

Автоматизированный анализ клеточной плотности при раке молочной железы как дополнительный способ повысить объективность и достоверность прогноза рака молочной железы

Р.М. Палтуев, А.Г. Кудабергенова, В.Ф. Семиглазов, А.В. Комяхов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России;
Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68

Контакты: Руслан Маликович Палтуев paltuev@mail.ru

Введение. За последние 10 лет стало очевидно, что рак молочной железы (РМЖ) на молекулярном уровне представляет собой группу гетерогенных опухолевых заболеваний. Текущая цель повседневной клинической практики при назначении лечения заключается в том, чтобы точно спрогнозировать исход болезни у каждого отдельного пациента и убедиться, что степень риска рецидива РМЖ после выполнения адъювантной гормональной терапии без адъювантной химиотерапии не увеличивается.

Цель исследования – оценить, как клиническое использование показателя риска клеточной плотности может на практике усовершенствовать прогноз риска рецидива заболевания у пациентов с РМЖ после выполнения стандартных клинико-патоморфологических исследований.

Материалы и методы. В работе проанализированы результаты терапии по данным кумулятивного канцер-регистра по диагностике и лечению РМЖ в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России в 2000–2009 гг. В базе данных содержится информация о диагностике, лечении и выживаемости 5106 больных РМЖ. Архивный материал (периода 2000–2009 гг.) из парафиновых блоков «таргетной группы» для методик молекулярно-генетического профилирования был залит в блоки-реципиенты, окрашен соответствующими антителами, как широко используемыми в настоящее время маркерами ЭР, ПР, HER2/neu, Ki-67, так и малоизученными маркерами: клеточной плотности, p53, CK5/6, CK14, CD4/CD8, p63, EGFR, FOXP3, AR, FOX1.

Результаты. Проведенное исследование на 1118 больных РМЖ стадии T1–2N0M0 показывает, что анализ показателя риска клеточной плотности позволяет прогнозировать исход заболевания. Маркер коррелирует со степенью гистологической злокачественности реже, чем Ki-67, определенный в данной группе пациентов. Вследствие этого определение клеточной плотности является дополнительным способом повышения объективности и достоверности прогноза РМЖ.

Выводы. Автоматизированный анализ клеточной плотности при РМЖ является практически оператор-независимым методом, что повышает точность и объективность полученных результатов. Клеточная плотность при РМЖ менее 3000 клеток/мм² является благоприятным прогностическим признаком.

Ключевые слова: рак молочной железы, прогноз риска рецидива, степень гистологической злокачественности, Ki-67, иммуногистохимический подтип, клеточная плотность

DOI: 10.17650/1994-4098-2017-13-3-12-16

Automated analysis of cell density in breast cancer as an additional method of increasing objectivity and accuracy of breast cancer prognosis

R.M. Paltuev, A.G. Kudabergenova, V.F. Semiglazov, A.V. Komyakhov

N.N. Petrov National Medical Research Oncology Center, Ministry of Health of Russia;
68 Leningradskaya St., Pesochnyi Settlement, Saint Petersburg 197758, Russia

Introduction. In the last ten years, it became obvious that on the molecular level breast cancer is a group of heterogenous tumors. The current objective of routine clinical practice of treatment prescription includes accurate disease prognosis for every individual patient and conviction that the risk of breast cancer recurrence after adjuvant hormone therapy without adjuvant chemotherapy doesn't increase.

The study objective is to evaluate how clinical use of risk associated with cell density can in practice improve prognosis of recurrence risk in patients with breast cancer after standard clinical and pathomorphological examinations.

Materials and methods. The article analyzes therapy results using data from the cumulative cancer registry of breast cancer diagnosis and treatment of the N.N. Petrov National Medical Research Oncology Center in 2000–2009. The database includes information on diagnosis, treatment, and survival of 5106 patients with breast cancer. Archived material (from 2000 to 2009) from paraffin blocks of the “targeted group” for methods of molecular and genetic profiling was poured into recipient blocks, stained with corresponding antibodies such as widely used ER, PR, HER2/neu, Ki-67 markers as well as poorly studied markers: cell density, p53, CK5/6, CK14, CD4/CD8, p63, EGFR, FOXP3, AR, FOX1.

