

Прогностическое значение RANK-маркера (рецептора-активатора нуклеарного фактора каппа-В) у больных раком молочной железы

С.И. Заброда¹, Е.А. Маслокова¹, Л.И. Кoryтова¹, Г.А. Раскин¹, К.М. Пожарисский¹, О.В. Кoryтов²

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 Заброда zabrodasergey@yandex.ru

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый 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.

Исследование посвящено 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. Критерием включения являлся гистологически подтвержденный диагноз инвазивного РМЖ. В целях изучения уровня OPG проводилось иммуногистохимическое исследование, которое выполнялось по стандартному протоколу на срезах биопсийного материала. Среднее значение уровня экспрессии рецептора-активатора нуклеарного фактора каппа-В (RANK) в опухолевых клетках РМЖ составило 18,7 %, медиана — 5 % (минимальное значение — 0 %, максимальное — 90 %). Больные были разделены на 2 группы по уровню экспрессии: 1-я — с высоким уровнем RANK — high (больше медианы), 2-я — с низкой экспрессией RANK — low (меньше медианы). В группу RANK (high) вошли 39 пациенток, в группу RANK (low) — 44. При анализе клинико-патологических характеристик больных РМЖ с учетом экспрессии RANK не было отмечено каких-либо статистически значимых различий в отношении наличия или отсутствия пораженных регионарных лимфатических узлов, категории Т и индекса Ki-67. При анализе клинико-патоморфологических и иммуногистохимических характеристик больных РМЖ с учетом уровня экспрессии RANK не было отмечено каких-либо статистически значимых различий в отношении наличия или отсутствия пораженных регионарных лимфатических узлов, возраста, категории Т и индекса Ki-67 ($p > 0,05$). Однако выявлена следующая закономерность: высокая экспрессия RANK в группе с положительными эстрогеновыми и прогестероновыми рецепторами встречалась чаще, чем в группе с отрицательными рецепторами ($p = 0,04$).

Ключевые слова: рецептор-активатор нуклеарного фактора каппа-В, остеопротегерин, лиганд рецептора-активатора нуклеарного фактора каппа-В, рак молочной железы, отдаленное метастазирование

DOI: 10.17650/1994-4098-2015-11-2-19-24

Prognostic value of receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK) marker in patients with breast cancer

S.I. Zabroda¹, E.A. Maslyukova¹, L.I. Korytova¹, G.A. Raskin¹, K.M. Pozharissky¹, O.V. Korytov²

¹Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, Ministry of Health of Russia; 70 Leningradskaya St.,
Pesochnyi Settlement, Saint Petersburg, 197758, Russia;

²S.M. Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense of Russia; 6 Academician Lebedev St., Saint Petersburg, 195009, Russia

Despite notable progress made in studying breast cancer (BC), the mechanisms of metastases, in view of the classification into molecular subtypes, in patients with BC remain to be fully uninvestigated, in the presence of a good prognosis in particular. To study novel diagnostic and predictive markers in a new way presents current problems in the pathology of BC.

This investigation deals with the expression of osteoprotegerin (OPG) in the tumor cells of patients with BC. It enrolled 83 patients with locally advanced BC (T2–4N0–3M0) who had been treated in 2003 to 2010. The inclusion criterion was a histologically verified diagnosis of invasive BC. To study the level of OPG, the investigators conducted an immunohistochemical study of biopsy sections according to the standard protocol. The mean expression of receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK) in the BC cells was 18.7 %; its median was 5 % (range, 0–90 %). The patients were divided into 2 groups according to the level of RANK expression: 1) high (higher than the median); 2) low (lower than the median). The high RANK group included 39 patients; the low RANK group comprised 44 patients. Analysis of the clinical and pathological characteristics of BC patients with regard RANK expression did not show any statistically significant differences in the presence or absence of affected regional lymph nodes, T category, and Ki-67 index. The analysis of clinical and pathomorphological and immunohistochemical characteristics in patients with breast cancer, taking into consideration RANK expression level, did not show any statistically significant differences with respect to presence or absence of affected regional lymph nodes, age, T category and Ki-67 index ($p > 0.05$). However, it revealed the following pattern: the high expression of RANK was more common in patients positive for estrogen and progesterone receptors than in those for negative receptors ($p = 0.04$).

