

УДК 618.19-006.6-085:616-087:612.621.31+577.2

ДІАГНОСТИЧНА ЗНАЧИМІСТЬ ТКАНИННИХ МАРКЕРІВ РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ

Конар Р.С., Русин В.І., Русин А.В., Рішко М.Ф., Козодаєва М.П.

Закарпатський обласний клінічний диспансер, Ужгородський національний університет, кафедра госпітальної хірургії, м.Ужгород

РЕЗЮМЕ: в представленій статті висвітлюється практична важливість молекулярних методів діагностики раку грудної залози. Розглянуто ті молекулярні маркери, ефективність і корисність яких мають досить високий рівень доказовості, а саме: рецептори стероїдних гормонів, оцінка експресії HER2/neu, фактор росту ендотелію судин, S-фази і плоїдність. Кожен з тканинних (біологічних) маркерів РГЗ є важливим прогностичним фактором, який визначає можливу відповідь на лікування.

Ключові слова: рак грудної залози, молекулярні маркери, рецептори стероїдних гормонів, прогноз

Завдяки успіхам біохімії, молекулярній біології і біотехнології, в даний час в арсеналі дослідників і клініцистів є величезна кількість біологічно значимих показників, що можуть допомогти в прогнозі раннього раку грудної залози (РГЗ) і виборі ад'ювантної терапії при розповсюдженному процесі. Тканинні маркери визначаються безпосередньо в пухлинній тканині і характеризують індивідуальні особливості пухлини, специфіку її «поведінки» і регуляції. Кількість показників, що розглядаються в якості потенційних біомаркерів постійно зростає, що вказує на швидкий прогрес в галузі вивчення механізмів регуляції проліферації і диференціювання пухлинних клітин [1]. При РГЗ визначення будь-якого молекулярного маркера може переслідувати два практичні завдання. По-перше, виявлення групи ризику, що вимагає додаткового лікування чи більш ретельного спостереження, серед хворих з ранніми стадіями, не підлягаючих ад'ювантній терапії по клінічних і інших лабораторних показниках. По-друге, оцінка чутливості до визначених видів терапії та індивідуалізація схем ад'ювантного лікування хворих із розповсюдженим процесом [2]. Ще одним аспектом практичного використання результатів вивчення молекулярно-біологічних характеристик РГЗ може бути розробка нових препаратів, які цілеспрямовано діють на досліджувані білки (чи гени) і блокують регульовані ними процеси.

Одним із перших показників, що увійшли в практику лікування РГЗ, які відносяться до категорії біологічних маркерів, були рецептори стероїдних гормонів. Впровадження в клінічну практику методів визначення рецепторів естрогенів і прогестерону дало можливість виявити пухлини, чутливі до ендокринної терапії. Ця ідея була висловлена ще наприкінці 60 років. Відповідно, при рецептор-позитивних пухлинах призначається ендокринне лікування, а при рецептор-негативних – хіміо- чи хіміопроменеве лікування. Рецептори гормонів являють собою білки, що специфічно і вибірково з'єднують відповідні стероїди після їхнього проникнення в клітину [5]. Спочатку звернули увагу на рецептори естрогенів (RE), трохи пізніше стали визначати також рецептори прогестерону (RP). Присутність RE в первинній пухлині грудної залози свідчить про її потенційну чутливість до ліку-

