

Арутюнян Е.В.^{1,2}, Бриллиант А.А.¹, Новикова Е.А.², Сазонов С.В.^{1,2}

Некоторые закономерности экспрессии иммуногистохимических маркёров на клетках карциномы молочной железы

1 - ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург; 2 - ГБОУ ВПО Уральский Государственный Медицинский Университет МЗ РФ, г. Екатеринбург

Arutyunyan E.V., Brilliant A.A., Novikova E.A., Sazonov S.V.

Some of the expression patterns of immunohistochemical markers on cells of breast carcinoma

Резюме

При раке молочной железы уровень экспрессии топоизомеразы II α (TOP II α) может иметь самостоятельное предиктивное значение в связи с эффективной терапией опухоли антибиотиками группы антрациклинов, направленных на ингибирование данного белка. Исследованы 578 случая инфильтративной карциномы молочной железы на экспрессию TOP II α , Ki-67, HER-2/neu, ER, PR иммуногистохимическим методом. Экспрессия топоизомеразы II α оценивалась по шкале, предложенной Л. Уша (гиперэкспрессия > 35%). Гиперэкспрессия по топоизомеразе II α наблюдается в 14% образцов карциномы молочной железы. Обнаружена положительная сильная зависимость между увеличением степени экспрессии Ki-67 и TOP II α . Зависимость уровня экспрессии топоизомеразы II α от экспрессии Her-2/neu, ER, PR не обнаружена.

Ключевые слова: карцинома молочной железы, топоизомераза II α (Top II α), эпидермальный фактора роста (HER-2/neu), Ki-67

Summary

In breast cancer, the level of topoisomerase II α (TOP II α) expression can have independent predictive importance due to effective antibiotic treatment with anthracycline, which acts against this protein. 578 cases of infiltrative breast carcinoma were studied. The expression of TOP II α , Ki-67, Her2-neu, ER, PR was studied by immunohistochemical method. Expression of TOP II α was evaluated with use of the scale, developed by L. Usha (overexpression > 35%). Overexpression of TOP II α was found in 14 % of breast carcinomas. The strong positive correlation was found between increase of Ki-67 expression and TOP 2 α expression. We did not find any significant dependence of TOP2 α expression from Her-2/neu, ER and PR expression.

Keywords: breast carcinoma, topoisomerase II α (Top II α), epidermal growth factor (HER-2/neu), Ki-67

Введение

Достижения последних лет в области молекулярной биологии позволили выявить многие особенности фенотипа, механизмы канцерогенеза карциномы молочной железы: индукцию опухолью сигналов роста, высокий уровень репликационного потенциала, резистентность к рост-ингибиторным сигналам, уклонение от апоптоза, ангиогенез, тканевую инвазию и метастазирование. Описано более ста факторов прогноза, дающих представление о биологическом поведении опухоли [1].

В прогностическом плане среди известных маркёров опухолевых клеток значимое место занимает определение уровня пролиферативной активности. Повышение уровня пролиферации свидетельствует о худшем прогнозе у пациенток, не получавших ранее лечения [2].

Одним из маркёров пролиферации клеток карциномы молочной железы является топоизомераза II α (Top

II α). Топоизомераза II α - ядерный фермент, необходимый в процессах репликации ДНК и пролиферации клеток. С другой стороны, топоизомераза имеет отношение к репарации ДНК, что ведет к повышению выживаемости опухолевых клеток [3]. Изучение гена и экспрессии Top II α стало актуальным после выявления эффективности ответа опухоли на лечение антибиотиками группы антрациклинов, направленных на ингибирование данного белка [4].

Ген TOP II α расположен близко к гену, кодирующему человеческий эпидермальный фактора роста (HER-2/neu) на хромосоме 17q12-21. Амплификация HER-2/neu связана с aberrацией TOP II α гена, что затрудняет представление о том, какой ген наиболее тесно связан с чувствительностью к антрациклинам. Предполагается, что нарушения в гене HER-2/neu вызывают амплификацию гена TOP II α по механизму break-fusion-bridge. Кроме того, амплификация гена топоизомеразы TOP II α не всегда означает его экспрессию, но ам-

плификация гена HER-2/neu сопровождается его экспрессией практически всегда [5]. Как следствие, во многих исследованиях HER-2/neu статус учитывается при отборе пациентов для анализа амплификации TOP IIa. В настоящее время топозомераза IIa исследуется при условии гиперэкспрессии или амплификации Her-2/neu.

