

[Перейти в содержание Вестника РНЦРР МЗ РФ N12](#)

Текущий раздел: **Молекулярная медицина**

Связь уровня апоптоза и экспрессии рецепторов эстрогена при раке молочной железы.

Кудинова Е.А., Кулинич Т.М., Мельникова Н.В., Ооржак А.В., Боженко В.К.

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздравсоцразвития РФ, г. Москва

Адрес документа для ссылки: http://vestnik.ncrr.ru/vestnik/v12/papers/kud_v12.htm

Статья опубликована: 25 октября 2012 года

Контактная информация:

Рабочий адрес: 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 86, ФГБУ «РНЦРР»

Боженко В.К. - д.м.н., профессор, руководитель отдела патоморфологии и лабораторной диагностики ФГБУ «РНЦРР» vbojenko@mail.ru

Кудинова Е.А. - к.м.н., заведующая клинико-диагностической лабораторией ФГБУ «РНЦРР», раб.тел.: +7(499)120-11-14

Мельникова Н.В. - к.м.н., с.н.с. лаборатории патоморфологии отдела патоморфологии и лабораторной диагностики ФГБУ «РНЦРР», раб.тел.: +7(495)333-91-30, E-mail: n_melnikova@list.ru

Кулинич Т.М. – к.м.н., врач-лаборант клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «РНЦРР».

Ооржак А.В. – клинический ординатор ФГБУ «РНЦРР»

Контактное лицо: Ооржак Айлан Владимировна, тел: 8(926)6506966

E-mail: aylan08@mail.ru

Резюме

Тканевой гомеостаз в молочной железе обеспечивается в результате равновесия между пролиферацией и апоптозом. Уровень апоптоза в ткани рака молочной железы достоверно положительно коррелирует с уровнем экспрессии рецепторов эстрогена в группе протокового рака молочной железы. Однако в группе долькового рака при проведении неоадьювантной химиотерапии уровень апоптоза в клетках опухоли снижается. Спонтанный апоптоз положительно коррелирует с уровнем пролиферативной активности в ткани рака молочной железы (коррелирует с величиной G2M). В группе анеуплоидных опухолей спонтанный апоптоз положительно коррелирует с индексом плоидности, но не отличается в диплоидных и анеуплоидных опухолях.

Ключевые слова: апоптоз, рецепторы эстрогенов, анеуплоидия, рак молочной железы

Correlation between apoptosis level and estrogen receptor expression in breast cancer

Kudinova E. A., Kulinich T.M., Melnikova N.V., Oorzhak A.V., Bozhenko V.K.

Federal State Establishment Russian Scientific Center of Roentgenoradiology (RSCRR)
of Ministry of Health and Social Development of Russian Federation, Moscow

Summary

Tissue homeostasis in mammary gland is maintained by balance between proliferation and apoptosis. This balance disappeared in breast cancer tissue. Apoptosis level in breast cancer tissue significantly positively correlates with estrogen receptors expression level in ductal breast cancer and decreases in lobular cancer after neoadjuvant chemotherapy. Spontaneous apoptosis positively correlates with proliferative activity in breast cancer tissue (correlates with G2M stage). In aneuploid tumors, spontaneous apoptosis positively correlates with the ploidy index, but does not differ in diploid and aneuploid tumors.

***Key words:** apoptosis, estrogen receptors, aneuploidy, breast cancer*

Оглавление:

Введение

Материалы и методы

- **Характеристика клинического материала**
- **Обработка ткани и проточно-цитометрический анализ**
- **Оценка уровня апоптоза**

Результаты и обсуждение

- **Сравнение уровня апоптоза и экспрессии эстроген рецепторов**
- **Изменение уровня апоптоза после химиотерапии**
- **Сравнение уровня апоптоза и плоидности**
- **Сравнение апоптоза и пролиферативной активности**

Заключение

Список литературы

Введение

Заболеваемость и смертность женщин от рака молочной железы в России и развитых странах мира продолжает оставаться одной из самых актуальных проблем в современном обществе. Особенности клеточных характеристик опухоли в значительной степени определяют прогноз и отдаленную выживаемость. Немаловажным является поиск новых биологических маркеров, позволяющих максимально индивидуализировать лечебную

тактику. Тканевой гомеостаз в молочной железе обеспечивается в результате равновесия между пролиферацией и апоптозом [5]. Основные тканевые маркеры, используемые при раке молочной железы- рецепторы стероидных гормонов, S-фаза и плоидность [6,10,4]. Формирование концепции апоптоза и осознание роли апоптоза в многочисленных физиологических процессах привело к активному исследованию нарушений и роли 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.

