

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2001
УДК 618.19-006.6-078.73

*Е. И. Глухова, М. И. Лукашина, В. Н. Богатырев,
А. Ю. Барышников*

ЭКСПРЕССИЯ P53, BCL-2 И FAS (APO-1/CD95) ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

*НИИ клинической онкологии,
НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей*

Заболеваемость и смертность от рака молочной железы (РМЖ) среди женщин в нашей стране имеет тенденцию к неуклонному росту. В структуре онкологической заболеваемости женского населения и в России и в других наиболее развитых странах Европы и США РМЖ занимает одно из первых мест [1, 6, 7]. При этом отмечаются постоянный рост уровня заболеваемости, а также выявление больных с начальными стадиями заболевания.

В этой связи разработка и внедрение в клиническую практику ранней диагностики и эффективных методов лечения продолжают оставаться важным разделом проблем борьбы со злокачественными опухолями.

С помощью раннего выявления заболевания, профилактики и адекватного лечения ранних форм РМЖ может быть достигнуто сокращение смертности. В связи с этим особое значение приобретает изучение клинического течения, лечения и факторов прогноза РМЖ, таких, как экспрессия онкобелков и гликопротеинов, контролирующих апоптоз.

В настоящее время идентифицировано и достаточно подробно изучено несколько онкогенов, ассоциированных с различными опухолями, в том числе с РМЖ: p53, bcl-2, c-erbB2, c-myc и др. [2, 17, 18, 23, 24, 31, 37, 49].

Ген p53 является одним из наиболее изученных представителей группы генов-супрессоров опухолевого роста и занимает важное место в системе генов, ответственных за процессы репарации ДНК перед началом клеточного деления, регуляцию клеточного цикла и апоптоз [2—5, 8, 32, 39, 40, 48]. Он локализован на 17-й хромосоме (17q13) и кодирует фактор активации транскрипции, который действует как негативный регулятор роста клеток. P53 представляет собой полифункциональный белок, основная функция которого осуществляется в ядре. Нарушения функций p53 в результате точечных мутаций, делеций, образования комплекса с другим клеточным регулятором или изменения субклеточной локализации приводят к утрате супрессивных свойств и стимулируют опухолевый

CLINICAL INVESTIGATIONS

E.I.Glukhova, M.I.Lukashina, V.N.Bogatyrev, A.Yu.Baryshnikov

EXPRESSION OF P53, BCL-2 AND FAS (APO-1/CD95) IN BREAST CANCER

*Institute of Clinical Oncology,
Institute of Experimental Diagnosis and Therapy of Tumors*

Breast cancer (BC) accounts for continuously increasing morbidity and mortality of women in this country and abroad. BC is one of the commonest female malignancies in Russia and other most developed European countries and the USA [1,6,7]. There is also a rise in BC incidence and detection of patients with early disease.

Development and practical application of effective methods for early diagnosis and treatment of cancer is an important area of cancer control.

BC mortality may be reduced through early detection, prevention and adequate treatment of early cancer, and of particular importance is therefore study of clinical course, treatment and prognosis factors of BC such as expression of oncoproteins and glycoproteins that control apoptosis.

There are several oncogenes associated with various tumors including BC that are identified and rather well studied such as p53, bcl-2, c-erbB2, c-myc and others [2,17,18,23,24,31,37,49].

Gene p53 is a best studied representative of tumor growth suppressors that plays an important role among genes responsible for DNA reparation before cell division cell, cycle regulation and apoptosis [2-5,8,32,39,40,48]. It is localized in chromosome 17 (17q13) and encodes transcription activation factor that acts as a down-regulator of cell growth. The p53 is a multifunctional protein with its most important function performed in the nucleus. Impairment of p53 functioning as a result of point mutations, deletions, binding to another cell regulator or alteration in subcellular location leads to reduction in its suppressive capacity and enhances tumor growth. Amplification of chromosome locus 17q13 is often found in advanced breast tumors but is not associated with poor prognosis. Mutations in the p53 are a commonest genetic aberration found in a variety of tumors [3,4,8,35,45]. Mutations of wild (normal) p53 type result in generation of a mutant gene p53 (p53mt), and the cell loses the ability of apoptosis. The p53 was the first mutant gene identified in hereditary sarcomas and

процесс. Амплификация хромосомного локуса 17q13 часто встречается на поздних стадиях опухоли молочной железы (МЖ), но не ассоциирована с плохим прогнозом. Мутации в p53 — наиболее частое генетическое нарушение, регистрируемое в самых различных опухолях [3, 4, 8, 35, 45]. В результате мутаций дикого (нормального) типа p53 образуется мутантный тип гена p53 (p53mt), и клетка теряет способность к апоптозу. P53 был первым мутантным геном, идентифицированным в наследственных формах сарком и РМЖ при наследственном синдроме Li-Fraumeni [24]. По некоторым оценкам, 1% женщин в возрасте до 40 лет с первичным РМЖ имеют герминальную мутацию этого гена. Соматические мутации регистрируются в 53–86% случаев [2]. В инвазивных опухолях МЖ наличие мутаций p53 коррелирует с низким уровнем дифференцировки, снижением количества рецепторов эстрогена и высоким пролиферативным индексом клеток [30]. Последовательное накопление мутаций p53 обеспечивает опухоли более быстрый и инвазивный рост, который прекращается лишь со смертью организма.

