

Клиническое значение p53 и показателей ДНК-проточной цитофлуориметрии в сочетании с клиничко-морфологическими факторами прогноза при раке молочной железы

Л.К. Цой, В.Н. Богатырев, В.П. Летягин, Я.В. Вишневская, А.М. Платова

ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контакты: Лина Константиновна Цой linatsoy@yandex.ru

Определение мутантного типа p53 и основные показатели, исследуемые при помощи ДНК-проточной цитофлуориметрии вкупе с другими клиническими и морфологическими факторами прогноза, могут быть использованы в качестве дополнительных прогностических критериев индивидуально у каждой больной раком молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, ДНК-проточная цитофлуориметрия, факторы прогноза, ранние формы рака молочной железы, p53 мутантного типа

The clinical value of p53 and the parameters of DNA-flow cytofluorometry in combination with clinical and morphological predictors in breast cancer

L.K. Tsoi, V.N. Bogatyrev, V.P. Letyagin, Ya.V. Vishnevskaya, A.M. Platova

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The determination of mutant p53 and the basic parameters studied by DNA-flow cytofluorometry in combination with other clinical and morphological predictors may be used as additional prognostic criteria individually in each patient with breast cancer.

Key words: breast cancer, DNA-flow cytofluorometry, prognostic factors, early forms of breast cancer, mutant p53

Введение

Несмотря на большой прогресс, достигнутый в диагностике и лечении рака молочной железы (РМЖ) за последние десятилетия, рак данной локализации остается одной из основных причин смерти женщин, больных злокачественными новообразованиями (ЗН).

Статистика ЗН свидетельствует о приросте заболеваемости РМЖ в России за последние годы более чем на 8,9%, а смертности — около 3%.

Улучшения сложившейся ситуации можно добиться за счет совершенствования ранней диагностики, внедрения программ скрининга, оптимизации лечебных подходов. В связи с этим немаловажным является поиск новых биологических маркеров, позволяющих максимально индивидуализировать первичную терапию [1–4].

В качестве прогностических факторов при РМЖ используются как клинические показатели — возраст, стадия, морфологическая градация и степень злокачественности опухоли, — так и молекулярно-биологические характеристики — рецепторный

статус, наличие гиперэкспрессии Her-2/neu, p53 и параметры ДНК-проточной цитофлуориметрии (ДНК-ПЦ) [5–7].

Большим преимуществом метода ДНК-ПЦ является полное воспроизведение результатов исследования и объективная оценка сразу нескольких индивидуальных характеристик клеток опухоли, отражающих степень ее злокачественности (плоидность, индекс ДНК, количество анеуплоидных клеток в опухоли, число клеток в фазах клеточного цикла G_{0-1} , S, G_{2+M} и индекс пролиферации) [8–10].

Материалы и методы

Наше исследование включало 65 больных I и II стадий, получавших лечение в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в период с 1998 по 2002 г. Средний возраст пациенток составил $53,9 \pm 12,5$ года (21–78 лет).

У 26 (43,3%) больных диагностирована I, у 34 (56,7%) — II стадии заболевания.

Исследование ДНК-ПЦ проводилось на лазерном проточном цитофлуориметре EPICS-XL («Coulter», США). Полученные данные проанализированы с помощью программы MultiCycle («Phoenix

Flow Systems», США), описывающей ploидность и число опухолевых клеток в каждой фазе клеточного цикла.

В исследование включены следующие гистологические варианты опухолей молочных желез: протоковый инфильтрирующий рак (ПИР) — 29 (48,3%) больных, дольковый инфильтрирующий рак (ДИР) — 19 (31,7%), медуллярный и тубулярный рак — по 4 (6,7%) случая соответственно, слизистый и метapластический — по 2 (3,3%) наблюдения.

При анализе степени злокачественности получены следующие результаты: III степень злокачественности наиболее распространена при IIa стадии, а I — при стадии T1N0M0, при этом II степень злокачественности встречалась одинаково часто. При инфильтративно-протоковом морфологическом варианте РМЖ III степень злокачественности наблюдается чаще, чем при других гистологических его формах. Также для ПИР наиболее характерен статус, отрицательный по рецепторам эстрогена (РЭ⁻) и прогестерона (РП⁻), а для ДИР, наоборот, положительный — РЭ⁺/РП⁺. Гиперэкспрессия Her-2/neu 2+/3+ чаще отмечалась при ПИР, чем при ДИР. В случае редкого морфологического варианта опухоли гиперэкспрессии Her-2/neu не наблюдалось.

Исследование морфологического материала пациенток с использованием метода лазерной ДНК-ПЦ позволило определить, что у 2 из 60 больных РМЖ опухолевые клетки содержали диплоидный набор хромосом. В остальных 58 (96,7%) случаях опухоли были анеуплоидными. До 40% анеуплоидных клеток содержалось в 6 (10,3%) исследуемых опухолях, от 41 до 60% — в 33 (56,9%) и от 61% и выше — в 19 (32,8%). Таким образом, установлено, что при анеуплоидных опухолях преобладают значения от 40 до 70% (в среднем 61% анеуплоидных клеток в ткани новообразования).

