

## Экспрессия рецепторов андрогенов и C-Kit (CD117) в тройном негативном раке молочной железы

А.Ю.Крылов<sup>1</sup>, Ю.В. Крылов<sup>2</sup>, В.В. Янченко<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> ГУО «Институт повышения квалификации и переподготовки кадров Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь» г. Минск, Беларусь

<sup>2</sup> УЗ «Витебское областное клиническое патологоанатомическое бюро», г. Витебск, Беларусь

<sup>3</sup> УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Беларусь

<sup>4</sup> ОДО «Научно-исследовательское предприятие Ресан», г. Витебск, Беларусь

## Expression of androgen receptor and C-Kit (CD117) in triple negative breast cancer

A.Y. Krylov<sup>1</sup>, Y.V. Krylov<sup>2</sup>, U.V. Yanchanka<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Institute of improvement of professional skill and retraining of personnel of the State committee of judicial examinations of Belarus, Minsk, Belarus

<sup>2</sup> Vitebsk regional clinical pathoanatomical bureau, Vitebsk, Belarus

<sup>3</sup> Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

<sup>4</sup> JSC "Scientific-research enterprise Resan", Vitebsk, Belarus

### Аннотация

Иммуногистохимическим методом оценивали экспрессию андрогеновых рецепторов (AR) и C-Kit (CD117) в клетках тройного негативного рака молочной железы. Из 110 исследованных нами случаев тройного негативного рака молочной железы экспрессия AR выявлена в 30%, C-Kit (CD117) в 41,8%. Определение андрогеновых рецепторов и C-Kit (CD117) клеток рака молочной железы иммуногистохимическим методом является ценным элементом диагностики для последующего выбора целевой индивидуальной гено- или иммунотерапии ТНРМЖ.

### Ключевые слова

Андрогеновый рецептор, C-Kit (CD117), тройной негативный рак молочной железы, моноклональные антитела, иммуногистохимия

### Введение

По результатам ИГХ исследования определяется выбор направления лекарственной терапии

### Summary

Expression was assessed by immunohistochemistry for the androgen receptor (AR) and C-Kit (CD117) in the cells of the triple negativnogo breast cancer. Of the 110 cases studied by us triple nega-tive breast cancer AR expression was detected in 30%, C-Kit (CD117) in 41.8%. Determination of androgen receptors and C-Kit (CD117) breast cancer cell immunohistochemical diagnostic method is a valuable element for subsequent selection of the target individual genomes or immunotherapy TNBC.

### Keywords

Androgen receptor, C-Kit (CD117), triple-negative breast cancer, monoclonal antibody, immunohistochemistry

прооперированных пациенток с РМЖ. Трастузумаб назначается при гиперэкспрессии HER2/neu, гормональная терапия при наличии экспрессии

ER и PR. При ТНРМЖ терапия трастузумабом и гормональная не эффективны, отмечается плохой прогноз, применяется агрессивная терапия цитостатиками.

ТНРМЖ составляет 11-22% всех вновь выявленных инвазивных опухолей молочной железы. ТНРМЖ обычно представлены инвазивными протоковыми карциномами с высоким грейдом и плохим прогнозом [1, 2].

Отсутствие возможности использования для лечения ТНРМЖ таргетной и гормональной терапии, диктует необходимость поиска дополнительных ИГХ маркеров для определения возможности разработки таргетной терапии ТНРМЖ.

В наших предыдущих исследованиях ИГХ методом определяли наличие андрогеновых рецепторов (AR) в клетках ТНРМЖ. В 11 (22%) из 50 случаев выявлено наличие AR в клетках ТНРМЖ. Метастазы в регионарных лимфатических узлах не определялись ни в одном случае AR ТНРМЖ [3].

Протоонкоген C-Kit (CD117, PBT, SCFR) локализуется в 4 хромосоме, локус 4g12 и включает 21 экзон и является трансмембранным рецептором тирозинкиназы, который играет важную роль в развитии гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСТ), рака легкого и РМЖ. C-Kit экспрессируется в молочной железе в физиологических условиях [4]. Сообщалось, что экспрессия C-Kit высока в эпителии нормальной молочной железы и снижается в инвазивном раке [5,6]. Tahany M и соавторы в 54 из 72 случаев ТНРМЖ (75%) обнаружили позитивные CD117, причем отчетливо окраска была в 20 наблюдениях (37,1%) [7].

Kanarathy Pillai et al проанализировали 340 женщин в Малазии с 2002-2006 гг., нашли 42 случая ТНРМЖ (12,4%). Сравнили 18 ТНРМЖ с 18 не ТНРМЖ. В 16 случаях (88,9%) C-Kit было позитивным, в 2 (11,1%) негативным, в не ТНРМЖ 5 (27,8%) позитивным, 13 (72,2%) негативным [8].