Key words: receptor activator of nuclear factor kappa-B, osteoprotegerin, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, breast cancer, distant metastasis

Введение

Открытие рецептора-активатора нуклеарного фактора каппа-В (RANK), его лиганда (RANKL) и остеопротегерина (OPG) и их роли в регуляции нормально-го костного ремоделирования привело к более глубокому пониманию механизмов костного метастазирования. До открытия в 1990-х годах системы RANK/RANKL/OPG было известно, что резорбция и ремоделирование костей регулировались опосредованно через остеобласты и стромальные клетки, но впоследствии выяснилось, что суперсемейство факторов некроза опухоли, лиганды и рецепторы могут быть вовлечены в костное ремоделирование. Сигнальные пути RANK/RANKL регулируют формирование зрелых остеокластов из их предшественников, а также их активность в костном ремоделировании. OPG защищает скелет

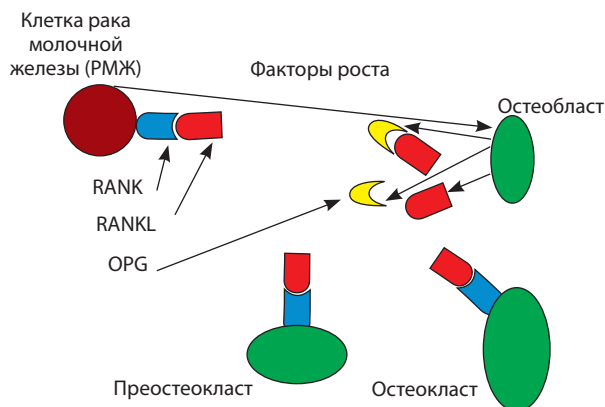


Рис. 1. Патологический сигнальный путь развития остеолитического метастаза. RANKL, вырабатываемый остеобластами, связывает RANK, что ведет к стимуляции остеокластов и прогрессированию лизиса костной ткани

от чрезмерного остеолитического метастаза путем привязки к RANKL, тем самым делая невозможным его привязку к рецептору RANK [1–3]. Таким образом, соотношение RANKL/OPG является важным определителем костной массы и костной целостности (рис. 1).

В последнее 10-летие достигнут явный прогресс в понимании механизмов, посредством которых регулируются процессы ремоделирования костной ткани (резорбция и минерализация), однако многие вопросы, касающиеся роли системы RANK/RANKL/OPG в формировании отдаленных метастазов, остаются недостаточно изученными (рис. 2) [2, 3].

RANK – это трансмембранный белок, экспрессия которого первоначально была обнаружена только в дендритных клетках и зрелых остеокластах [4]. Вскоре в работе J.E. Fata et al. появилось сообщение о том, что экспрессия RANK-маркера была обнаружена в здоровых тканях молочной железы [5], а также в клетках рака предстательной железы и PMЖ [6, 7]. Данные исследования подтверждали важность роли RANK-белка в развитии остеолитических метастазов в кости [8]. На примере семейного рака Педжета была показана значимость системы RANK/RANKL [9, 10] и как следствие роль RANK-маркера в пролиферирующих клетках опухоли [11, 12].

Несмотря на значительный прогресс в исследовании PMЖ с учетом разделения на молекулярные подтипы, механизмы образования метастазов у больных PMЖ остаются до конца не изученными, особенно при наличии благоприятного прогноза. Изучение новых информативных диагностических и прогностических маркеров по-новому представляет современные проблемы патологии PMЖ [7].

