

© Коллектив авторов, 2020

Л.В. ВОЛКОВА¹, Ф.Н. ПАРАМЗИН², А.И. ПАШОВ¹, А.А. МУСАТОВ¹, Л.А. АШРАФЯН³

ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ПРОГНОСТИЧЕСКОГО ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО МАРКЕРА KI-67 В КАРЦИНОМЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹Балтийский федеральный университет имени И. Канта, Калининград, Россия

²Центральная городская клиническая больница,
Калининград, Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова, Москва, Россия

Цель. Провести сравнительный анализ уровня экспрессии маркера пролиферации Ki-67 в раке молочной железы (РМЖ) неспецифического типа, выявленного с помощью традиционной визуальной оценки и при применении метода цифровой микроскопии с использованием программного обеспечения PatternQuant (QuantCenter 3DHISTECH).

Материалы и методы. Проведен сравнительный анализ традиционного способа визуальной количественной оценки маркера пролиферации Ki-67 врачом-патологом и методики с использованием цифровой микроскопии с применением программного обеспечения PatternQuant (QuantCenter 3DHISTECH) на материале 50 случаев РМЖ неспецифического типа у пациенток Калининградской области.

Результаты. Установлено, что, несмотря на сходные средние показатели экспрессии Ki-67, имели место различия в определении максимальных и минимальных показателей пролиферации, при оценке врачом-патологом результаты оценки были несколько выше по сравнению с автоматизированным подсчетом. Это является особенно значимым при определении порогового уровня экспрессии Ki-67 (14%) в каждом индивидуальном случае для определения молекулярного субтипа опухоли.

Заключение. Для объективизации количественной оценки рекомендуется дальнейшее унифицированное исследование показателей пролиферации в карциномах молочной железы, особенно в случаях выраженной гетерогенности опухолей.

Ключевые слова: рак молочной железы, иммуногистохимия, маркер пролиферации Ki-67, цифровая микроскопия.

Вклад авторов. Ашрафян Л.А.: концепция и дизайн исследования, редактирование; Волкова Л.В., Парамзин Ф.Н., Пашов А.И., Мусатов А.А.: сбор и обработка материала, статистическая обработка данных, написание текста, редактирование.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Для цитирования: Волкова Л.В., Парамзин Ф.Н., Пашов А.И., Мусатов А.А., Ашрафян Л.А. Оценка экспрессии прогностического иммуногистохимического маркера Ki-67 в карциноме молочной железы. Акушерство и гинекология. 2020; 1(Прил.): 81-85.
<https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.1suppl.81-85>

L.V. VOLKOVA¹, F.N. PARAMZIN², A.I. PASHOV¹, A.A. MUSATOV¹, L.A. ASHRAFYAN³

ASSESSMENT OF KI67 IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION AS A PROGNOSTIC MARKER IN BREAST CARCINOMA

¹Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

²Central City Clinical Hospital, Kaliningrad, Russia

³V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Minzdrav of Russia, Moscow, Russia

Aim. To compare Ki-67 proliferation marker expression in unspecified type of breast cancer determined by traditional visual assessment and digital microscopy using PatternQuant software (QuantCenter 3DHISTECH).

Material and methods. A comparative study including 50 patients with unspecified type of breast cancer was conducted to compare the determination of the Ki-67 proliferation marker by a pathologist using the traditional visual quantitative assessment and by digital microscopy using PatternQuant software (QuantCenter 3DHISTECH).

Results. Despite comparable mean Ki-67 expressions, their maximum and minimum values determined by a pathologist were slightly higher than by automated assessment. This is especially important in determining a threshold for Ki-67 expression (14%) in each individual case to distinguish molecular subtypes of breast cancer.

Conclusion To objectify the quantitative assessment, a further standardized examination of breast cancer proliferation markers is recommended, especially in cases of significant tumor heterogeneity.

Keywords: breast cancer, immunohistochemistry, Ki-67 proliferation marker, digital microscopy.

Authors' contributions. Ashrafyan L.A.: conception and design of the study, редактирование; Volkova L.V., Paramzin F.N., Pashov A.I., Musatov A.A.: data collection and analysis, statistical analysis, manuscript preparation and editing

Conflicts of interest. The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding. There was no funding for this study.