В ряде исследований выявлена высокая частота экспрессии TOP IIa в HER-2/neu -негативных опухолях, что ставит под сомнение общее мнение о том, что изменения TOP IIa специфично для HER-2/neu -позитивных опухолей и может считаться прогностическим и предиктивным фактором только для этой подгруппы [6]. Вопрос о наличии или отсутствии взаимосвязи между экспрессией топозомеразы IIa и HER-2/neu до конца не решен.

Выявлено коррелятивное повышение уровня топозомеразы при одновременной гиперэкспрессии белка Ki-67, который является прогностическим фактором при раке молочной железы [7]. Ki-67- это ядерный белок, который связан с клеточной пролиферацией и экспрессируется в фазах митотического цикла S,G1, G2, и M, но не G0. В образцах нормальной ткани молочной железы он также экспрессируется, но на низком уровне (менее 3% клеток в ER- негативных опухолях, но не в ER- позитивных) [8].

Материалы и методы

В качестве объекта исследования в работе использовался материал 578 случаев инфильтративной карциномы молочной железы из ГБУЗ Свердловский областной онкологический диспансер и Городской маммологический центр (ГКБ№ 40) г. Екатеринбург. Гистологические исследования проводились в патологоанатомических отделениях ГБУЗ СООД и ГКБ№40, иммуногистохимические исследования – на базе ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий в лаборатории патоморфологии.

Для проведения иммуногистохимических исследований использовались предметные стекла с адгезивным покрытием SuperFrost® Plus (Menzel). Определение экспрес-

сии рецепторов Estrogen, Progesteron, Ki-67 и Topoisomerase II α, осуществлялись в автостейнере «DAKO» с использованием моноклональных мышинных антител (DAKO, Дания) (Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor, Clone 1D5; Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor, Clone PgR636; Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1; Monoclonal Mouse Anti-Human Topoisomerase II α, Clone Ki-S1). Определение экспрессии HER-2/neu на клетках опухоли осуществлялось на автостейнере «Ventana» с помощью anti-HER2/neu Rabbit Monoclonal Primary Antibody, Clone 4B5 (Ventana, США).

Предварительная демаскировка антигенов проходила в Модуле подготовки PT Link (DAKO, Дания) с использованием буфера для демаскировки EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (DAKO, Дания). Оценку реакции осуществляли на световом микроскопе «Zeiss Imager M» (Германия).

Уровень экспрессии рецепторов Estrogen, Progesteron оценивался по шкале 0-8 [9]. Экспрессия белка Ki-67, топозомеразы II α - по процентному отношению числа окрашенных ядер клеток карциномы к неокрашенным. Оценка уровня мембранной экспрессии HER-2/neu в опухолевых клетках производилась по шкале от 0 до 3+ (в соответствии с рекомендациями ASCO/CAP 2007г). Экспрессию топозомеразы IIa оценивали по шкале 0-4 [10]. Согласно данной классификации уровень экспрессии свыше 35% следует расценивать как гиперэкспрессию (класс 3 и 4), уровень экспрессии в диапазоне 1-35% оценивается как нормальный (класс 1 и 2), уровень экспрессии менее 1% - неопределяемый (класс 0).

По результатам исследования формировались базы данных с использованием программы Microsoft Office Excel 2003. Статистические исследования выполнены с использованием набора программ описательной статистики и матриц корреляций в программном пакете «Statistica 6.0». Достоверность различия сравниваемых показателей определяли по t-критерию Стьюдента, используемого для нормального распределения данных. Различия средних величин считали достоверными при $p < 0,05$.