Протоонкоген bcl-2 впервые был выделен из точки разрыва транслокаций между 14-й и 18-й хромосомами и обнаружен в большом количестве в различных лимфомах. Была установлена его биологическая функция, которая заключается в способности блокировать апоптоз [41, 42]. В семейство bcl-2 входят bcl-2, bcl-6, bax, bak, bad, одни индуцирующие, другие ингибирующие апоптоз. Ген bcl-2 в настоящее время считают основным ингибитором апоптоза. Он представляет собой онкоген, локализующийся в хромосоме человека 18q21 [27, 28]. Обнаружение bcl-2 во многих компартаментах клетки (митохондриальная мембрана, эндоплазматический ретикулум и ядро) указывает на важную роль этого протоонкогена в модуляции поступающих сигналов [11, 14, 38]. Гиперэкспрессия гена bcl-2 предотвращает характерные морфологические признаки апоптоза. Клетки, в которых гиперэкспрессия гена блокирует апоптоз, устойчивы к действию индукторов клеточной гибели и могут длительно сохранять жизнеспособность даже без факторов роста в культуре [25, 29]. При этом повышается чувствительность к мутагенным сигналам. Ген bcl-2 в таких условиях является онкогеном, обуславливающим клеточное перерождение и развитие злокачественных опухолей.

Другой ген — Apo-1 — характеризуется эффектом, противоположным гену bcl-2, а его продукт Fas может индуцировать апоптоз [10]. Fas-лиганд передает сигнал программированной клеточной гибели через CD95(Fas/APO-1)-рецептор, включающий каскад передачи сигнала смерти. В связи с этим в последнее время активно изучается CD95-рецепторно-лигандная система с целью выявления экспрессии этого антигена на опухолевых клетках, его функционального состояния и возможности воздействия на CD95(Fas/APO-1)-антиген с терапевтической целью.

Из изложенного ясно, что анализ апоптоза, экспрессии p53, p53mt и bcl-2 позволяет получить молекулярно-генетическую характеристику популяций клеток РМЖ, которая может быть полезна для прогноза и лечения РМЖ.

Материалы и методы. В данной работе проведено иммуноцитохимическое изучение экспрессии онкобелков (CD95, bcl-2, p53mt, p53pan) при РМЖ.

В качестве объекта исследования использовался операционный материал от больных РМЖ, проходивших лечение в клинике РОНЦ им. Н. Н. Блохина

BC in patients with hereditary Li-Fraumeni syndrome [24]. As reported, about 1% of women under 40 years of age with primary BC have germinal mutation of this gene. Somatic mutations are found in 53–86% of the cases [2]. The presence of p53 mutations in invasive cancer is related to poor differentiation, low content of estrogen receptors and high index of cell proliferation [30]. Successive accumulation of p53 mutations provides a more rapid and invasive tumor growth that stops only upon the patient death.

Protooncogene bcl-2 was first isolated from the point of translocation break between chromosomes 14 and 18 and is found in a large amount in various lymphomas. Its biological function is to block apoptosis [41,42]. The bcl-2 family includes bcl-2, bcl-6, bax, bak, bad with some of the genes being initiators and others inhibitors of apoptosis. The gene bcl-2 is considered the principal apoptosis inhibitor. It is an oncogene located in human chromosome 18q21 [27,28]. The presence of bcl-2 in many cell compartments (mitochondrial membrane, endoplasmic reticulum and nucleus) is evidence of its significant role in signal modulations [11,14,38]. Hyperexpression of the bcl-2 prevents characteristic signs of apoptosis. Cells in which apoptosis is blocked due to bcl-2 hyperexpression are refractory to cell death inducers and preserve viability for a long time even in cultures free from growth factors [25,29]. The sensitivity to mutagenic signals is increasing. Under these conditions the bcl-2 is an oncogene responsible for cell regeneration and development of malignant tumors.

Another gene, Apo-1, produces an opposite to bcl-2 effect and its product Fas may induce apoptosis [10]. Fas ligand transmits apoptosis signal through CD95 (Fas/Apo-1) receptor that switches on the death signal transmission cascade. There is a vast study of CD95 receptor-ligand system aimed to detect expression of this antigen on tumor cells, to establish its functional status and the possibility to influence CD95(Fas/Apo-1) antigen for therapeutic purposes.

So, study of apoptosis, p53, p53mt and bcl-2 expression will provide molecular-genetic characterization of BC cell populations that may be useful for BC prognosis and treatment.

Materials and Methods. This paper describes an immunochemical study of expression of oncoproteins (CD95, bcl-2, p53mt, p53pan) in BC.

The study was performed on surgical specimens from BC patients managed at the N.N.Blokhin CRC during June 1999 to February 2000. The patients underwent surgery consisting of modifications of radical mastectomy. Most patients were aged 31 to 79 years.

We analyzed 100 breast tumor specimens including 71 ductal infiltrative carcinomas (29 with and 42 without metastases); 14 lobular infiltrative carcinomas; 6 tubular carcinomas; 3 Paget carcinomas; 3 mixed carcinomas (ductal and lobular); 1 mucinous carcinoma, 1 medullary carcinoma, 1 phylloid tumor.

