

АПОПТОЗ В ПАТОГЕНЕЗЕ ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИХ И ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М.В. Мнихович, Л.М. Соломатина, Е.В. Купова

Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова

В статье проведен анализ литературы, освещающей проблему апоптоза в целом и роль апоптоза в патогенезе различных заболеваний молочной железы как опухолевой так и гиперпластической природы.

Последние годы характеризуются резким возрастанием частоты заболеваний молочных желёз. Наибольший удельный вес среди их доброкачественной патологии составляют гиперпластические процессы, объединённые общим термином «фиброзно-кистозная болезнь» или «мастопатия». Эволюция представления об их биологической сущности в течение более чем ста лет происходила в широком диапазоне: от признания этой патологии в качестве обязательного этапа неопластической трансформации до отрицания определения как «болезнь» (S.M. Love et al., 1990). В течение длительного времени мастопатия рассматривалась как предраковое состояние, что определило в Советском Союзе во второй половине прошлого века реализацию программы диспансеризации, в рамках которой проводилась работа по выявлению, лечению и наблюдению за больными с этой патологией. Однако статистические данные свидетельствуют о неуклонном росте заболеваемости раком молочной железы. Так, в последние годы в России в структуре злокачественных новообразований у женщин частота опухолей молочных желёз (19,8%) превышает таковую опухолей тела (6,8%), шейки матки (5,2%) и яичников (4,9%) (Е.М. Аксель 2006; В.М. Мирабишвили, 2007). В настоящее время более половины случаев злокачественной патологии женской репродуктивной сферы приходится на долю рака молочной железы.

Изучение механизмов развития, своевременная диагностика и лечение фиброзно-кистозной болезни (ФКБ) важны в силу двух основных обстоятельств: во-первых, у части пациенток развитие заболевания сопровождается выраженной клинической симптоматикой, снижающей качество их жизни; во-вторых, пролиферативные формы ФКБ являются факторами риска для развития рака молочной железы (S.J. London et al., 1992; L.C. Hartman et al., 2005; J.G. Elmore, 2005). В формировании современных представлений об апоптозе важное место занимает работа [Kerr, et. al. 1972] о существовании двух различных видов клеточной смерти у животных - апоптоза и некроза.

Картина апоптоза у животных - это переход фосфатидилсерина из внутреннего монослоя цитоплазматической мембраны в наружный монослой, уменьшение объема клетки, сморщивание цитоплазматической мембраны, конденсация ядра, разрывы нити ядерной ДНК и последующий распад ядра на части, фрагментация клетки на мембранные везикулы с внутриклеточным содержимым (апоптозные тельца), фагоцитируемые макрофагами и клетками-соседами. Такая же участь

постигает клетку, когда в ней произошла мутация, которая может привести к опухолевому разрастанию ткани, когда она становится ненужной для организма, например, в процессе онтогенетического развития или, применительно к лимфоцитам, на заключительных этапах инфекционного процесса, когда организм уже не нуждается в дальнейшей выработке антител [Cohen, ea 1993 , Thompson, ea 1995 , Jacobson, ea 1997].

При апоптозе сохраняется целостность мембран, органеллы выглядят морфологически интактными, а продукты дробления клетки, апоптозные тельца (или везикулы) представляют собой отдельные фрагменты, окруженные мембраной. Формирование концепции апоптоза и осознание роли апоптоза в многочисленных физиологических процессах привело к активному исследованию нарушений и значения этого процесса при различных патологических состояниях. Особый интерес представляет изучение патологии апоптоза как стадии онкогенеза. Общепринятой точкой зрения в настоящее время считается концепция, согласно которой, нарушение равновесия между процессами пролиферации и апоптоза является главной причиной формирования опухоли. Эта парадигма является основной отправной точкой для разработки новых методов диагностики и лечения в онкологии.

Апоптоз является вариантом запрограммированной клеточной гибели и выполняет защитно-адаптивную роль в поврежденной ткани взрослого человека, поскольку способствует устранению генетически измененных или поврежденных клеток.

