

ЭКСПРЕССИЯ ТОПОИЗОМЕРАЗЫ-2А И Е-КАДГЕРИНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПОДТИПАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И РЕПРОДУКТИВНОМ СТАТУСЕ БОЛЬНЫХ

Шатова Ю.С.¹, Ващенко Л.Н.¹, Новикова И.А.¹, Златник Е.Ю.¹, Владимирова Л.Ю.¹, Ульянова Е.П.¹, Комова Е.А.¹, Черникова Е.Н.¹, Машурова С.А.²

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия (344037, Ростов-на-Дону, ул. 14 линия, 63) e-mail: shat5@rambler.ru

²ГАУ РО «ОКДЦ» Ростов-на-Дону, Россия (344010, Ростов-на-Дону, ул. Пушкинская, 127)

Выявление иммуногистохимических маркеров опухолевых клеток позволяет уточнить характеристики различных подтипов РМЖ и индивидуализировать тактику лечения больных. Иммуногистохимическим методом изучена экспрессия маркеров топоизомеразы-2α и Е-кадгерина в клетках РМЖ у 95 пациенток с различными биологическими подтипами и состоянием овариально-менструальной функции. В клетках Her2neu+ опухолей экспрессия топоизомеразы 2α была выше, чем при других подтипах, а экспрессия Е-кадгерина в опухолях различных подтипов не различалась. В опухолях женщин, находящихся в постменопаузе, наблюдался высокий уровень экспрессии обоих маркеров. У больных в перименопаузе отмечен низкий уровень экспрессии топоизомеразы-2α и высокий — Е-кадгерина, а при сохранной овариально-менструальной функции выявлена умеренная экспрессия топоизомеразы-2α и наиболее низкая — Е-кадгерина. Итак, показаны особенности экспрессии топоизомеразы-2α и Е-кадгерина при различных биологических подтипах РМЖ и репродуктивном статусе больных.

Ключевые слова: рак молочной железы, топоизомераза-2-альфа, Е-кадгерин

TOPOISOMERASE-2A AND E-CADHERIN EXPRESSION IN DIFFERENT BREAST CANCER SUBTYPES AND REPRODUCTIVE STATUSES OF PATIENTS

Shatova J.S.¹, Vashhenko L.N.¹, Novikova I.A.¹, Zlatnik E.J.¹, Vladimirova L.J.¹, Uljanova E.P.¹, Komova E.A.¹, Chernikova E.N.¹, Mashurova S.A.²

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia (63, 14 Liniya Str., 344037, Rostov-on-Don), e-mail: shat5@rambler.ru

²Regional Consultive Diagnostic Center, Rostov-on-Don, Russia (127, Pushkinskaya Str., 344010, Rostov-on-Don)

Detection of new immunohistochemical markers allows specifying the different breast cancer subtypes and personalization of the treatment. Topoisomerase 2α and E-cadherin expression were determined by immunohistochemical methods in tumors of 95 patients with different breast cancer subtypes and ovarian function. The maximal levels of topoisomerase 2α positive cells were found in Her2neu+ subtype in comparison with triple negative, luminal A and luminal B subtypes while E-cadherin expression was similar in all the subtypes. In postmenopausal patients both markers were highly expressed. In perimenopausal patients topoisomerase 2α demonstrated low expression and E-cadherin the high one. In tumors of patients with normal ovarian function E-cadherin expression was shown to be the lowest of all the groups and topoisomerase 2α expression was moderate. Thus some peculiarities of topoisomerase 2α and E-cadherin expression in patients with various breast cancer subtypes and reproductive statuses were shown.

Keywords: breast cancer, topoisomerase 2α, E-cadherin

Как свидетельствуют исследования последних лет, рак молочной железы (РМЖ) является гетерогенным заболеванием [4]. Выявление новых иммуногистохимических маркеров и оценка их прогностического значения позволяют уточнить характеристики различных подтипов РМЖ [2] и индивидуализировать тактику лечения больных [4]. Топоизомераза-2-альфа (Торо2α) и Е-кадгерин участвуют в таких важных процессах, как регуляция клеточного цикла, сигнальной трансдукции, адгезия, дифференцировка и миграция опухолевых клеток. Данные литературы о зависимости частоты и уровня