вальних заходів, спрямованих на видалення джерела естрогенів з організму чи на протидію їхнім ефектам. RP становить інтерес як молекулярний маркер РГЗ не тільки тому, що він є першою необхідною ланкою реакції клітини на прогестини і визначає її чутливість до відповідних препаратів, але і тому, що його синтез у клітинах РГЗ індукується естрогенами [10]. Таким чином, наявність RP може свідчити про те, що RE, принаймні частково, функціонально активні. Ад'ювантна гормонотерапія найбільш ефективна у хворих РГЗ із позитивним рецепторним статусом: її ефективність складає близько 10% при RE-негативних пухлинах, приблизно 50% — при RE-позитивних пухлинах. Хворі на РГЗ з RE+/RP+-пухлинами характеризуються 65-70% вірогідності відповіді на гормонотерапію [4, 5]. Клітини пухлини, у яких відсутні рецептори стероїдних гормонів, не можуть підпадати під вплив гормонів, що циркулюють в організмі. Відомо також, що пухлини грудної залози, що містять обидва чи хоча б один з рецепторів стероїдних гормонів, мають більш сприятливе протікання і післяопераційний прогноз у хворих з такими пухлинами, ніж у хворих з рецептор негативними пухлинами. Однак розходження у виживанні є не дуже великими, тому найбільш важливим в практичному відношенні є використання результатів визначення RE і RP у відборі хворих, чутливих до ендокринної терапії. Згідно з літературними даними, близько 75% РГЗ є естрогено-позитивними (EP+). З 65% естрогено-позитивних пухлин грудної залози мають також позитивні рецептори до прогестерону (PR+, RE+). Серед пухлин грудної залози 25% не містять рецепторів до естрогену або їхній статус не відомий, і тільки близько 5% хворих на РГЗ мають RE+, RP+ [8]. 60 % пухлин, позитивних по рецепторах естрогенів, відповідає на гормонотерапію на протигагу до негативної групи. Ще більшу увагу при виборі методу лікування варто приділяти рецепторам прогестерону. Їхня присутність у пухлині є найбільш значимим критерієм її гормон чутливості. Хворим з такими пухлинами безумовно показана ендокринна терапія. Визначення рецепторів стероїдних гормонів у пухлині грудної залози дозволяє не тільки вибрати метод лікування, але також деякою мірою скласти прогноз захворювання як при первинному, так і при

метастатичному раку грудної залози. Так, не ліковані пацієнти з первиннодіагностованим раком грудної залози і негативними рецепторами естрогенів мають більш високий ризик рецидиву в порівнянні з пацієнтами в аналогічній стадії захворювання з позитивними рецепторами естрогену. Те ж саме стосується і хворих, пухлини яких містять рецептори прогестерону – виживаність без рецидивів і метастазів у них вірогідно вище, ніж у пацієнтів з пухлинами, негативними по рецепторах прогестерону. Для хворих у менопаузі велике значення мають рецептори прогестерону. Такі хворі мають найбільші показники 10-літньої без рецидивної виживаності в порівнянні з тими, пухлини яких є негативними по рецепторах прогестерону чи позитивні по естрогенним рецепторам. Для хворих, що знаходяться в репродуктивному віці наявність рецепторів прогестерону є менш вагомою, ніж для хворих у менопаузі, а більш значимим є наявність рецепторів естрогенів [2, 10].

Таким чином, визначення рецепторів стероїдних гормонів використовується в якості тканинних маркерів, що грають важливу роль у прогнозуванні гормон-чутливості і трохи меншу роль у прогнозі протікання захворювання. В даний час у різних клініках і лабораторіях використовуються 3 відносно рівнозначні методи визначення рецепторного статусу РГЗ. Радіолигандний, імуноферментний, імуногістохімічний (ІГХ). Перевагою перших 2 методів є їхній кількісний характер, що дозволяє об'єктивізувати критерії оцінки рецепторного статусу. Радіолигандний метод дозволяє також оцінити і функціональну активність рецептора на одній з перших стадій його взаємодії з гормоном, що робить прогноз гормоночутливості більш надійним, ніж при визначенні імунореактивних білків. З іншого боку, ІГХ метод, хоча й носить відносно суб'єктивний напівкількісний характер, має важливу позитивну якість. Вона полягає в тому, що при фарбуванні зрізів можна чітко визначити приналежність рецепторів саме пухлинним клітинам, що практично неможливо при використанні біохімічних методів [1, 4]. Крім того, цей метод дозволяє працювати з архівним матеріалом — парафіновими блоками і навіть готовими стеклами, що робить його єдиною можливим варіантом у випадках, коли необхідність дослідження рецепторів стероїдних гормонів виникла чи була усвідомлена через тривалий час після операції. Збіг результатів визначення рецепторного статусу РГЗ усіма 3 методами складає в середньому 80—85%. На сьогодні в якості альтернативи ІГХ-методу все більший практичний інтерес набуває метод визначення експресії молекулярних маркерів на клітинному рівні — імуноцитохімічний (ІЦХ). Той факт, що пункцій на біопсія є більш простою та малотравматичною процедурою, практично не супроводжується ускладненнями та дозволяє отримати достатню кількість матеріалу для ІЦХ-дослідження, свідчить про перевагу ІЦХ. До того ж, ІЦХ не пот-