Tumor specimens were taken during operation or by punch biopsy, then touch smears were prepared and dried in air for 30–60 min. To perform cytological verification one specimen underwent Leishman's staining and the remaining specimens were wrapped up in foil and left in refrigerator at -20°C for 24 hours or longer. Before the reaction the cytological specimens were taken out from the refrigerator and left in foil to warm up to room temperature. After that the smears were fixed in cooled acetone 1–2 min to be tested for reactivity by indirect and direct immunofluorescence with monoclonal antibodies (MAb) anti-bcl-2 (Dako, Boehringer Mannheim), anti-p53, FITC conjugated (Dako), CD95 (ICO-160) and ICO-25 (Medbiospectr) using an Opton (FRG) microscope. To detect intracellular oncoproteins (bcl-2, p53) the sections were treated with 1% triton X-100 at 4°C for 1–2 min, washed two times in PBS (pH 7.4) and treated with 1% BSA for 15–20 min; after removal of BSA the specimens were treated with MAb in working dilutions. After 16–18 hours of incubation at 4°C the specimens were

РАМН с июня 1999 г. по февраль 2000 г. В исследование включены данные о больных, получивших оперативное лечение в объеме радикальной мастэктомии в различных ее модификациях.

Основную группу составили больные в возрасте от 31 года до 79 лет.

Было исследовано 100 образцов ткани МЖ, из них 71 — с протоковым инфильтративным раком (29 — без метастазов и 42 — с метастазами); 14 — с дольковым инфильтративным раком; 6 — с тубулярным раком; 3 — с раком Педжета; 3 — со смешанным раком (дольковый и протоковый); 1 — со слизистым; 1 — с медулярным раком; 1 — с листовидной опухолью.

Исследуемый материал — ткань МЖ, полученная во время операции или трепанобиопсии. В дальнейшем из этого материала готовили цитопрепараты (мазки-отпечатки), которые просушивали на воздухе 30–60 мин. Для цитологической верификации материала одно стекло красили по Лейшману, а остальные заворачивали в фольгу и помещали в холодильник при -20°C на 1 сут и более. Для проведения реакции цитопрепараты доставали из морозильной камеры и оставляли в фольге прогреваться до комнатной температуры. Затем отпечатки фиксировали в охлажденном ацетоне 1–2 мин и проводили реакции непрямой и прямой иммунофлюоресценции с помощью моноклональных антител (МКАТ) анти-bcl-2 («Dako», «Boehringer Mannheim»), анти-p53mt («Calbiochem»), анти-p53, FITC-конъюгированные («Dako»), CD95 (ICO160) и ICO25 (НПЦ «Медбиоцентр»), которую оценивали на микроскопе «Opton» (ФРГ). Для определения внутриклеточных онкобелков (bcl-2, p53) цитопрепараты обрабатывали 1% тритоном X-100 при 4°C в течение 1–2 мин, затем дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере — PBS — pH 7,4. Далее цитопрепараты обрабатывали 1% бычьим сывороточным альбумином в течение 15–20 мин, удаляли его и наносили МКАТ согласно рабочему разведению. После 16–18-часовой инкубации в холоде при 4°C цитопрепараты отмывали дважды в PBS по 5–10 мин. В дальнейшем наносили рабочий раствор FITC-конъюгата по 20 мкл и инкубировали 30 мин при 4°C , после чего трижды отмывали в PBS по 5–10 мин, закапывали 50% глицерин по 20 мкл и накрывали покровными стеклами для оценки реакции на люминесцентном микроскопе.

Результаты и обсуждение. Экспрессию маркеров оценивали иммуноцитохимически по количеству положительных клеток. По уровню экспрессии онкобелков всех больных разделили на 2 группы — положительные и отрицательные случаи. За положительные принимали такие, в которых маркеры экспрессировались более чем на 10% опухолевых клеток. По гистологическому заключению выделили несколько групп: группа I — инфильтративный протоковый рак; II — инфильтративный дольковый рак; III — редкие формы рака. В группе I рассматривали 2 подгруппы: 1 — инфильтративный протоковый без метастазов; 2 — инфильтративный протоковый с метастазами (2а — 1–2 регионарных метастаза; 2б — более 2 метастазов).

Для идентификации опухолевых клеток при иммунофлюоресцентной реакции использовали МКАТ ICO25 к MUC-1 [9]. В данном исследовании использовали образцы, в которых ICO25 экспрессировался на цитоплазматической мембране более чем у 50% опухолевых клеток с очень интенсивным окрашиванием.

Установлено, что CD95 незначительно экспрессируется в большинстве случаев. Этот маркер отсутствует в группе I в 73,2% случаев, в группе II — в 78,6%, в группе III — в 68,7% (табл. 1).

Таблица 1

Экспрессия биомаркеров в разных гистологических группах РМЖ
Biomarker expression with respect to BC histology

Table 1

Маркер	Экспрессия	Инфильтративный протоковый рак		Инфильтративный дольковый рак		Редкие формы рака		p
		число наблюдений						
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	
CD95 (ICO160)	+	19	26,8	3	21,4	5	31,3	0,83
	-	52	73,2	11	78,6	11	68,7	
Bcl-2	+	48	66,6	11	84,6	7	43,8	0,06
	-	23	32,4	2	15,4	9	56,2	
P53mt	+	36	67,9	4	66,7	6	75,0	0,92
	-	17	32,1	2	33,3	2	25,0	
P53pan	+	27	41,5	6	50,0	5	35,7	0,76
	-	38	58,5	6	50,0	9	64,3	
Marker	Expression	No.	%	No.	%	No.	%	p
		cases						
		Infiltrative ductal carcinoma		Infiltrative lobular carcinoma		Rare carcinoma types		

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: + означает наличие экспрессии, — ее отсутствие.

