

УДК 618.19-006.6-033.2:57.088

A. V. Youshkova, A. Yu. Baryshnikov, E. V. Stepanova, M. I. Nechushkin, Ya. V. Vishnevskaya

EXPRESSION OF BIOMOLECULAR MARKERS IN BREAST CANCER PATIENTS WITH IMN METASTASIS

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

ABSTRACT

Breast cancer is the most common oncological disease in women and is the major death cause in 35–55 years old women. The identification of needed markers for accurate prognosis and adequate treatment in breast cancer is still controversial.

17 patients with breast cancer with metastasis in axillar and IMN metastasis were enrolled in the study. Immunohistochemical analysis of HER-2/neu, VEGF, Ki-67, Bcl2, Bax and p53 was performed on paraffin-embedded tissue section.

4 patients (23,5 %) had disease progression 6–36 month after surgery. Follow-up period was 15–32 months. Based on the data obtained we suppose that the expression of apoptotic and angogenic markers can predict the efficacy of chemotherapy.

Key words: angiogenesis, axillar metastasis, IMN metastasis.

A. В. Юшкова, М. И. Нечушкин, А. Ю. Барышников, Е. В. Степанова, Я. В. Вишневская

ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С МЕТАСТАЗАМИ В ПАРАСТЕРНАЛЬНУЮ ОБЛАСТЬ

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

Рак молочной железы занимает 1-е место по частоте возникновения среди женщин и является основной причиной смертности в возрасте 35–55 лет. Идентификация маркеров для более точного прогноза течения заболевания и выбора адекватной терапии является пока открытой проблемой для больных раком молочной железы.

В статье приведены данные исследования, включающего 17 больных раком молочной железы с метастазами в аксиллярные и лимфатические узлы парастернального коллектора. Всем больным проведены радикальные операции в ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН в период с 2000 по 2002 г. У 4 (23,5 %) больных появились метастазы в течение 6–36 мес. Исследование проводилось иммуногистохимическим методом на парафиновых блоках больных с использованием антител к to Ki-67, Bcl2, Bax, p53, HER-2/neu и VEGF.

Полученные в ходе исследования результаты предполагают использование маркеров ангиогенеза и апоптоза для прогнозирования течения рака молочной железы с метастазами в парастернальный коллектор.

Ключевые слова: ангиогенез, аксиллярные метастазы, метастазы в парастернальный лимфоколлектор.

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) занимает 1-е место по частоте возникновения среди женщин и является основной причиной смертности в возрасте 35–55 лет. 5-летняя общая выживаемость больных составляет в среднем 65 %, однако она сильно зависит от стадии заболевания. Женщины, у которых были обнаружены метастазы РМЖ на момент удаления первичной опухоли ($T_{1-2}N_3M_0$ по классификации TNM), имеют не-

благоприятный прогноз (3-летняя безрецидивная выживаемость — менее 50 %), и, используя традиционные клиничко-морфологические характеристики, определить прогноз течения болезни и, следовательно, дальнейшую тактику лечения более точно сложно.

В связи с этим на главное место в прогнозировании течения злокачественного процесса выходит молекулярная морфопатология, которая учитывает наличие/отсутствие онкогенов и супрессоров опухолевого

роста (так называемых молекулярно-биологических маркеров) в клетках [1]. Различия в экспрессии определенных маркеров могут объяснить, почему сравнимые по распространенности и гистологической структуре опухоли различаются по агрессивности течения заболевания. Особое внимание патоморфологов привлекает возможность получить сведения о нарушениях механизмов пролиферации, апоптоза и ангиогенеза в опухоли [2].

Увеличение в последнее время интереса к определению различных молекулярно-биологических маркеров в опухолевой ткани потребовало разработки новых, точных и надежных методов оценки изменений, происходящих в опухолевых клетках. Иммуногистохимия является господствующим методом оценки гиперэкспрессии или мутации белка. Современные иммуногистохимические методы позволяют точно оценивать статус белков не только на криостатных срезах, но и на фиксированных в формалине, заключенных в парафин тканях. Иммуногистохимическое определение белков в клетках, как было показано, совпадает с данными, полученными при использовании методов определения изменений на геномном уровне.

