

УДК 577.218-616-006.04

ЭКСПРЕССИЯ p53 И BCL2 ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПОДТИПАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Кит О.И., Шатова Ю.С., Новикова И.А., Владимирова Л.Ю., Ульянова Е.П.,
Комова Е.А., Кечеджиева Э.Э.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России,
Ростов-на-Дону, e-mail: rnioi@list.ru, shat5@rambler.ru

Изучена экспрессия маркеров p53 и bcl-2 в клетках РМЖ 95 пациенток с различными молекулярно-биологическими подтипами. Выявлено, что практически одинаково часто гиперэкспрессия p53 наблюдалась при люминальном В и Her2neu+ подтипах РМЖ и несколько снижается при ТНР. Накопление p53 при люминальном А – подтипе встречалось в 2 раза реже, чем при ТНР, и в 2,5 и 2,7 раза реже, чем при люминальном В и Her2neu+ РМЖ, соответственно. При этом степень ядерной реакции с антителами p53 в ткани опухоли и количество окрашенных клеток отличались. При изучении экспрессии BCL2 выявлено снижение частоты позитивных случаев окрашивания цитоплазмы опухолевых клеток с изменением рецепторного статуса опухоли, а именно, снижение в несколько раз числа позитивных случаев при ТНР и Her2neu+ подтипах РМЖ. Наименьшее соотношение (0,25) числа положительных случаев по экспрессии p53 к случаям положительной экспрессии bcl-2 отмечено при люминальном А подтипе. Несколько выше этот показатель отмечен при ТНР и люминальном В – подтипе, составив 0,6 и 0,83, соответственно. Обратная зависимость наблюдалась при Her2+ РМЖ, составив 2, где отмечено преобладание доли опухолей, позитивных по экспрессии p53 над bcl-2+.

Ключевые слова: рак молочной железы, BCL2, p53

P53 AND BCL2 EXPRESSION IN DIFFERENT BREAST CANCER SUBTYPES

Kit O.I., Shatova JU.S., Novikova I.A., Vladimirova L.JU., Ul'janova E.P.,
Komova E.A., Kechedzhieva JE.JE.

Federal state budget-funded institution of the Ministry of Health of Russia «Rostov scientific and research institute of oncology», Rostov-on-Don, e-mail: rnioi@list.ru, shat5@rambler.ru

p53 and bcl-2 expression in the breast cancer among the 95 patients with different molecular subtypes were analyzed. It was found, that the p53 overexpression level among luminal B and Her2neu+ breast cancer subtypes was equal but few decreased among TNBC. The p53 concentration in luminal A subtype was in 2 times more rarely than in TNBC, and in 2,5 and in 2,7 times than in luminal B and Her2neu+, correspondingly. At the same time, the levels of the nuclear reaction with p53 antibodies in the tumor tissue and the quantity of the colored cells differed. The research of bcl-2 expression discovered its decrease of the positive cases according to the tumor receptor state changes, especially in TNBC and HER2neu+, which was several times lower. The least correlation (0,25) of the p53 expression to bcl-2 expression positive cases was found in luminal A subtype. Few higher this index was in TNBC and luminal B subtypes, 0,6 and 0,83, correspondingly. Inverse dependence was observed in HER2neu+ breast cancer, where the index was 2 and the prevalence of the p53 expression positive tumors above bcl-2+ was detected.

Keywords: breast cancer, BCL2, p53

Как свидетельствуют исследования последних лет, РМЖ является гетерогенным заболеванием [2; 3]. Выявление все новых и новых молекулярно-генетических и иммуногистохимических маркеров и их корреляций позволяет индивидуализировать тактику лечения больных [1]. Ключевыми белками, участвующими в управлении апоптозом, являются белки семейства BCL-2 и супрессор опухолевого роста p53. Частота встречаемости экспрессии BCL2 (BCL2+) составляет, по данным разных авторов, от 54,1 % до 75,7% [10; 9]. Некоторыми авторами проведены исследования по ассоциации BCL2+ с тем или иным молекулярно-биологическим подтипом РМЖ. Так, например, по данным [4], у 70 % больных ТНР выявлено отсутствие экспрессии BCL2 (BCL2-), что коррелировало с высокой пролиферативной активностью опухоли. Эти же данные о достаточно