Note. Here and in tables 2, 3: + demonstrates the presence and - the absence of expression

washed two times in PBS for 5–10 min. FITC conjugate, 20 mcl, was added and the specimens were incubated for 30 min at 4°C , washed three times in PBS for 5–10 min; then 50% glycerol 20 mcl was added and the sections were covered with cover glass and tested for reactivity using a luminescence microscope.

Results and Discussion. Marker expression was assessed immunocytochemically by the number of positive cells. The patients were stratified into two (positive and negative) groups with respect to oncoprotein expression. Cases with marker expression on more than 10% of cells were considered positive. There were several groups specified with respect to histological findings, as follows: group I consisted of infiltrative ductal carcinomas, group II of infiltrative lobular carcinomas and III of rare cancer forms. Group I was further subdivided into subgroup 1 of infiltrative ductal node-negative carcinoma and subgroup 2 of infiltrative ductal node-positive carcinoma (2a: 1 or 2 regional metastases; 2b: more than 2 metastases).

MAB ICO25 against MUC-1 was used to identify tumor cells during the test [9]. This study used specimens in which ICO25 was expressed on cytoplasmic membrane of more than 50% tumor cells with very intensive staining.

CD95 is expressed rather mildly in most cases. This marker was not found in 73.2% of cases from group I, in 78.6% of cases from group II and in 68.7% of cases in group III (table 1).

As discovered immunocytochemically bcl-2 was expressed with moderate staining intensity in tumor cell cytoplasm and less frequently in the nucleus (figs.1,2). Positive bcl-2 expression was detected in 66.6% of cases in group I, in 84.6% of cases in group II and in 43.8% of cases in group III ($p \leq 0.06$). Distribution of bcl-2 expression with respect to lymph node involvement in group I was, as follows: 31.1% of negative and 68.9% of positive cases in subgroup 1 (table 2) vs 32.6% of negative and 67.4% of positive cases in subgroup 2. Expression of



Рис. 1. Экспрессия bcl-2, цитоплазматическое окрашивание клеток РМЖ.

Fig.1. bcl-2 expression, cytoplasmatic staining of BC cells.

Обнаружено, что при иммуноцитохимическом определении bcl-2 экспрессируется в цитоплазме опухолевых клеток, реже — в ядре (рис. 1, 2) при умеренной интенсивности окрашивания. Положительную экспрессию bcl-2 в группе I отмечали в 66,6% случаев, в группе II — в 84,6%, в группе III — в 43,8% ($p \leq 0,06$). В группе I по подгруппам в зависимости от метастазирования в лимфоузлы наблюдали следующее распределение экспрессии bcl-2: в подгруппе 1 31,1% отрицательных случаев, 68,9% положительных (табл. 2). В подгруппе 2 отсутствие экспрессии bcl-2 отмечали в 32,6% случаев, положительными по bcl-2 были 67,4% случаев. В подгруппе 2 в зависимости от количества метастазов в лимфоузлы наблюдали отличие по экспрессии bcl-2: в подгруппе 2a (с 1–2 метастазами) было 53,3% отрицательных случаев, 46,7% — положительных, в подгруппе 2b (более 2 метастазов) — 21,4 и 78,6% соответственно ($p \leq 0,05$) (табл. 3).

По данным литературы [15, 34, 44], bcl-2 наблюдался во многих опухолях, и его антиапоптотические характеристики были связаны скорее всего с выживанием опухолевой клетки. Отмечено, что между уровнем апоптоза и экспрессией bcl-2 существует обратная зависимость [12]. Некоторые авторы указывали, что bcl-2 экспрессировался в клетках эпителия нормальной ткани МЖ, а также при протоковом и дольковом раке [43]. Н.-J. van Slooten и соавт. установили связь между экспрессией bcl-2, ответом на химиотерапию и количеством патологических и биологических опухолевых параметров при неузловой форме РМЖ [17, 46, 47]. Была отмечена положительная корреляция между высокой экспрессией bcl-2 и эстроген- и прогестеронположительными рецепторами ($p < 0,001$), тогда как высокая экспрессия bcl-2 негативно коррелировала с p53 ($p < 0,001$). Пациенты с опухолями, показавшими высокий уровень экспрессии bcl-2, имели значительно лучшую общую выживаемость ($p = 0,009$).

При иммуноцитохимическом исследовании установлено, что p53 экспрессируется в ядре опухолевых клеток, реже — в цитоплазме (p53mt) с умеренным и интенсивным окрашиванием (рис. 3, 4). При оценке полученных результатов во всех исследованных группах наблюдали разнообразную и неоднородную экспрессию белка p53. В группе I экспрессию p53mt

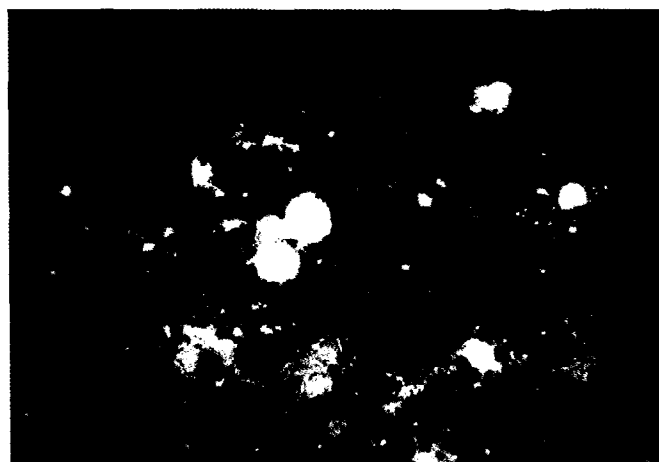


Рис. 2. Экспрессия bcl-2 на ядре опухолевых клеток.