Results. The study of 1118 patients with stage T1–2N0M0 breast cancer has shown that analysis of risk associated with cell density allows to predict disease outcome. Correlation between the marker and the grade of histological malignancy is more rare than for Ki-67 determined

in this patient group. As a result, determination of cell density is an additional method to increase objectivity and accuracy of breast cancer prognosis.

Conclusions. Automated cell density analysis for breast cancer is almost fully operator-independent which increases accuracy and objectivity of the results. Cell density in breast cancer lower than 3000 cells/mm² is a favorable prognostic factor.

Key words: breast cancer, recurrence risk prognosis, histological malignancy, Ki-67, immunohistochemical subtype, cell density

Введение

За последнее десятилетие стало очевидным, что рак молочной железы (РМЖ) на молекулярном уровне представляет собой группу гетерогенных опухолевых заболеваний [1–8].

В повседневной клинической практике при назначении лечения текущая цель заключается в том, чтобы точно спрогнозировать исход болезни у каждого отдельного пациента и определить, насколько низка степень риска рецидива РМЖ после выполнения адъювантной гормональной терапии и благоприятен исход заболевания. При этом необходимо с большей осторожностью отнестись к вопросу назначения адъювантной химиотерапии [9–10]. В то же время современные рекомендации позволяют выявить только небольшую подгруппу пациентов с низким риском рецидива, а использование клинико-патоморфологических показателей для стратификации риска может вести к избыточному лечению пациентов с РМЖ в результате назначения им адъювантной терапии [1, 9].

В целях разработки единых принципов оценки групп риска необходимо провести сравнение возможностей диагностики для характеристики свойств опухоли морфологическими, иммуногистохимическими методами и методикой автоматизированной оценки клеточной плотности опухолевой ткани с помощью автоматизированных систем обработки изображений гистологических препаратов.

В настоящее время все большее распространение получают методы прогнозирования, в которых используются автоматизированные системы обработки и анализа виртуальных микроскопических изображений гистологических препаратов. Они позволяют значительно повысить точность и объективность прогноза.

Цель исследования заключается в том, чтобы оценить, как клиническое использование показателя риска клеточной плотности может на практике усовершенствовать прогноз риска рецидива заболевания у пациентов с РМЖ после выполнения стандартных клинико-патоморфологических исследований.

Материалы и методы

В работе проанализированы результаты терапии по данным кумулятивного канцер-регистра по диагностике и лечению РМЖ в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии

им. Н.Н. Петрова» Минздрава России в 2000–2009 гг. (авторы идеи создания данного канцер-регистра – В.Ф. Семиглазов, Р.М. Палтуев).

В базе данных содержится информация о диагностике, лечении и выживаемости 5106 больных РМЖ, внесенная по 32 параметрам:

1) Паспортные данные и контакты: ФИО, возраст, номер паспорта, адрес проживания, номер телефона.

2) Оперативное лечение и патоморфологическое исследование: объем оперативного лечения; размеры опухоли; состояние подмышечных лимфатических узлов мультифокальность или мультицентричность опухоли; ее гистологический тип; стадии заболевания (сTNM и pTNM); степень гистологической злокачественности по шкале Элстона–Эллиса; наличие инвазии лимфатических сосудов и выраженного внутрипротокового компонента; уровень экспрессии эстрогеновых и прогестероновых рецепторов (ЭР и ПР) эпидермального фактора роста HER2.

3) Предоперационное лечение: схема системного лечения; размеры опухоли до и после неoadъювантного лечения, определяемые клинически, маммографически и по данным ультразвукового исследования; степень патоморфологического регресса по классификации Миллера–Пэйна (Miller–Payne).