ребує значних затрат часу, виконується в межах 2-3 годин [1].

Однак, призначаючи ендокринну терапію хворим, пухлини яких містять прогестеронові й естрогенові рецептори, клініцистам необхідно пам'ятати, що в ряді випадків навіть наявність у пухлинних клітинах цих рецепторів необов'язково свідчить про чутливість пухлини до гормонотерапії. Оскільки резистентність до ендокринної терапії може спостерігатися з самого початку навіть у RE- і RP-позитивних пухлин чи розвинути пізніше в міру прогресування хвороби, рецепторний статус виявився необхідним, але не завжди достатнім показником гормоно-чутливості РГЗ. У зв'язку з цим постійно ведеться пошук додаткових критеріїв, що характеризують їхню функціональну активність і вплив інших регуляторних факторів на біологічну поведінку РГЗ. До числа найважливіших регуляторів подібного типу відносять поліпептидні фактори, що продукуються пухлинними клітинами й іншими компонентами пухлинної тканини (фібробластами, макрофагами і лімфоцитами, ендотеліоцитами), які стимулюють ріст клітин-продуцентів (аутокринний механізм) чи сусідніх клітин (паракринний механізм). Багатьма дослідниками, було показано, що наявність у пухлині грудної залози рецепторів епідермального фактора росту (РЕФР), особливо при відсутності рецепторів стероїдних гормонів, свідчить про несприятливий прогноз захворювання навіть на ранніх стадіях і про резистентність до ендокринної терапії. Проте через неоднозначність результатів, отриманих різними дослідниками, жоден з показників, що характеризує чутливість РГЗ до ауто/паракринних регуляторів, не ввійшов поки в рутинну клінічну практику. Однак можна чекати, що найближчим часом інтерес до дослідження РЕФР при РГЗ знову зросте в зв'язку з тим, що на стадію клінічних випробувань вийшли препарати, що специфічно впливають на РЕФР, — моноклональні антитіла до рецептора (цетуксимаб) [2].

Певний прорив в області практичного використання маркерів, зв'язаних з РЕФР-залежною регуляцією росту РГЗ, відбувся після появи герцептину, що представляє собою гуманізовані антитіла до HER2/neu — одному з тирозинкіназних рецепторів сімейства C-erbB-2, до якого належить і РЕФР. Це одна з найважливіших систем передачі мітогенного сигналу в клітині [8]. Гіперекспресію c-erbB-2 (Her2/neu) отримують у 20-30% хворих на РГЗ. Підвищений рівень онкобілка характеризує неблагоприємне протікання захворювання і є поганою прогностичною ознакою при локальному, місцевопоширеному та метастатичному РГЗ. Активація онкогена, що детермінує білок c-erbB-2 (Her2/neu), вказує на неблагоприємні ознаки РГЗ *in situ* і свідчить про низький ступінь диференціації пухлинних клітин. Отже, при гіперекспресії c-erbB-2 (Her2/neu) показано призначення трастузумабу. У хворих на РГЗ при поєднанні негативно-