низкой экспрессии BCL2 подтверждены и в других исследованиях, где, помимо низкого уровня экспрессии BCL2, при ТНР отмечено высокое содержание p53 и высокая частота мутаций BRCA1 [8; 11]. Клинико-морфологическое исследование на материале 61 пациентки [12] выявило, что BCL2+ ассоциировано со старшим возрастом, постменопаузой, люминальным подтипом опухоли (особенно А), отсутствием гиперэкспрессии или амплификации гена HER2neu, низкой или средней степенью ее злокачественности. При этом средний возраст больных BCL2+ достоверно выше, чем больных BCL2- (62 года против 53). А вот экспрессия p53 (p53+), по данным литературы, наоборот, связана с негативными рецепторами эстрогенов, HER2neu+ и высокой степенью злокачественности опухоли [5]. Так, повышенная экспрессия Bcl-2 при РМЖ коррелирует с наличием

в опухоли рецепторов эстрогенов и прогестерона [7]. По мнению Callagy G. и соавторов, это объясняется положительной эстроген-рецептор-зависимой регуляцией экспрессии Bcl-2 [6]. Таким образом, данные литературы по частоте встречаемости и корреляции экспрессии BCL2 и p53 с молекулярно-биологическими подтипами РМЖ носят разрозненный характер и касаются в основном ТНР. Более того, результаты исследований часто мало сопоставимы, ввиду того, что принципы деления РМЖ на

подтипы менялись с течением времени (St. Gallen 2011; 2013).

Материалы и методы исследования

Была изучена экспрессия маркеров p53 и bcl-2 в клетках РМЖ 95 пациенток с различными молекулярно-биологическими подтипами с помощью иммуногистохимического метода. Иммуногистохимическое исследование проводили на срезах с парафиновых блоков опухолей, предназначенных для стандартного морфологического исследования. Используемые в работе первичные антитела и их разведения представлены в табл. 1.

Таблица 1

Панель использованных в исследовании антител

Специфичность	Клон	Фирма	Разведение	Буфер для «демаскировки антигенов»
Нормальный и мутантный тип p53	DO-7	DAKO	1:200	10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 9,0)
Bcl-2	Sp 66	DAKO	1:100	10 mM Tris, 1 mM EDTA (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 65°C, восстановление антигена в течение 20 минут при температуре 97°C и дальнейшее охлаждение до 65°C. Затем стекла промывались в течение 1–3 минут TBS-буфером (Dako) и помещались в автостейнер Thermo Scientific для окрашивания в автоматическом режиме. Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали систему детекции Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System. 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. В исследовании применяли следующие критерии оценки маркеров: 1) опухоль считали отрицательной по p53, если в ткани опухоли отсутствовала ядерная реакция с антителами или количество окрашенных клеток было менее 25%, и положительной по p53, если было окрашено более 25% ядер опухолевых клеток.

2) опухоль считали отрицательной по bcl-2, если в ткани опухоли отсутствовала цитоплазматическая реактивность с антителами или количество окрашенных клеток было менее 25%, и положительной по bcl-2, если было окрашено более 25% опухолевых клеток. Распределение больных по биологическим подтипам осуществлялось на основании рекомендаций Панели экспертов St.Gallen (2013) и практических рекомендаций RUSSCO (2013). Статистический анализ результатов исследования проводился с помощью программы STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., США) и MedCalc (версия 9.3.5.0).

Результаты исследования и их 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%). Данные по экспрессии p53 и bcl-2 представлены в табл. 2.

Таблица 2

Экспрессия p53 и bcl-2 у больных с различными молекулярно-биологическими подтипами РМЖ

	экспрессия p53	экспрессия bcl-2
Люминальный А (n = 26)	6 (23,1%)	26 (100%) ¹
Люминальный В (n = 33)	21 (63,6%)*	25 (75,8%)*
HER2neu+ (n = 15)	10 (66,7%)*	7 (46,7%)* ¹
ТНР (n = 21)	10 (47,6%)*	7 (33,3%)* ¹

Примечания:

* – различия достоверны в отношении люминального А подтипа РМЖ ($p \leq 0,05$)

¹ – различия достоверны в отношении люминального В подтипа ($p \leq 0,05$)

Проведенное исследование выявило, что практически одинаково часто гиперэкспрессия p53 наблюдалась при люминаль-