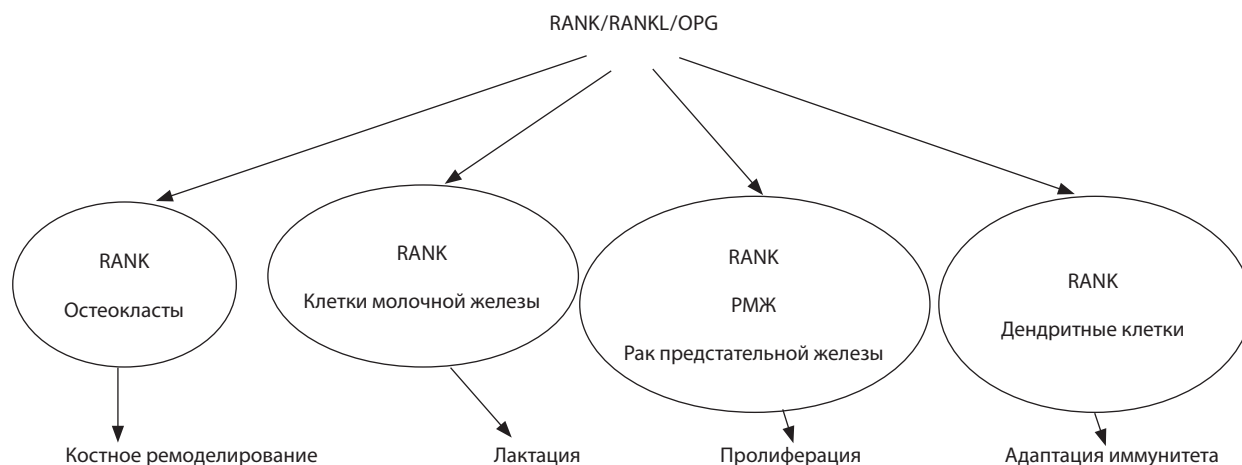


Рис. 2. Значение RANK в различных органах и тканях

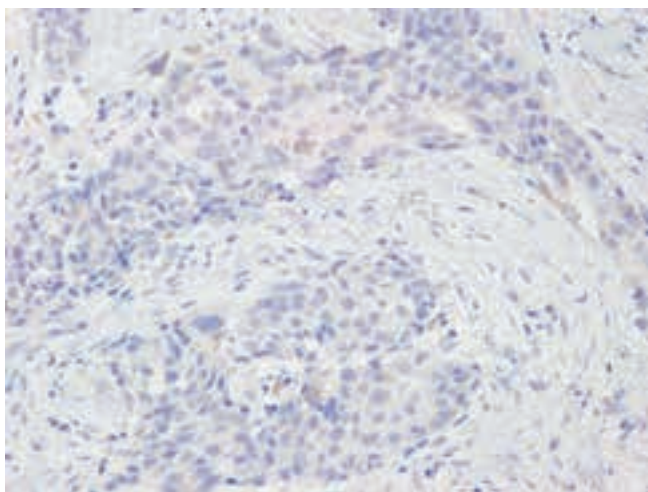


Рис. 3. Положительная экспрессия RANK — 1 % позитивных клеток относительно общего числа опухолевых клеток (увеличение $\times 400$)

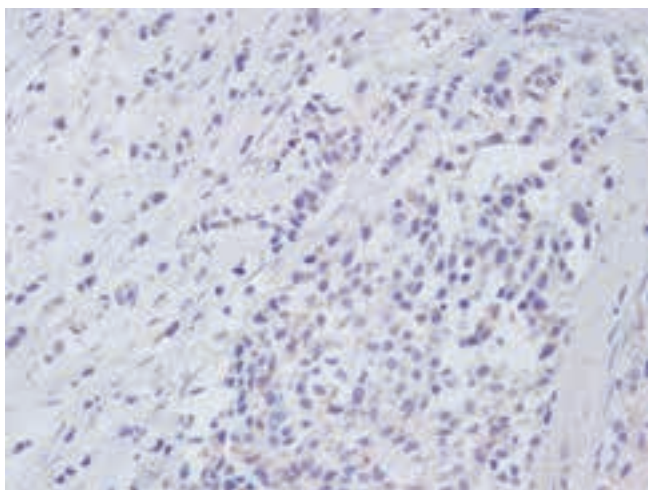


Рис. 4. Положительная экспрессия RANK — 30 % позитивных клеток относительно общего числа опухолевых клеток (увеличение $\times 400$)