го рецепторного статусу з гіперекспресією c-erbB-2 (Her2/neu) відзначають резистентність до стандартних схем хіміотерапії, а також променевої терапії [4, 7, 9]. Блокування HER2/neu може істотно сповільнити чи зупинити ріст пухлин, залежних від подібних стимулів, однак ефективне використання біологічно активних препаратів передбачає попередню оцінку індивідуальної чутливості хворих до даного виду лікування. При застосуванні герцептину загальноприйнятим і найбільш адекватним методом оцінки чутливості є використання імуногістохімічного (ІГХ) фарбування пухлинних тканин на білок HER2/neu з наступною оцінкою ампліфікації гена c-erbB-2 методом флюоресцентної гібридизації *in situ* (FISH). Як правило, менш дороге ІГХ-дослідження проводиться в якості попереднього загального скринінгу, а FISH використовується в спірних випадках, коли ІГХ-метод не дає чітко позитивної чи чітко негативної відповіді. Подібний підхід добре зарекомендував себе в лікуванні хворих РГЗ, дозволяючи забезпечити максимальну ефективність лікування герцептином, уникнувши при цьому невиправданих витрат на обстеження [12].

В останні роки велика увага приділяється проблемі неоангіогенезу (формування нових судин) у злоякісних пухлинах. Вже не викликає сумніву той факт, що пухлина не може розвиватися і рости без утворення в ній розгалуженої мережі капілярів, що забезпечують постачання клітин киснем і живильними речовинами. Найважливішим позитивним регулятором ангіогенезу безперечно є фактор росту ендотелію судин (vascular endothelial growth factor – VEGF). Доведено, зокрема, що VEGF відіграє ключову роль у неоангіогенезі при РГЗ. Результати ряду ретроспективних клінічних досліджень свідчать про те, що експресія VEGF при РГЗ має істотне значення для прогнозу захворювання, а також впливає на чутливість пухлин до гормонального і медикаментозного лікування. Його високий рівень свідчить про несприятливий прогноз як при ранньому, так і при розповсюдженому РГЗ. Крім того, у даний час активно створюються і досліджуються нові препарати з антиангіогенними властивостями, і оцінка активності VEGF-залежного ангіогенезу може стати основою для їхнього цілеспрямованого застосування. Спроби використовувати показники змісту VEGF у крові (як у сироватці, так і в плазмі) в якості адекватної заміни тканинної експресії цього білка при оцінці активності ангіогенезу в РГЗ і прогнозуванні результату захворювання і (або) ефективності терапії дотепер великого успіху не мали [2].

До тканинних пухлинних маркерів також відносять S-фазу і плоідність, що визначаються методом ДНК-метрії з використанням проточних цитофлюориметрів. Метод заснований на відомому факті, що кількісний вміст ДНК у клітині відображає стадії клітинного циклу, популяції клітин, що беруться для аналізу. Застосування флюоресую-

чих барвників дозволяє вибірково зафарбувати тільки ДНК клітини, дозволяючи визначити кількість ДНК у досліджуваній клітинній популяції і розподілити клітини (в залежності від кількості в них ДНК) на фази життєвого циклу [6]. Життєвий цикл являє собою інтервал між двома мітозами і складає для тваринних клітин приблизно 10 – 24 години. За цей час клітина проходить 4 фази життєвого циклу: 1) G1 – фаза початкового росту, під час якої синтезується мРНК, білки; відбувається ріст клітини. Клітини, що пройшли диференціювання і більше не поділяються, постійно знаходяться у фазі спокою G0; 2) S – фаза реплікації, тобто процес самоподвоєння молекул ДНК; 3) G2 – фаза підготовки до мітозу: розподіл мітохондрій, реплікація центріолей, початок утворення веретена поділу; 4) M – фаза (мітоз) – поділ хромосом, поділ клітини. Досить нетривала фаза, яка складається з профази, прометафази, метафази, анафази і телофази. У сукупності фази G1, G0, S і G2 називаються інтерфази, що змінюється в клітинному циклі фазою мітозу.