Fig.2. bcl-2 expression in the tumor cell nucleus.

bcl-2 with respect to the number of lymph node metastases in subgroup 2 was, as follows: 53.3% of negative and 46.7% of positive tumors in subgroup 2a (1-2 metastases) vs 21.4% and 78.6% in subgroup 2b, respectively ($p \leq 0.05$) (table 3).

According to the published data bcl-2 was found in many tumors, and its anti-apoptotic characteristics were mainly associated with tumor cell survival [15,34,44]. There was an inverse relationship between apoptosis intensity and bcl-2 expression [12]. There are reports of bcl-2 expression in normal breast epithelium as well as in ductal and lobular carcinoma [43]. Н.-J. van Slooten et al. established relationship between bcl-2 expression, response to chemotherapy and pathological and biological tumor parameters in non-nodular BC [17,46,47]. There was a positive relationship between elevated bcl-2

Таблица 2

Table 2

Экспрессия биомаркеров при инфильтративном протоковом РМЖ
Biomarker expression in infiltrative ductal BC

Маркер	Экс- прес- сия	Без метастазов		С метастазами		p
		число наблюдений				
		абс.	%	абс.	%	
CD95 (ICO160)	+	7	25,0	12	27,9	0,8
	-	21	75,0	31	72,1	
Bcl-2	+	19	68,9	29	67,4	0,82
	-	9	31,1	14	32,6	
P53mt	+	18	85,7	19	57,6	0,06
	-	3	14,3	14	42,4	
P53pan	+	13	48,1	14	36,8	0,51
	-	14	51,9	24	63,2	
Marker	Expres- sion	No.	%	No.	%	p
		cases				
		No metastases		Metastases		

отмечали в 67,9% случаев, отсутствие экспрессии — в 32,1%. В группах II и III наблюдали аналогичную тенденцию (см. табл. 1). В подгруппе 1 группы I отсутствие экспрессии p53mt отмечали в 14,3% случаев, а наличие — в 85,7% (см. табл. 2). В подгруппе 2 экспрессия p53mt зарегистрирована в 57,4% случаев, ее отсутствие — в 42,4%. В подгруппе 2б наблюдали снижение положительных реакций (50%) и нарастание отрицательных (50%), тогда как в подгруппе 2а отмечалось 72,8% положительных случаев и 27,2% отрицательных (см. табл. 3).

МКАТ к общему p53 (p53pan), реагирующие с мутантным и диким типом p53, в группе I давали следующие результаты (см. табл. 1): положительные — 41,5% случаев, отрицательные — 58,5%. В отличие от мутантного общий p53 чаще давал негативную реакцию во всех исследуемых группах. В группе II с инфильтративным дольковым раком отсутствие экспрессии p53pan отмечали в 50% случаев, положительными были 50%. В группе III тенденция распределения экспрессии общего p53 была следующая: положительных случаев 35,7%, отрицательных — 64,3%. В группе I в зависимости от метастазирования, т. е. с увеличением злокачественности опухоли (подгруппы 1 и 2) наблюдали снижение экспрессии онкобелка p53pan: подгруппа 1 — 48,1% положительных случаев, 51,9% — отрицательных, подгруппа 2 — 36,8 и 63,2% соответственно (см. табл. 2).

По данным литературы [26, 30], экспрессия p53 значительно коррелирует со стадией РМЖ и некоторыми другими параметрами. P53-статус, размер опухоли ($p = 0,06$), количество подмышечных метастазирующих узлов ($p = 0,01$), ER ($p = 0,01$)- и PgR-статус ($p = 0,03$) имеют прогностическое значение для общей выживаемости. Все больше накапливается данных о том, что p53 может быть полезным маркером для выявления онкологических больных, которым требуется более интенсивная постоперационная терапия [13, 16, 20–22, 33, 50].



Рис. 3. Иммунофлюоресцентное окрашивание p53pan клеток РМЖ.
Fig.3. p53pan immunofluorescent reactivity in BC cells.

Таблица 3
Экспрессия биомаркеров при метастатических формах инфильтративного протокового РМЖ
Biomarker expression in infiltrative ductal BC with metastases

Маркер	Экспрессия	1—2 метастаза		Более 2 метастазов		p
		число наблюдений				
		абс.	%	абс.	%	
CD95 (IC0160)	+	5	33,3	7	25,0	0,82
	-	10	66,7	21	75,0	
Bcl-2	+	7	46,7	22	78,6	0,05
	-	8	53,3	6	21,4	
P53mt	+	8	72,8	11	50,0	0,28
	-	3	27,2	11	50,0	
P53pan	+	5	35,7	9	37,5	1,0
	-	9	64,3	15	62,5	
Marker	Expression	No.	%	No.	%	p
		cases				
		1-2 metastases		More than 2 metastases		

expression and estrogen and progesterone receptor positiveness ($p < 0.001$) and a negative relationship between elevated bcl-2 expression and p53 ($p < 0.001$). Patients with high expression of bcl-2 had a much better survival ($p = 0.009$).