Однако до сих пор идентификация маркеров для более точного прогноза течения заболевания и выбора адекватной терапии является пока открытой проблемой для больных РМЖ. Исследование прогностических маркеров в комплексе со всеми подходами, которые обычно доступны в клинической практике, в будущем поможет выбрать наиболее эффективные методы лекарственной терапии индивидуально для каждого больного.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 17 больных раком молочной железы, имеющих метастазы в парастеральные лимфатические узлы. Средний возраст больных составил 50 ± 7 лет. Всем больным проведены радикальные операции в РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН в период с 2000 по 2002 г. Среди них у 4 больных размеры опухоли соответствовали стадии T_1 , у 10 — T_2 и у 2 — T_3 . Гистологический тип и степень злокачественности определяли согласно классификации ВОЗ (1987) [1]. Протоковый инфильтративный рак был выявлен у 11 (64,7 %) больных, дольковый инфильтративный — у 3 (17,6 %), смешанный дольковый и протоковый — у 2 (11,8 %) и у 1 (24 %) больной — тубулярный рак. Определение рецепторов эстрогена проводилось рутинным биохимическим методом в лаборатории клинической биохимии. 81 % больных были положительными по рецепторам эстрогенов.

Почти все больные получали адъювантное лечение по схеме CAF в количестве 4–6 курсов. 4 больных не получали адъювантного лечения.

У 4 (23,5 %) больных появились метастазы в течение 6–36 мес. после операции. Срок наблюдения за больными составил 13–52 мес.

В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела к p53 (клон DO7, разведение 1:200, DAKO Corp.), Bcl2 (клон 124, разведение 1:50,

DAKO Corp.), VEGF (клон A-3, разведение 1:1000, Santa Cruz Biotech) и кроличьи поликлональные антитела к HER-2/neu (разведение 1:1500, DAKO Corp.), Вах (разведение 1:500, DAKO Corp.).

Иммуногистохимическое исследование проводили по стандартной методике. Для выявления антигенных детерминант проводили обработку срезов в Target Retrieval Solution (DAKO Corp.) в течение 30 мин при температуре 95 °C, инкубацию с первичными антителами проводили в течение ночи при температуре 4 °C. Для визуализации реакции антиген–антитело использовали стрептавидин-биотиновую тест-систему LSAB+kit (DAKO Corp.). Хромогеном служил ДАБ+ (DAKO Corp.). Срезы докрашивали гематоксилином и заключали в бальзам.

В исследовании применяли следующие критерии результатов:

- 1) опухоль считали положительной по p53 или VEGF, если в ткани опухоли было окрашено более 25 % опухолевых клеток;
- 2) опухоль считали положительной по Bcl2 или Вах, если было окрашено более 20 % опухолевых клеток;
- 3) для оценки интенсивности окрашивания антителами к HER2/neu использовали критерии: 0 — отсутствие окрашивания; 1+ — слабое окрашивание мембраны опухолевых клеток; 2+ — средняя интенсивность окрашивания полной мембраны более 10 % опухолевых клеток; 3+ — сильная степень окрашивания более 10 % опухолевых клеток. Опухоль, оцениваемую как 0 или 1+, считали отрицательной, 2+ или 3+ — положительной по HER2/neu.

Статистический анализ проводили на персональном компьютере с использованием программы SPSS (v 9.0 for Windows). Для проверки достоверности различий значений признаков в группах использовали тесты «хи-квадрат» (χ^2) и точный критерий Фишера. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$ (95 % точности).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице представлены данные об экспрессии молекулярно-биологических маркеров в первичной опухоли и соответствующих им метастазах в лимфатические узлы. Накопление p53 наблюдается в 35 % случаев первичной опухоли, Bcl2 — в 87 %, Вах — в 42 % случаев. 18 % случаев имели гиперэкспрессию HER2/neu. Экспрессия VEGF (стимулятора ангиогенеза) обнаружена в 36 % случаев первичной опухоли.

В метастазах молочной железы в парастеральные лимфатические узлы накопление p53 встречается у 41 % больных, высокая экспрессия Bcl2 — у 73 %, Вах — у 75 %, VEGF — у 55 %, гиперэкспрессия HER2/neu — у 18 % больных.

Мы обнаружили высокую степень соответствия гиперэкспрессии p53, Bcl2 и HER2/neu в первичной опухоли и метастазах в парастеральные лимфатические узлы. Экспрессия Вах и VEGF увеличивается в метастазах в лимфатические узлы (данные статистически недостоверны). Так, частота экспрессии Вах в лимфа-