4) Послеоперационное лечение: вид адъювантного лечения – схемы, дозы препаратов, количество циклов.

5) Данные о выживаемости: местно-регионарный рецидив (дата); отдаленные метастазы (дата, локализация); жизненный статус на протяжении 10-летнего периода наблюдения (жива, умерла, причины смерти).

Данные для расчета показателей безрецидивной и общей выживаемости больных были получены в результате проведения периодических обследований, на которые больные приглашались, а также из амбулаторных карт и в ходе прямых телефонных контактов с больными или их родственниками. Для изучения отдаленных результатов лечения в различных прогностических группах показатели общей и безрецидивной выживаемости рассчитывались по методу Каплана–Майера (Kaplan–Meyer), чтобы оценить кумулятивные показатели выживаемости при динамическом наблюдении.

Архивный материал из парафиновых блоков «таргетной группы» для методик молекулярно-генетического профилирования (T1–2N0M0 стадии –

Таблица 1. Соотношение иммуногистохимического подтипа рака молочной железы (РМЖ) со степенью гистологической злокачественности

Table 1. Relationship between immunohistochemical breast cancer subtype and malignancy grade

Степень гистологической злокачественности G	Иммуногистохимический подтип РМЖ	Число больных, %
G1	ER+ / PR±HER–	91
	ER– / PR–HER–	7
	ER– / PR–HER+	1
	ER+ / PR±HER+	1
G2	ER+ / PR±HER–	73
	ER– / PR–HER–	18
	ER– / PR–HER+	6
	ER+ / PR±HER+	3
G3	ER+ / PR±HER–	47
	ER– / PR–HER–	43
	ER– / PR–HER+	5
	ER+ / PR±HER+	5

Таблица 2. Корреляция степени гистологической злокачественности и уровня маркера Ki-67

Table 2. Correlation between histological malignancy and Ki 67 marker level

Степень гистологической злокачественности G	Уровень маркера Ki-67, %	Число больных, %
G1	<5	49
	5–20	30
	>20	11
G2	<5	24
	5–20	38
	>20	28
G3	<5	12
	5–20	38
	>20	60

1118 больных с 2000 по 2009 г.) был залит в блоки-реципиенты, окрашен соответствующими антителами, как широко используемыми в настоящее время маркерами ЭР, ПР, HER2/neu, Ki-67, так и малоизученными маркерами: клеточной плотности, p53, p63, CK5/6, CK14, CD4/CD8, EGFR, FOXP3, AR, FOX1. Данные, полученные методом тканевых матриц в лаборатории патоморфологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова», были внесены в программу Statistica 6.0 (Microsoft, 2000), в которой проведен анализ общей и безрецидивной выживаемости с учетом влияния этих маркеров и схем лечения в данных группах.

Наблюдаемые корреляции позволили предположить, что большинство прогностических морфологических и иммуногистохимических маркеров выявляют опухоли одинаковой биологии низкого и высокого риска рецидива (табл. 1 и 2).

При этом было отмечено, что уровень Ki-67 при низкой степени гистологической злокачественности отмечается выше 20 % (в 11 % случаев), при высокой степени – ниже 5 % (12 % случаев). В связи с этим целесообразно расширить панель используемых маркеров для более точной оценки риска рецидива.

Результаты

В данной статье представлен *анализ прогностического значения клеточной плотности при РМЖ*. Сущность метода состоит в способе прогноза РМЖ с использованием цифрового изображения гистологического препарата и значения полученного количества опухолевых клеток, а также в формировании прогноза на основании полученного параметра. Согласно *заявленному нами* изобретению (заявка № 2017 127 233, дата подачи на регистрацию: 28 июля 2017 г.), автоматически рассчитывают площадь каждого цифрового поля, после чего на основании подсчитанного количества опухолевых клеток в выделенных цифровых полях и рассчитанной площади определяют среднее значение клеточной плотности, приведенное к 1 мм² площади исследуемого гистологического препарата. При этом при значении указанного прогностического параметра менее 3000 клеток/мм² можно прогнозировать благоприятный исход заболевания (рис. 1). Указанный критерий был установлен на основании статистического анализа данных многолетних наблюдений за больными с диагнозом РМЖ, у которых после проведенного лечения были определены показатели средней клеточной плотности опухолевой ткани. При этом высокая вероятность правильности прогноза по заявляемому способу была подтверждена с помощью исследования выживаемости пациентов по методу Каплана – Майера (рис. 2). В указанной группе больных за 10 лет был зафиксирован только 1 случай летального исхода, что свидетельствует о высокой вероятности прогностического значения данного метода.