экспрессии этих маркеров от биологического подтипа РМЖ противоречивы. Так, по данным одних авторов, частота гиперэкспрессии Торо2α составляет 36–61,4% и повышается при p53+ и высокой степени злокачественности вне зависимости от биологического подтипа РМЖ; другие авторы сообщают о выявлении Торо2α+ у 93,1% Her2neu+ больных [5]. В исследовании, выполненном на группе больных с Her2neu+ метастатическим РМЖ, помимо связи Торо2α+ и Her2neu+, показана ассоциация Торо2α+ с PIK3CA и положительными рецепторами эстрогенов, а добавление в план лечения, помимо Трастузумаба, антрациклинов улучшает результаты лечения у Торо2α+ больных [6]. Значимость Е-кадгерина показана при изучении различных злокачественных опухолей и связана с его свойствами супрессора опухолевого роста и инвазивности (желудка, легкого, шейки матки, молочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря) [1]. Однако в исследовании на материале 98 больных РМЖ показано, что прогностическая значимость этого маркера сомнительна. Тем не менее выявлена его корреляция со степенью дифференцировки опухоли и отсутствием метастазов в регионарных лимфоузлах [8]. Экспрессия Е-кадгерина описана как фактор положительного прогноза выживаемости больных РМЖ, особенно при тройном негативном раке (ТНР) [7], хотя именно он характеризуется неблагоприятным течением. Установлено значительное подавление экспрессии Е-кадгерина у больных с мультицентрическим ростом РМЖ в сравнении с уницентрическим [10], причем, по мнению авторов, с этим связан его негативный прогноз. Проведение корреляционного анализа экспрессии Е-кадгерина и рецепторов андрогенов показало, что при ТНР с увеличением уровня экспрессии рецепторов андрогенов (РА) экспрессия Е-кадгерина снижается, а профиль опухоли РА+/Е-кадгерин говорит о повышенном риске рецидивирования и метастазирования [9].

Таким образом, литературные данные о значимости Е-кадгерина и Торо2α+ при различных биологических подтипах РМЖ разрознены и противоречивы; кроме того, остается неисследованной экспрессия этих маркеров у больных РМЖ при их различном репродуктивном статусе, что может играть роль в течении заболевания и ответа опухоли на терапию с учетом связи обоих маркеров с экспрессией рецепторов к гормонам.

Цель исследования: изучить экспрессию маркеров Торо2α+ и Е-кадгерина при различных биологических подтипах РМЖ и при различном репродуктивном статусе больных.

Материалы и методы

Была изучена экспрессия маркеров Торо2α и Е-кадгерина в клетках РМЖ 95 пациенток с различными молекулярно-биологическими подтипами с помощью иммуногистохимического (ИГХ) анализа, который проводили на срезах с парафиновых блоков опухолей, удаленных при операции и предназначенных для стандартного

морфологического исследования. Используемые в работе первичные антитела и их разведения представлены в таблице 1.

Таблица 1

Панель использованных для ИГХ-анализа антител

Специфичность	Клон	Фирма	Разведение	Буфер для «демаскировки антигенов»
Торо2α	SWT 3D1	DCS	1:25	10 мМTris, 1 мМEDTA (pH 6,0)
Е-кадгерин	NCH-38	DAKO	1:100	10 мМTris, 1 мМEDTA (pH 6,0)

Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. «Демаскировку» антигенов проводили в PT-Link Thermo. Протокол включал в себя предварительный нагрев до 65⁰С, восстановление антигена в течение 20 мин при температуре 97⁰С и дальнейшее охлаждение до 65⁰С. Затем стекла промывались в течение 1–3 мин TBS-буфером (Dako) и помещались в автостейнер ThermoScientific для окрашивания в автоматическом режиме. Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали систему детекции Reveal Polyvalent HRP-DAB DetectionSystem. Срезы докрашивали гематоксилином Майера, для заключения использовали бальзам Bio-Mount. Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа «Leica» (Германия) под увеличением x10, x20, x40. Для рецепторов Торо2α оценивали количество опухолевых клеток, положительных по ядерной экспрессии данного маркера, и подсчитывали количество окрашенных ядер на 100 ядер в 3 полях зрения. Для Е-кадгерина оценивали количество клеток, положительных по мембранной экспрессии данного маркера, учитывали выраженность реакции: 0 – отсутствие реакции, 1 – слабая реакция, 2 – умеренная реакция, 3 – сильная реакция; кроме того, обращали внимание на полное или неполное мембранное окрашивание, а также наличие цитоплазматического окрашивания. Статистическую обработку результатов проводили параметрическими и непараметрическими методами (t-критерий Стьюдента, критерий Уилкоксона).