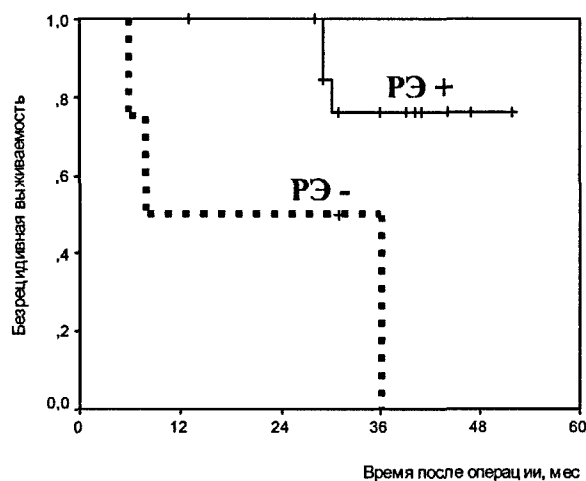
Экспрессия молекулярно-биологических маркеров в первичной опухоли и метастазах в лимфатических узлах

Маркер	Первичная опухоль, %	Метастаз в лимфатические узлы, %
p53	35	41
Bcl2	87	73
Bax	42	75
HER2/neu	18	18
VEGF	36	55

тических узлах составляет 75 % по сравнению с 42 % в первичной опухоли. Экспрессия VEGF составляет 36 % в первичной опухоли и 55 % в метастазе.

Мы также проанализировали взаимосвязь экспрессии молекулярно-биологических маркеров с появлением метастазов после удаления первичной опухоли.

Маркеры p53, Bcl2, Bax и VEGF не показали прогностической значимости на небольшой группе больных. Среди 4 больных, имевших прогрессирование болезни, 67 % были HER2/neu-положительными (3+), тогда как среди больных, не имевших прогрессирования, частота гиперэкспрессии HER2/neu составила 11 % ($p=0,08$). Среди традиционных факторов прогноза в нашем исследовании наличие рецепторов эстрогенов в опухоли было благоприятным фактором. При отсутствии рецепторов эстрогенов в опухоли время до прогрессирования больных составило 8 мес., а при наличии рецепторов в опухоли не было достигнуто на момент наблюдения ($p=0,014$).



Безрецидивная выживаемость больных РМЖ в зависимости от экспрессии рецепторов эстрогена в опухоли

ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика новых прогностических факторов (маркеров апоптоза и ангиогенеза) при РМЖ является необходимой для определения больных, имеющих высокий риск метастазирования. В нашем исследовании

больные с гиперэкспрессией HER2/neu или положительным рецепторным статусом чаще имеют прогрессирование после удаления опухоли и проведения адъювантной терапии в режиме CAF. Другие факторы из-за малого срока наблюдения и небольшого количества больных не показали прогностической значимости.

Существуют многочисленные данные литературы о том, что молекулярно-биологические маркеры могут иметь прогностическую значимость для больных РМЖ с метастазами в лимфатические узлы. Среди них наиболее перспективными являются HER2/neu и VEGF.

Белок HER2/neu (c-erb B2) — член семейства рецепторов эпидермального фактора роста. Это гликопротеин с молекулярной массой 185 кДа. Экспрессию этого белка в небольших количествах находят на цитоплазматической мембране клеток эпителиального происхождения. При трансформации клеток происходит усиление синтеза белка и увеличение количества рецепторов на поверхности клеток (гиперэкспрессия). При РМЖ гиперэкспрессия HER2/neu возникает чаще всего в результате амплификации гена. Гиперэкспрессия HER2/neu в опухоли сопровождается резким снижением апоптоза, усилением пролиферации, уменьшением рецепторов эстрогенов в опухоли, снижением эффективности химио- и эндокринотерапии. HER2/neu может предсказывать укорочение безрецидивной выживаемости у больных РМЖ, получавших различные режимы химио- и гормонотерапии [3, 10–12]. Нами также показано прогностическое значение HER2/neu для больных, имеющих метастазы в лимфатические узлы. Требуется проведение дополнительных исследований для подтверждения прогностического значения HER2/neu в лечении больных РМЖ.

Неоангиогенез — формирование сети капилляров из эндотелиальных клеток, выстилающих мелкие вены, — необходимое условие для дальнейшего роста опухолевого узелка, достигшего в диаметре 1–2 мм. Недостаток в питательных веществах и кислороде, необходимых для роста опухоли, приводит к появлению клонов опухолевых клеток, выделяющих факторы, которые стимулируют неоангиогенез. Прорастание новых микрососудов является необходимым процессом, способствующим росту опухоли, а также увеличивающим ее метастатические способности [6].

На сегодняшний день существуют несколько методов оценки ангиогенной активности опухолей. Один из наиболее широко используемых — непосредственный подсчет количества микрососудов в опухоли, окрашенных специфическими антителами к эндотелиальным клеткам CD34, CD31 и фактору VIII [13]. Другие методы основываются на определении в опухоли основных стимуляторов ангиогенеза (VEGF, bFGF).