For citation: Volkova L.V., Paramzin F.N., Pashov A.I., Musatov A.A., Ashrafyan L.A. Assessment of Ki67 immunohistochemical expression as a prognostic marker in breast carcinoma. Akusherstvo i Ginekologiya/Obstetrics and Gynecology. 2020; 1 (Suppl): 81–5. (in Russian) <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.1suppl.81-85>

Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место среди всех онкологических заболеваний у женщин, и, несмотря на успехи в его диагностике и лечении, имеет место рост заболеваемости и смертности от РМЖ. Прослеживается тенденция к увеличению числа женщин молодого возраста с РМЖ. В 2018 г. взяты на учет 64 544 больных с впервые выявленным злокачественным новообразованием молочной железы [1]. Объективная оценка предиктивных и прогностических факторов является ключевой задачей при обследовании и лечении больных онкологическими заболеваниями. Современный стандарт диагностики РМЖ включает гистологическое и иммуногистохимическое (ИГХ) исследования РМЖ, включающие оценку в опухоли уровня экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона, HER2/neu и Ki-67, необходимую для планирования адекватной терапии [2, 3]. Одним из важнейших прогностических факторов при РМЖ является маркер пролиферации Ki-67, выявляемый ИГХ на биопсийном и операционном материале [4, 5]. Метод позволяет определить процент позитивно окрашенных ядер опухолевых клеток, т.е. дать характеристику пролиферативной активности опухоли. В настоящее время указанный показатель оценивают визуально, результаты исследования характеризуются высокой вариабельностью и нередко зависят от опыта врача-патоморфолога [6–8], в связи с этим объективизация оценки экспрессии Ki-67 является актуальной диагностической задачей [2, 9, 10]. Количественная оценка экспрессии маркера Ki-67 при РМЖ различных гистологических типов и степеней злокачественности представляется необходимой для изучения исследования фундаментальных аспектов онкоморфологии РМЖ [11, 12].

Цель исследования – сравнительный анализ уровня экспрессии маркера пролиферации Ki-67 в РМЖ неспецифического типа, выявленного с помощью традиционной визуальной оценки и при применении метода цифровой микроскопии с использованием программного обеспечения PatternQuant (QuantCenter 3DHISTECH).

Материалы и методы

Количественное ретроспективное морфологическое исследование экспрессии Ki-67 проведено с использованием метода цифровой микроско-

пии и программного обеспечения PatternQuant (QuantCenter 3DHISTECH) на парафиновых срезах операционного материала толщиной 4 мкм у 50 пациенток с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа в Калининградской области (архив лаборатории иммуногистохимической и патологоанатомической диагностики КДЦ БФУ им. И. Канта). Методы исследования – клиничко-морфологический анализ, гистологическое исследование с использованием критериев Ноттингемской классификации, ИГХ-окрашивание на иммуногистостейнере BondMax с использованием антител Ki67 (Clone MIB 1, Dako), Progesteron Receptor (16), Estrogen Receptor (6F11), статистическая обработка результатов с помощью программ Statistica 10.0 и Excel 2010. Показатели экспрессии Ki-67, полученные врачом при визуальном количественном исследовании препаратов РМЖ (3–5 полей зрения, подсчет экспрессии в 100 опухолевых клетках в участках опухоли с максимально выраженной пролиферацией), сравнивали с результатами автоматического подсчета цифровых изображений опухоли на идентичных по площади участках опухоли (3 поля зрения, ув. ×400) [6, 7, 13, 14]. Учитывали позитивное ядерное окрашивание опухолевых клеток (%): 1) при относительно однородном распределении Ki-67+ опухолевых клеток количественную оценку проводили в трех случайно выбранных полях зрения; 2) при гетерогенном распределении позитивно окрашенных опухолевых клеток исследовали краевые участки опухоли/«горячие точки» – области с максимальной выраженной экспрессией Ki-67 [10, 15, 16]

Результаты и обсуждение

В основной исследованной выборке (50 случаев) инвазивного РМЖ неспецифического типа средний возраст пациенток составил $61,2 \pm 12,8$ года. Распределение РМЖ по степеням злокачественности было следующим: РМЖ Grade2 выявлен у 36 пациенток, Grade3 – у 13 больных, Grade1 – у 1 женщины, что в целом соответствует описанным ранее данным [17]. Положительная экспрессия рецепторов эстрогенов в опухолях имела место у 41 женщины, прогестерона – у 39. Результаты оценки показателей экспрессии Ki-67 традиционным способом при визуальной количественной оценке врачом и при автоматизированном подсчете процента позитивно