As found immunocytochemically p53 is expressed in tumor cell nuclei and less frequently in cytoplasm (p53mt) with moderate to intensive staining (figs.3,4). Expression of p53 in our study was variable and non-uniform in all study groups. The p53mt reactivity was positive in 67.9% and negative in 32.1% of cases in group I. A similar trend was discovered in groups II and III (see table 1). In subgroup 1 of group I negative reactivity was found in 14.3% and positive reactivity in 85.7% of cases. In subgroup 2 of group I negative reactivity was found in 42.4%

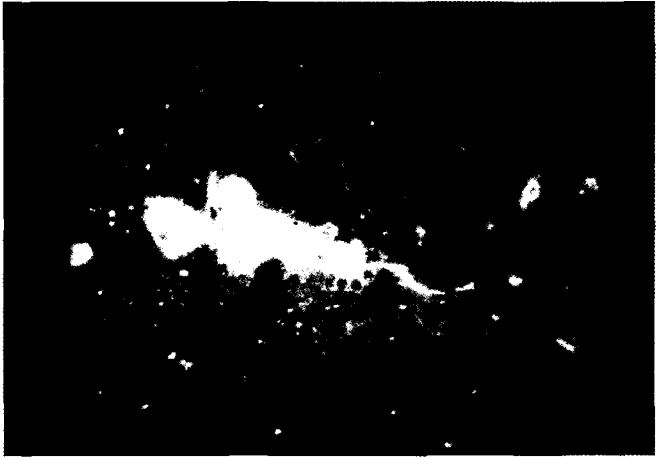


Рис. 4. Иммунофлюоресцентное окрашивание p53mt клеток РМЖ.
Fig.4. p53mt immunofluorescent reactivity in BC cells.

При оценке полученных результатов обнаружили прямую связь между CD95 и p53pan в группах I, II, III ($r = 0,86, 0,99, 0,78$), обратную корреляцию между CD95 и мутантным p53 в группе I ($r = -0,30, p \leq 0,001$). В группах I и II отмечали обратную связь между CD95 и bcl-2 ($r = -0,27, p \leq 0,001$; $r = -0,56, p \leq 0,002$). В группе II выявлена прямая связь между bcl-2 и p53mt ($r = 0,78$). В подгруппе 2a обнаруживали прямую корреляцию между CD95, bcl-2 и p53pan ($0,66 \leq r \leq 0,79$), обратную — между CD95, p53mt, p53pan ($-0,76 \leq r \leq -0,61, p \leq 0,001$). В подгруппе 2b связь между CD95 и p53mt прямая ($r = 0,82$), а bcl-2 с этими онкобелками обратная ($-0,61 \leq r \leq -0,18, p \leq 0,001$).

Существует мнение, что опухолевый рост обуславливается именно блокированием апоптоза при сохраняющемся уровне пролиферации. Причем связано это с блокированием функций гена p53 и гиперэкспрессией bcl-2 [19, 36].

Bcl-2+/p53--фенотип отмечали во всех случаях нормальной ткани МЖ, при протоковой гиперплазии, дольковом раке, а также наблюдали в 67% случаев протокового рака *in situ*. Большинство повреждений с измененными bcl-2/p53-фенотипами, включая все случаи bcl-2-/p53+, представлены плохо дифференцированным протоковым раком *in situ* [43].

Выводы. 1. Установлена обратная корреляция экспрессии CD95 и bcl-2 при инфильтративном протоковом ($r = 0,27, p \leq 0,001$) и инфильтративном дольковом ($r = -0,56, p \leq 0,002$) РМЖ.

2. При инфильтративном протоковом раке отмечали тенденцию к увеличению экспрессии bcl-2 ($p \leq 0,05$) с повышением злокачественности заболевания (увеличением количества метастазов и появлением отдаленных метастазов).

3. Установлена обратная корреляция экспрессии p53mt и CD95 при инфильтративном протоковом раке ($r = -0,30, p \leq 0,001$), а также при редких формах рака ($r = -0,96, p \leq 0,008$).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Двойрин В. В., Аксель Е. М., Трапезников Н. Н. Заболеваемость и смертность от злокачественных новообразований населения России и некоторых других стран СНГ в 1993 г. — М., 1995.
2. Зборовская И. Б., Ельчева И. А., Татосян А. Г. Новое в терапии РМЖ. — М., 1998. — С. 11—18.
3. Кармова Е. А., Гудков А. В. //Биохимия. — 2000. — Т. 65, № 1. — С. 48—56.
4. Копнин Б. П. //Там же.
5. Самохин А. В., Томкевич М. С., Готовский Ю. В., Мизиано Ф. Г. Иммунология, апоптоз и гомеопатия. — М., 1998. — С. 137—138.
6. Трапезников Н. Н., Поддубная И. В. Справочник по онкологии. — М., 1996.
7. Трапезников Н. Н., Аксель Е. М. Статистика рака молочной железы. Новое в терапии злокачественных опухолей. — М., 1998.
8. Чумаков П. М. //Биохимия. — 2000. — Т. 65, № 1. — С. 34—37.
9. Якубовская Р. И., Карманова Т. А., Барышников А. Ю. и др. //Арх. пат. — 1991. — № 6. — С. 11—16.
10. Akbar A. N., Salmon M., Janossy G. //Int. Arch. Allergy Immunol. — 1994. — Vol. 105, N 4. — P. 359—362.
11. Bakhshi A. J., Jensen P., Goldman P. et al. //Cell. — 1985. — Vol. 41. — P. 889.
12. Bargou R. C., Daniel P. T., Mapara M. Y. et al. //Int. J. Cancer. — 1995. — Vol. 60. — P. 854—859.
13. Berruti A., Bottini A., Berssiga A. et al. //Ann. Oncol. — 1998. — Vol. 9, N 210 — Suppl. 4. — P. 5. — N 210.
14. Chittenden T., Harrington E. et al. //Nature. — 1995. — Vol. 374. — P. 733.