Результаты и обсуждение

Из 95 пациенток у 26 (27,4%) был определен люминальный А подтип, у 33 (34,7%) – люминальный В подтип, у 15 — Her2neu+ (15,8%), у 21 — ТНР (22,1%). 31 больная имела сохранную овариально-менструальную функцию, 45 находились в постменопаузе, 19 — в перименопаузе.

Окрашивание ядер опухолевых клеток антителами к Торо2α отмечено при всех исследованных подтипах РМЖ. Как видно из таблицы 2, содержание положительно окрашенных клеток было максимальным при Her2+ подтипе, при ТНР и при люминальном В подтипах РМЖ оно было статистически значимо ниже, а при люминальном А подтипе

выявлено слабое окрашивание антителами к топоизомеразе 2α в ядрах единичных опухолевых клеток.

Таблица 2

Экспрессия Торо2α и Е-кадгерина у больных с различными биологическими подтипами РМЖ (%)

ИГХ-маркеры	Биологические подтипы РМЖ			
	Люминальный А (n=26)	Люминальный В (n=33)	Her2neu+ (n=15)	ТНР (n=21)
Торо2α	Единичные клетки*	36,7±3,3*	77,5±7,5	52,5±7,5*
Е-кадгерин	100	87,5±3,3	80,1±2,8	84,6±3,6

*- различия достоверны в отношении Her2neu+ подтипа (p<0,05)

Позитивная реакция с антителами к Е-кадгерину наблюдалась при всех биологических подтипах РМЖ либо на мембране опухолевых клеток, либо в виде диффузного окрашивания цитоплазмы, в некоторых случаях отмечался смешанный (мембранно-цитоплазматический) характер окрашивания. Экспрессия маркера наблюдалась во всех клетках опухоли или в фокусах опухолевых клеток. Люминальный А подтип характеризовался 100%-ным полным интенсивным окрашиванием мембраны опухолевых клеток. При люминальном В подтипе среднее содержание положительно окрашенных клеток антителами к Е-кадгерину составило 87,5±3,3% с разбросом от 75% до 95%. В 48,5% (16 из 33) случаев наблюдалось полное интенсивное окрашивание мембраны опухолевых клеток, в 36,4% (12 из 33) случаев имел место смешанный характер окрашивания и 5 случаев (15,1%) характеризовались диффузным окрашиванием цитоплазмы. При ТНР и Her2neu+ подтипах РМЖ в 100% случаев выявлено умеренное окрашивание мембраны опухолевых клеток с наличием слабого диффузного окрашивания цитоплазмы. При ТНР РМЖ антителами к Е-кадгерину окрашивались 84,6±3,6% опухолевых клеток, при Her2neu+ 80,1±2,8%. Достоверной разницы в значении этого показателя при различных подтипах РМЖ не выявлено (табл. 2). Отмечено снижение интенсивности окрашивания мембраны и появления цитоплазматического окрашивания при люминальном В, ТНР и Her2+ молекулярных подтипах по сравнению с люминальным А.

Как видно из таблицы 3, уровень экспрессии Торо2α существенно различается в опухолях больных с различной сохранностью овариально-менструальной функции. Минимальные значения отмечаются в опухолях женщин в перименопаузе, при сохранной репродуктивной функции показатели были средними, а в опухолях женщин в постменопаузе — максимальными, статистически достоверно превышающими показатели остальных групп (p<0,05).

Таблица 3

Экспрессия Торо2α и Е-кадгерина у больных РМЖ с различным репродуктивным статусом (%)

ИГХ-маркеры	Репродуктивный статус		
	Сохранная функция (n=31)	Перименопауза (n=19)	Постменопауза (n=45)
Торо2α	50,0±3,3* ¹	28,3±4,9* ²	77,5±2,5 ¹
Е-кадгерин	73,3±2,2	98,0±2,0 ²	95,0±3,5 ²

- — различия достоверны в отношении постменопаузы; ¹ — различия достоверны в отношении перименопаузы; ² — различия достоверны в отношении группы с сохранной репродуктивной функцией (p<0,05)

Уровень экспрессии Е-кадгерина был высок во всех группах, но в опухолях женщин с сохранной репродуктивной функцией он был достоверно ниже, чем в других (табл. 3). При этом у 20 пациенток (64,5%) отмечалось полное интенсивное окрашивание мембран клеток, у 11 (35,5%) – неполное окрашивание средней интенсивности. В опухолях женщин в пост- и перименопаузе полное интенсивное окрашивание клеточной мембраны отмечалось только в 25% и 33,3% случаев соответственно, т.е. опухоли женщин репродуктивного периода отличались не только уровнем экспрессии Е-кадгерина, но характером клеточной реакции.

