

ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Республиканский Онкологический Научный Центр МЗ РУз

(г. Ташкент, Узбекистан)

Работа выполнена в соответствии с планом НИР РОНЦ МЗ РУз. по теме «Современные подходы в диагностике и лечении больных раком молочной железы», № гос. регистрации 001467.

Вступление. В патогенезе большинства онкопатологий лежат механизмы блокирования процессов апоптоза. Одним из механизмов образования и развития опухолевого процесса являются мутации в генах, регулирующих клеточный цикл [2, 8, 11]. Данные ряда авторов указывают на то, что трансформированные клетки, содержащие мутантные гены, неспособны подвергаться апоптозу [1, 4, 6, 7]. В работе [3] приводятся сведения о зависимости уровня апоптоза в опухолевых клетках (ОК) у больных с раком молочной железы (РМЖ) с их возрастом. При этом делается акцент на противоречивый характер данных: если одни авторы выявили усиление апоптоза с увеличением возраста больных, то другие установили более выраженный апоптоз ОК у больных репродуктивного возраста по сравнению с женщинами в менопаузе; третья группа исследователей не выявила корреляции связей [5, 12]. Пролиферативная и апоптотическая активность у больных с РМЖ в соответствии с рекомендациями Fitzgibbons et al. (2000), оценивается по градациям (>1%, >10%, >20% ОК). Исходя из этого, экспрессия гена Ki-67 более чем в 20% ОК и низкий уровень экспрессии bcl-2 рассматриваются как крайне неблагоприятные факторы. Большое количество или накопление мутантного гена (mt) p53 в опухолевой ткани (ОТ) свидетельствует об агрессивном поведении этой формы РМЖ, коротким безметастазным и безрецидивным периодом, плохим прогнозом и более продолжительной терапией [4, 6, 7, 12, 13]. Уровень p53 может использоваться в комплексном исследовании РМЖ в качестве независимого прогностического маркера и способствует отбору больных, потенциально чувствительных к химио- или лучевой терапии [9, 10].

Цель исследования. Изучение уровня маркеров пролиферации и апоптоза в ОТ молочной железы (МЖ), их соотношение у больных РМЖ разного возраста и связь с эффективностью терапии.

Объект и методы исследования. В исследовании приняли участие 90 больных РМЖ (табл. 1). Пациентки были разделены на 3 группы (табл. 2): в I-ую включены больные фертильного возраста от 26

Таблица 1

Характеристика больных

Стадия	TNM	Количество больных	
		Абсолютное	%
II b	T3N0M0	5	5,5
III a	T2N2M0	15	16,7
	T3N1M0	47	52,2
	T3N2M0	18	20
	T4N1M0	2	2,2
III b	T4N2M0	3	3,3
Итого:		90	100

Таблица 2

Распределение больных по возрасту

Группы	Количество больных n – 90	Средний возраст больных
I группа до 45 лет	23 (25,5%)	37,6 лет
II группа до 55 лет	50 (55,5%)	46,2 лет
III группа старше 55 лет	17 (18,8%)	57,7 лет

Таблица 3

Распределение больных в зависимости от гистологического варианта и характера роста опухоли

Гистологический вариант рака молочной железы	Количество больных, абсолютное (%) n=90
Инфильтрирующий протоковый рак	72 (80%)
Инфильтрирующий дольковый рак	14 (15,6%)
Прочие формы рака	4 (4,4%)

до 45 лет, во II-ую – женщины пременопаузального возраста от 46 до 54 года, в III-ую вошли пациентки свыше 55 лет (климактерического и постменопаузального периода).

Проанализирован уровень экспрессии маркеров Ki-67, p53 и bcl-2 в биопсийном материале ОТ МЖ у пациенток различных возрастных групп. При анализе опухолевого материала установлено, что протоковый рак встречается у 80% больных, тогда

Экспрессия молекулярно-биологических маркеров в биопсийном опухолевом материале больных РМЖ в (%) до проведения ПХТ