Работ, посвященных анализу связи апоптоза с клинико-морфологическими факторами, такими как рецепторы к эстрогену и прогестерону немного. В работе Lewis J.S. и соавторов об эстрадиол-индуцированном апоптозе говорится, что в клеточных линиях MCF-7 (ER)- положительного рака молочной железы при добавлении в клеточную культуру физиологические концентрации 17beta-эстрадиола подвергаются быстрому и полному апоптозу, в то время как если его не добавлять, то они остаются устойчивыми [9]. В настоящей работе мы попытались оценить связь апоптоза и экспрессии рецепторов прогестерона и эстрогена в образцах ткани рака.

В настоящей работе была поставлена цель исследовать соотношение процессов апоптоза и пролиферации, а также связь апоптоза с экспрессией рецепторов эстрогена при раке молочной железы, а также влияние предоперационной химиотерапии на апоптоз.

[Перейти в оглавление статьи >>>>](#)

Материалы и методы

Характеристика клинического материала

В исследование включены 140 больных раком молочной железы, получавших лечение в РНЦРР. Возрастной диапазон 27 - 90 лет, средний возраст 55,8 лет.

Распределение больных раком молочной железы по стадии Т (размер опухоли) было следующим: Т1-38 случаев (20,3%), Т2-82 (43,9%), Т3-9 (4,8%), Т4-11 (5,9%). Метастазы в регионарных лимфатических узлах гистологически верифицированы в 61 случае, без метастазов в регионарные лимфатические узлы – 79 случаев. По гистологическому диагнозу – инфильтрирующий протоковый рак был выявлен в 110 случаях, инфильтрирующий дольковый в 26 случаях, слизистый в 4 случаях.

Дооперационная химиотерапия проведена у 36 пациенток, группа без дооперационной химиотерапии состояла из 104 больных.

Уровень экспрессии эстрогенов был оценен иммуногистохимическим способом у 118 человек, он колебался от 0 до 100%. Для проведения иммуногистохимического исследования использовался материал, предварительно фиксированный в 10% нейтральном буферном формалине и заключенный в парафин. Использовались антитела к рецепторам эстрогена (NCL-L-ER-6F11, Leica, Великобритания) и прогестерона (NCL-L-PGR-312, Leica, Великобритания). Результаты иммуногистохимических реакций экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона оценивались полуколичественным способом.

[Перейти в оглавление статьи >>>](#)

Обработка ткани и проточно-цитометрический анализ

Клеточная суспензия приготавливалась из операционного материала пациентов с исследуемыми новообразованиями молочной железы. Срез биоптата новообразования по большому диаметру толщиной 2-4мм разделяли на мелкие фрагменты в 500 мкл фосфатно-солевого буфере (ФСБ) (рН=7,4), затем измельчали в гомогенизаторе Medimachine (Dako, Дания) в течение 2 минут с 1,5 мл ФСБ. Полученную суспензию фильтровали через 50 мкм фильтр и отмывали в 1,5 мл ФСБ центрифугированием в течение (7-10 мин, 300хg). После удаления супернатанта объем осадка удваивался добавлением ФСБ. Фиксация осуществлялась 70% этанолом (-20°C) по стандартной методике.