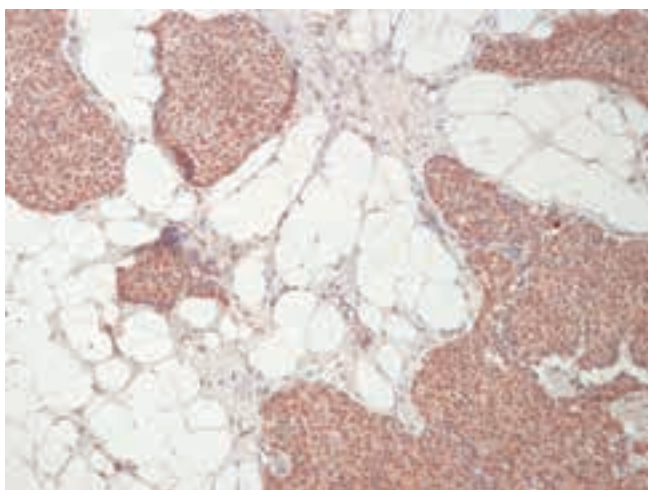


Рис. 5. Положительная экспрессия RANK — 70 % позитивных клеток относительно общего числа опухолевых клеток (увеличение $\times 200$)

Остается открытым вопрос профилактического назначения бисфосфонатов (золедроновая кислота — 5 мг 1 раз в 6 мес) [13, 14] при высоких рисках возникновения костных метастазов у больных РМЖ на фоне остеопороза [15–17].

В целях изучения уровня экспрессии RANK проводилось иммуногистохимическое исследование. Иммуногистохимическое исследование выполнялось по стандартному протоколу.

Цель исследования — выявить связи между уровнем экспрессии RANK в опухолевых клетках, временем до прогрессирования (возникновения метастазов), выживаемостью, клинико-морфологическими особенностями опухоли.

Материалы и методы

В исследование были включены 83 пациентки с местно-распространенным РМЖ (T2–4N0–3M0), пролеченные 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 изучался ретроспективно.

Антитело к RANK использовалось фирмы Santa Cruz, 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 позитивно окрашенных опухолевых клеток относительно их общего числа. По цитологическому составу исследуемого материала основную массу составили пролиферирующие опухолевые клетки различной дифференцировки. Опухолевые клетки, экспрессирующие RANK, окрашивались коричневым цветом. Экспрессия более чем в 5 % клеток расценивалась как высокая — high, менее 5 % — низкая — low (рис. 3–5).

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 12. Для сравнения клинико-патологических характеристик среди групп RANK (high) и RANK (low) использовались критерий χ^2 , тесты Фишера. 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 двумя группами; $p < 0,005$ считалось статистически достоверным.

Результаты

Уровень экспрессии в опухолевых клетках колеблется от 0 до 90 %. Среднее значение уровня экспрес-

сии RANK в опухолевых клетках РМЖ составило 18,7 %, медиана – 5 %. Минимальное значение – 0 %, максимальное – 90 %. Больные были разделены на 2 группы по уровню экспрессии: 1-я – с высоким уровнем RANK (high) (больше медианы), 2-я – с низкой экспрессией RANK (low) (меньше медианы). В группу RANK (high) вошли 39 пациенток, в группу RANK (low) – 44.

Большинство больных (81,9 %) в обеих группах имели гормоноположительные опухоли и относились к типам люминальный А и люминальный В. Индекс Ki-67 в группе RANK (low) колебался в интервале от 1 до 80 %, среднее значение составило 18,8 %. В группе больных RANK (high) минимальное значение Ki-67 составило 2 %, максимальное – 60 %, среднее – 18,1 %. В группах больных RANK (high) и RANK (low) низкие и высокие значения пролиферативного индекса ($Ki-67 \leq 14$; $Ki-67 > 14$) встречались с одинаковой частотой ($p = 0,06$).