Маркер	Группы и количество больных	Экспрессия маркера		
		Высокая (+) >50 %	Умеренная (+/-) от 10 % до 50 %	Низкая/ отсутствие <5 %
mt p53	I – 23	10 (43,5%)	7 (30,4%)	6 (26,1)
	II – 50	28 (56,0%)	12 (24,0)	10 (20,0)
	III – 17	3 (17,6%)	7 (41,2)	7 (41,2)
Ki-67	I – 23	12 (52,2%)	8 (34,8)	3 (13,0)
	II – 50	20 (40,0%)	15 (30,0)	15 (30,0)
	III – 17	7 (41,2%)	8 (47,1)	2 (11,8)
bcl-2	I – 23	5 (21,7%)	15 (65,2)	3 (13,0)
	II – 50	18 (36,0%)	12 (24,0)	20 (40,0)
	III – 17	7 (41,2%)	3 (17,6)	7 (41,2)

как инфильтрирующий рак у 15,5 % (табл. 3). Иммуногистохимический анализ проводили на парафиновых срезах, предназначенных для стандартного морфологического исследования. Были исследованы моноклональные антитела к Ki-67, p-53, bcl-2. Исследование проведено по общепринятой методике с системой визуализации продуктов иммуногистохимических реакций (DAKO Cytomation LSAB 2 System – HRP). Интерпретация оценки экспрессии Ki-67, p53, bcl-2 была проведена полуколичественным методом окрашивания клеток. При окрашивании менее 5% клеток, вне зависимости от интенсивности, опухоль считается негативной. Позитивный статус верифицировался при: 1) окрашивании более 50% клеток вне зависимости от интенсивности; 2) интенсивном (3+) окрашивании – более 5% клеток; 3) умеренном окрашивании – от 10% до 50% клеток.

Результаты исследований и их обсуждение.

Анализ гистологических препаратов пациенток с РМЖ указывал на экспрессию мутантного гена p53 (mt p53), не зависящую от возраста пациенток. Так, например, в I-ой и II-ой группах экспрессия выявлялась в 73,9% и 80% соответственно опухолевых образцах, а в III-ей группе mt p53 встречался с частотой 58,8%. Опухолевых Ki-67- положительных образцов было в I-ой группе 87,0%, во II-ой – 70%; в III-ей – 88%. Позитивная экспрессия гена bcl-2 выявлена в 87,0% случаев в I-ой группе, во 2-ой – 60% опухолевых образцов с bcl-2 положительной экспрессией, а в 3-ей группе – 58,8% образцов (табл. 4).

При сравнительной характеристике уровня экспрессии маркеров апоптоза и пролиферации с эффективностью терапии было установлено, что полной регрессии опухоли после проведения 2-х курсов полихимиотерапии (ПХТ) по схеме CAF не происходило ни у одной больной, частичная регрессия опухоли выявлена у 33,3% больных, стабилизация опухолевого процесса наблюдалась у 64,4%, а прогрессирование – у 2,2% (табл. 5).

Отсутствие полной регрессии опухоли при проведенной стандартной схеме мы связали с высоким

уровнем экспрессии mt p53 в ОК МЖ (от 60% до 80% опухолевых образцов были mt p53-положительны независимо от возраста больных), в связи с этим ОК клетки этих больных приобрели резистентность к ПХТ и p53-зависимого апоптоза не происходило. Среди этих же опухолевых образцов выявлена высокая положительная экспрессия гена bcl-2, а так как известно, что ген bcl-2 является ингибитором p53-зависимого апоптоза, то в данном случае, возможно, отсутствие или низкое содержание гена p53 дикого типа не приводит к антиапоптотическому механизму действия белка bcl-2. Mt p53 не участвует в блокировании митотического цикла. Поэтому клетки с измененным геномом продолжают пролиферировать,

а селективный отбор приводит к появлению трансформированного клона клеток, которые приобретают резистентность к терапии. Деблокирование mt p53 клеточного цикла и индукция пролиферации подтверждается наличием большого количества (от 70% до 90%) Ki 67-положительных опухолевых образцов у больных с частичной регрессией опухоли и стабилизацией опухолевого процесса.

Таблица 5

Степень регрессии опухоли после проведения 2 курсов ПХТ по схеме CAF

Степень регрессии опухоли	Количество больных n-90	Количество больных в %
Полная	0	0
Частичная	30	33,3
Стабилизация	58	64,4
Прогрессирование	2	2,2

Выводы. Таким образом, нами показана взаимосвязь неблагоприятного характера течения РМЖ с увеличением уровня экспрессии mt p53 и гена пролиферации Ki-67, а также со снижением или повышением экспрессии гена bcl-2. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости определения Ki-67, mt p53, bcl-2 фенотипа ОК с целью проведения эффективной противоопухолевой терапии.

