

¹В.Є. Жильчук, ²Н.Ю. Лук'янова, ²Н.О. Безденежних, ²А.Л. Воронцова

Особливості експресії молекулярних маркерів у пухлинних клітинах молочної залози під впливом інтерферону-альфа

¹Рівненський обласний онкологічний диспансер, м. Рівне

²Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАНУ, м. Київ

Ключові слова: рак молочної залози, інтерферон-альфа, PE, PII, Bcl-2, Her2/neu, E-кадгерин, Ki-67, імуногістохімія.

Проведено дослідження особливостей експресії PE, PII, Bcl-2, Her2/neu, E-кадгерину та Ki-67 в пухлинних клітинах хворих на РМЗ, комплексне лікування яких було доповнене застосуванням рекомбінантного інтерферону-альфа (Лаферобіону). Встановлено, що використання ІФН в неoad'ювантному режимі у хворих на РМЗ сприяє збільшенню в пухлинних клітинах рівня експресії рецепторів стероїдних гормонів і молекул міжклітинної адгезії E-кадгерина, та зниженню проліферативної активності досліджуваних пухлин, що в свою чергу свідчить про сприятливий прогноз.

Особенности экспрессии молекулярных маркеров в опухолевых клетках молочной железы под воздействием интерферона-альфа

В.Е. Жильчук, Н.Ю. Лукьянова, Н.А. Безденежных, А.Л. Воронцова

Проведено исследование особенностей экспрессии PЭ, PII, Bcl-2, Her2/neu, E-кадгерина и Ki-67 в опухолевых клетках больных РМЖ, комплексное лечение которых было дополнено применением рекомбинантного интерферона-альфа (Лаферобина). Установлено, что использование ИФН в неoad'ювантном режиме у больных РМЖ способствует увеличению в опухолевых клетках уровня экспрессии рецепторов стероидных гормонов и молекул межклеточной адгезии E-кадгерина, и снижению пролиферативной активности исследуемых опухолей, что в свою очередь свидетельствует о благоприятном прогнозе.

Ключевые слова: рак молочной железы, интерферон-альфа, PЭ, PII, Bcl-2, Her2/neu, E-кадгерин, Ki-67, иммуногистохимия.

Патология. – 2009. – Т.6, №2. – С. 50-53

Features of molecular marker expression in breast cancer tumor cells under the impact of interferon-alpha

V.E. Zhyl'chuk, N.Yu. Lukyanova, N.O. Bezdenezhnykh, A.L. Vorontsova

We studied ER, PR, Bcl-2, Her2/neu, E-cadherin and Ki-67 expression in breast cancer cells from patients who received recombinant interferon-alpha (Laferobion) in addition to their regimen. It was shown that non-adjuvant use of interferon in treatment of breast cancer patients caused elevation of expression level of steroid hormone receptors and intracellular adhesion molecules (E-cadherin) and decreased proliferative activity, what pointed on good prognosis

Key words: Breast cancer, Interferon-alpha, ER, PR, Bcl-2, Her-2/neu, E-cadherin, Ki-67, immunohistochemistry.

Pathologia. 2009; 6(2): 50-53

Дослідження останніх років свідчать про наявність різноманітних змін в геномі пухлинних клітин, які відрізняють їх від нормальних клітин за цілим комплексом ознак та формують так званий злякисний фенотип клітини. Серед таких ознак слід згадати такі властивості трансформованих клітин, як неконтрольована проліферація, здатність до інвазивного росту і метастазування, активація ангиогенезу, тощо. Добре відомо, що особливості фенотипу клітин, які утворюють певну злякисну пухлину, у великій мірі визначають і характер пухлинного процесу, зокрема швидкість росту цієї пухлини, інтенсивність її метастазування, реакцію на медикаментозне лікування і долю злякисного захворювання в цілому. Тому дослідження особливостей фенотипу злякисних клітин кожної конкретної пухлини є надзвичайно актуальною проблемою сучасної онкології, а пошук засобів модифікуючого впливу на фенотипові особливості пухлинних клітин є одним із найважливіших напрямків біотерапії раку [1]. Саме цій проблемі були присвячені дослідження, результати яких наведені у даній роботі.