окрашенных клеток опухоли с помощью программы PatternQuant представлены в таблице. Установили, что средние показатели экспрессии Ki-67 в изученных выборках (общая выборка, опухоли Grade2) при оценке врачом и с помощью программы PatternQuant продемонстрировали сходные тенденции. Тем не менее при оценке врачом они были несколько выше по сравнению с автоматизированным подсчетом. Это может быть обусловлено выбором различных полей зрения для исследования при ретроспективном анализе архивных препаратов с помощью программы PatternQuant с целью последующего сравнения с ранее изученными препаратами при комплексной

гистологической и ИГХ-диагностике РМЖ. В пользу данного утверждения свидетельствуют различия в величине минимальных и максимальных показателей экспрессии Ki-67 при оценке двумя использованными методами (рисунок), что является особенно значимым при определении порогового уровня экспрессии Ki-67 (14%) в каждом индивидуальном случае для определения молекулярного субтипа РМЖ на основе оценки суррогатных ИГХ-маркеров (люминальный тип А или люминальный тип В).

Для оценки степени соответствия результатов подсчета средних показателей экспрессии Ki-67 при визуальной количественной оценке и при исполь-

Рисунок. Экспрессия Ki-67 при инвазивном РМЖ при визуальной оценке врачом (а) и при применении метода цифровой микроскопии (б)

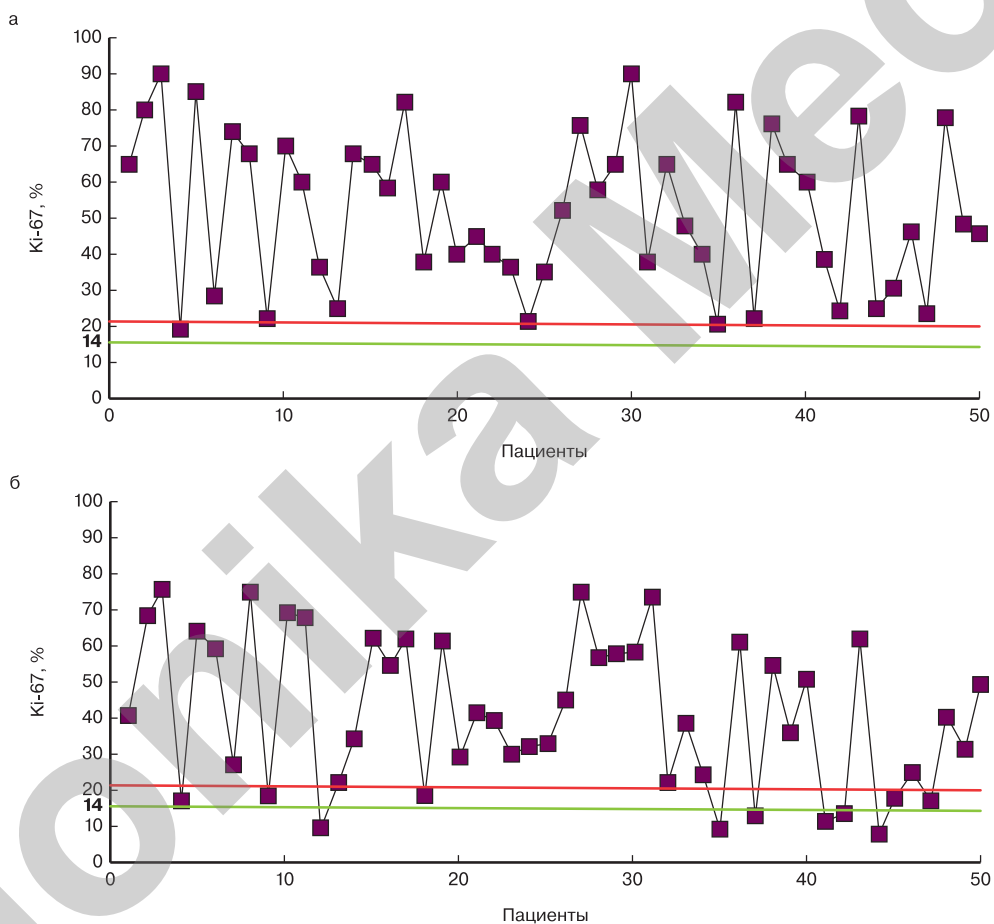


Таблица. Результаты оценки экспрессии Ki-67 при инвазивном раке молочной железы, проведенной различными методами