and positive reactivity in 57.4% of cases. There was a decreasing trend in positive reactivity (50%) and an increasing trend in negative reactivity (50%) in subgroup 2b against 72.8% of positive and 27.2% of negative cases in subgroup 2a (see table 3).

MAb against common p53 (p53pan) reacted with mutant and wild p53 to demonstrate positive reactivity in 41.5% and negative reactivity in 58.5% of cases from group I (see table 1). Unlike mutant type, common p53 showed negative reactivity in all study groups. In group II with infiltrative lobular carcinoma 50% demonstrated no p53pan expression and 50% showed positive reactivity. In group III common p53 expression was present in 35.7% and absent in 64.3% of cases. In group I there was increase in p53pan expression as malignancy grade was growing with 48.1% of positive and 51.9% of negative cases in subgroup 1 against 36.8% of positive and 63.2% of negative cases in subgroup 2 (see table 2).

As reported in the literature p53 expression is related to BC stage and some other parameters [26,30]. The following factors are of prognostic significance: p53 status, tumor size ($p=0.06$), number of axillary lymph node metastases ($p=0.01$), ER status ($p=0.01$), PgR status ($p=0.03$). There is an increasing evidence that p53 may be a useful marker for screening of cancer patients requiring postoperative therapy [13,16,20-22,33,50].

We discovered a direct relationship between CD95 and p53pan in groups I, II and III ($r=0.86, 0.99$ and 0.78), an inverse relationship between CD95 and mutant p53 in group I ($r=-0.30, p \leq 0.001$). There were an inverse relationship between CD95 and bcl-2 ($r=-0.27, p \leq 0.001$; $r=-0.56, p \leq 0.002$) in groups I and II, a direct relationship between bcl-2 and p53mt ($r=0.78$) in group II, a direct relationship between CD95, bcl-2 and p53pan ($0.66 \leq r \leq 0.79$) and an inverse relationship between CD95, p53mt, p53pan ($-0.76 \leq r \leq -0.61, p \leq 0.001$) in subgroup 2a, a direct relationship between CD95 and p53mt ($r=0.82$) and an inverse relationship between bcl-2 and these oncoproteins ($-0.61 \leq r \leq -0.18, p \leq 0.001$) in subgroup 2b.

It is thought that tumor growth is maintained owing to block of apoptosis with cell proliferation preserved, the apoptosis block being due to inhibition of p53 function and hyperexpression of bcl-2 [19,36].

Phenotype bcl-2+/p53- was found in all normal breast tissue specimens, in ductal hyperplasia, lobular carcinoma and in 67% of *in situ* ductal carcinoma. Most aberrations with altered bcl-2/p53 phenotypes including all bcl-2-/p53+ cases were found in poorly differentiated ductal carcinoma *in situ* [43].

Conclusions. 1. There was an inverse relationship between CD95 and bcl-2 expressions in infiltrative ductal ($r=-0.27, p \leq 0.001$) and infiltrative lobular ($r=-0.56, p \leq 0.002$) BC.

2. The bcl-2 expression demonstrated an increasing trend ($p \leq 0.05$) as cancer malignancy was rising (increasing number of metastases and appearance of distant metastases).

3. There was an inverse relationship between expressions of p53mt and CD95 in infiltrative ductal carcinoma ($r=-0.30, p \leq 0.001$) as well as in the rare type group ($r=-0.96, p \leq 0.008$).