В якості агента, модифікуючого злякисний фенотип клітин раку молочної залози людини, ми використали

цитокін інтерферон-альфа (ІФН), який є широко визнаним модифікатором біологічних відповідей, крім того, сучасними дослідженнями доведено, що ІФН є поліпотентним цитокіном, здатним пригнічувати проліферацію злякисних клітин, він викликає пригнічення ангиогенезу в пухлинній тканині та стимулює специфічну імунну відповідь; ІФН володіє антимутагенною активністю, підсилює апоптоз в пухлинних клітинах, індукований різними чинниками; він пригнічує рухомість пухлинних клітин та експресію в них онкогенів, тощо [2, 3]. Сказане обумовило доцільність дослідження впливу ІФН на деякі фенотипові особливості пухлинної клітини, що з одного боку може надати додаткову інформацію щодо механізмів протипухлинної дії ІФН на клітинно-молекулярному рівні, а з іншого – ще раз підтвердити доцільність використання цього цитокіну в біотерапії раку молочної залози [4].

Під час проведення досліджень ми зосередили увагу на змінах під впливом ІФН таких фенотипових маркерів клітин раку молочної залози людини як антиген Ki-67, що є маркером їх активної проліферації [5]; як представник Ca²⁺-залежних молекул клітинної адгезії E-кадгерин, втрата функції або експресії якого

призводить до втрати клітиною здатності до адгезії та набуття інвазивного фенотипу, а також до порушення нормальної структури тканини. Відомо, що одним з важливих загальноновизнаних показників прогнозу протікання РМЗ є рівень експресії рецепторів естрогену (РЕ) та прогестерону (РП). Одним з перспективних прогностичних факторів є рівень експресії (та/або ампліфікації) в пухлині онкогена HER2/neu. Ген HER2/neu відповідає за продукцію трансмембранного протеїна HER2 з рецепторними функціями, який дуже схожий за своєю будовою з рецептором до епідермального фактора росту [6]. Гіперекспресія Her-2 у тканинах РМЗ виявляється у 25-30% хворих і є незалежним прогностичним маркером протікання хвороби та ефективності лікування [7]. Зокрема, було показано, що, ампліфікація гена HER2/neu у тканинах пухлини корелює з несприятливим прогнозом, а також з резистентністю до гормонотерапії [8, 9].

Показано також, що хворі з пухлинами, які не мають принаймні одного з цих рецепторів, мають більш високу ймовірність смерті. Надзвичайно важливим є дослідження протоонкогену Vcl-2, який бере участь в процесі виникнення злоякісного новоутворення в зв'язку з тим, що він пригнічує апоптоз. Існують дані, які показують, що гіперекспресія Vcl-2 може розглядатися як погана прогностична ознака при ряді новоутворень, з'ясовано також, що гіперекспресія Vcl-2 асоціюється з лікарською стійкістю пухлинних клітин до багатьох хіміопрепаратів [10, 11].

Мета: з'ясувати механізми впливу інтерферону на пухлинні клітини молочної залози людини за допомогою дослідження фенотипових особливостей пухлин хворих на РМЗ які отримували інтерферонотерапію.

Пацієнти і методи. Клінічну групу склали 91 хвора на РМЗ, які лікувалися в Рівненському обласному онкологічному диспансері протягом 1996-2008 рр. Пацієнтки були проінформовані та дали згоду на використання хірургічного матеріалу з дослідницькою метою. Класифікацію пухлин проводили всім хворим; на першому етапі лікування було визначено стадію захворювання та гістологічний тип пухлини. Для морфологічного дослідження зразки пухлинних тканин, в тому числі трепанбіопсій, фіксували в 4% розчині нейтрального формаліну і заливали в парафін за загальноновживаним методом. З парафінових блоків готували препарати, фарбували їх гематоксилін-еозіном і вивчали в світло-оптичному мікроскопі. Стадію захворювання або поширеність пухлинного процесу визначали за міжнародною системою TNM (6-те видання). Під час проведення курсу передопераційної крупнофракційної телегаматерапії в сумарній дозі 30 гр. всім хворим проводили перитуморальне введення «Лаферобіону» в дозі 6 млн. МО протягом 5-ти дб.

Імуногістохімічне дослідження експресії антигенів з використанням моноклональних антитіл (МКАТ) проти РЕ, РП, Vcl-2, Her2/neu, E-кадгерину та Ki-67 було проведено на матеріалах трепанбіопсій, отриманих перед початком лікування та на парафінових зрізах пухлинної тканини, отримані під час операції.