У нормальній клітинній популяції по тривалості (G0 + G1) фази в багато разів перевищують тривалість S фази і фази (G2 + M). Тобто більшість клітин у такій популяції буде знаходитися у фазі (G0 + G1), а мінімальне – в S фазі. Для ракової клітинної популяції характерною ознакою є підвищена проліферативна активність. Незалежно від причини, що приводить до зміни проліферативної активності клітин, порушується як клітинний цикл клітини окремо, так і життєвий цикл ракової клітинної популяції в цілому в бік підвищення S і (G2 + M) фаз. У нормальній клітинній популяції стадії G0G1, у яких клітини знаходяться великий проміжок часу і здійснюють свою основну функціональну активність, характеризуються ступенем плоідності 2n. У клітинах пухлини раку грудної залози в 60 – 80 % випадків набір хромосом у пухлинах анеуплоїдний, тобто не кратний гаплоїдному. До анеуплоїдних відносяться трисомії, моносомії. Рідко анеуплоїдні зустрічаються при доброякісних пухлинах грудної залози. 20 – 40 % ракових пухлин грудної залози диплоїдні. Вони мають більш сприятливий прогноз у порівнянні з анеуплоїдними пухлинами грудної залози. Як диплоїдні, так і анеуплоїдні новоутворення з високої проліферативною активністю є прогностично несприятливими. Особливо сполучення анеуплоїдні з високою проліферативною активністю.

Плоідність і S фазу визначають методом проточної цитофлюориметрії. Впровадження цього метода в клінічну практику – це велике досягнення сучасної медицини. Проточний цитометр – як складений мікроскоп, здатний швидко кількісно аналізувати безліч властивостей клітин. У даному випадку прилад буде аналізувати кількість ДНК у клітинах. Тому є ще одна назва методу – ДНК – метрія. Суть методу – клітини по одній проходять через спеціальну камеру, перетинаючи пучок світ-

ла високої інтенсивності зі швидкістю кілька тисяч у секунду. На потрібній довжині хвилі вимірюється флуоресценція барвників, кількісно зв'язаних з нуклеїновими кислотами (ДНК) ядер клітин. Флуоресцентні світлові сигнали реєструються за допомогою світлочутливих датчиків, підсилюються і перетворюються в цифрові значення [6, 11].

Таким чином, метод ДНК – метрії дає можливість визначити наявність анеуплоїдного клітинного клону, що є одним з найважливіших критеріїв при діагностиці злоякісних пухлин, а також визначити активність проліферації цього клітинного клону. В одному зразку, взятому при біопсії, ми одержуємо одночасно 2 важливі параметри, що відображають поведінку пухлини – швидкість і характер її росту, розуміння характеру злоякісного процесу. Крім цього, використовуючи інформацію про особливості клітинного циклу пухлини, клініцист онколог має можливість успішно підібрати адекватні схеми поліхіміотерапії для лікування раку грудної залози.

Відомо, що деякі протипухлинні препарати найбільш активні на визначеній фазі клітинного циклу, наприклад: S фаза – метотрексат, 6-меркаптопурин, фторурацил G2/M – вінкрисин, вінбластин, колхіцин і т.д.