Перспективы дальнейших исследований.

Исследования будут продолжены и расширены с учетом определения других онкомаркеров у больных с РМЖ. Необходимо изучить корреляцию между онкомаркерами и экспрессией данных генов с отдаленными результатами лечения. Намечается оптимизировать режим ПХТ у больных РМЖ с осложнениями, что позволит улучшить результаты лечения и выживаемость пациенток с вышеприведенной патологией.

Литература

1. Ермилова В. Д. Роль современной патоморфологии в характеристике рака молочной железы / В. Д. Ермилова // Практик. онкол. – 2002. – Т. 3, № 1. – С. 15-20.
2. Герштейн Е. С. Тканевые маркеры как факторы прогноза при раке молочной железы / Е. С. Герштейн, Н. Е. Кушлинский // Практик. онкол. – 2002. – Т. 3, № 1. – С. 38-44.
3. Крючков А. Н. Апоптоз опухолевых клеток рака молочной железы и его влияние на прогноз заболевания / А. Н. Крючков // Российский онкологический журнал. – 2009. – № 1. – С. 45-47.
4. Кушлинский Н. Е. Современные возможности молекулярно-биохимических методов оценки биологического «поведения» рака молочной железы / Н. Е. Кушлинский, Е. С. Герштейн // Вестн. РАМН. – 2001. – № 9. – С. 65-70.
5. Семиглазов В. Ф. Значение прогностических и предсказывающих факторов при выборе лечения у больных метастатическим раком молочной железы / В. Ф. Семиглазов // Практик. онкол. – 2000. – № 2. – С. 26-30.
6. Allred D. Accumulation of mutant p53 is associated with increased proliferation and poor clinical outcome in node negative breast cancer / D. Allred [et al.] // J. Nat. Cancer Inst. – 1993. – Vol. 85. – P. 200-206.
7. Elledge R. M. bcl-2, p53, and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a South-West Oncology Group study / R. M. Elledge [et al.] // J. Clin. Oncol. – 1997. – Vol. 15. – P. 1916-1922.
8. Esteva F. Prognostic markers in early breast cancer / F. Esteva, G. Hortobagyi // Breast Cancer Res. – 2004. – Vol. 6, № 3. – P. 109-118.
9. Goradini D. Biomolecular prognostic factors in breast cancer / D. Goradini, M. Diadone // Curr. Opin. Obstet. Gynecol. – 2004. – Vol. 16, № 1. – P. 49-55.
10. O'Malley F. P53 mutations are confined to the comedo type ductal carcinoma in situ of the breast: immunohistochemical and sequencing data / F. O'Malley [et al.] // Lab. Invest. – 1994. – № 71. – P. 67-72.
11. Ruibal A. Clinic-biological impact of pS2 positivity in estrogen receptor negative-infiltrating ductal carcinomas of the breast / A. Ruibal [et al.] // Rev. Esp. Med. Nucl. – 2000. – Vol. 19, № 6. – P. 428-433.
12. Thor A. D. Accumulation of p53 tumor suppressor Surowiak P. Analysis of five-year course of the disease / P. Surowiak [et al.] // Folia Histochem. Cytobiol. – 2001. – Vol. 39, № 2. – P. 143-144.
13. gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers / A. D. Thor [et al.] // J. Natl. Cancer Inst. – 1992. – № 84. – P. 845-855.

УДК 618. 19-006. 6-037+575. 1]-07.

ЕКСПРЕСІЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ МАРКЕРІВ У ХВОРИХ РАКОМ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Шомансурова Н. С., Гилдієва М. С.

Резюме. Приводяться дані по вивченню експресії онкогенних маркерів Ki-67, p53 і bcl-2 в матеріалі біопсії пухлинної тканини при раку молочної залози (РМЗ). Показаний взаємозв'язок несприятливого перебігу РМЗ із збільшенням рівня експресії mt p53 і гена проліферації Ki-67, а також із зниженням або підвищенням експресії гена bcl-2.

Ключові слова: рак молочної залози, онкогенні маркери, експресія, поліхіміотерапія.