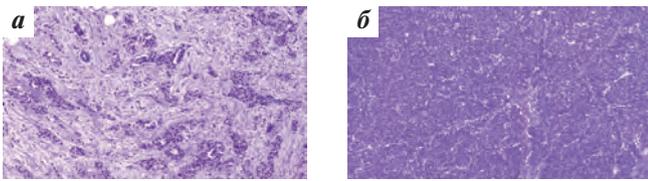


Рис. 1. Гистологическая картина препарата с клеточной плотностью: а – низкой (2218,24 клеток/мм²), б – высокой (21 207,49 клеток/мм²); окраска гематоксилин-эозином, ×40

Fig. 1. Histological specimens with different cell densities: а – low (2218.24 cells/mm²), б – high (21 207.49 cells/mm²); hematoxylin eosin staining, ×40

При сравнении корреляции клеточной плотности Ki-67 со степенью гистологической злокачественности было отмечено, что корреляция низкого риска рецидива по результатам определения клеточной плотности с низкой степенью гистологической злокачественности встречается у 20 % больных. В этой же группе пациентов уровень Ki-67 меньше 5 % был определен в 49 % случаев.

Обсуждение

Проведенное исследование в группе 1118 пациентов с T1–2N0M0 стадией РМЖ показывает, что определение клеточной плотности позволяет прогнозировать исход заболевания. Данный маркер коррелирует со степенью гистологической злокачественности реже, чем Ki-67, определенный в данной группе пациентов. Соответственно, определение клеточной плотности является дополнительным способом повышения объективности и достоверности прогноза РМЖ.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

Authors declare no conflict of interest

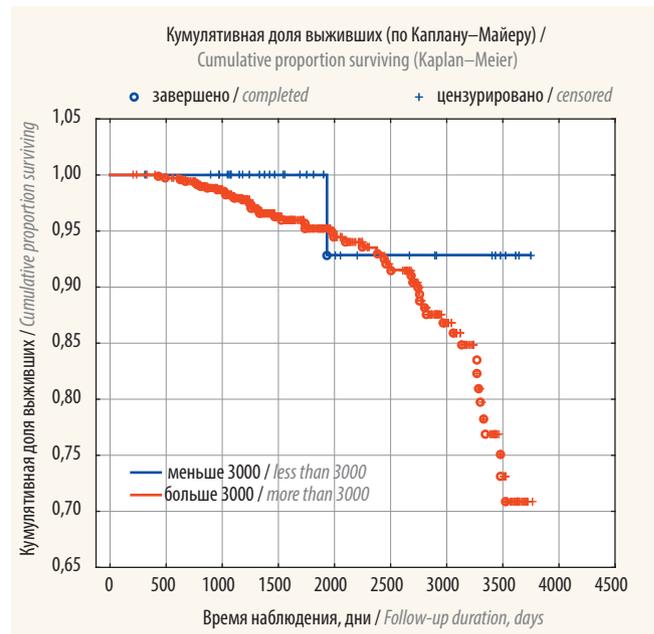


Рис. 2. Сравнение клеточной плотности (больше/меньше 3000 клеток/мм²) методом тканевых матриц в обследуемой в группе больных, $p = 0,37$

Fig. 2. Comparison of cell densities (more/less than 3000 cells/mm²) using tissue matrixes in the studied patient group, $p = 0.37$