При изучении экспрессии CD117 в различных гистологических типах ТНРМЖ Simon и соавторы сообщили, что только 2,1% протоковых карцином и 0,5% дольковых экспрессируют C-Kit, в тоже время медулярные опухоли экспрессируют этот маркер в 19,1%. Разные результаты могут быть обусловлены применением различных анти-тел и методик оценки результатов [9,10].

В исследовании у Yun Zhu и соавторов (2014) 171 пациентки с ТНРМЖ 16,8% от всех РМЖ обнаружена экспрессия C-Kit в 72 (42,1%). При этом гистологически позитивные C-Kit соответствовали протоковым карциномам 62 (41,3%) из

150, метапластические в 5 (83,3%), медулярные в 3 из 9 (33%), другие типы в 2 (33,3%) из 6. В этой работе C-Kit положительной опухолью считалась при наличии цитоплазматической и/или мембранной окраски более чем в 1% клеток [9]. В работах Kashigawa и соавторов (2014) [11], а так же Sara Jonsons и соавторов (2014) [12] экспрессию C-Kit оценивали подобно HER-2. Так степень 0 при отсутствии окрашивания; степень 1+ 10% клеток или слабое неполное окрашивание мембран; 2+ - как минимум 10% клеток с полным, слабым или умеренным окрашиванием; 3+ как минимум 10% клеток с сильным, полным окрашиванием мембран. Экспрессия C-Kit считалась положительной при 2+ и 3+, отрицательный - при 0 и 1+.

*Цель исследования.* Оценка ИГХ экспрессии рецепторов андрогенов и C-Kit (CD117) клетками ТНРМЖ.

### Материалы и методы

Материалом исследования явились 110 случаев ТНРМЖ отобранных по базам данных и журнала ИГХ исследования Витебского, Гродненского патологоанатомических бюро и отделения онкоморфологии РНПЦ (онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова). Средний возраст пациенток составлял 58±12 лет. Материал обрабатывался по стандартным методикам, срезы окрашивали гематоксилин-эозином. ИГХ экспрессию рецепторов андрогенов и C-Kit определяли стандартными наборами фирмы «ДАКО», Androgen Rec Clone AB441 M3562 (моноклональные антитела), CD117/C-Kit A4502 (поликлональные кроличьи антитела). При оценке результатов экспрессии рецепторов андрогенов, положительным считался результат, когда отчетливое ядерное окрашивание наблюдалась более чем в 1% клеток (по аналогии с оценкой рецепторов эстрогена). При этом учтены случаи когда их количество превышало 30%. Для оценки C-Kit (CD117) за положительный результат принимали окрашивание при наличии опухоли более 1% клеток с цитоплазматическим и/или мембранным окрашиванием (Yun Zhu и соавторы 2014) [9]. При этом отдельно учитывались по аналогии с HER2 случаи гиперэкспрессии, когда минимум 10% клеток имели сильное положительное окрашивание мембран. Случаи сомнительного качества, краевая окраска и т.д. исключены из исследования. При клинико-морфологическом анализе использовались данные республиканского канцер-регистра. Статистическая обработка данных возраста пациенток представляется в

виде  $M \pm s$  (где  $M$  – среднее значение и  $s$  – стандартное отклонение).

### Результаты и обсуждение

При анализе 110 случаев (таблица 1) ТНРМЖ положительная экспрессия AR+>1% (рисунок 1) отмечена в 33 наблюдениях, что составило 30%, отрицательная AR- в 77 наблюдениях (70%). Средний возраст AR+ пациенток был выше, чем у AR- ( $60 \pm 13$  лет и  $57 \pm 12$  лет соответственно). Гистологическая степень злокачественности (Грейд), было выше в AR- опухолях, чем в AR+. Наиболее злокачественные опухоли Грейд 3 составили для AR- 45 случаев (40,9%), для AR+ - 15 (13,6%). В 9 наблюдениях (8,2%) изучаемых случаев или 27,3% от позитивных AR, экспрессия AR клетками ТНРМЖ превышала 30%.

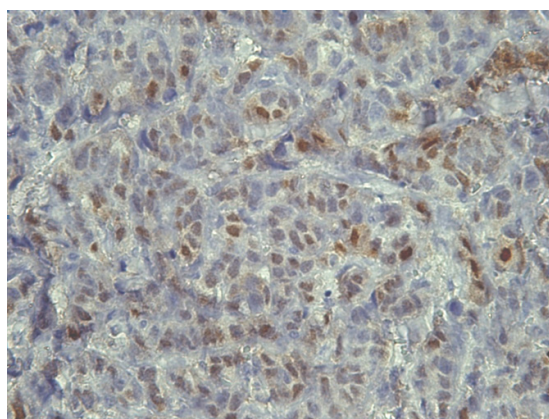
ИГХ изучение экспрессии C-Kit (CD117) в 110 случаях ТНРМЖ зарегистрировало положитель-