Таблица 1. Средние значения уровня экспрессии Ki-67, HER-2/neu, Progesteron, Estrogen в ткани карциномы молочной железы у пациентов с нормальной экспрессией и гиперэкспрессией Top IIa

Рецептор	Группа 1 Top IIa= 1-35%, n=453		Группа 2 Top IIa= 36-100%, n=79	
	Среднее значение m±M	Коэффициент корреляции с уровнем Top IIa, r	Среднее значение m±M	Коэффициент корреляции с уровнем Top IIa, r
Top IIa	0,12± 0,09		0,53 ± 0,14	
Ki-67	0,19 ± 0,15	0,53	0,55 ± 0,19	0,56 $P_{(1-2)} < 0,05$
HER-2/neu	1,0 ± 1,2	0,16	1,1 ± 1,3	- 0,17 $P_{(1-2)} > 0,05$
Progesteron	2,9 ± 2,9	- 0,13	1,1 ± 2,2	- 0,14 $P_{(1-2)} > 0,05$
Estrogen	3,9 ± 2,9	- 0,08	1,4 ± 2,6	- 0,09 $P_{(1-2)} > 0,05$



Рис 1. Совместное распределение уровня экспрессии TopII α и Ki-67

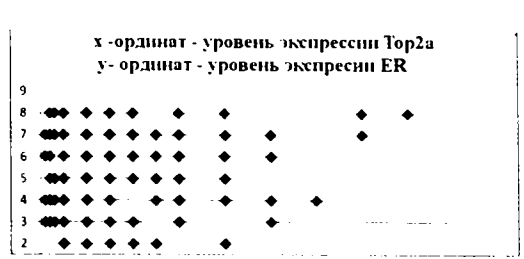


Рис 2. Совместное распределение уровня экспрессии TopII α и ER

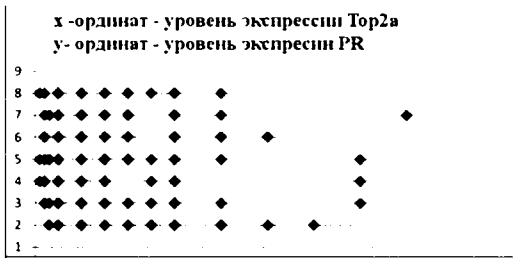


Рис 3. Совместное распределение уровня экспрессии TopII α и PR

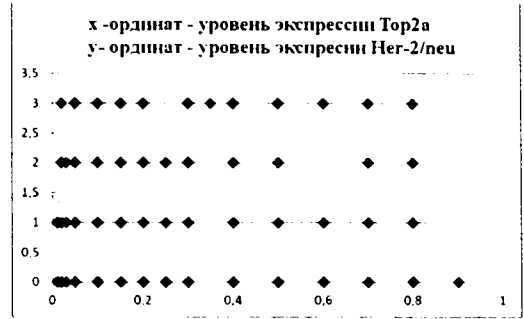


Рис 4. Совместное распределение уровня экспрессии TopII α и HER-2/neu

Таблица 2. Средние значения уровня экспрессии Ki-67, HER-2/neu, Progesteron, Estrogen в ткани карциномы молочной железы у пациентов с экспрессией Top II α .

Рецептор	Top II α = 1=100%, n=532	
	Среднее значение $m \pm M$	Коэффициент корреляции с уровнем Top II α , r
Top II α	0,18 \pm 0,18	
Ki-67	0,23 \pm 0,2	0,76
HER-2/neu	1,0 \pm 1,2	0,06
Progesteron	2,6 \pm 2,9	- 0,25
Estrogen	3,5 \pm 3	- 0,29

Результаты и обсуждение

Все случаи были разделены нами на 2 группы (таблица 1). В группу 1 вошли случаи с нормальным уровнем экспрессии топоизомеразы II α (экспрессия на 1-35% опухолевых клеток). В группу 2 вошли случаи с повышенным уровнем экспрессии топоизомеразы II α (36-100%). Случаи, в которых топоизомераза определялась менее чем в 1% клеток не оценивались. В ходе анализа исходных данных получили, что 78% образцов РМЖ имеют нормальную экспрессию рецепторов топоизомеразы II α (n = 453), гиперэкспрессия рецепторов Top II α (n = 79) встречается в 14%. В 8% случаев (n = 46) значение топоизомеразы практически не определялось.

Внутри каждой группы рассчитан коэффициент корреляции между топоизомеразой и другими ИГХ маркерами (рецепторы эстрогена, прогестерона, Her-2/neu, Ki-67) с целью выявления зависимости и измерения силы зависимости

между ними. В результате было определено, что в группе 1 между топоизомеразой II α и рецепторами к эстрогену, прогестерону имеется отрицательная слабая связь ($r = -0,08$ и $r = -0,13$ соответственно), с HER-2/neu слабая положительная связь ($r = 0,16$), с Ki-67 – средняя положительная связь ($r = 0,53$). В группе 2 между топоизомеразой II α и рецепторами к эстрогену, прогестерону, HER-2/neu отрицательная очень слабая связь ($r = -0,09$, $r = -0,14$, $r = -0,17$ соответственно), с Ki-67 – средняя положительная связь ($r = 0,56$).