ном В и Her2neu+ подтипах РМЖ и несколько снижается при ТНР. Накопление p53 при люминальном А – подтипе встреча-

лось в 2 раза реже, чем при ТНР, и в 2,5 раза и 2,7 раза реже, чем при люминальном В и Her2neu+ РМЖ, соответственно. При этом степень ядерной реакции с антителами p53 в ткани опухоли и количество окрашенных клеток отличались. Так, при люминальном А – подтипе клетки стромы опухоли и инфильтрирующие опухоль лимфоциты вообще не окрашивались антителами к p53. Разброс количества окрашенных клеток при данном подтипе находился в пределах от полного отсутствия окрашивания ядер опухолевых клеток до 30%. Такая же интенсивность окрашивания опухолевых клеток была и при ТНР. А вот при люминальном В разброс клеток по экспрессии данного маркера находился в пределах от 50% ядер опухолевых клеток до 90%, в среднем составив $76,8 \pm 7,7\%$. При Her2neu+ РМЖ отмечалась разнообразная картина. У половины больных процент позитивных клеток превысил уровень «cut-off», но не вышел за пределы 30%. У другой половины практически все опухолевые клетки имели ядерное окрашивание антителами к p53. В каждом из исследованных случаев отмечалось положительное окрашивание антителами к bcl-2 инфильтрирующей опухоль лимфоцитов, что являлось для нас внутренним положительным контролем. Среднее содержание опухолевых клеток, положительных по экспрессии bcl-2, в опухолях с люминальным А – подтипом составило $83,5 \pm 8,4\%$, где разброс находился в пределах от 60% до 95%. При люминальном В подтипе среднее содержание bcl-2 положительных опухолевых клеток составило $74,5 \pm 3,7\%$, где разброс находился от 60% до 85% клеток. При Her2neu+ РМЖ количество опухолевых клеток было существенно меньше, по сравнению с люминальными подтипами, и не превысило 30%. При ТНР отмечалась такая же разнородная картина, как и при изучении ядерного окрашивания антителами к p53. У половины больных количество опухолевых клеток, окрашенных антителами к bcl-2, не превышало 30%, у оставшихся больных в среднем составило 70%. Обнаружены некоторые различия и в интенсивности окрашивания цитоплазмы опухолевых клеток в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ. Так, при люминальном А – подтипе, как правило, цитоплазма имела яркую или среднюю интенсивность окрашивания, при люминальном В – подтипе у 17 из 25 позитивных случаев имели среднюю интенсивность окрашивания, у 4 – слабую и у 4 – цитоплазма была ярко окрашена антителами к bcl-2. При Her2neu+ РМЖ цитоплазма имела слабую интенсивность окрашивания, при ТНР одинаково часто была отмечена интен-

сивность окрашивания слабая и средняя. Таким образом, проведенное исследование экспрессии bcl-2 выявило закономерность снижения частоты позитивных случаев окрашивания цитоплазмы опухолевых клеток с изменением рецепторного статуса опухоли, а именно, снижение в несколько раз числа позитивных случаев при ТНР и Her2neu+ подтипах РМЖ.

Рассмотрев соотношение числа положительных случаев по экспрессии p53 к случаям положительной экспрессии bcl-2, выявлено, что наименьшее соотношение (0,25) отмечено при люминальном А молекулярном подтипе, когда при повышении доли опухолей положительных по экспрессии bcl-2 отмечено снижение числа опухолей, позитивно окрашенных антителами к p53. Несколько выше этот показатель отмечен при ТНР и люминальном В – подтипе, составив 0,6 и 0,83 соответственно. Обратная зависимость наблюдалась при Her2+ РМЖ, составив 2, где отмечено преобладание доли опухолей, позитивных по экспрессии p53 над bcl-2+.