Апоптоз может запускаться в любую фазу клеточного цикла в случае геномных повреждений, которые не могут быть устранены. Это также является защитным клеточным механизмом против злокачественной трансформации. Ferguson и Anderson (Going J.J., 1988) описали пик индекса апоптоза в конце лютеиновой фазы цикла в клетках молочной железы, используемых ранее для оценки пролиферативных процессов. Пик апоптоза является следствием снижения концентрации эстрадиола с прогестероном в конце цикла. На самом деле, на линиях клеток молочной железы (MCF-7) было показано, что эстрадиол индуцирует апоптоз клеток. Однако обнаруживаемый пик апоптоза может быть также объяснен влиянием прогестерона во время второй фазы цикла.

Считается, что в образовании гиперпластических процессов определенную роль играет апоптоз. Он играет большую роль в морфогенезе и является механизмом постоянного контроля размеров органов.

Исследование апоптоза может позволить уточнить не известные до настоящего времени патогенетические механизмы заболеваний, в частности гиперпластических процессов в органах репродуктивной системы, в том числе в молочной железе.

Патогенетические механизмы развития гиперпластических процессов в молочной железе до настоящего времени не выяснены.

Некоторые гиперпластические процессы такие как (продуктивные формы фиброаденоматоза, цистаденопапилломы, интрадуктальные папилломы) являются фактором риска развития рака молочной железы

В настоящее время, основное количество экспериментального материала получено с использованием морфологического подхода, регистрирующего морфологические особенности апоптозных изменений. При этом показано, что в случае рака молочной железы, имеют место противоречивые данные о прогностической

значимости уровня апоптоза. По данным разных авторов он может иметь как положительное, так и отрицательное прогностическое значение

В регуляции апоптоза принимает участие большое количество веществ, а наиболее изученными из них являются вещества семейства bcl-2. Ген bcl-2 впервые был описан как ген, который транслоцируется в клетках фолликулярной лимфомы и ингибирует апоптоз. При дальнейших исследованиях оказалось, что bcl-2 является мультигеном. Все вещества, относящиеся к данному классу делятся на активаторы и ингибиторы апоптоза.

Члены этого семейства взаимодействуют друг с другом. И одним из уровней регуляции апоптоза является взаимодействие белок-белок. Белки семейства bcl-2 формируют как гомо- так и гетеродимеры. Например, mcl-1 взаимодействует с bax при преобладании первого жизнеспособность клетки повышается, при избытке второго – уменьшается.

Белок mcl-1 путем ингибирования митохондриально-опосредованного апоптоза, препятствует появлению цитохрома C в цитоплазме клетки. Который в свою очередь является иницирующим фактором, запускающим каскад реакций, приводящих к фрагментации ДНК и лизису белков. Данный механизм апоптоза свойственен патологически измененным клеткам.

Нарушение регуляции апоптоза характерно как для доброкачественных, так и злокачественных новообразований молочной железы [2,3,6,15]. В литературе особое внимание уделяется изучению особенностей апоптоза в эпителиальных клетках рака молочной железы [17,19,20]. Работы, посвященные исследованию уровня апоптоза при доброкачественных новообразованиях молочной железы единичны [5,2,3,5,8,10]. Причем, для его оценки используется преимущественно TUNEL-метод [4,6,9].

Боженко В.К. и соавт. сообщили об изучении оценки уровня спонтанного апоптоза у 140 пациенток раком молочной железы, получавших лечение, средний возраст 55,8 лет. Метастазы в регионарных лимфатических узлах гистологически подтверждены в 61 случае.

Фиброаденомы проанализированы у 16 пациенток в возрасте от 15 до 46 лет, средний возраст 31,6 года и изучены 11 случаев фиброзно-кистозной мастопатии у пациенток в возрасте от 19 до 53 лет, средний возраст 40,6 лет. Проведенный анализ уровня апоптоза показал, что в неизменной ткани молочной железы он составил в среднем 2,24%. В эпителии фиброаденом его значения составило в среднем 2,23%. В образцах мастопатии – 4,23%. Максимальные значения уровня апоптоза характеризуют рак молочной железы – в среднем 7,14%. Причем, для инфильтрирующего долькового рака они были минимальны и составили 3,88%. Инфильтрирующий протоковый рак, 7,92%. Приведенные результаты показывают существенные отличия в уровнях спонтанного апоптоза в неизменной ткани молочной железы по сравнению с патологически измененными вариантами. Сравнение уровня спонтанного апоптоза при различных заболеваниях показывает увеличение его в ряду фиброаденома - фиброзно-кистозная мастопатия – рак молочной железы. Однако достоверные отличия обнаруживаются только с группой рака молочной железы.

