG 0 или 1. Для анализа использовали иммуногистохимическое окрашивание первичной опухоли, полученное в результате биопсии. Клинический материал изучали ретроспективно.

В целях изучения уровня OPG проводилось иммуногистохимическое исследование, которое выполнялось по стандартному протоколу на срезах биопсийного материала. Антитело к OPG использовалось фирмы GeneTex, было кроличьим поликлональным, разведение 1:1000, инкубация 30 мин; система визуализации Real EnVision, anti-rabbit (фирмы DAKO, Дания). Оценка иммуногистохимического окрашивания осуществлялась путем подсчета числа позитивных клеток относительно общего числа опухолевых клеток. Экспрессия более чем 50 % клеток расценивалась как высокая, менее 50 % – низкая (рис. 3–5).

Цитологически опухоль в основном состояла из пролиферирующих опухолевых клеток разной дифференцировки. Опухолевые клетки, имеющие OPG, окрашивались коричневым цветом (см. рис. 3–5).

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 12. Для сравнения клинико-патологических характеристик среди групп OPG (high) и OPG (low) использовались критерий χ^2 , тесты Фишера и Вилкоксона. Общая выживаемость (ОВ) была определена как продолжительность жизни (в месяцах) между датой постановки диагноза и датой смерти. Для построения кривых выживания применяли метод Каплана–Майера, а тесты Фишера и Вилкоксона – для оценки статистических различий между этими двумя группами; $p < 0,005$ считалось статистически достоверным.

Результаты

Среднее значение уровня экспрессии OPG составило 49 %, медиана – 50 %. Минимальное значение –

0 %, максимальное – 90 %. По уровню экспрессии больные были разделены на 2 группы: 1-я – с высоким OPG (high) (больше медианы), 2-я – с низкой экспрессией OPG (low) (меньше медианы). В группу OPG (high) вошли 47 пациенток, в группу OPG (low) – 36.

Большинство больных в обеих группах (81,9 %) имели гормоноположительные опухоли и относились к люминальным типам А и В. Пролиферативный индекс Ki-67 в группе OPG (high) колебался в интервале от 2 до 60 %, среднее значение составило 17,93 %. В группе больных OPG (low) минимальное значение Ki-67 составило 1 %, максимальное – 90 %, среднее – 19,3 %. В группах больных OPG (high) и OPG (low) низкие и высокие значения пролиферативного индекса (Ki-67 ≤ 14 %; Ki-67 > 14 %) встречались с одинаковой частотой ($p = 0,429$).

При анализе клинико-патологических характеристик больных РМЖ с учетом экспрессии OPG не было отмечено каких-либо достоверных различий в отношении наличия или отсутствия пораженных регионарных лимфатических узлов, категории Т и индекса Ki-67. Подтипы РМЖ были разделены на люминальный А, люминальный В, HER-2-положительный люминальный, ErbB-2 нелюминальный и трижды негативный, согласно рекомендациям Санкт-Галлена (2011) [6].

Однако на основе ранжирования выявлена следующая закономерность: наиболее высокие значения экспрессии OPG с достоверной вероятностью встречались в группе HER-2 люминального рака ($p = 0,012$) по сравнению со всеми другими молекулярными подтипами (таблица, рис. 6). В группе с положительными эстроген-прогестероновыми рецепторами высокие значения экспрессии OPG встречались достоверно чаще, чем в группе с отрицательными рецепторами; $p < 0,05$ (рис. 7).

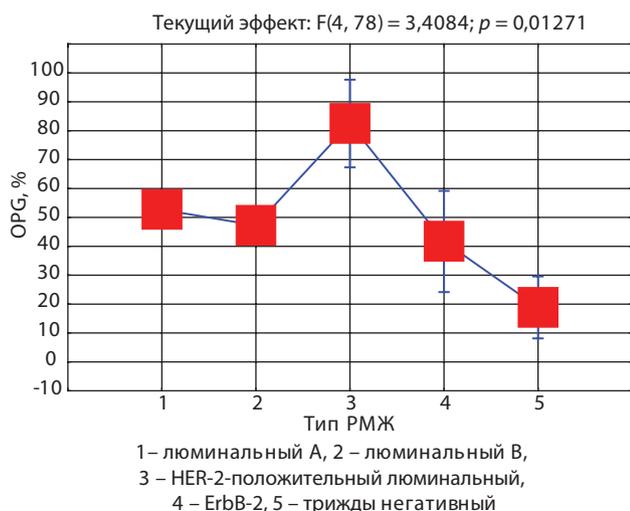


Рис. 6. HER-2 люминальный тип РМЖ представлен высоким уровнем OPG по сравнению с другими молекулярными подтипами

Клинико-патологические характеристики больных РМЖ

Характеристика	OPG (high)	OPG (low)	p
Возраст, лет			
< 50	13	12	0,576
> 50	34	24	
Стадия Т			
T1	9	5	0,908
T2	23	16	
T3	7	7	
T4	8	8	
Статус лимфоузлов			
N(+)	34	30	0,237
N(-)	13	6	
Гистологический тип протоковый	46	31	0,207
дольковый	2	4	
Люминальный А	27	16	0,012
Люминальный В	13	12	
HER-2 люминальный	4	0	
ErbB-2	1	2	
Трижды негативный	2	6	
Степень РМЖ			
I или II	41	34	0,27
III	6	2	
Ki-67			
> 14 %	25	16	0,429
≤ 14 %	22	20	