| Исследованная выборка (n – число случаев) | Визуальная количественная оценка врачом (%) | | Оценка с помощью программы PatternQuant, QuantCenter 3DHISTECH (%) | |
|--|--|---------|---|------------|
| | Средние (M±m) | Min/Max | Средние (M±m) | Min/Max |
| РМЖ, общая выборка (50) | 52,06±21,36 | 19/90 | 41,43±20,86 | 8,33/75,43 |
| РМЖ Grade 2 (36) | 50,38±20,77 | 19/82 | 40,13±20,50 | 8,33/74,75 |
| РМЖ Grade 3 (13) | 52,27±21,79 | 65/90 | 41,49±21,23 | 27,3/75,43 |
| РМЖ ER+ (41) | 52,06±21,36 | 19/82 | 41,43±20,86 | 8,33/74,75 |
| РМЖ PR+ (39) | 50,38±20,77 | 19/85 | 40,13±20,50 | 8,33/74,75 |

зовании цифровых изображений опухоли оценкой с помощью программы PatternQuant выполнен корреляционный анализ данных основной выборки (50 случаев). Выявлена линейная корреляционная зависимость высокой величины, $r=0,72$, $p<0,05$.

Таким образом, по-видимому, в настоящее время для объективной оценки уровня экспрессии важного прогностического маркера пролиферации Ki-67, входящего в стандартную панель ИГХ-исследования опухоли у пациенток с РМЖ, может быть рекомендовано применение визуальной количественной оценки опытным специалистом-патологом. В этом случае возможны адекватный учет гистологических особенностей строения опухоли и степени ее злокачественности, проведение оценки пролиферативной активности в фокусах с ее максимальной выраженностью. Автоматизированный подсчет процента позитивно окрашенных клеток опухоли с помощью программы PatternQuant (QuantCenter 3DHISTECH) на единице площади среза дает удовлетворительные результаты при условии правильного выбора участков опухоли для последующего анализа их цифровых изображений. С учетом полученных данных для объективизации количественной оценки экспрессии Ki-67 может быть рекомендовано дальнейшее одновременное унифицированное исследование показателей пролиферации в максимально идентичных участках опухоли в расчете на одинаковое число опухолевых клеток, что особенно значимо в случаях выраженной гетерогенности опухолей.

Заключение

Средние показатели экспрессии Ki-67 при РМЖ неспецифического типа при традиционной количественной визуальной оценке врачом-патологом и с помощью программы PatternQuant продемонстрировали сходные тенденции как в общей выборке РМЖ неспецифического типа, так и в подгруппах, разделенных по степени злокачественности и экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона в опухоли.

Выявлены различия в определении максимальных и минимальных показателей пролиферации при РМЖ. При их оценке врачом-патологом результаты были несколько выше по сравнению с автоматизированным подсчетом, что может быть особенно значимым при определении порогового уровня экспрессии Ki-67 (14%) в каждом индивидуальном случае для определения молекулярного субтипа опухоли — люминального типа А или люминального типа В.

Несмотря на достаточно высокую эффективность количественной оценки экспрессии Ki-67 при РМЖ с помощью метода цифровой микроскопии и программного обеспечения QuantCenter 3DHISTECH, для объективизации результатов рекомендуется унифицированное исследование показателей пролиферации в максимально идентичных участках опухоли в расчете на одинаковое число опухолевых клеток, что особенно значимо в случаях выраженной гетерогенности опухолей.