Экспрессия VEGF является важным прогностическим признаком укорочения выживаемости у больных РМЖ, особенно N⁺-группы [4, 9]. Опубликованы данные более 87 ретроспективных исследований, посвященных изучению прогностической значимости плотности микрососудов опухоли при РМЖ, включающих

суммарно более 8936 пациентов [7, 14]. В работах более $\frac{2}{3}$ авторов высокое количество микрососудов предсказывало ухудшение безрецидивной и общей выживаемости [5, 7, 8]. Из 27 исследований, где был проведен многофакторный анализ, в 23 было показано, что количество сосудов в опухоли является независимым прогностическим фактором течения РМЖ [7], причем для больных как с метастазами в лимфатические узлы, так и без метастазов [14, 15]. Нами не было показано зависимости частоты появления метастазов от экспрессии VEGF в первичной опухоли.

Открытие механизмов метастазирования, определение критических мишеней для ингибирования метастазирования являются актуальными задачами экспериментальной онкологии. В нашем исследовании опухолевые клетки в парастеральных лимфатических узлах имеют высокую частоту экспрессии Вах и VEGF. Проведение дополнительных исследований позволит выявить достоверные различия в экспрессии молекулярно-биологических маркеров между первичной опухолью и метастазами в парастеральные лимфатические узлы.

Использование молекулярно-биологических маркеров для прогнозирования течения рака молочной железы является перспективным направлением. Проведение углубленного изучения маркеров апоптоза и ангиогенеза при РМЖ с метастазами в парастеральную область поможет адекватно оценить прогностическую значимость этих факторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ермилова В. Д. Роль современной патоморфологии в характеристике рака молочной железы // Практическая онкология. — 2002. — № 3(1). — С. 15–20.
2. Кушлинский Н. Е., Герштейн Е. С. Современные возможности молекулярно-биохимических методов оценки биологического «поведения» рака молочной железы // Вестн. РАМН. — 2001. — № 9. — С. 65–70.
3. Berry D. et al. HER-2 and p53 expression vs. tamoxifen resistance in estrogen-receptor-positive node-positive breast cancer // J. Clin. Oncol. — 2000. — Vol. 18. — P. 3471–3479.
4. Desruisseau S., Palmari J., Giusti C. et al. Clinical relevance of amphiregulin and VEGF in primary breast cancers // Int. J. Cancer. — 2004. — Vol. 111(5). — P. 733–740.
5. Ellis P. A., Smith I. E., Detre S. et al. Reduced apoptosis and proliferation and increased Bcl2 in residual breast cancer following preoperative chemotherapy // Breast Cancer Res. Treat. — 1998. — Vol. 48. — P. 107–116.
6. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications // N. Eng. J. Med. — 1971. — Vol. 285. — P. 182.
7. Gasparini G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer // Crit. Rev. Oncol. Hematol. — 2001. — Vol. 37. — P. 97–114.
8. Gasparini G., Harris A. L. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool // J. Clin. Oncol. — 1995. — Vol. 13. — P. 765–782.
9. Konecny G. E., Meng Y. G., Untch M. et al. Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients // Clin. Cancer Res. — 2004. — Vol. 10(5). — P. 1706–1716.
10. MacGrogan G., Jollet I., Huet S. et al. Comparison of quantitative and semiquantitative methods of assessing MIB-1 with the S-phase fraction in breast carcinoma // Mod. Pathol. — 1997. — Vol. 10. — P. 769–776.
11. Miles D. W., Harris W. H., Gillett C. E. et al. Effect of c-erbB(2) and estrogen receptor status on survival of women with primary breast cancer treated with adjuvant cyclophosphamide/methotrexate/fluorouracil // Int. J. Cancer. — 1999. — Vol. 84. — P. 354–359.
12. Muss H. B. et al. C-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer // New Engl. J. Med. — 1994. — Vol. 330. — P. 1260–1266.
13. Parums D., Cordell J., Macklem K. et al. // Clin. Pathol. — 1990. — Vol. 43. — P. 752.
14. Uzzan B., Nicolas P., Cucherat M., Perret G.-Y. Microvessel Density as a Prognostic Factor in Women with Breast Cancer: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis // Cancer Res. — 2004. — Vol. 64. — P. 2941–2955.
15. Weidner N., Folkman J., Pozza F. et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma // J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda). — 1992. — Vol. 84. — P. 1875–1887.