В группе анеуплоидных опухолей ПИР зафиксирован в 28 (48,3%), ДИР — в 19 (32,7%), а редкие формы РМЖ — всего в 11 (19%) случаях. Из них I степень злокачественности имели 12 (20,7%) образцов, II — 24 (41,4%) и III — 22 (37,9%). Отсутствие локорегиональных метастазов отмечалось в 49 (84,5%) клинических наблюдениях, у 4 (6,9%) пациенток был поражен 1 лимфатический узел (ЛУ), столько же больных имели поражение 2 ЛУ и у 1 (1,7%) пациентки были зафиксированы метастазы в 3 ЛУ.

При определении влияния клеточного состава опухоли на продолжительность жизни больных выявлены следующие закономерности: число анеуплоидных клеток значимо влияет на общую — ОВ ($p=0,009$) и безрецидивную — БРВ ($p=0,05$) выживаемость. При содержании в опухоли >60% анеуплоидных клеток наблюдалось значимое снижение

3- и 5-летней ОВ ($57,9 \pm 11,3$ и $52,6 \pm 11,5\%$ соответственно) и БРВ ($47,4 \pm 11,5$ и $47,4 \pm 11,5\%$). Следующим оцениваемым критерием был ген-супрессор опухолевого роста (p53-mut), являющийся основным регулятором программируемой клеточной гибели. Однако в результате приобретенных мутаций продуцируемая уже мутантная форма белка p53 не может выполнять положенных для нее функций, и процесс размножения опухолевых клеток приобретает хаотичный, неуправляемый характер [11–13].

При оценке корреляции искомого параметра с известными факторами прогноза обнаружен ряд закономерностей. Определение экспрессии мутантной формы белка p53 выполнено у 60 больных РМЖ, из них у 30 (50%) пациенток отмечена положительная иммуноцитохимическая реакция. Уровень экспрессии, соответствующий (+), имел место в 19 (63,3%) клинических случаях, (++) — в 6 (20%), (+++) — в 5 (16,7%). В зависимости от степени распространенности процесса уровень экспрессии p53 возрастал. Так, при I стадии уровень экспрессии (+) зарегистрирован у 5 (50%), при II — у 3 (30%), при III — у 2 (20%) пациенток. При IIa стадии уровень экспрессии (+) составил уже 14 (70%) случаев, (++) и (+++) — по 3 (15%) наблюдения. Следует отметить, что если полученные значения по умеренному (++) и высокому (+++) уровню при обеих стадиях фактически совпадали, то доля низкого (+) уровня экспрессии при стадии IIa оказалась несколько выше — 14 (41,2%) случаев, а отсутствие экспрессии было более характерным для I стадии — 16 (61,5%) наблюдений.

Корреляции между экспрессией p53 мутантного типа и возрастом больных в проведенном исследовании не обнаружено.

Тем не менее существует зависимость между экспрессией p53-mut и различными морфологическими типами опухоли. Так, только при ПИР встречаются средний (++) и высокий (+++) уровни экспрессии p53-mut — 37,9% случаев. Что касается других морфологических форм, то для них наиболее характерно отсутствие экспрессии исследуемого маркера: ДИР (-) — 16 (84,2%) и редкие формы рака — (-) — 7 (58,3%) клинических случаев (см. таблицу).

Также выявлена корреляция между степенью злокачественности и экспрессией p53-mut. При отрицательной экспрессии наиболее характерна I степень злокачественности — 10 (76,9%) случаев, а при умеренном и высоком ее уровне — III степень — 8 (36,4%) наблюдений.

Экспрессия p53-mut коррелирует с количественными параметрами клеток опухолей молочных желез, определяемых с помощью метода лазерной ДНК-ПЦ. При уровне экспрессии с содержанием анеуплоидных клеток в опухоли >61% доля 3Н, экс-

Распределение больных по уровню экспрессии p53-mut в зависимости от гистологического типа рака

Гистологический тип	Уровень экспрессии p53-mut		
	—	+	++/+++
ПИР (n=29)	7 (24,1)	11 (37,9)	11 (37,9)
ДИР (n=19)	16 (84,2)	3 (15,8)	0
Редкие формы рака (n=12)	7 (58,3)	5 (41,7)	0

Примечание. Представлено число больных, в скобках — процент.

прессорирующих p53-mut, выше, чем при отсутствии экспрессии — 12 (63,2%) против 7 (36,2%) соответственно.

При низком уровне экспрессии p53 индекс ДНК значимо ниже ($1,3 \pm 0,43$; $p=0,036$), чем при среднем или высоком ее уровне ($1,51 \pm 0,33$; $p=0,145$) либо в случае ее отсутствия ($1,54 \pm 0,24$). При этом индекс ДНК при отсутствии экспрессии и при среднем или высоком ее уровне значимо не различается ($p=0,965$).