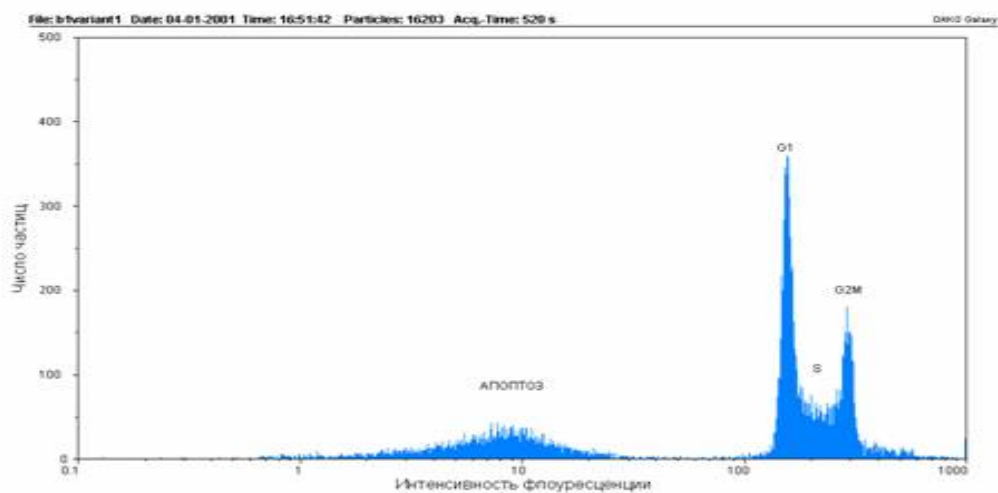
200 мкл фиксированной клеточной суспензии отмывали в 1мл ФСБ (7-10 мин, 300хg). После удаления супернатанта клетки инкубировали в защищенном от света месте 30 минут при комнатной температуре с 5 мкл антител к цитокератинам AE1/AE3, мечеными FITC (F 0859, DAKO), чтобы идентифицировать эпителиальные клетки. Затем при тех же условиях клеточную суспензию инкубировали в течение 10 мин с 15мкл р-ра РНКазы (концентрация 10мг/мл в дистиллированной воде).

Для определения индекса плоидности и показателей клеточного цикла в полученную клеточную суспензию вносили 50 мкл 2mM раствора йодида пропидия в дистиллированной воде («Sigma», США) с добавлением 500 мкл ФСБ и инкубировали в течение 40 минут в защищённом от света месте. Непосредственно перед анализом клеточную суспензию фильтровали через 50мкм нейлоновый фильтр, вносили 1 мл ФСБ. Анализ проводился на проточном цитофлуориметре фирмы DAKO Galaxy, программа Flomax.

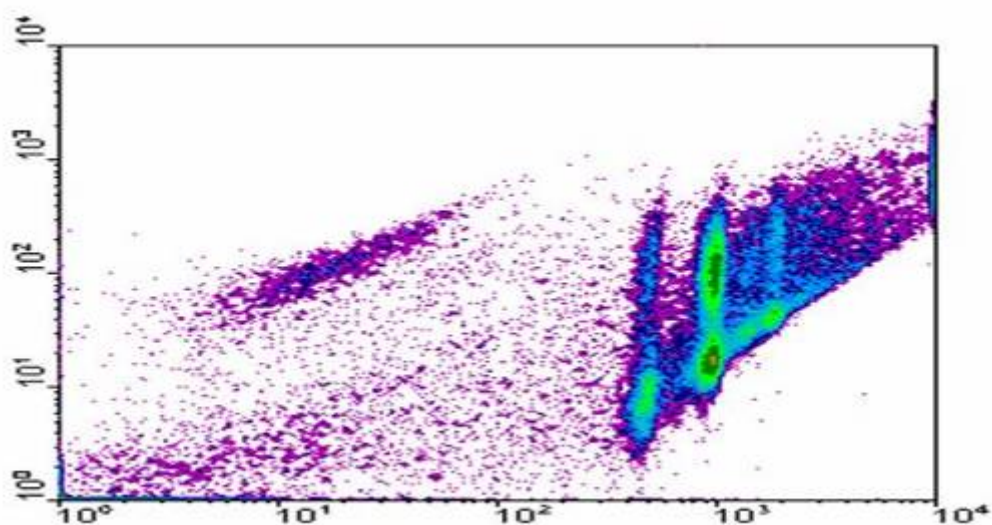
[Перейти в оглавление статьи >>>](#)

Оценка уровня апоптоза

Общий уровень апоптоза оценивался как субдиплоидный пик на ДНК-гистограмме при окрашивании раствором йодида пропидия (Рис.1).