Заключение

Таким образом, установлена более высокая экспрессия Торо2α в Her2neu+ опухолях по сравнению с опухолями других подтипов, а экспрессия Е-кадгерина в опухолях разных подтипов достоверно не отличалась. Полученные данные позволяют уточнить иммуногистохимические профили различных биологических подтипов РМЖ. Кроме того, они подтверждают полученные нами ранее данные об «особой» иммуногистохимической картине и микроокружения Her2neu+ опухолей [2, 3], что в свою очередь позволит в дальнейшем расширить и индивидуализировать тактику лечения этих пациенток. Экспрессия исследованных маркеров у женщин с разным репродуктивным статусом имеет ряд различий. Опухоли больных репродуктивной группы характеризовались умеренным уровнем экспрессии Торо2α и более низким уровнем по сравнению с другими Е-кадгерина; в перименопаузе отмечен низкий уровень экспрессии Торо2α и высокий Е-кадгерина, а в опухолях женщин, находящихся в постменопаузе, наблюдался высокий уровень экспрессии обоих маркеров. Итак, показаны особенности экспрессии Торо2α и Е-кадгерина при различных биологических подтипах РМЖ, а также при различном репродуктивном статусе больных.

Список литературы

1. Делекторская В.В., Кушлинский Н.Е. Клиническое значение содержания молекулярно-биологических маркеров в зонах инвазивного рака толстой кишки // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2010. — № 9. — С. 337–340.
2. Кит О.И., Шатова Ю.С., Новикова И.А. и др. Экспрессия p53 и BCL2 при различных подтипах рака молочной железы // Фундаментальные исследования. — 2014. — № 10(1). — С. 85–88.
3. Новикова И.А., Шатова Ю.С., Златник Е.Ю. и др. Проллиферативные и иммунологические характеристики молекулярно-биологических подтипов рака молочной железы // Междунар. журн. прикл. и фундам. исслед. — 2014. — № 11 (1). — С. 116–119.
4. Семиглазов В.Ф. Новые подходы к лечению рака молочной железы // Вопросы онкологии. — 2013. — Т. 59, № 3. — С. 288–291.
5. Engstrøm M. TOP2A gene copy number change in breast cancer / M. Engstrøm., B.Ytterhus, L. Vatten et al. // JClinPathol. — 2014. Vol. 56, № 67. — P. 420–5.
6. Fountzilas G. Topoisomerase II alpha gene amplification is a favorable prognostic factor in patients with HER2-positive metastatic breast cancer treated with trastuzumab / G. Fountzilas, C. Christodoulou, M. Bobos et al. // Journal of translational medicine. — 2012. № 10. — P. 212.
7. Kashiwagi S. Significance of E-cadherin expression in triple-negative breast cancer / S. Kashiwagi, M. Yashiro, T. Takashima et al. // Br. J. Cancer. — 2010. Vol. 2, № 103. — P. 249–55.
8. Kawahara F. The expression of E-cadherin as a prognostic factor in breast cancer / F. Kawahara, M. Noguchi, R. Yagasaki et al. // Oncol. Rep. — 2011. Vol. 2, № 4. — P. 401–5.
9. Tang D. The expression and clinical significance of the androgen receptor and E-cadherin in triple-negative breast cancer / D. Tang, S. Xu, Q. Zhang et al. // Med. Oncol. — 2012. Vol. 2, № 29. — P. 526–33.
10. Weissenbacher T. Multicentric and multifocal versus unifocal breast cancer: differences in the expression of E-cadherin suggest differences in tumor biology / T. Weissenbacher, E. Hirte, C. Kuhn et al. // BMC Cancer. — 2013. № 13. — P. 361.

Рецензенты:

Шихлярова А.И., д.б.н., профессор, рук. лабораторией изыскания новых противоопухолевых средств ФГБУ «РНИОИ» Минздрава РФ, г. Ростов-на-Дону;

Франциянц Е.М., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «РНИОИ» Минздрава РФ, г. Ростов-на-Дону.