При числе клеток в фазе $G_{0-1} < 80\%$ положительная экспрессия p53-mut встречается значительно чаще — у 20 (64,5%) больных ($p=0,038$). В связи с этим можно предположить наличие отрицательной корреляционной связи между числом клеток в фазе G_{0-1} и уровнем экспрессии p53, которое подтверждается при проведении корреляционного анализа ($rs=-0,372$, $p=0,003$), где rs — коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

При содержании в S-фазе $>15\%$ клеток положительная экспрессия p53-mut встречается намного чаще — 12 (70,6%) случаев ($p=0,045$). Скорее всего, существует взаимосвязь между числом клеток в S-фазе и уровнем экспрессии p53-mut, что под-

тверждается данными корреляционного анализа ($rs=0,3$, $p=0,02$).

При числе клеток в фазе $G_{2+M} \geq 9\%$ положительная экспрессия p53 наблюдается значимо чаще — у 18 (69,2%) больных ($p=0,009$). Также следует предположить наличие корреляционной связи между числом клеток в фазе G_{2+M} с уровнем экспрессии p53-mut, что также подтверждается при проведении корреляционного анализа ($p=0,343$ и $0,007$).

При индексе пролиферации $>20\%$ положительная экспрессия p53-mut встречается в 21 (65,6%) случае ($p=0,01$). Это также свидетельствует о наличии корреляционной связи между индексом пролиферации и уровнем экспрессии p53-mut, что снова подтверждается результатами корреляционного анализа ($rs=0,374$, $p=0,003$).

Заключение

На основании приведенных данных можно сделать заключение о том, что экспрессия p53 мутантного типа в опухолях больных РМЖ является неблагоприятным фактором прогноза. Уровень экспрессии p53 достоверно влияет на 3- и 5-летнюю ОВ (0,029) и БРВ (0,039) пациенток. При отсутствии экспрессии данного фактора (-) 3-летняя ОВ составляет $93,1 \pm 4,7$, а 5-летняя — $87,6 \pm 6,9\%$; 3-летняя БРВ — $86,2 \pm 6,4$, а 5-летняя — $74,6 \pm 8,4\%$. С увеличением экспрессии p53 продолжительность жизни больных достоверно снижается: 3- и 5-летняя ОВ составляет $63,6 \pm 14,5$, а БРВ — $45,5 \pm 15\%$.

Таким образом, включение p53-mut наравне с критериями ДНК-ПЦ позволит значительно индивидуализировать панель прогностических факторов для каждого конкретного случая. Это, в свою очередь, может иметь решающее значение при коррекции лечебной программы с гарантией увеличения продолжительности жизни леченных больных.

ЛИТЕРАТУРА

- Аксель Е.М., Давыдов М.И. Статистика злокачественных новообразований молочных желез. В сб.: Лекции по маммологии. М.: МЕДпресс-информ, 2009. с. 9–16.
- Божок А.А., Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В. и др. Факторы прогноза при раке молочной железы. СПб., 2006. www.RosOncoWeb
- Боядзис М.М., Лубоуиц П.Ф., Фрейм Д.Н. Краткое руководство по лечению опухолевых заболеваний. М.: Практическая медицина, 2009. с. 325–93.
- Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2006. Вестн РОНЦ им. Н.Н. Блохина 2008;19:52–70.
- Kelloff G.J., Lippman S.M., Danneberg A.J. et al. Progress in chemoprevention drug development: The promise of molecular biomarkers for prevention of intraepithelial neoplasia and cancer — a plan to move forward. Clin Cancer Res 2006; 12(12):3661–1697.
- Lombardo J.F. Molecular prediction of recurrence of breast cancer (author reply). N Engl J Med 2005;353:1300.
- Paik S., Bryant J., Tan-Chiu E. et al. Real-world performance of Her-2 testing — national surgical adjuvant breast and bowel project experience. J Natl Cancer Inst 2002;94:852–4.
- Чен У.И., Уордли Э. Рак молочной железы. Рид Элсивер, 2009. с. 89–103.
- Page D.L., Gray R., Allred D.C. et al. Prediction of node-negative breast cancer outcome by histologic grading and S-phase analysis by flow cytometry: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (2192). Am J Clin Oncol 2001;24:10–8.
- Skliris G., Parkes A., Limer J. et al. Evaluation of seven oestrogen receptor b antibodies for immunohistochemistry, western blotting and flow cytometry in human breast tissue. J Pathol 2002;197:155–62.
- Летягин В.П. Опухоли молочных желез. М.: Практическая медицина, 2007. с. 87–91.
- Hayes D.F. Tumor markers for breast cancer. Ann Oncol 2003;4:807–19.
- Van den Brandt P.A., Spiegelman D., Yann S.S. et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. Am J Epidemiol 2000;152 (6): 514–27.