а)



б)

Рис.1 Способы регистрации уровня апоптоза. а). Окраска йодидом пропидия – субдиплоидный пик.

б). Субдиплоидная популяция цитокератин - позитивных частиц (FL-1 – окраска а/т к цитокератинам, FL-2 - окраска йодидом пропидия).

Также нами оценивался уровень апоптоза эпителиальных клеток как субдиплоидная популяция цитокератин-позитивных частиц.

Статистическую обработку результатов исследования проводили в программе Статистика 6.0 (Statsoft inc USA) с использованием методов непараметрического анализа (U-критерий Манна-Уитни).

[Перейти в оглавление статьи >>>>](#)

Результаты и обсуждение

В настоящее время считается общепризнанным, что процесс малигнизации (или злокачественной трансформации) клетки включает нарушение двух фундаментальных механизмов: контроля клеточного деления и запрограммированной клеточной гибели – апоптоза. Показано также, что нарушение этих процессов индивидуально для каждой конкретной опухоли. То есть, молекулярно-генетические изменения затрагивают различный набор молекул, участвующих в регулировании этих процессов в каждом конкретном случае злокачественной опухоли.

Именно поэтому, в последнее время, большое количество работ посвящено исследованию значения молекулярно-биологических факторов в диагностике и прогнозе злокачественных новообразований и, в частности, рака молочной железы [1,2]. Ряд таких факторов уже нашли свое место в диагностическом комплексе (такие как уровень экспрессии эстроген рецепторов, Her2-neu), в то время как значимость и область применения большинства других продолжает изучаться [11,3]. К таким показателям относятся и молекулярно-биологические факторы апоптоза.

[Перейти в оглавление статьи >>>>](#)

Сравнение уровня апоптоза и экспрессии эстроген рецепторов

В таблице 1 приводятся коэффициенты корреляции между уровнем экспрессии эстроген рецепторов и апоптоза для суммарной группы рака молочной железы.

Табл. 1. Коэффициенты корреляции между уровнем экспрессии рецепторов гормонов и уровнем общего и цитокератинового апоптоза.

Апоптоз	Рецепторы эстрогена	Коэф. корреляции (r)	P
Цитокератиновый	ER	0,24	0,004
Общий	ER	0,12	0,158

Видно, что уровень цитокератинового апоптоза имеет прямую значимую корреляцию со степенью экспрессии рецепторов эстрогена ($r = 0,24$). Коэффициент корреляции между уровнем цитокератинового и общего апоптоза составил 0,54 ($P=0,0043$).

В таблицах 2 и 3 приведены коэффициенты корреляций для отдельных гистологических форм.

Табл. 2. Корреляция показателей апоптоза и уровня экспрессии рецепторов эстрогена при протоковом раке молочной железы

Апоптоз	Рецепторы эстрогена	Коэф. корреляции (r)	P
Цитокератиновый	ER	0,28	0,003
Общий	ER	0,21	0,028

Табл. 3. Корреляция показателей апоптоза и уровня эстроген рецепторов при дольковом раке молочной железы

Апоптоз	Рецепторы эстрогена	Коэф. корреляции (r)	P
Цитокератиновый	ER	-0,07	0,736
Общий	ER	-0,62	0,000

Интересно, что при оценке корреляций отдельно в различных гистологических группах имеется обратная зависимость между уровнем экспрессии рецепторов эстрогена и апоптозом, при этом дольковый рак имеет обратную корреляцию, а протоковый прямую. Исследование корреляции уровня рецепторов прогестерона как в общей группе рака молочной железы, так и подгруппах с различной гистологической формой не обнаружило статистически значимых коэффициентов.