Полученные результаты показали, что уровень спонтанного апоптоза достоверно отличается при различных гистологических формах рака молочной железы (инфильтрирующий протоковый, инфильтрирующий дольковый рак), имеющих различный клинический прогноз.

Gompel A., 2002; Kandouz M., 1999 подсчитали фракцию апоптотических клеток в культуре нормальных клеток и на линиях гормонально-зависимых раковых клеток. Прогестины (Org 2058, Org OM38, тиболон) увеличивали количество клеток в апоптозе вне зависимости от присутствия эстрадиола. Подобное действие обнаруживалось при применении различных антиэстрогенных агентов и стероидных дериватов, более активных, чем 4-гидрокситамоксифен (Kandouz M., 1999; Gompel A., 2000; Somaĭ S., 2003).

В связи с этим были изучены механизмы, посредством которых медируется проапоптотическое действие. Регуляция апоптоза контролируется несколькими генами - проапоптоза и антиапоптоза. Первым геном антиапоптоза был открыт Bcl-2. Продукты генов этого семейства, содержащие ВНЗ домен, могут подвергаться гетеродимеризации, в связи с чем выживание или гибель клеток будут зависеть от соотношения bcl-2/bax. При низком соотношении происходит апоптоз (Oltvai Z.N., 1993). Это действие медируется молекулой на мембране митохондрий, цитохромом c. Bcl-2 и bax также связаны с митохондриальной мембраной; цитохром c высвобождается из мембраны и запускает каскад каспаз (Slee E.A., 1999). Каспазы являются семейством молекул, необходимых для процесса апоптоза. Активация каспаз носит необратимый характер и приводит к апоптозу клеток, при этом предыдущие звенья процесса обратимы. Так, полагают, что bcl-2 способен останавливать апоптоз, вызываемый многими стимулами. Белок p53, супрессирующий опухоли ген, может индуцировать апоптоз по пути bcl-2/bax. Поэтому, если восстановительные механизмы, активируемые p53, не могут убрать повреждения ДНК, индуцируется апоптоз, и таким образом, проявляется защитный эффект против передачи поломок ДНК.

Kandouz M., 1996, 1999; Gompel A., 2000, 2002; Somaĭ S., 2003 было показано, что эстрадиол и прогестерон могут модулировать экспрессию bcl-2 и bclxL без влияния на экспрессию проапоптотических белков bax и bak в нормальных и раковых клетках молочной железы. Эстрадиол действует на уровне транскрипции, его действие может быть остановлено при назначении антиэстрогена, ICI 182780 (Somaĭ S., 2003). Прогестины значительно снижают уровни bcl-2 и bclxL, в то время как эстрадиол оказывает противоположный эффект. Кроме того, комбинация эстрадиола и прогестерона не предотвращает их влияние на bcl-2. Однако bcl-2 является необходимым звеном в регуляции процесса апоптоза и может предотвратить апоптоз, вызванный ионизирующей радиацией, ультрафиолетовым воздействием, химиотерапией, как и индуцированный p53 апоптоз. Поскольку эстрадиол стимулирует экспрессию p53, он может остановить апоптоз, индуцированной химиотерапией (Teixeira C., 1995). Сильное ингибирующее действие прогестинов может усилить эти эффекты.