Парафінові зрізи товщиною 4-6 мкм, були монтовані на скельця, покриті полі-L-лізіном або на скельця з адгезивними властивостями SuperFrost Plus (Німеччина) і залишені на добу в термостаті при 37°C. Для оптимального імуногістохімічного визначення експресії антигенів проводили демаскування антигенів шляхом обробки зрізів 0,06%-им розчином трипсину протягом 10 хвилин при 37°C, потім проводили інкубацію препаратів з первинними МКАТ в оптимальному розведенні протягом однієї години. Через годину скельця відмивали та наносили кролячу сироватку проти імуноглобулінів миші в надлишковому титрі також на 1 годину. Далі скельця зі зрізами знову відмивали в ЗФР та інкубували з ПАП-комплексом протягом 45 хвилин. Після відмивання ПАП-комплексу, що не зв'язався з кролячою анти-мишачою сироваткою проводили реакцію гістохімічного визначення активності пероксидази. Якщо для візуалізації застосовували систему EnVision, яку наносили після МКАТ, то гістохімічне визначення активності пероксидази проводили безпосередньо через 30 хвилин інкубації з вищезгаданою системою. Після виявлення активності пероксидази зрізи тканини пухлин дофарбували гематоксиліном протягом 2-3 хвилин і укладали в бальзам або Faramount Aqueous Mounting Medium (DacoCytomation, Данія). Оцінку результатів фарбування проводили за допомогою світлового мікроскопу (збільшення 200, 400).

Результати. В дослідженні ми спостерігали зміну рецепторного статусу пухлин хворих, які отримували ІФН, у порівнянні з даними, отриманими до початку інтерферонотерапії. Зокрема, збільшувався відсоток пухлин, які були позитивними за РЕ (на 11,9%) та прогестерону РП (на 23,8%). Таким чином, нами показано, що застосування ІФН в неoad'ювантному режимі у хворих на РМЗ сприяє підвищенню рівня експресії стероїдних гормонів. Згідно даних літератури, наявність в пухлинах РЕ та РП є маркерами сприятливого прогнозу, а також вказує на чутливість пухлини до гормонотерапії, а також пов'язана з більш високим ступенем диференціювання пухлини і, відповідно, з більш низькою ймовірністю появи метастазів.

Важливе значення у прогнозуванні протікання РМЗ має також рецептор HER-2/neu, присутність якого ряд дослідників [6, 12, 13], пов'язує з різким зниженням апоптозу, а також більш агресивним протіканням захворювання. Ми не спостерігали відмінностей у експресії даного білка до та після інтерферонотерапії. Таким чином, нами показано, при використанні ІФН в неoad'ювантному режимі рівень експресії білка HER-2/neu в пухлинах хворих на РМЗ не збільшується, що є сприятливою прогностичною ознакою перебігу хвороби.

Відомо також, що вплив ІФН на пухлинні клітини безпосередньо пов'язаний зі зміною експресії деяких білків-регуляторів апоптозу. Одним з маркерів

присутність якого в пухлинних клітинах є сприятливою прогностичною ознакою перебігу хвороби при РМЗ є BCL-2 [14]. Цей білок присутній в нормальній тканині молочної залози і може відігравати роль у нормальному циклі її розвитку [15]. При аналізі експресії білка-регулятора апоптозу BCL-2 в пухлинах хворих на РМЗ нами було встановлено, що рівень експресії білка BCL-2 в пухлинах хворих, що отримували ІФН знижується на 45,2%. Таким чином, враховуючи результати аналізу 3-річної виживаності, можна стверджувати, що додавання ІФН до схем протипухлинної терапії знімає негативний прогностичний ефект відсутності експресії BCL-2.

Ще одним прогностичним маркером РМЗ є Е-кадгерин - білок, що обумовлює адгезивні контакти між клітинами, також має важливе значення при прогнозі протікання даного захворювання, оскільки його відсутність пов'язана з агресивним ростом пухлин, а також швидким розвитком регіонарних та віддалених метастазів [16]. За літературними даними відомо, що відновлення експресії Е-кадгерину в ракових клітинах за допомогою введення гено-інженерних конструкцій може викликати перехід від інвазивного до неінвазивного фенотипу [17]. Ми спостерігали підвищення числа Е-кадгерин-позитивних пухлин (з 28,5% в контролі до 71,4% у групі хворих, яка отримувала ІФН), що цілком узгоджується з отриманими даними щодо кращих показників виживаності у пацієнтів, яким було призначено інтерферонотерапію.