[Перейти в оглавление статьи >>>](#)

Изменение уровня апоптоза после химиотерапии

Известно, что большинство химиопрепаратов имеют цитотоксический эффект и приводят к активации процессов апоптоза в опухолевых клетках [7,8].

Мы сравнили уровни в образцах ткани рака молочной железы в группах с и без предоперационной химиотерапии. В таблицах 4 и 5 сравниваются уровни общего и цитокератинового апоптоза.

Табл. 4. Изменение уровня цитокератинового апоптоза после предоперационной химиотерапии.

	Уровень апоптоза цитокератин положительных клеток (среднее), %			
Группа/гистологическая форма	протоковый	дольковый	t-знач.	P
Сумма	7,92	3,88	2,101	0,038
С предоперационной химиотерапией	8,84	1,40	1,955	0,060
Без химиотерапии	7,61	4,77	1,269	0,207
	Не отличаются	P=0,032		

Табл. 5. Изменение уровня общего апоптоза после предоперационной химиотерапии

	Уровень общего апоптоза (среднее), %			
Группа/гистологическая форма	протоковый	дольковый	t-знач.	P
Сумма	17,01	13,33	1,699	0,092
С предоперационной химиотерапией	17,39*	12,30*	1,011	0,32
Без химиотерапии	16,98*	13,65*	1,34	0,18
	*-Не отличаются	*-Не отличаются		

Интересно, что дольковый и протоковый рак обнаруживают отличные зависимости на фоне предоперационной химиотерапии. Если в ткани протокового рака уровень апоптоза практически не меняется, то дольковый рак после проведенной химиотерапии имеет более низкий уровень апоптоза.

[Перейти в оглавление статьи >>>>](#)

Сравнение уровня апоптоза и плоидности

Исследованные морфологические материалы рака молочной железы по плоидности распределилось следующим образом: в 39% случаев опухолевые клетки содержали диплоидный набор хромосом, в 49% случаев выявлены анеуплоидные опухоли и в 13% случаев были обнаружены тетраплоидные клетки.

Распределение в группе протокового рака молочной железы (n=90): диплоиды-34%, анеуплоиды-52%, тетраплоиды-15%. Распределение по плоидности для долькового рака (n=36): диплоиды-62%, анеуплоиды-35%, тетраплоиды-4%.

Табл. 6. Средние и стандартные отклонения уровня апоптоза в различных гистологических формах рака молочной железы в зависимости от плоидности.

Итоговая таблица средних. Наименьшее N для любой пер.: 118							
ГИСТ_1	PLOIDY	APO_CYTN		Ст. откл	APO_ALLN		Ст.откл.
протоковый	анеуплоиды	8,348431	51	9,268239	17,55157	51	8,79535
протоковый	тетраплоиды	8,998125	16	8,917711	16,49125	16	7,75406
протоковый	диплоиды	6,705000	32	5,927331	16,64313	32	10,43293
дольковый	анеуплоиды	4,025000	6	3,456517	10,22429	7	6,01912
дольковый	тетраплоиды	0,250000	1	0,000000	0,78000	1	0,00000
дольковый	диплоиды	4,118333	12	2,986070	15,97077	13	10,50432
Все груп.		7,272203	118	7,781094	16,42950	120	9,28919

Дисперсионный анализ не обнаруживает отличий в уровне апоптоза для групп с различной гистологической формой рака и различной плоидностью. То есть внутри каждой нозологической группы уровень апоптоза в зависимости от плоидности достоверно не отличается. Данные представлены на Рис. 2.