При анализе клинико-патологических характеристик больных РМЖ с учетом экспрессии RANK не было отмечено каких-либо статистически значимых 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) [18]. При анализе клинико-патоморфологических и иммуногистохимических характеристик больных РМЖ с учетом уровня экспрессии RANK не было отмечено каких-либо статистически значимых различий в отношении наличия или отсутствия пораженных регионарных лимфатических узлов, возраста, катего-

Клинико-патологические характеристики больных РМЖ

Характеристика	RANK (high), n = 39	RANK (low), n = 44	p
Возраст, годы < 50 > 50	12 28	13 30	0,981
Стадия Т T1 T2 T3 T4	8 18 5 8	6 21 9 8	0,859
Статус лимфоузлов N (+) N (-)	29 10	35 9	0,574
Гистологический тип протоковый дольковый	35 4	42 2	0,316
Люминальный А Люминальный В HER-2 люминальный ErbB-2 Трижды негативный	23 8 4 2 2	20 17 0 2 6	0,08
Стадия РМЖ I или II III	34 5	41 3	0,355
Ki-67 > 14 % ≤ 14 %	15 24	26 18	0,060

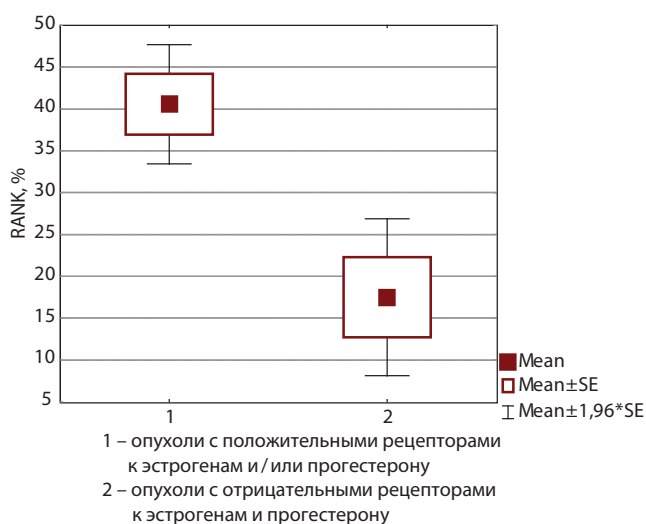


Рис. 6. Сравнение средних значений уровня экспрессии RANK в группах с положительными и отрицательными рецепторами к эстрогенам и прогестерону

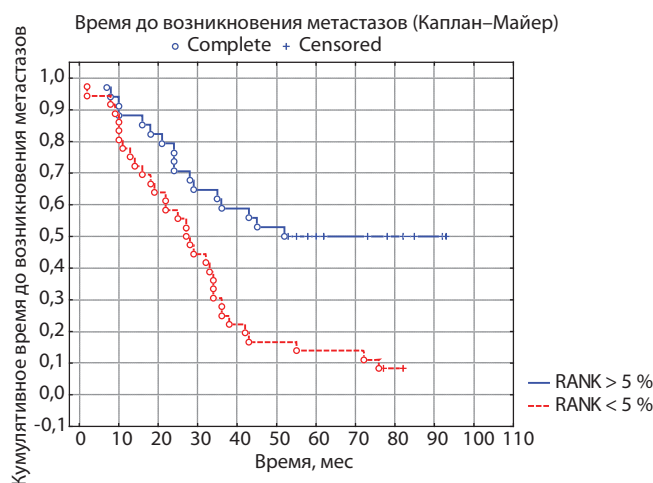


Рис. 7. Время до прогрессирования (возникновения метастазов) у больных РМЖ в зависимости от уровня экспрессии RANK

рии Т и индекса Ki-67 ($p > 0,05$). Однако выявлена следующая закономерность: высокая экспрессия значения RANK встречалась в группе с положительными эстрогеновыми и прогестероновыми рецепторами чаще, чем в группе с отрицательными рецепторами $p = 0,04$ (таблица, рис. 6).