После проведения корреляционного анализа по всей выборке мы получили более сильную корреляционную связь. При анализе всех положительно экспрессирующих Top II α (1-100%) случаев (таблица 2) мы отмечена высокая сила положительной корреляции между топоизомеразой II α и Ki-67 $r = 0,76$ (рис.1), слабая отрицательная с рецепторами эстрогена $r = -0,29$ (рис.2) и прогестерона $r = -0,25$ (рис.3), и очень слабая связь с HER-2/neu $r = 0,06$ (рис. 4).

Выводы

1. При иммуногистохимическом исследовании случаев РМЖ в 15% обнаружена гиперэкспрессия топоизомеразы II α .

2. Выявлена прямая сильная зависимость между увеличением степени экспрессии Ki-67 и TOP II α .

3. Корреляция уровня экспрессии топоизомеразы II α от экспрессии Her-2/neu, эстрогена, прогестерона не обнаружена. ■

Арутюнян Е.В. научный сотрудник лаборатории патоморфологии ГБУЗСО ИМКТ, аспирант кафедры ги-

стологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО УГМУ МЗ РФ, г. Екатеринбург; *Бриллиант А.А.*, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории патоморфологии ГБУЗСО ИМКТ, г. Екатеринбург; *Новикова Е.А.* ассистент, аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО УГМУ МЗ РФ, г. Екатеринбург; *Сазонов С.В.*, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией патоморфологии ГБУЗСО ИМКТ, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО УГМУ МЗ РФ, г. Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку: *Арутюнян Е.В.* 620036, г. Екатеринбург, ул. Собалева, 25 тел: +7 343 376 98 28; e-mail: arutyunyan.katerina@bk.ru

Литература:

1. Боженов В.К., Рожкова Н.И., Кудинова Е.А. и соавт. Профиль экспрессии генов как фактор прогноза при раке молочной железы. Обзор (Электронный ресурс). Вестник Российского Научного Центра рентгено-радиологии. Выпуск 11. 2011. Адрес документа для ссылки: http://vestnik.rncrt.ru/vestnik/v11/papers/bozh2_v11.htm
2. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В. Опухолевые маркеры при раке молочной железы. Врач. 2011; 12: С.2-12.
3. Бугреев Д.В., Невинский Г.А. Структура и механизм действия ДНК-топоизомераз 1А-типа. Успехи биологической химии. 2009; Т.49: С. 129-158
4. Имянитов Е.Н. Выбор терапии рака молочной железы на основе молекулярных маркеров: успехи и неудачи. Сибирский онкологический журнал. 2008; №2: С.50.
5. Bhargava R., Priti Lal, Chen Beiyun. HER-2/ neu and Topoisomerase II α gene amplification and protein expression in invasive breast carcinomas. American Society for Clinical Pathology 2005; 123: P. 889-895
6. Zaczek A. J., Markiewicz A., Seroczyuska B. et al Prognostic Significance of TOPII α gene dosage in HER-2/NEU-Negative Breast Cancer. Oncologist 2012; 17(10): P.1246-55.
7. Сазонов С.В., Новикова Е.А., Арутюнян Е.В. Иммуногистохимическое исследование уровня экспрессии топоизомеразы II α в клетках карциномы молочной железы. Вопросы онкологии. Материалы VIII всероссийского съезда онкологов. В 3-х томах. 2013; Т.1: С. 323-324.
8. Faratian D., Bartlett J. Predictive markers in breast cancer- the future. Histopathology 2008; 52: P. 91-98.
9. Elledge R.M., Green S., Pugh R. et al. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. Int.J. Cancer 2000, Mar. 20; 89(2): P. 111-7.
10. Usha L. Tabesh B, Morrison L. E. et al. Topoisomerase II alpha gene copy loss has adverse prognostic significance in ERBB2-amplified breast cancer: a retrospective study of paraffin-embedded tumor specimens and medical charts. Journal of Hematology & Oncology 2008, 1: P.12.