Ступінь злоякісності та диференціювання РМЗ багато в чому визначається проліферативною активністю пухлинних клітин, однак, традиційний підрахунок мітотичної активності не відображає проліферативного потенціалу пухлини, оскільки власне мітоз проходить

протягом кількох годин (що може бути візуалізовано при рутинному дослідженні), а підготовка до нього – близько 24 годин, у зв'язу з чим вивчення Ki-67 (маркера проліферації, який експресується у всіх клітинах, які вийшли з G0-фази) є актуальним, дозволяє визначити саме «прихований» проліферативний потенціал даної пухлини і вести мову про ступінь злоякісності [18]. Згідно багаточисельних клінічних спостережень [19], високий відсоток Ki-67-позитивних клітин в пухлинах хворих на РМЗ є ознакою несприятливого прогнозу, що вказує на доцільність проведення променевої та хіміотерапії. Наявність Ki-67, з одного боку може вказувати на сприятливий прогноз, оскільки клітини, які активно діляться, є більш чутливими до ряду протипухлинних препаратів, тоді як з іншого боку такі хворі мають схильність до розвитку більш важких рецидивів, а також мають значно вищий ризик смерті [20]. За отриманими нами даними, застосування ІФН достовірно не знижувало кількість Ki-67- позитивних клітин. Так рівень експресії Ki-67 в пухлинних клітинах перед застосуванням ІФН складав 38,1%, а після інтерферонотерапії - 30,1%.

З наведених вище результатів можна зробити висновки, що використання ІФН в неoad'ювантному режимі у хворих на РМЗ сприяє збільшенню в пухлинах рівня експресії рецепторів стероїдних гормонів і молекул міжклітинної адгезії Е-кадгерина, та зниженню проліферативної активності досліджуваних пухлин, що в свою чергу свідчить про сприятливий прогноз. При цьому, слід зазначити, що застосування ІФН у хворих на РМЗ не змінює експресію білка HER-2/neu в пухлинних клітинах.

Таблиця 1

Зміни експресії молекулярних маркерів під впливом ІФН

Експресія молекулярних маркерів	ІФН (n=42), %		Контроль (n=49),%	
	До початку лікування	Після радикальної операції	До початку лікування	Після радикальної операції
PE ⁺	n=21 50% ± 3,4	n=26 61,9% ± 3,7	n=25 51% ± 3,3	n=24 49% ± 2,9
РП ⁺	n=16 38,1% ± 2,4*	n=26 61,9% ± 3,8*	n=24 49% ± 3,4	n=24 49% ± 3,4
Her2/neu ⁺	n=15 35,7% ± 2,2	n=15 35,7% ± 2,2	n=18 36,7% ± 3,0	n=18 36,7% ± 3,0
Ki67 ⁺	n=16 38,1% ± 3,9	n=13 30,1% ± 3,9	n=21 42,8% ± 4,7	n=21 42,8% ± 4,7
Bcl2 ⁺	n=31 73,8% ± 5,1*	n=12 28,6% ± 1,9*	n=33 67,3% ± 4,0	n=33 67,3% ± 4,0
Е-кадгерин ⁺	n=12 28,5% ± 2,2*	n=30 71,4% ± 4,6*	n=18 36,7% ± 3,1	n=19 38,8% ± 3,2

*p<0,05

Література:

1. Modifying influence of prolonged action of interferon on phenotypic characteristics of human lung cancer cells *in vitro* / Yu.I. Kudryavets, N.O. Bezdenezhnykh, N.Yu. Lukyanova, N.A. Tregubova, A.L. Vorontsova // *Experimental Oncology*. – 2008. – v.30, №4. – P. 283 - 288.
2. Кудрявец Ю.Й. Интерферон-альфа посилює розвиток апоптозу, індукованого різними чинниками в пухлинних клітинах *in vitro* // *Експер. онкологія* 2001. - т. 23 (4). – С. 267-73.
3. Под ред. Винсента Т.ДеВита, Хеллмана С., Розенберга А.С. Биологические методы лечения онкологических заболеваний М.: «Медицина», 2002.- 920с.
4. Г.М.Телетаева. Цитокины и противоопухолевый иммунитет // *Практическая онкология* – т.8, №4.- 2007.- С. 211-218.
5. Суховерша О.А. Комплексне лікування хворих на хіміорезистентний недрібноклітинний рак легені з урахуванням молекулярно-генетичних особливостей пухлини // *Онкологія*. – Т.8, №3. - 2006. - С. 235-240.
6. Sahin AA. Biologic and clinical significance of HER-2/neu (cerbB-2) in breast cancer // *Adv Anat Pathol*. – 2000. – v.7, №3. – P. 158 - 66.
7. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene / DJ Slamon, GM Clark, SG Wong, WJ Levin, A Ullrich, WL McGuire // *Science*. – 1987. – v.235. – P. 177-182.
8. Beltrán M., Colomer R. Elevated serum HER-2/neu level predicts decrease response to hormone therapy in metastatic breast cancer // *Journal of Clinical Oncology*. – 2002. – v.20, №23. – P. 4605-4606.
9. Panasci LC HER-2/neu serum levels vis-à-vis hormonal response in metastatic breast cancer. - *J Clin Oncol*. – 2002. – v.20. – p. 3357.
10. Moderate activation of the apoptosis inhibitor bcl-xL worsens the prognosis in pancreatic cancer / H Friess, Z Lu, A Andrén-Sandberg, P Berberat [et al] // *Ann. Surg.* – 1998. – v.228, №3. – P. 780-787.
11. Bcl-2 and bcl-xL Antisense Oligonucleotides Induce Apoptosis in Melanoma Cells of Different Clinical Stages / Robert A. Hafner, Christoph Küttel, Renzo Sigrist [et al] // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2002. – v.118, №3. –P. 505-512.
12. Yaziji H, Gown AM. Testing for HER-2/neu in breast cancer: is fluorescence in situ hybridization superior in predicting outcome? // *Adv Anat Pathol*. – 2002. - v.9, №6. – p. 338-44.
13. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy / JS Ross, JA Fletcher, GP Linette, J Stec, E Clark, M Ayers, WF Symmans, L Pusztai, KJ Bloom. // *Oncologist*. – 2003. – v.8, №4. – p. 307-25.
14. Bcl-2 Is a Prognostic Marker in Breast Cancer Independently of the Nottingham Prognostic Index / GM Callagy, PD Pharoah, SE Pinder, FD Hsu, TO Nielsen, J Ragaz, IO Ellis, D Huntsman, C Caldas // *Clinical Cancer Research*. – 2006. - v.12. –P. 2468-2475.
15. Clinical significance of bcl-2 gene expression in human breast cancer tissues / H Kobayashi, H Iwase, Y Ito, H Yamashita, H Iwata, T Yamashita, K Ito, T Toyama, T Nakamura, A Masaoka // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 1997. – v.42, №2. – P. 173-181.
16. Bex G., van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression // *Breast Cancer Res*. – 2001. – v. 3, №5. – P. 289-293.
17. Cadherin superfamily of adhesion molecules in primary lung cancer / K.Charalabopoulos, A.Gogali, O.K.Kostoula, S.H.Constantopoulos // *Exp. Oncol* - 2004. – v.26, №4. – P. 256-260.
18. Urruticoechea A., Smith I.E., Dowsett M. Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer // *Journal of Clinical Oncology*. – 2005. - v.23, №28. – P. 7212-7220.
19. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients / E de Azambuja, F Cardoso, G de Castro Jr, M Colozza, M S Mano, V Durbecq, C Sotiriou, D Larsimont, M J Piccart-Gebhart, M Paesmans // *British Journal of Cancer*. – 2007. – v.96. – P. 1504-1513.
20. Ki67 in breast cancer: Correlation between proliferation cellular and other prognostic factors/ R. Gerson, L. Alban, A. Martínez, A. Villalobos, A. Serrano // *J Clin Oncol*. – 2009. v.27, suppl; abstr e22184.

Відомості про авторів:

Жильчук Віктор Євгенович, кандидат медичних наук, лікар онкохірург, Рівненський обласний онкологічний диспансер.
 Лук'янова Наталія Юріївна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділу механізмів протипухлинної терапії, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАНУ, м. Київ.
 Безденежних Наталія Олександрівна, молодший науковий співробітник відділу експериментальних клітинних систем, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАНУ, м. Київ.
 Воронцова Ада Леонідівна, доктор біологічних наук, професор, провідний науковий співробітник відділу експериментальних клітинних систем, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАНУ, м. Київ.

Адреса для листування:

Лук'янова Наталія Юріївна, моб. тел: 8-067-739-7782; e-mail: oncom@onconet.kiev.ua