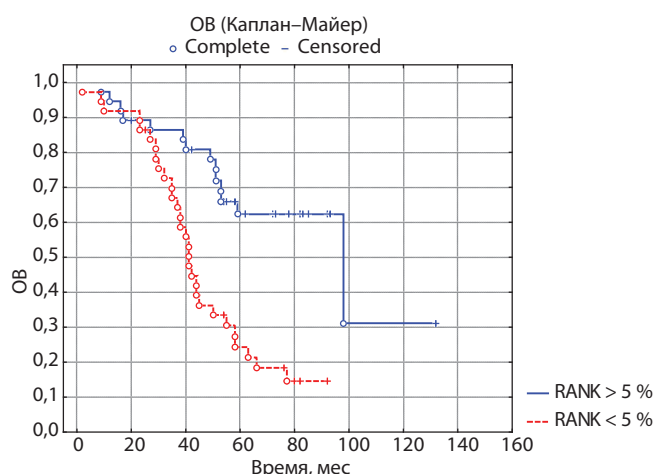


Рис. 8. ОВ больных РМЖ в зависимости от уровня экспрессии RANK в опухоли

Анализ зависимости времени до возникновения метастазов от уровня экспрессии RANK показал статистически достоверное уменьшение времени до прогрессирования заболевания при низкой экспрессии RANK (low) у больных РМЖ по сравнению с группой больных с высокой экспрессией RANK (high) (рис. 7). Достоверность подтверждалась тестами Cox's F-Test ($p = 0,00015$), Gehan's Wilcoxon Test ($p = 0,00410$)

Аналогичная закономерность наблюдалась при оценке ОВ. Выживаемость больных, у которых опухолевые клетки имели высокую экспрессию RANK ($> 5\%$), была статистически достоверно выше, чем в группе больных, где выявлялась низкая экспрессия RANK ($< 5\%$). Достоверность различий между кривыми выживаемости подтверждалась тестами Gehan's Wilcoxon ($p = 0,01057$) и Cox's F-Test ($p = 0,00006$) (рис. 8).

Обсуждение

Сигнальный путь RANK/RANKL/OPG достаточно изучен в доклинических исследованиях, выработанная гипотеза об участии этих маркеров в образовании метастазов в костной ткани сподвигла ученых к их изучению в естественных условиях [19–21]. В клинических условиях нескольких исследований обнаружили связь между высоким уровнем RANK в первичной опухоли и склонностью к развитию костных метастазов [7, 22]. Открытие роли RANK в костной реабсорбции вселяет большие надежды на предотвращение «скелетных событий», связанных с метастазами в кости у больных РМЖ. В работе D. Santini et al. на примере 295 пациентов было доказано, что высокие значения RANK коррелировали с плохим прогнозом, однако в нашем исследовании уровень экспрессии RANK $> 5\%$ ассоциировался с хорошим прогнозом, а именно выживаемость таких больных была статистически достоверно выше, чем в группе пациентов с низким уровнем экспрессии RANK ($< 5\%$). В нашем исследовании наблюдалась прямая взаимосвязь между экспрессией RANK, временем до возникновения метастазов и выживаемо-

стью. У больных с высокой экспрессией RANK время до прогрессирования (метастазы в кости и/или метастазы в кости и другие органы) и выживаемость были статистически достоверно выше по сравнению с пациентами с низкой экспрессией RANK.

В исследовании не была установлена прямая зависимость между уровнем RANK в клетках РМЖ, возрастом, степенью дифференцировки опухоли. Однако у больных с положительными эстрогеновыми и прогестероновыми рецепторами высокие значения RANK встречались достоверно чаще, чем в группе с отрицательными рецепторами. А так как наличие положительного гормонального статуса является фактором хорошего прогноза, то наличие низких значений RANK в изначально благоприятной группе прогноза не исключает дополнительной прогностической значимости.

Выводы

Система RANK/RANKL/OPG — важное звено в ряду патологических процессов, в том числе и онкологических заболеваний, сопровождающихся поражением костной ткани. Изучение роли экспрессии RANK в опухолевой клетке РМЖ представляет актуальную задачу для исследования на клиническом материале, а также открывает перспективы для разработки новых методов молекулярно-направленного персонализированного химиотерапевтического лечения.