Кроме того, по результатам, полученным на нормальных клетках молочной железы, было показано, что прогестины и антиандрогены модулируют экспрессию других мишеней каскада апоптоза, таких как p53 (повышение уровня), каспаза 3 (повышение уровня), в то время как эстрадиол оказывает противоположное действие на уровень этих протеинов (Gompel A., 2000; Somaĭ S., 2003). Также эти белки являются мишенями для стероидов в некоторых клеточных линиях молочной железы. Авторами изучались клеточные линии рака молочной железы, содержащие мутированные p53 и T47-D, соответственно не несущие проапоптотические свойства. Было удивительно обнаружить противоположные данным авторов дикие формы, в которых эстрадиол индуцирует p53 наряду с пролиферативным своим

действием, а прогестины и антиэстрогены подавляют их экспрессию (Kandouz M., 1999; Gompel A., 2000). Прогестины оказывают противоположные действия в нормальных клетках и с мутированным p53, что необходимо для превентивного влияния на развитие рака молочной железы, поскольку полагается, что 30-40 % случаев рака молочной железы и некоторые случаи гиперплазии происходят на фоне мутации p53.

Максименко А.Н.(2006) изучал экспрессию антиапоптозного фактора MCL - 1 в тканях молочной железы при её гиперпластических процессах.

Исследования проводились на материале послеоперационного биоптата, по поводу резекции ФА молочной железы у 17 женщин, средний возраст которых составил 30,56 методами гистологического и иммуногистохимического исследования.

Результаты исследования показали, что процент занимаемой площади MCL -1 в ФА $3,69 \pm 2,976$ достоверно превышал аналогичный показатель в окружающих опухоль тканях $1,69 \pm 0,47$, $p < 0,001$.

Процент занимаемой площади ТК в ФА $0,38 \pm 0,04$ достоверно превышало аналогичный показатель в окружающих опухоль тканях $0,28 \pm 0,01$, $p < 0,001$.

Таким образом, было доказано, что: в регуляции апоптоза в тканях молочной железы принимает участие антиапоптозный фактор MCL -1, что подтверждено наличием его экспрессии с помощью иммуногистохимического метода исследования. Процент занимаемой площади MCL -1 в ФА $3,69 \pm 2,976$ достоверно превышает аналогичный показатель в окружающих опухоль тканях $1,69 \pm 0,47$. Экспрессия MCL -1 в фиброаденомах достоверно превышает аналогичный показатель в контактных тканях молочной железы. Величина экспрессии MCL -1 в контактных с опухолью тканях молочной железы зависит от их состояния. Изменения тканей молочной железы, характерные для продуктивных форм фиброаденоматоза, сопровождаются усилением экспрессии антиапоптозного фактора MCL -1

ЛИТЕРАТУРА

1. Высоцкая И.В. Дисгормональные дисплазии молочных желез / И.В. Высоцкая, В.П. Летагин, Е.А. Ким // Маммология. – 2006. – № 2. – С.9-12.
2. Летагин В.П. Факторы риска развития рака молочной железы / В.П. Летагин, И.В. Высоцкая, Е.А. Ким // Маммология. – 2006. – №4. – С.10-13.
3. Сметник В.П. Половые гормоны и молочная железа / В.П. Сметник // Гинекология. – 2000. – № 2. – С.133-135.
4. Опухолевые маркеры рака молочной железы / И.В. Высоцкая [и др.] // Маммология. – 2005. – № 1. – С.61-65.
5. Герштейн Е.С. Биологические маркеры молочной железы: методологические аспекты и клинические рекомендации / Е.С. Герштейн, Н.Е. Кушлинский // Маммология. – 2005. – № 1. – С.65-69.
6. Канцерогенез. Под ред. Д. Г; Заридзе. М., 2005
7. Практическая маммология / под ред. акад. М.И. Давыдова, проф. В.П. Летагина. – М.: Практическая медицина, 2007. – 458с.
8. Мустафин Ч.К. Вопросы диагностики и лечения диффузной мастопатии / Ч.К. Мустафин // Доктор Ру. – 2005. – № 5. – С.17-20.
9. Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы: в 4-х т. / И.С. Фрейдлин, А.А. Тотолян. – СПб.: Наука, 2001. – Т.3. – 390с.