ную реакцию в более (1% клеток) в 46 наблюдениях (41,8%) (рисунок 2). Отрицательная реакция была в 64 наблюдениях (58,2%). Средний возраст для C-Kit (CD117) положительных опухолей был значительно ниже, чем для негативных (соответственно  $54 \pm 12$  лет и  $61 \pm 12$  лет). По гистологической степени злокачественности положительные и отрицательные опухоли существенно не отличались. C-Kit (CD117) определялась в Грейд 3 опухолях в 29 случаях (26%), отрицательная реакция была в 36 наблюдениях (32%). В 10 случаях из всех 110 наблюдалась гиперэкспрессия (9,1%) (рисунок 3). Среди 46 C-Kit (CD117) положительных опухолей это составило 41,9%.

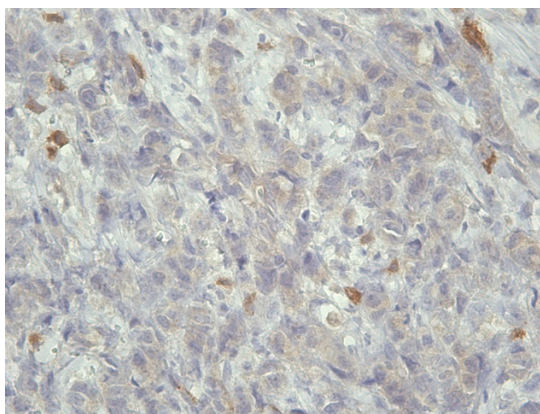
Таким образом, проведенный нами ИГХ анализ подтвердил данные других авторов о наличии в ТНРМЖ маркеров предполагающих разработку подходов к его таргетной терапии. Кроме того, установлено, что средний возраст AR+ пациенток

**Таблица 1. ИГХ экспрессия AR и C-Kit клетками ТНРМЖ (n=110)**

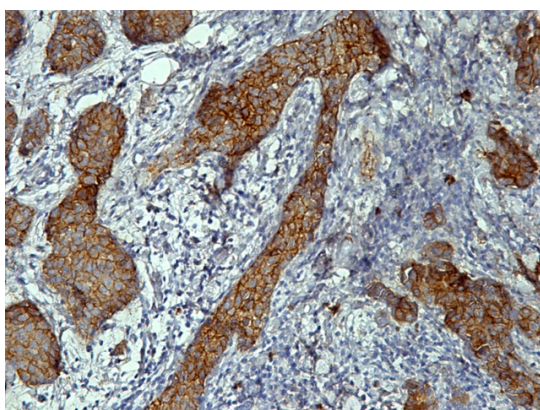
Маркер, показатели	%
AR+ (n=33)	30%
G1-2(n=18)	16,4%
G3(n=15)	13,6%
AR- (n=77)	70%
G2(n=32)	29,1%
G3(n=45)	40,9%
C-Kit+ (n=46)	41,8%
G2(n=17)	15,5%
G3(n=29)	26,4%
C-Kit-(n=64)	58,2%
G1-2(n=28)	24,5%
G3(n=36)	32,7%



**Рис. 1. Ядерное окрашивание в различные оттенки коричневого цвета с антителами к AR x400**



**Рис. 2. Цитоплазматическое окрашивание в различные оттенки коричневого цвета с антителами к C-Kit (CD117) x400**



**Рис. 3. Интенсивное мембранное и цитоплазматическое окрашивание с антителами к C-Kit (CD117) x100**

был выше, чем C-Kit+ (CD117), гистологическая степень злокачественности C-Kit (CD117) позитивных опухолей почти в два раза превалировала над андроген-позитивными опухолями.

Особого внимания заслуживают факты обнаружения опухолей с высоким процентом AR+ клеток, и, особенно, случаев гиперэкспрессии C-Kit (CD117). Во многих публикациях посвященных экспрессии этого маркера указывается на необходимость изучения возможности применения ингибитора C-Kit тиразинокиназ в частности иматиниба при ТНРМЖ по аналогии с его высокой эффективностью на начальных этапах применения при гастроинтестинальных стромальных опухолях [13-16]. Однако все не так однозначно. Ряд исследований показал, что ответ на лечение иматинибом тесно связан с мутационной активизацией C-Kit (CD117), а не с экспрессией C-Kit (CD117) протеина [17,18]. В исследовании Yun Zhu и соавторов (2014) проведено изучение C-Kit генных мутаций в экзонах

9, 11, 13 и 17 у 10 C-Kit негативных женщин и 35 C-Kit позитивных. Обнаружена только одна активированная мутация в экзоне 11 C-Kit. Однако, в этой публикации позитивная оценка C-Kit основана на наличии в опухолях цитоплазматического и/или мембранного окрашивания более, чем в 1% клеток, и не указана, была ли в этом случае гиперэкспрессия. Это предполагает продолжить изучения наличия мутаций в ТНРМЖ с различной степенью экспрессии C-Kit.