Определение уровня RANK в клетках РМЖ дает дополнительную возможность прогнозировать течение РМЖ (выживаемость и время до прогрессирования). Особый интерес представляет группа люминальных раков, которые, являясь относительно благоприятными по клиническому течению заболевания, в отдельных случаях ведут себя непредсказуемо. Причина прогрессирования у этой категории больных до настоящего времени не установлена. Все чаще в отечественной и зарубежной литературе можно встретить результаты назначения золедроновой кислоты (5 мг 1 раз в 6 мес) в профилактическом режиме у больных РМЖ на фоне остеопороза без признаков развития метастазов в кости. Выявление новых прогностических маркеров, таких как RANK, позволяет обосновать необходимость профилактического назначения бисфосфонатов или деносумаба, а также более активного наблюдения за группой пациентов с высоким риском раннего прогрессирования заболевания.

В отечественной фармакологии разработан и активно применяется новый препарат золедроновой кислоты — Резокластин ФС. Резокластин ФС используется как для лечения метастатического поражения костей, так и для коррекции нарушений минерального обмена — гиперкальциемии и остеопороза у онкологических больных. Определение новых маркеров костной резорбции и назначение Резокластину ФС 5 мг 1 раз в 6 мес в профилактическом режиме у больных РМЖ является дальнейшей целью наших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Eilon G., Mundy G.R. Direct resorption of bone by human breast cancer cells *in vitro*. *Nature* 1978;276(5689):726–8.
2. Simonet W.S., Lacey D.L., Dunstan C.R. et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89(2):309–19.
3. Nakagawa N., Kinoshita M., Yamaguchi K. et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253(2):395–400.
4. Wada T., Nakashima T., Hiroshi N., Penninger J.M. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 2006;12(1):17–25.
5. Fata J.E., Kong Y.Y., Li J. et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 2000;103(1):41–50.
6. Kim N.S., Kim H.J., Koo B.K. et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Mol Cell Biol* 2006;26(3):1002–13.
7. 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* 2006;107(2):289–98.
8. Kapur R.P., Yao Z., Iida M.H. et al. Malignant autosomal recessive osteopetrosis caused by spontaneous mutation of murine Rank. *J Bone Miner Res* 2004;19(10):1689–97.
9. Hughes A.E., Ralston S.H., Marken J. et al. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nat Genet* 2000;24(1):45–8.
10. 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.
11. Ikeda T., Kasai M., Utsuyama M., Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* 2001;142(4):1419–26.
12. Hikita A., Yana I., Wakeyama H. et al. Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem* 2006;281(48):36846–55.
13. Black D.M., Greenspan S.L., Ensrud K.E. et al. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2003;349:1207–15.
14. Древал А.В., Марченкова Л.А., Бахарев И.В. и др. Анализ клинического опыта применения отечественного дженерика золедроновой кислоты для лечения остеопороза. *Лечащий врач* 2014;5:108–12. [Dreval A.V., Marchenkova L.A., Baharev I.V. et al. Analysis of the clinical experience of the application of the national generic of the zoledronic acid for osteoporosis treatment. *Lechaschiy vrach = Assistant physician* 2014;5:108–12. (In Russ.)].
15. Clzardin P. Bisphosphonates' antitumor activity: an unravelled side of a multifaceted drug class. *Bone* 2011;48:71–9.
16. Stopeck A.T., Lipton A., Body J.J. et al. Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J Clin Oncol* 2010;28:5132–39.
17. Murphy M.G., Cerchio K., Stoch S.A. et al. Effect of L-000845704, an aVb3 integrin antagonist, on markers of bone turnover and bone mineral density in postmenopausal osteoporotic women. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2022–8.
18. Семиглазов В.Ф. Опухоли репродуктивной системы. Клинические рекомендации по диагностике и лечению рака молочной железы. СПб., 2013. С. 149–50. [Semiglavov V.F. Tumors of reproductive system. Clinical guidelines for diagnostics and management of the breast cancer. Saint Petersburg, 2013. Pp. 149–50. (In Russ.)].
19. Jones D.H., Nakashima T., Sanchez O.H. et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 2006;440(7084):692–6.
20. Armstrong A.P., Miller R.E., Jones J.C. et al. RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. *Prostate* 2008;68(1):92–104.
21. Mikami S., Katsube K., Oya M. et al. Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas. *J Pathol* 2009;218(4):530–9.
22. 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.