15. Colombel M., Symmans F., Gil S. et al. //Am. J. Pathol. — 1993. — Vol. 43. — P. 390—400.
16. Ellege R. M., Green S., Howes L. et al. //J. clin. Oncol. — 1997. — Vol. 15. — P. 1916—1922.
17. Evan G. I., Wyllie A. H., Gilbert C. S. et al. //Cell. — 1992. — Vol. 69. — P. 119—128.
18. Fernandes-Alhemri T., Litwack G., Alnemri E. S. //J. biol. Chem. — 1994. — Vol. 269. — P. 30761—30764.
19. Guenter T., Schneider—Stock R., Rys J. et al. //J. Cancer Res. Clin. Oncol. — 1997. — Vol. 123. — P. 388.
20. Fisher D. //Cell. — 1994. — Vol. 78, N 4. — P. 539—542.
21. Hardy—Bessard A. C., De Roquancourt A., De Cremoux P. et al. //Ann. Oncol. — 1998. — Vol. 9. — N 190. — Suppl. 4. — P. 4.
22. Harris C. C., Hollstein M. //New. Engl. J. Med. — 1993. — Vol. 329. — P. 1318—1327.
23. Hockenbery D., Nunez G., Millman C. et al. //Nature. — 1990. — Vol. 348, N 6299. — P. 334—338.
24. Horak E., Smith K., Bromley L. et al. //Oncogene. — 1991. — N 6 (12). — P. 2277—2284.
25. Hsu B., Marin M. C., Brishay S. et al. //Cancer Bull. — 1994. — Vol. 46, N 2. — P. 125—129.
26. Ioakim-Liossi A., Markopoulos C., Karakitsos P. et al. //Acta Cytol. — 1998. — Vol. 42, N 4. — P. 918—922.
27. Jacobson M. D., Burne J. F., King M. P. et al. //Nature. — 1993. — Vol. 361, N 6410. — P. 365—366.
28. Jacobson M. D., Raff M. C. //Ibid. — 1995. — Vol. 374, N 6525. — P. 814—816.
29. Joosens E., Makar A., van Leuven H. et al. //Ann. Oncol. — Vol. 9, N. 92.— Suppl. 4. — P. 20.
30. Kandemir E. G., Yaylaci M., Uskent N. //Ibid.— N 34. — P. 7.
31. Kerr J. E. A., Wyllie A. H., Currie A. R. //Brit. J. Cancer. — 1972. — Vol. 26, N 4. — P. 239—257.
32. Kuerbitz S. J., Plunkett B. S., Walsh W. V., Kastan M. B. //Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1992. — Vol. 89. — P. 7491—7495.
33. Levine A. J., Momand J., Finlay C. A. //Nature. — 1991. — Vol. 351. — P. 453—456.
34. Lipponen P., Pietilainen T., Kosma V. M. et al. //J. Pathol. — 1995. — Vol. 77. — P. 49—55.
35. Lowe S. //Science. — 1994. — Vol. 266. — P. 807—809.
36. Magnelli L., Chiarugi V. //J. Cancer Res. Clin. Oncol. — 1997. — Vol. 123. — P. 365.
37. Manchester K. M., Heston W. D., Donner D. B. //Biochem. J. — 1993. — Vol. 290, N 1. — P. 185—190.
38. Oltvai Z. N., Korsmeyer S. J. //Cell. — 1994. — Vol. 79. — P. 189—192.
39. Oren M. //Semin. Cancer Biol. — 1994. — Vol. 5, N 3. — P. 221—227.
40. Prives C. //Cell. — 1994. — Vol. 78, N 4. — P. 543—546.
41. Reed J. C. //J. cell Biol. — 1994. — Vol. 124. — P. 1—6.
42. Reed J. C. //Curr. Opin. Oncol. — 1995. — N 7. — P. 541—546.
43. Siziopikou K. P., Prioleau J. E., Harris J. R., Schnitt S. J. //J. Cancer. — 1996. — Vol. 77, N 3. — P. 499—506.
44. Stek K., McDonnelly T., Snieg N., El-Naggar A. //Cytometry. — 1996. — Vol. 24, N 2. — P. 116—122.
45. Symonds H., Krall L., Remington L. et al. //Cell. — 1994. — Vol. 78, N 4. — P. 703—711.
46. Van Slooten H.-J., Clahnen P. C., van Dierendonck J. H. et al. //Brit. J. Cancer. — 1996. — Vol. 74. — P. 78—85.
47. Van Slooten H.-J., van de Vijver M. J., van de Velde C. J. H. et al. //Ibid. — 1998. — Vol. 77, N 5. — P. 789—796.
48. Wyllie A. H. //Ibid. — 1993. — Vol. 67. — P. 205—208.
49. Yonish-Rouss E., Grunwald D., Wilder S. et al. //Molec. Cell. Biol. — 1993. — Vol. 13. — P. 1415—1423.
50. Zhang Z. F., Karpeh M., Lauwers G. et al. //Cancer Det. Prev. — 1995. — Vol. 18. — P. 156—164.

Поступила 06.07.2000 / Submitted 06.07.2000

© Коллектив авторов, 2001
УДК 618.19-006.6-06:616.24-001.2

Л. Ю. Арустамян, В. Л. Кассиль, Т. И. Грушина, А. Д. Машнин

ЛЕЧЕНИЕ ЛУЧЕВЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ЛЕГКИХ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

НИИ клинической онкологии

В комплексном лечении рака молочной железы лучевая терапия занимает одно из ведущих мест. Несмотря на совершенствование методик лучевой терапии, предусматривающих щажение окружающих здоровых тканей и органов, лучевые повреждения легких (ЛПД) при лучевой терапии рака молочной железы возникают, по данным разных авторов [8, 9], у 11,1—60% больных. Лучевое воздействие на легкие приводит к повреждению бронхиального дерева, кровеносных сосудов, в результате чего возникает снижение растяжимости

L.Yu.Arustamyan, V.L.Kassil, T.I.Grushina, A.D.Mashnin

TREATMENT OF LUNG RADIATION DAMAGE IN BREAST CANCER PATIENTS

Institute of Clinical Oncology

Radiotherapy is a principal modality in multimodality treatment for breast cancer. In spite of increasing improvement of sparing radiotherapy methods 11.1% to 60% of breast cancer patients have lung radiation damage (LRD) as a result of radiotherapy [8-9]. Irradiation of lungs results in injury of the bronchial tree and vessels that reduces lung expansion and air passage through the respiratory tract (restrictive and obstructive lesions).

Common approaches in advanced late LRD involve active anti-inflammatory and antibiotic therapies, expectorants,