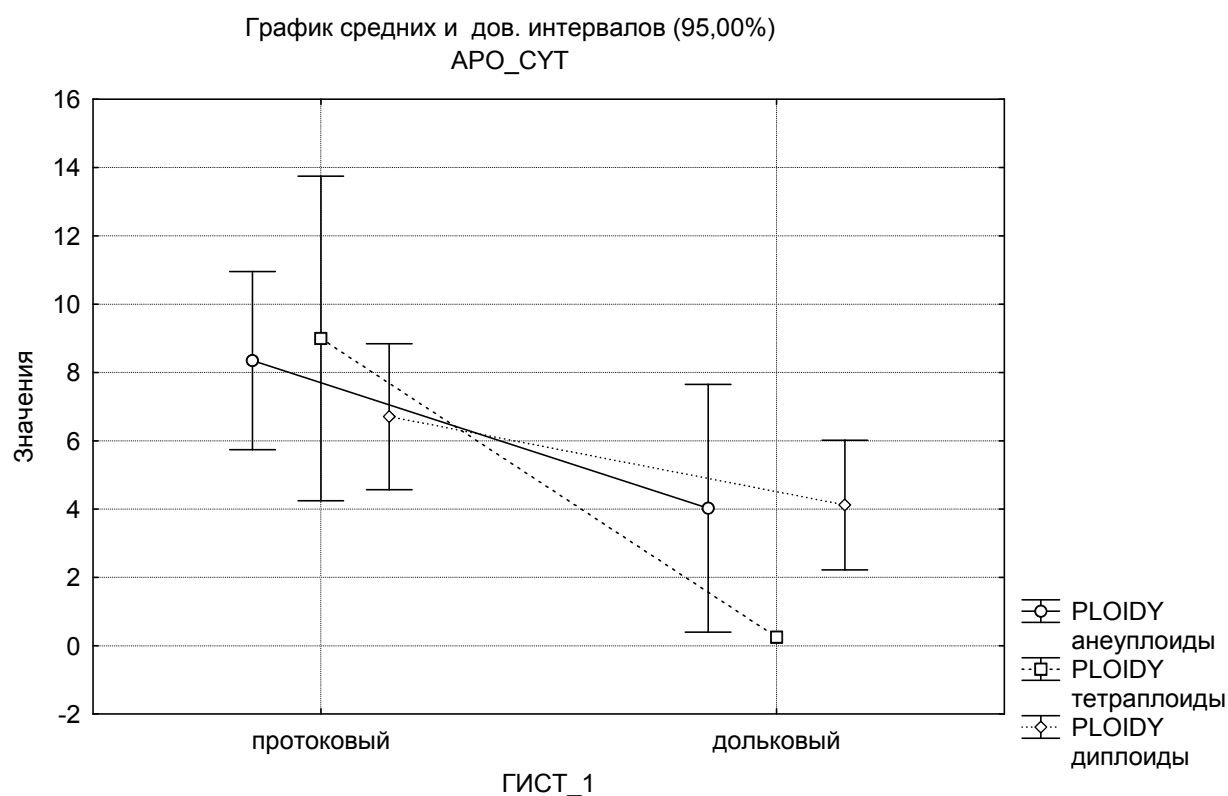


Рис. 2. Уровень апоптоза в различных гистологических формах рака молочной железы в зависимости от плоидности.

[Перейти в оглавление статьи >>>>](#)

Сравнение апоптоза и пролиферативной активности

Мы исследовали также корреляции показателей апоптоза и пролиферации в зависимости от гистологической формы и предопреационной химиотерапии.

Результаты для суммарной группы рака молочной железы показаны в таблице 7.

Табл. 7. Корреляции показателей апоптоза и активности пролиферации в ткани молочной железы (все случаи без химиотерапии, включая норму)

Показатели апоптоза и активности пролиферации в ткани молочной железы		Коеф. корреляции (r)	P
G1	S	-0,69	0,000
G1	G2M	-0,47	0,000
G1	APO_CYT	-0,21	0,032
G1	APO_ALL	-0,28	0,004
S	G2M	-0,31	0,001

S	S_G2M	0,7	0,000
S	APO_CYT	0,05	0,614
S	APO_ALL	0,30	0,002
G2M	S_G2M	0,5	0,000
G2M	APO_CYT	0,21	0,032
G2M	APO_ALL	0,00	1,000
S_G2M	APO_CYT	0,21	0,032
S_G2M	APO_ALL	0,28	0,004
APO_CYT	APO_ALL	0,58	0,000

Видно, что уровень апоптоза имеет положительную корреляцию с пролиферативной активностью – величиной G2M и суммарной G2M+S фазы. Показано, что в группе без химиотерапии эти закономерности сохраняются, в то время как в группе без химиотерапии достоверных корреляций между уровнем апоптоза и пролиферации не обнаружено.