Литература/References

1. Kaprin A.D., Starinsky V.V., Petrova G.V. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году. М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2019. 30с. [Kaprin A.D., Starinsky V.V., Petrova G.V. Status of cancer care for the population of Russia in 2018. Moscow: P. Herzen Moscow Oncology Research Institute—Branch of FSBI NMRRC of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2019: 30 p. (in Russian)].
2. Penault-Llorca F., Radosevich-Robin N. Ki67 assessment in breast cancer: an update. Pathology. 2017; 49(2): 166–71. doi: 10.1016/j.pathol.2016.11.006
3. Jing N., Fang C., Williams D.S. Validity and reliability of Ki-67 assessment in oestrogen receptor positive breast cancer. Pathology. 2017; 49(4): 371–8. doi: 10.1016/j.pathol.2017.02.001.
4. Rakha E.A., Green A.R. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. Pathology. 2017; 49(2): 111–9. doi: 10.1016/j.pathol.2016.10.012.
5. Harvey J., Thomas C., Wood B., Hardie M., Dessauvage B., Combrinck M., Frost F.A., Sterrett G. Practical issues concerning the implementation of Ki-67 proliferative index measurement in breast cancer reporting. Pathology. 2015; 47(1): 13–20. doi: 10.1097/PAT.0000000000000192.
6. Кушнарев В.А., Артемьева Е.С., Кудайбергенова А.Г. Сравнение цифрового и визуального методов для оценки индекса Ki-67 в инвазивных карциномах молочной железы. Архив патологии. 2018; 80(2): 38–42. [Kushnarev V.A., Artemyeva E.S., Kudaybergenova A.G. Comparison of digital and visual methods for Ki-67 assessment in invasive breast carcinomas. Archive of Pathology = Arkhiv Patologii. 2018; 80(2): 38–42. (in Russian)]. doi:10.17116/patol201880238-42
7. Elmore J.G., Nelson H.D., Pepe M.S., Longton G.M., Tosteson A.N., Geller B., Onega T., Carney P.A., Jackson S.L., Allison K.H., Weaver D.L. Variability in pathologists' interpretations of individual breast biopsy slides: a population perspective. Ann Intern Med. 2016; 164(10): 649–55. doi: 10.7326/M15-0964.
8. Williams B.J., Hanby A., Millican-Slater R., Nijhawan A., Verghese E., Treanor D. Digital pathology for the primary diagnosis of breast histopathological specimens: an innovative validation and concordance study on digital pathology validation and training. Histopathology. 2018; 72(4): 662–71. doi: 10.1111/his.13403.
9. Del Rosario Taco Sanchez M., Soler-Monsó T., Petit A., Azcarate J., Lasheras A., Artal C., Gil M., Falo C., Pla M.J., Matias-Guiu X. Digital quantification of Ki-67 in breast cancer. Virchows Archiv. 2019; 474(2): 169–76. doi: 10.1007/s00428-018-2481-3.
10. Elmore J.G., Longton G.M., Pepe M.S., Carney P.A., Nelson H.D., Allison K.H., Geller B.M., Onega T., Tosteson A.N., Mercan E., Shapiro L.G., Brunyé T.T., Morgan T.R., Weaver D.L. A randomized study comparing digital imaging to traditional glass slide microscopy for breast biopsy and cancer diagnosis. J Pathol Inform. 2017; 8:12. doi: 10.4103/2153-3539.201920.
11. Joshi S., Watkins J., Gazjnska P., et al. Digital imaging in the immunohistochemical evaluation of the proliferation markers Ki67, MCM2 and Geminin, in early breast cancer, and their putative prognostic value. BMC Cancer. 2015; 15: 546. doi:10.1186/s12885-015-1531-3
12. Menter D.G., Hoque A., Motiwala N., Sahin A.A., Sneige N., Lieberman R., Lippman S.M. Computerized image analysis of Ki-67 in ductal breast carcinoma in situ. Anal Quant Cytol Histol. 2001; 23(3): 218–28. PMID: 11444192
13. Прилепская Е.А., и др. Возможности автоматизированного анализа изображений в патологии. Архив патологии. 2016; 78(1): 51–5. [Prilepskaya E.A., et al. Possibilities of automated image analysis in pathology. Archive of Pathology = Arkhiv Patologii. 2016; 78 (1): 51–5. (in Russian)] 10.17116/patol201678151-55
14. Zhong F., Bi R., Yu B., Yang F., Yang W., Shui R. A comparison of visual assessment and automated digital image analysis of Ki67 labeling index in breast cancer. PloS one. 2016; 11(2): e0150505. doi: 10.1371/journal.pone.0150505
15. Varga Z., Cassoly E., Li Q., Oehlschlegel C., Tapia C., Lehr H.A., Klingbiel D., Thürlimann B., Ruhstaller T. Standardization for Ki-67 assessment in moderately