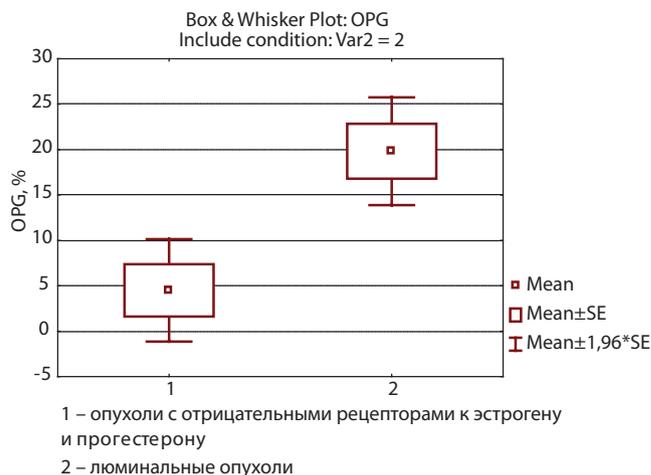


Рис. 7. Средние значения OPG у больных РМЖ с отрицательными и положительными рецепторами к эстрогену и прогестерону

Анализ зависимости времени до возникновения метастазов от уровня экспрессии OPG показал достоверное уменьшение времени до прогрессирования заболевания при низкой экспрессии OPG (low) у больных РМЖ по сравнению с группой больных с высокой экспрессией OPG (high) (рис. 8). Достоверность подтверждалась тестом Cox's F-Test ($p = 0,03913$).

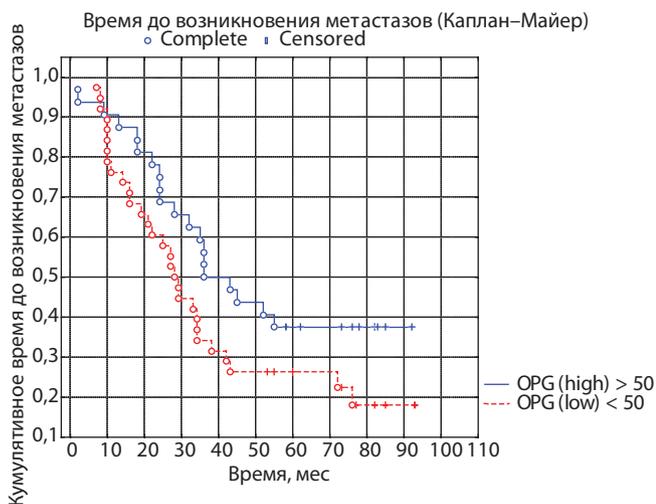


Рис. 8. Время до прогрессирования (возникновения метастазов) у больных РМЖ в зависимости от уровня экспрессии OPG

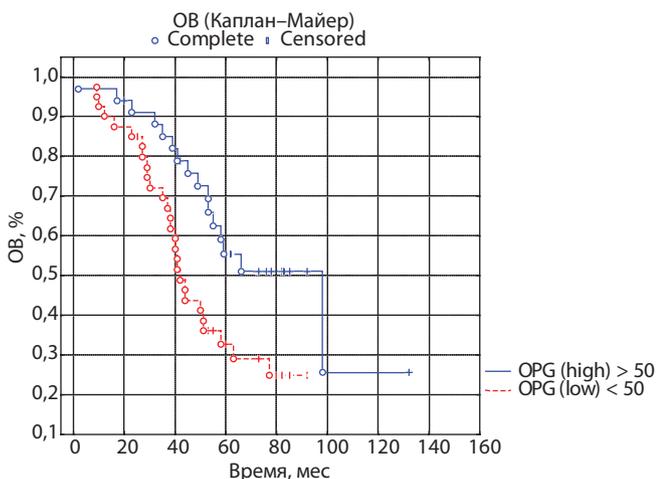


Рис. 9. ОВ больных РМЖ в зависимости от уровня экспрессии OPG в опухоли

Аналогичная закономерность наблюдалась при оценке ОВ. Выживаемость больных, у которых опухолевые клетки имели высокую экспрессию OPG (> 50 %), была статистически значимо выше, чем в группе больных, где выявлялась низкая экспрессия OPG (< 50 %). Достоверность различий между кривыми выживаемости подтверждалась тестами Gehan's Wilcoxon ($p = 0,01057$) и Cox's F-Test ($p = 0,00849$) (рис. 9).