Заключение

Таким образом, проведенное исследование подтвердило различие в уровне экспрессии рецепторов белков, участвующих в процессе апоптоза: p53 и BCL-2. Полученные результаты в большинстве своем не противоречат данным литературы. Однако, по нашим данным, уровень экспрессии p53 при люминальных подтипах различен. Если при люминальном А – подтипе он традиционно низкий, то при люминальном В – подтипе, наоборот, высокий и сравним с таковым в гормон-негативных опухолях. На наш взгляд, это объясняется прежде всего неоднородностью люминального В – подтипа. И высокий уровень экспрессии p53 при нем обеспечивается за счет гормон-позитивных опухолей, ассоциированных с гиперэкспрессией или мутацией Her2neu. Скорее всего, именно Her2neu+ статус опухоли наиболее сильно коррелирует с высоким уровнем экспрессии p53, что объясняет его снижение при ТНР. Этот же факт неоднородности люминального В – подтипа объясняет и достоверное снижение экспрессии bcl-2 в люминальных В – опухолях по сравнению с люминальным А – подтипом. Таким образом, полученные результаты предполагают дальнейшие исследования в этом направлении, с целью выявить более специфические различия в молекулярном портрете РМЖ.

Список литературы

1. Кулигина Е.Ш. Эпидемиологические и молекулярные аспекты рака молочной железы//Практическая онкология, 2010, Т11 (4): 204–216.

2. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., Манихас А.Г. Рак молочной железы: химиотерапия и таргетная терапия. Москва 2012. – 359 с.
3. Семиглазов В.Ф. Новые подходы к лечению рака молочной железы. Вопросы онкологии 2013. Т59 (3). – С. 288–291.
4. Abdel-Fatah T.M., Perry C., Dickinson P., Ball G., Moseley P., Madhusudan S., Ellis I.O., Chan S.Y. Bcl2 is an independent prognostic marker of triple negative breast cancer (TNBC) and predicts response to anthracycline combination (ATC) chemotherapy (CT) in adjuvant and neoadjuvant settings. *Annals of Oncology* 2013 Nov; 24(11):2801-7. doi: 10.1093/annonc/mdt277. Epub 2013 Aug 1.
5. Ivana Bozovic-Spasojevic, Lieveke Ameye, Marianne Paesmans, Denis Larsimont, Angelo Di Leo, Stella Dolci, Martine Piccart, Evandro de Azambuja, and Sherene Loi. Prognostic, predictive abilities and concordance of BCL2 and TP53 protein expression in primary breast cancers and axillary lymph-nodes: A retrospective analysis of the Belgian three arm study evaluating anthracycline vs CMF adjuvant chemotherapy. *Breast, The*, 2014-08-01, Volume 23, Issue 4, pp. 473–481.
6. Callagy G.M., Pharoah P.D., Pinder S.E., Hsu F.D., Nielsen T.O., Ragaz J., Ellis I.O., Huntsman D., Caldas C. Bcl-2 Is a prognostic marker in breast cancer independently of the nottingham prognostic index. *Clinical Cancer Research* 2006; 12 (8): 2468–75.
7. Dawson S.J., Makretsov N., Blows F.M., Driver K.E., Provenzano E., Le Quesne J., Baglietto L., Severi G., Giles G.G., McLean C.A., Callagy G., Green A.R., Ellis I., Gelmon K., Turashvili G., Leung S., Aparicio S., Huntsman D., Caldas C., Pharoah P. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *British Journal of Cancer*. 2010; 103 (5): 668–75.
8. Foulkes W.D., Stefansson I.M., Chappuis P.O., Bégin L.R., Goffin J.R., Wong N., Trudel M., Akslen L.A. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 95, no. 19, pp. 1482–1485, 2003.
9. Hwang K.T., Woo J.W., Shin H.C., Kim H.S., Ahn S.K., Moon H.G., Han W., Park I.A., Noh D.Y. Prognostic influence of BCL2 expression in breast cancer. *International Journal of Cancer – Oct 2012*; 131(7); E1109–19.
10. Kallel-Bayouthe I., Hassen H.B., Khabir A., Boujelbene N., Daoud J., Frikha M., Sallemi-Boudawara T., Aifa S., Rebaï A. Bcl-2 expression and triple negative profile in breast carcinoma. *Medical Oncology*. – Dec 2011; 28 Suppl 1(0); pp. 55–61.