- differentiated breast cancer. A retrospective analysis of the SAKK 28/12 study. PLoS One. 2015; 10(4): e0123435. doi: 10.1371/journal.pone.0123435
16. *Plancovaline B., Laurinaviciene A., Herlin P., Besusparis J., Meskauskas R., Baltrusaityte I., Iqbal Y., Laurinavicius A.* A methodology for comprehensive breast cancer Ki67 labeling index with intra-tumor heterogeneity appraisal based on hexagonal tiling of digital image analysis data. Virchows Archiv. 2015; 467(6): 711–22. doi: 10.1007/s00428-015-1865-x
17. *Rakha E.A., Aleskandarani M., Toss M.S., et al.* Breast cancer histologic grading using digital microscopy: concordance and outcome association. Journal of clinical pathology. 2018; 71(8): 680–6. doi:10.1136/jclinpath-2017-204979

Поступила 23.12.2019

Принята в печать 26.12.2019

Received 23.12.2019

Accepted 26.12.2019

Сведения об авторах:

Волкова Лариса Владимировна, д.м.н., профессор, заведующая лабораторией иммуногистохимической и патогистологической диагностики Клинико-диагностического центра БФУ им. И. Канта, профессор кафедры фундаментальной медицины медицинского института, ФГАОУ ВО «Балтийский Федеральный Университет имени И. Канта». Тел.: +7 (4012) 59-55-95 e-mail: volkova-lr@rambler.ru

Адрес: 236016, Россия, г. Калининград, ул. А. Невского, д.14.

Парамзин Федор Николаевич, врач хирург-онколог ГБУЗ КО «Центральная городская клиническая больница». Тел.: +7 (4012) 64-78-21; e-mail: fedia93@gmail.com

Адрес: 236005, Россия, г. Калининград, ул. Летняя, д. 3.

Пашов Александр Иванович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии медицинского института ФГАОУ ВО «Балтийский Федеральный Университет имени И. Канта». Тел.: +7 (911) 461-49-98; e-mail: pachov@mail.ru

Адрес: 236016, Россия, г. Калининград, ул. А. Невского, д.14.

Мусатов Алексей Александрович, клинический ординатор кафедры фундаментальной медицины медицинского института ФГАОУ ВО «Балтийский Федеральный Университет имени И. Канта». Тел.: +7 (4012) 59-55-95; e-mail: sayaleks@gmail.com

Адрес: 236016, Россия, г. Калининград, ул. А.Невского, д.14.

Ашрафян Лев Андреевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова, директор института онкогинекологии и маммологии. Тел.: +7 (095)531-44-44; e-mail: levaa2004@yahoo.com

Адрес: 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

About the authors:

Larisa V. Volkova, MD, PhD, Professor, Head of the Department of Laboratory Diagnostics of Clinical Diagnostical Centre, Professor of the Department of Fundamental Medicine of Medical Institute, Immanuel Kant Baltic Federal University. Phone: +7(921)852-2042; e-mail: volkova-lr@rambler.ru

Address: 14 Alexander Nevsky Str., 236016, Kaliningrad, Russia;

Fedor N. Paramzin, surgeon-oncologist, "Central City Clinical Hospital". Phone: +7 (4012)64-78-21; e-mail: fedia93@gmail.com

Address: 3 Letnya Str., 236005, Kaliningrad, Russia;

Aleksander I. Pashov, MD, Head of the Department of Obstetrics and Gynecology, Immanuel Kant Baltic Federal University.

Phone +7(911)-461-49-98; email: pachov@mail.ru

Address: 14 Alexander Nevsky Str., 236016, Kaliningrad, Russia;

Aleksey A. Musatov, Clinical Ordinator of the Medical Institute, Immanuel Kant Baltic Federal University. Phone: + 7(911)453-64-06; e-mail: sayaleks@gmail.com

Address: 14 Alexander Nevsky Str., 236016, Kaliningrad, Russia, 236016.

Lev A. Ashrafyan, acad. of RAS, MD, Professor, deputy director of FSBI «National medical research center for obstetrics, gynecology and perinatology named

after academician V.I. Kulakov» ministry of healthcare of the Russian Federation. Phone: +7(095)531-44-44 e-mail: levaa2004@yahoo.com

Address: 4, Oparina street, Moscow, Russian Federation, 117997.