Вывод

Автоматизированный анализ клеточной плотности при РМЖ является практически **оператор-независимым методом**, что повышает точность и объективность полученных результатов. Клеточная плотность при РМЖ менее 3000 клеток/мм² выступает благоприятным прогностическим признаком.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Семиглазов В.Ф., Палтуев Р.М., Манихас А.Г. и др. Клинические рекомендации РООМ по диагностике и лечению рака молочной железы. М.: АБВ-пресс, 2015. [Semiglazov V.F., Paltuev R.M., Manikhas A.G. et al. RAOМ clinical guidelines on breast cancer diagnosis and treatment. Moscow: ABV-Press, 2015. (In Russ.)].
2. Семиглазов В.Ф., Палтуев Р.М., Семиглазов В.В. и др. Общие рекомендации по лечению раннего рака молочной железы St. Gallen-2015, адаптированные экспертами Российского общества онкомаммологов. Опухоли женской репродуктивной системы 2015;11(3): 43–60. [Semiglazov V.F., Paltuev R.M., Semiglazov V.V. et al. General St. Gallen-2015 guidelines for the treatment of early breast cancer (adapted by the experts of the Russian Society of Breast Oncologists). Opukholi zhenskoy reproductivnoy sistemy = Tumors of female reproductive system 2015;11(3):43–60. (In Russ.)].
3. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., Палтуев Р.М. и др. Адъювантная химиотерапия рака молочной железы: поиск новых путей планирования. Вопросы онкологии 2014;60(1):102–8. [Semiglazov V.F., Semiglazov V.V., Paltuev R.M. et al. Adjuvant chemotherapy for breast cancer: search for new ways of planning. Voprosy onkologii = Problems in Oncology 2014;60(1):102–8. (In Russ.)].
4. Шатова Ю.С., Франциянц Е.М., Новикова И.А. и др. Локальный гормональный фон опухоли и перифокальной зоны у больных раком молочной железы: данные и перспективы их применения. Опухоли женской репродуктивной

- системы 2016;12(3):30–5. [Shatova Yu.S., Frantsiyants E.M., Novikova I.A. et al. The local hormonal environment of tumor and perifocal zone in patients with breast cancer: data and prospects of their application. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy sistemy = Tumors of female reproductive system*. 2016;12(3):30–35. (In Russ.)].
5. Манихас А.Г., Бабешкин Р.Н., Палтуев Р.М., Манихас Г.М. Место неoadъювантной химиотерапии трижды негативного рака молочной железы в Санкт-Петербургском городском клиническом онкологическом диспансере. *Опухоли женской репродуктивной системы* 2016;12(2): 26–34. [Manikhas A.G., Babeshkin R.N., Paltuev R.M., Manikhas G.M. The role of neoadjuvant chemotherapy of triple-negative breast cancer in St. Petersburg City Clinical Oncological Dispensary. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy sistemy = Tumors of female reproductive system*. 2016;12(2):26–34. (In Russ.)].
6. Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B. et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406(6797):747–52. DOI: 10.1038/35021093. PMID: 10963602.
7. Sorlie T., Perou C.M., Tibshirani R. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(19):10869–74. DOI: 10.1073/pnas.191367098. PMID: 11553815.
8. Sotiriou C., Neo S.Y., McShane L.M. et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(18):10393–8. DOI: 10.1073/pnas.1732912100. PMID: 12917485.
9. Carlson R.W., Brown E., Burstein H.J. et al. NCCN Task Force report: adjuvant therapy for breast cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2006;4(Suppl 1):S1–26. PMID: 16507275.
10. Goldhirsch A., Wood W.C., Coates A.S. et al. Strategies for subtypes – dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann Oncol* 2011;22(8):1736–47. DOI: 10.1093/annonc/mdr304. PMID: 21709140.

Поступила в редакцию 31.07.2017 г. Поступила в печать 15.08.2017 г.