УДК 618. 19-006. 6-037+575. 1]-07.

ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Шомансурова Н. С., Гилдиева М. С.

Резюме. Приводятся данные по изучению экспрессии онкогенных маркеров Ki-67, p53 и bcl-2 в биопсийном материале опухолевой ткани при раке молочной железы (РМЖ). Показана взаимосвязь неблагоприятного течения РМЖ с увеличением уровня экспрессии mt p53 и гена пролиферации Ki-67, а также со снижением или повышением экспрессии гена bcl-2.

Ключевые слова: рак молочной железы, онкогенные маркеры, экспрессия, полихимиотерапия.

UDC 618. 19-006. 6-037+575. 1]-07.

Expression of Molecular Markers in Patients with Breast Cancer

Shomansurova N. S., Gildieva M. S.

Summary. Introduction. Blocking mechanisms of apoptosis are vital in the pathogenesis of the majority of cancer pathology. One of the mechanisms for the formation and development of tumor is mutations in genes that regulate the cell cycle. Proliferative and apoptotic activity in patients with breast cancer (BC), in accordance with the recommendations of Fitzgibbons et al. (2000), estimated by grade (>1%, >10%, >20% of tumor cells (TC)). Gene Expression of Ki-67 in more than 20% and low level of bcl-2 are unfavorable factors. The accumulation of the mutant gene (mt) p53 in tumor tissue (TT) indicates the aggressive behavior of this form of breast cancer, poor prognosis and more prolonged therapy. The level of p-53 can be used in the research of breast cancer as an independent prognostic marker.

Objective. To study the level of markers of cell proliferation and apoptosis in TT of BC, their ratio in BC patients of different age and relationship to the effectiveness of therapy.

Material and methods. 90 patients with breast cancer were examined. Patients are divided into 3 groups: in the I-th included patients of childbearing age from 26 to 45 years; in II group premenopause women aged 46 to 54,

III-rd – patients over 55 years (in menopause and postmenopause). The expression level of marker Ki-67, p-53 and bcl-2 in mammary gland of biopsy material were analyzed. The research was conducted by the standard technique with visualization of system products of immunohistochemical reactions (DAKO Cytomation LSAB 2 System – HRP).

Results of research. Mt p53 expression did not depend on the age of the patients. In I-st and II-nd group expression was detected in 73.9 % and 80 % of cases, and in III-rd – mt p53 occurs with a frequency of 58.8 %. Tumor Ki-67-positive samples were in the I-st group 87.0 %, in the II-nd -70 %, in the III-rd – 88 %. The positive expression of bcl-2 gene was found in 87.0 % in the I-th group of II-nd there were 60 % with positive bcl-2 expression, and in the third -58.8 %. In characterizing the expression of markers of apoptosis and proliferation of the effectiveness of therapy showed that complete tumor regression after 2 courses of chemotherapy (PCT) under the scheme CAF wasn't observed in any patient, partial tumor regression was found in 33.3 % of patients, stabilization of the tumor was observed in 64.4 %, and progression – in 2.2 %. Absence of full tumor regression under standard therapies we associated with high levels of expression in mt p53 TT, in connection with the TT cells of these patients became resistant to chemotherapy, as a result did not occur p53-dependent apoptosis. Among these tumor samples showed high positive expression of bcl-2, and since it is known that the gene bcl-2 is an inhibitor of p53-dependent apoptosis, in this case, perhaps, the absence or low levels of wild-type p53 does not lead to the antiapoptotic mechanism of action of the protein bcl 2.

Conclusion. Thus, the use shows the correlation of adverse nature of BC with increasing levels of mt p53 gene expression and cell proliferation Ki-67 and also with reduced or increased expression of bcl-2. The results show that the Ki-67 and p53, bcl-2 phenotype TC to carry out an effective antitumor therapy.

Prospects for future research. Research will be continued and expanded with the identification of other tumor markers in patients with BC. Correlation between oncomarkers and expression of these genes with long-term results of treatment are needed to be explored. It is planned to optimize the regimen of BC PCT in patients with complications that will improve the treatment and survival of patients with the above.

Key words: breast cancer, the oncogenic markers, expression, polychemotherapy.

Рецензент – проф. Баштан В. П.

Стаття надійшла 20. 04. 2013 р.