10. Abdel-Moneim I., Melamed M.R., Darzynkiewicz Z., Gorczyca W. Proliferation and apoptosis in solid tumors. Analysis by laser scanning cytometry// *Anal Quant Cytol Histol.* – 2001.- V. 23, № 1.- P.88.
11. Anderson TJ. Pathological studies of apoptosis in the normal breast// *Endocr Relat Cancer.* –1999.- V. 6, № 1.- P. 9-12.
12. Strange R. Apoptosis in mouse mammary gland development / R. Strange // *Experientia.* -1991. -№47.- P.105.
13. Ben-Hur H, Mordechay E, Halperin R, Gurevich P, Zandbank J, Herper M, Zusman I. Apoptosis-related proteins (Fas, Fas ligand, bcl-2 and p53) in different types of human breast tumors// *Oncol Rep.* – 2002.- V. 9, № 5.- P. 977-80.
14. Bertho AL, Santiago MA, Coutinho SG. Flow cytometry in the study of cell death// *Mem Inst Oswaldo Cruz.* - 2000.- V. 95, № 3.- P.429-33.
15. F. Dario Cuello-Carrion , Daniel R.Ciocca. Improved detection of apoptic cells using a modified in situ Tunel technique// *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* -1999.- V. 47, № 6.- P. 837-839.
16. Darzynkiewicz Z, Bedner E. Analysis of apoptotic cells by flow and laser scanning cytometry// *Methods Enzymol.* – 2000.- V. 322.- P. 18-39. Gonzalez-Campora R, Galera Ruiz MR, Vazquez Ramirez F, Rios Martin JJ, Fernandez Santos JM, Ramos Martos MM, Gomez Pascual A. Apoptosis in breast carcinoma// *Pathol Res Pract.* – 2000.- V. 196, № 3.- P. 167-74.
17. Michels J.J., Duigou F., Marnay J. Flow cytometry in primary breast carcinomas. Prognostic impact of proliferative activity// *Breast cancer Res. Treat.* – 2000 - V. 62, № 2. P. 117-26.
18. O'Donovan N, Crown J, Stunell H, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ. Caspase 3 in breast cancer// *Clin Cancer Res.* – 2003.- V. 9, № 2.- P. 738-42
19. Peng L, Jiang H, Bradely C. Detection of B lymphoma cells undergoing apoptosis by Annexin-V assay// *Chin Med Sci J.* – 2002.- V. 17, № 1.- P. 17-21.
20. Richard L. Ornberg. Proliferation and apoptosis measurements by color image analysis based on differential absorption// *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* - 2001.- V. 49, № 8.- P.1059-1060.
21. Schondorf T, Gohring UJ, Becker M, Hoopmann M, Schmidt T, Rutzel S, Rein DT, Ulrich U, Fechteler R, Bersch A, Mallmann P, Valter MM. High apoptotic index correlates to p21 and p27 expression indicating a favorable outcome of primary breast cancer patients, but lacking prognostic significance in multivariate analysis// *Pathobiology.* – 2004.- V. 71, № 4.- P. 217-22.
22. Rouleau-Dubois C, Cuny M, Ferrieres G, Simony-Lafontaine J, Rouanet P, Grenier J, Jeanteur P, Baldet P, Escot C. Spontaneous apoptosis in the intra-ductal component's stroma of breast invasive carcinoma// *Anticancer Res.* – 2004.- V. 24, № 1.- P. 53-7.
23. Sun S., Li L., Sun D. In situ observation of apoptosis and proliferation in breast cancer and its precancerous lesions// *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* – 1999. - V. 21, № 6.- P. 447-9.
24. Talieri M, Diamandis EP, Katsaros N, Gourgiotis D, Scorilas A. Expression of BCL2L12, a new member of apoptosis-related genes, in breast tumors// *Thromb Haemost.* – 2003.- V. 89, № 6.- P. 1081-8. Mark C. Willingham. Cytochemical methods for the detection of apoptosis// *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.*-1999.- V. 47, № 9.- P. 1101-1109.

25. Zhang SQ, Qiang SY, Yang WB, Jiang JT, Ji ZZ. [Expression of survivin in different stages of carcinogenesis and progression of breast cancer]// Ai Zheng. – 2004.- V. 23, № 6.- P. 697-700.

APOPTOSIS IN THE PATHOGENESIS OF THE HYPERPLASTIC AND TUMORAL BREAST DISEASES

M.V. Mnikhovich, L.M. Solomatina, E.V. Kupova

The analysis of the literature touching upon the problem of the apoptosis in general and the role of the apoptosis in the pathogenesis of various breast diseases of tumoral or hyperplastic origin was given.