[Перейти в оглавление статьи >>>>](#)

Заключение

Приведенные результаты показывают, что уровень апоптоза в ткани рака молочной железы имеет достоверную положительную корреляцию с уровнем экспрессии рецепторов эстрогена в группе протокового рака молочной железы ($r = 0,28$ для цитокератинового апоптоза; $r = 0,21$ для общего апоптоза).

Уровень апоптоза цитокератин положительных клеток в ткани молочной железы достоверно не меняется на фоне предоперационной химиотерапии. Однако в группе долькового рака предоперационная химиотерапия снижает уровень апоптоза в клетках опухоли ($P = 0,032$).

Спонтанный апоптоз имеет положительную достоверную корреляцию с уровнем пролиферативной активности в ткани рака молочной железы (коррелирует с величиной S+G2M, $r = 0,28$).

В группе анеуплоидных опухолей спонтанный апоптоз имеет положительную достоверную корреляцию с индексом плоидности. Однако уровень спонтанного апоптоза не отличается в группах диплоидных и анеуплоидных опухолей.

[Перейти в оглавление статьи >>>>](#)

Список литературы:

1. Боженко В.К., Гали-Оглы Г.А., Кудинова Е.А. и др. Оценка уровня спонтанного апоптоза при доброкачественных и злокачественных новообразованиях молочной железы. // http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v4/papers/bozhen_v4.htm (Дата обращения 10.09.2012)
2. Боженко В.К., Кудинова Е.А., Мельникова Н.В. и др. Анализ пролиферативной активности и апоптоза при гиперпластических процессах молочной железы. // http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v10/papers/bozhe1_v10.htm (Дата обращения 10.09.2012)
3. Ермилова В.Д. Роль современной патоморфологии в характеристике рака молочной железы. // Практическая онкология. 2002. Т 3. № 1. С.15-20.
4. Лепкова Н.В. Метахронный рак молочной железы(диагностика, лечение, прогноз): Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.14 / ГУ Российском Онкологическом Научный Центр им. Блохина РАМН. Москва. 2007. 26 с.
5. Черезов А. Е. Общая теория рака: тканевый подход. Москва. МГУ. 1997. 252 с.
6. Camplejohn R.S., Ash C.M., Gillett C.E. et al. The prognostic significance of DNA flow cytometry in breast cancer: results from 881 patients treated in a single center. // Br J Cancer. 1995. V. 71. N 1. P.140-145.
7. Chang J., Ormerod M., Powles T.J., et al. Apoptosis and proliferation as predictors of chemotherapy response in patients with breast carcinoma. // Cancer. 2000. V. 89. N 11. P. 2145-2152.
8. Demiray M., Ulukaya E.E., Arslan M., et al. Response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer could be predictable by measuring a novel serum apoptosis product, caspase-cleaved cytokeratin 18: a prospective pilot study. // Cancer Invest. 2006. V. 24 N 7. P. 669-676.
9. Lewis J.S., Meeke K., Osipo C., et al. Intrinsic mechanism of estradiol-induced apoptosis in breast cancer cells resistant to estrogen deprivation. // J Natl Cancer Inst. 2005. V. 97. N 23. P. 1746-1759.
10. Moureau-Zabotto L., Bouchet C., Cesari D., et al. Combined flow cytometry determination of S-phase fraction and DNA ploidy is an independent prognostic factor in node-negative invasive breast carcinoma: review of a series of 271 patients with stage I and II breast cancer. // Cancer Radiother. 2005. V.9. N 8. P. 575-586.
11. Povilaĩtite P.E., Matsionis A.Ė., Pavlenko I.A., et al. Different Her-2 status in infiltrative and intraductal components of the breast cancer. // Arkh Patol. 2012. V. 74. N 2. P. 45-46.

[Перейти в оглавление статьи >>>>](#)

ISSN 1999-7264

© Вестник РНЦРР Минздрава России

© Российский научный центр рентгенорадиологии Минздрава России