Обсуждение

Одну из ключевых ролей в регенерации костей и развитии в них метастазов играет OPG. ОВ и время до появления костных метастазов напрямую зависят от уровня его содержания на поверхности опухолевых клеток. OPG изначально был определен в качестве регулятора костного гомеостаза [7, 8], изучался в различных тканях; предполагалось, что этот белок может быть потенциально значимым для прогноза течения

РМЖ. Была доказана его прогностическая значимость в оценке выживаемости у больных раком предстательной железы и пациентов с миеломной болезнью [9–12].

В нескольких исследованиях обнаружена связь между уровнем экспрессии OPG в первичной опухоли (рак предстательной железы, миеломная болезнь) и склонностью к развитию метастазов в кости, однако у больных РМЖ такой зависимости не было выявлено [5, 13, 14].

В процессе исследования установлена прямая взаимосвязь между экспрессией OPG со временем до возникновения метастазов и выживаемостью. У больных с высокой экспрессией OPG время до прогрессирования (метастазы в кости и/или в другие органы) и выживаемость были достоверно выше по сравнению с аналогичными показателями у пациенток с низкой экспрессией OPG.

По данным С. Van Poznak et al., низкие значения OPG в первичных опухолях больных РМЖ ассоциировались с плохим прогнозом и коррелировали с основными клиническими и молекулярными особенностями, такими как рецепторный статус и степень дифференцировки опухолевых клеток. Низкие значения OPG чаще встречались у больных с негативным рецепторным статусом, а высокая экспрессия OPG — при гормоноположительных опухолях [15, 16].

В нашем исследовании не было установлено прямой зависимости между уровнем OPG в клетках опухоли молочной железы, возрастом, степенью дифференцировки опухоли. Однако у больных с положительными эстроген-прогестероновыми рецепторами высокие значения OPG встречались достоверно чаще, чем в группе с отрицательными рецепторами. А так как положительный гормональный статус является фактором хорошего прогноза, то наличие низких значений OPG в изначально благоприятной группе прогноза, вероятно, несет дополнительную прогностическую значимость.

Выводы

Определение уровня OPG в клетках РМЖ дает дополнительную возможность прогнозировать течение заболевания (выживаемость и время до прогрессирования).

Особенный интерес представляет группа люминального рака, когда при благоприятном течении заболевания у части пациентов опухоль прогрессирует. Не исключено, что именно уровень OPG может быть полезным в профилактическом назначении лекарственного лечения, например бисфосфонатов, или при отборе группы пациентов с высоким риском раннего прогрессирования заболевания для более активного наблюдения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Coleman R.E. Skeletal complications of malignancy. *Cancer* 1997;80(8 Suppl): 1588–94.
2. Bhatia P., Sanders M.M., Hansen M.F. Expression of receptor activator of nuclear factor kappaB is inversely correlated with metastatic phenotype in breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(1):162–5.
3. Stejskal D., Bartek J., Pastorkova R. et al. Osteoprotegerin, RANK, RANKL. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2001;145(2):61–4.
4. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001;142(12):5050–5.
5. Murthy R.K., Morrow P.K., Theriault R.L. Bone biology and the role of the RANK ligand pathway. *Oncology (Williston Park)* 2009; 23(14 Suppl 5):9–15.
6. Семиглазов В.Ф. Опухоли репродуктивной системы. Клинические рекомендации по диагностике и лечению рака молочной железы. СПб., 2013. С. 149–50. [Semiglazov V.F. Reproductive system tumors. Clinical practice guidelines for diagnostics and treatment of breast cancer. Saint-Petersburg, 2013. Pp. 149–50. (In Russ.)].
7. Jung K., Lein M., von Hosslin K. et al. Osteoprotegerin in serum as a novel marker of bone metastatic spread in prostate cancer. *Clin Chem* 2001;47(11):2061–3.
8. Terpos E., Szydlo R., Apperley J.F. et al. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood* 2003;102(3):1064–9.
9. Terpos E., Dimopoulos M.A. Myeloma bone disease: pathophysiology and management. *Ann Oncol* 2005;16(8):1223–31.
10. Fedarko N.S., Jain A., Karadag A. et al. Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate and lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000;7(12):4060–6.
11. Body J.J., Greipp P., Coleman R.E. et al. A phase I study of AMG-0007, a recombinant osteoprotegerin construct in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer Res* 2003;97(3 Suppl):887–92.
12. Lara P.N., Longmate J., Stadler W. Markers of bone metabolism predict survival in hormone refractory prostate cancer (HRPC): Results from a randomized California Cancer Consortium & University of Chicago trial. *J Clin Oncol* 2005;23(163):4569.
13. Chen G., Sircar K., Aprikian A. et al. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer Res* 2006;107(2):289–98.
14. Sasaki A., Ishikawa K., Haraguchi N. et al. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) expression hepatocellular carcinoma with bone metastasis. *Ann Surg Oncol* 2007;14(3):1191–9.
15. Brown J.M., Zhang J., Keller E.T. Opg, RANKL, and RANK in cancer metastasis: expression and regulation. *Cancer Treat Res* 2004;118:149–72.
16. Van Poznak C., Cross S.S., Saggese M. et al. Expression of osteoprotegerin (OPG), TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL), and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in human breast tumours. *J Clin Pathol* 2006;59(1): 56–63.