ЛІТЕРАТУРА

1. Волченко Н.Н., Савостикова М.В. Имуноцитохимическое исследование при раке молочной железы // Маммология, №4. – 2006. – С. 18-21.
2. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Биологические маркеры рака молочной железы: методические аспекты и клинические рекомендации // Маммология, №1. – 2005. – С.15-18.
3. Зборовская И.Б. Ельчева И.А., Татосян А.Г. Новое в терапии рака молочной железы / Под ред. Переводчиковой Н.И., Москва, 1998. – С.11-18.
4. Мельник Н.Н., Галахин К.А., Литвиненко А.А., Смоланка И.И., Скляр С.Ю., Лигирда О.Ф., Досенко І.В., Денка Е.Р. Прогностическое значение иммуногистохимических маркеров для выбора тактики терапии больных раком молочной железы // Онкология. – №6(4). – 2004. – С.259-261.
5. Семиглазов В.Ф. Значение прогностических и предсказывающих факторов при выборе лечения у больных метастатическим раком молочной железы // Практическая онкология. – №2. – 2000. – С. 26-30.
6. Шомова М.В., Богатырев В.Н., Летягин В.П. параметры ДНК-проточной цитофлюорометрии у больных с местно-распространенным раком молочной железы // Маммология. – №4. – 2006. – С.13-17.
7. Allred DC, Clark GM, Molina R, Tandon AK, Schnitt SJ, Gilchrist KW, et al: Over-expression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in-situ to invasive breast cancer. Human Pathol. – 1992. – Vol. 23. – P. 974-979. Brand F., Ravanel N., Gauchez A. et al. Prospect for anti-her2receptor therapy in breast cancer. Anticancer Res. – 2006. – P. 715-722.
8. Leitzel K., Teramoto Y., Konrad K., Chinchilli VM., Volas G., Grossberg H. et al. Elevated serum c-erbB-2 antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer. J Clin Oncol. – 1995. – Vol.9(3). – P. 1129-1135.
9. Ravdin PM, Green S, Dorr TM, 22. McGuire WL, Fabian C, Pugh RP, et al. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: Results of a prospective Southwest Oncology Group study. J Clin Oncol. – 1992. – Vol.10. – P.1284-1291.
10. Stanton P.D., Cooke T.G., Oakes S.J et al. Lack of prognostic significance of DNA ploidy and S-phase fraction in breast cancer. Br J Cancer. – 1992. – Vol.66(5). – P. 925-929.
11. Vogel Cl., Cobleigh M., Tripathy D., First – line, non-hormonal treatment of women with Her2 overexpressing metastatic breast cancer with Herceptin (trastuzumab, humanized anti-Her2antibody). Proc Am Soc Clin Oncol. – 2000. – P.91.

SUMMARY

THE DIAGNOSTIC VALUE OF THE TISSUE MARKERS OF BREAST CANCER

Conar R.S., Rusyn V.I., Rusyn A.V., Rishko M.F., Kozodaeva M.P.

Present paper deals with molecular diagnostic of breast cancer. The molecular markers with high level of effectiveness are discussed. They are: steroid receptors, Her2/neu receptors, vascular endothelial growth factor, S-phase, DNA-ploidy. Each of biomarkers of breast cancer is a significant prognostic factor, that determines the response to therapy.

Key words: breast cancer, molecular markers, steroid receptors, prognosis

На сьогоднішній день більшість молекулярних маркерів поки ще міцно не ввійшли в рутинну практику, що визначається високою вартістю подібних досліджень і складністю інтерпретації даних одночасного аналізу багатьох прогностичних факторів. Для клінічного використання міжнародними організаціями в даний час рекомендовано лише деякі з них, ефективність і корисність яких мають досить високий рівень доказовості, а саме: 1) визначення RE і RP у всіх первинних хворих для вирішення питання про доцільність призначення ендокринної терапії; 2) оцінка експресії (ампліфікації гена) HER2/neu у хворих з розповсюдженим раком, якщо планується лікування герцептином [4].

Отже, кожен із тканинних (біологічних) маркерів РГЗ є важливим прогностичним фактором, точніше фактором, що визначає можливу відповідь на лікування. Одним з аспектів практичного використання результатів вивчення молекулярно-біологічних характеристик РГЗ може бути розробка нових препаратів, які цілеспрямовано діють на досліджувані білки (чи гени) і блокують регульовані ними процеси [7, 8].