### **Заключение**

1. Экспрессия AR выявлена в 30%, а C-Kit (CD117) в 41,8% случаев тройного негативного рака молочной железы .
2. Определение андрогеновых рецепторов и C-Kit (CD117) клеток рака молочной железы иммуногистохимическим методом является основанием для разработки и выбора новых подходов целевой индивидуальной гено- или иммунотерапии ТНРМЖ.

## Литература

1. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS (2010) Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 363: 1938–1948.
2. Podo F, Buydens LMC, Degani H, Hilhorst R, Klipp E, et al. (2010) Triple-negative breast cancer: Present challenges and new perspectives. *Mol Oncol* 4(3): 209–229.
3. Крылов А.Ю., Крылов Ю.В., Янченко В.В. Определение андрогеновых рецепторов в клетках тройного негативного рака молочной железы. *Иммунопатология Аллергология Инфектология* 2016; №1: 32-36.
4. Miettinen M., Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13: 205–220.
5. Chui X, Egami H, Yamashita J et al. Immunohistochemical expression of the c-kit proto-oncogene product in human malignant and non-malignant breast tissues. *Br J Cancer* 1996; 73: 1233–1236.
6. Natali P.G., Nicotra M.R., Sures I. et al. Breast cancer is associated with loss of the c-kit oncogene product. *Int J Cancer* 1992; 52: 713–717.
7. Tahany M., Mahamed E. Over expression of c-KIT (CD117) in triple-negative breast cancer. *Egypt J Pathol* 2011 31: 113-117.
8. Pillai S.K., Tay A., Nair S. et al. Triple-negative breast cancer is associated with EGFR, CK 5/6 and c-Kit expression in Malaysian women. *BMC Clinical Pathology* 2012, 12:18.
9. Zhu Y., Mang Y., Guan B. et al. C-kit and PDGFRA gene mutations in triple negative breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7 (7): 4280-4285.
10. Simon R., Panussis S., Maurer R. et al. KIT (CD117)-positive breast cancers are infrequent and lack KIT gene mutations. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 178–183.
11. Kashiwagi S., Yashiro M., Takashima T. et al. C-Kit expression as a prognostic molecular marker in patients with basal-like breast cancer. *Br J Surg* 2013; 100: 490-496.
12. Jansson S., Bebdahi P.O., Grabau D.A. et al. The three receptor tyrosine kinases c-KIT, VEGFR2 and PDGFR $\alpha$ , closely spaced at 4q 12, show increased protein expression in triple-negative breast cancer. *Plosone*, July 2014: 1-10.
13. Kim M.J., Ro J.Y., Ahn S.H. et al. Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu overexpressing phenotypes. *Hum Pathol* 2006; 37: 1217-1226.
14. Lerma E., Peiro G., Ramon T. et al. Immunohistochemical heterogeneity of breast carcinomas negative for estrogen receptors, progesterone receptors and Her2/neu (basal-like breast carcinomas). *Mod Pathol* 2007; 20: 1200-1207.
15. Nalwoga H., Arnes J.B., Wabinga H. et al. Expression of EGFR and c-kit is associated with the basal-like phenotype in breast carcinomas of African women. *APMIS* 2008; 116: 515-525.
16. Lux M.L., Rubin B.P., Biase T.L. et al. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000; 156: 791-795.
17. Dy G.K., Miller A.A., Mandrekar S.J. et al. A phase II trial of imatinib (ST1571) in patients with c-kit expressing re-lapsed small-cell lung cancer: a CALGB and NCCTG study. *Ann Oncol* 2005; 16: 1811-1816.
18. Lasota J. Not all c-kit mutations can be corrected by imatinib. *Lab Invest* 2007; 87: 317.

## Сведения об авторах:

Крылов Андрей Юрьевич – Заведующий кафедрой судебной медицины ГУО «Институт повышения квалификации и переподготовки кадров Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь», к.м.н., доцент, врач-патологоанатом. Телефон +375-29-614-87-41. E-mail: andrei.krilov@mail.ru

Крылов Юрий Васильевич – Начальник бюро, д.м.н., профессор, УЗ «Витебское областное клиническое патологоанатомическое бюро». Телефон + 375 33 349 37 97. E-mail: vokrab@vitebsk.by

Янченко Владимир Вилиянинович – к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «ВГМУ». В.н.с. ОДО «НИКП РЕСАН». Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК. Тел.8 0212 57 53 80 – Янченко Владимир Вилиянинович.

Поступила 3.11.2016 г.