11. J. Rhee, S. Han, D. Oh, J.H. Kim, S. Im, W. Han, I.A. Park, Dong-Young Noh, Yung-Jue Bang and Tae-You Kim. The clinicopathologic characteristics and prognostic significance of triple-negativity in node-negative breast cancer [serial online]. *BMC Cancer*. 2008; 8: 307.
12. Zaha D.C., Lazăr E. Molecular characterization of apoptosis by the immunohistochemical evaluation of Bcl-2 in breast cancer. *Romanian Journal of Morphology and Embryology – 2012*; 53(1); 155–60.
3. Semiglazov V.F. Novye podhody k lecheniju raka molochnoj zhelezy. *Voprosy onkologii* 2013. Т59 (3): 288–291.
4. Abdel-Fatah T.M., Perry C., Dickinson P., Ball G., Moseley P., Madhusudan S., Ellis I.O., Chan S.Y. Bcl2 is an independent prognostic marker of triple negative breast cancer (TNBC) and predicts response to anthracycline combination (ATC) chemotherapy (CT) in adjuvant and neoadjuvant settings. *Annals of Oncology* 2013 Nov; 24(11):2801-7. doi: 10.1093/annonc/mdt277. Epub 2013 Aug 1.
5. Ivana Bozovic-Spasojevic, Lieveke Ameye, Marianne Paesmans, Denis Larsimont, Angelo Di Leo, Stella Dolci, Martine Piccart, Evandro de Azambuja, and Sherene Loi. Prognostic, predictive abilities and concordance of BCL2 and TP53 protein expression in primary breast cancers and axillary lymph-nodes: A retrospective analysis of the Belgian three arm study evaluating anthracycline vs CMF adjuvant chemotherapy. *Breast, The*, 2014-08-01, Volume 23, Issue 4, pp. 473–481.
6. Callagy G.M., Pharoah P.D., Pinder S.E., Hsu F.D., Nielsen T.O., Ragaz J., Ellis I.O., Huntsman D., Caldas C. Bcl-2 Is a prognostic marker in breast cancer independently of the nottingham prognostic index. *Clinical Cancer Research* 2006; 12 (8): 2468–75.
7. Dawson S.J., Makretsov N., Blows F.M., Driver K.E., Provenzano E., Le Quesne J., Baglietto L., Severi G., Giles G.G., McLean C.A., Callagy G., Green A.R., Ellis I., Gelmon K., Turashvili G., Leung S., Aparicio S., Huntsman D., Caldas C., Pharoah P. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *British Journal of Cancer*. 2010; 103 (5): 668–75.
8. Foulkes W.D., Stefansson I.M., Chappuis P.O., Bégin L.R., Goffin J.R., Wong N., Trudel M., Akslen L.A. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 95, no. 19, pp. 1482–1485, 2003.
9. Hwang K.T., Woo J.W., Shin H.C., Kim H.S., Ahn S.K., Moon H.G., Han W., Park I.A., Noh D.Y. Prognostic influence of BCL2 expression in breast cancer. *International Journal of Cancer – Oct 2012*; 131(7); E1109–19.
10. Kallel-Bayouthe I., Hassen H.B., Khabir A., Boujelbene N., Daoud J., Frikha M., Sallemi-Boudawara T., Aifa S., Rebaï A. Bcl-2 expression and triple negative profile in breast carcinoma. *Medical Oncology*. – Dec 2011; 28 Suppl 1(0); pp. 55–61.
11. J. Rhee, S. Han, D. Oh, J.H. Kim, S. Im, W. Han, I.A. Park, Dong-Young Noh, Yung-Jue Bang and Tae-You Kim. The clinicopathologic characteristics and prognostic significance of triple-negativity in node-negative breast cancer [serial online]. *BMC Cancer*. 2008; 8: 307.
12. Zaha D.C., Lazăr E. Molecular characterization of apoptosis by the immunohistochemical evaluation of Bcl-2 in breast cancer. *Romanian Journal of Morphology and Embryology – 2012*; 53(1); 155–60.

References

1. Kuligina E.Sh. Jepidemiologicheskie i molekulyarnye aspekty raka molochnoj zhelezy//Prakticheskaja onkologija, 2010; Т11(4): 204–216.
2. Semiglazov V.F. Semiglazov V.V., Manihas A.G. Rak molochnoj zhelezy: himioterapija i targentnaja terapija. [Breast cancer: chemotherapy and target therapy], Moscow 2012. 359 p.

Рецензенты:

Ващенко Л.Н., д.м.н., профессор, руководитель отделения опухолей мягких тканей и костей, ФГБУ «РНИОИ», г. Ростов-на-Дону;

Шихлярова А.И., д.б.н., профессор, главный научный сотрудник Южного научного центра РАН, г. Ростов-на-Дону.

Работа поступила в редакцию 05.08.2014.