

© С.А. Лисенко, С.І. Кіркільєвський, 2012

УДК: 616.24-006:616-006.6-008.6:615.2:616-091.8

С.А. ЛИСЕНКО¹, С.І. КІРКІЛЕВСЬКИЙ²

¹ Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, кафедра онкології, Вінниця; ² Національний інститут раку, Київ

ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ОНКОПРОТЕЇНУ HER2/NEU В ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ ХВОРИХ НА РАК ЛЕГЕНІ З ПРОЯВАМИ ПАРАНЕОПЛАСТИЧНОГО РЕВМАТОЛОГІЧНОГО СИНДРОМУ

У статті наведено результати досліджень рівня експресії онкопротеїну HER2/neu в пухлинних клітинах 132 хворих на рак легені. Для цього відібрані 51 хворий на рак легені з паранеопластичним ревматологічним синдромом та 81 – без проявів даного синдрому відповідно. Встановлено, що в пухлинних клітинах хворих на дрібноклітинний рак легені як з наявністю паранеопластичного ревматологічного синдрому, так і без нього, не виявлено гіперекспресії білка HER2/neu. Також доведено, що частота гіперекспресії HER2/neu в пухлинних клітинах хворих на недрібноклітинний рак легені з проявами паранеопластичного ревматологічного синдрому на 63,0% більше на відміну від аналогічних хворих без даного синдрому і спостерігається у 2,8 рази частіше при аденокарциномі легені, ніж при плоскоклітинному раку. Отже, наявність експресії онкопротеїна HER2/neu при раку легені залежить як від гістологічної будови пухлини, так і від клінічних характеристик хворого.

Ключові слова: рак легені, паранеопластичний ревматологічний синдром, гіперекспресія, онкопротеїн HER2/neu

Вступ. Сучасні дослідження в молекулярній біології та генетиці постійно відкривають нові можливості в лікуванні хворих на злоякісні новоутворення. На сьогодні доведено, що онкопротеїни – це білки, які беруть участь в канцерогенезі, дають додаткову інформацію про поведінку пухлини, включаючи швидкість її росту, здатність до інвазії та метастазування, стійкість до хіміопрепаратів. Відповідно і блокування активності певних рецепторів і білків призводить до зменшення пухлини і продовження життя хворих. Одночасно з'явилися нові можливості для прогнозування перебігу захворювання і вибору цільової, індивідуалізованої терапії [2, 6].

Одним з багатьох виявлених генів-маркерів канцерогенезу став HER2. Даний ген, відомий також як c-erbB-2 або HER2/neu, вперше був виявлений в нейробластомі щурів (звідси позначення neu), відіграє велику роль в нормальному розвитку, регуляції, диференціації та проліферації клітин [4]. Також HER2/neu задіяний у рухомості пухлинних клітин, адгезії, інвазії та ангиогенезі [7].

Продуктом гена є трансмембранний глікопротеїн HER2/neu, який є представником сімейства рецепторів епідермального фактора росту (EGFR). Стимуляція цього рецептора призводить до запуску транскрипційних механізмів, що прискорює проліферацію і ріст клітин [7]. Для багатьох злоякісних пухлин (грудної залози, яєчника, передміхурової залози, шлунково-кишкового тракту,

легені, гліом) гіперекспресія рецепторів ростових факторів сімейства EGF асоціюється з поширеністю процесу та негативним прогнозом [1, 6].

Гіперекспресія онкопротеїна HER2/neu яка виникає в результаті ампліфікації гена HER2/neu, виявляється в тканині 25-30% хворих на рак грудної залози [2]. Вона є негативним прогностичним критерієм перебігу захворювання, ознакою підвищеного ризику рецидиву пухлини і ефективності лікування герцептином [3, 8]. Також доведено, що оверекспресія HER2/neu у пухлині супроводжується різким гальмуванням апоптозу, що може відігравати важливу роль в механізмі хіміо- та гормонорезистентності [5, 10].

Дослідження останніх років доводять, що гіперекспресія маркера HER2/neu відзначається у 15-25% при недрібноклітинному раку легені і також корелює з генералізацією хвороби, високим метастатичним потенціалом та хіміорезистентністю пухлин. У пацієнтів, які мають HER2/neu-позитивний статус, спостерігаються гірші показники резектабельності, тривалості безрецидивного періоду та нижча виживаність [1, 6].

На сьогоднішній день певний інтерес та значну актуальність складають дослідження експресії HER2/neu у хворих на рак легені з ознаками паранеопластичного ревматологічного синдрому.

Мета дослідження. Визначити наявність і проаналізувати ступінь вираженості експресії онко-

протеїну HER2/neu в пухлинних клітинах хворих на рак легені з проявами паранеопластичного ревматологічного синдрому.

Матеріали та методи. Для дослідження використано фрагменти пухлин 132 хворих на рак легені, які лікувалися у Вінницькому обласному клінічному онкологічному диспансері протягом 2009–2012 років. Перша група (дослідна) – операційний або біопсійний матеріал від 51 хворого на рак легені з проявами паранеопластичного ревматологічного синдрому, друга група (контрольна) – зразки пухлин від 81 хворого на рак легені без проявів даної паранеоплазії. Серед всіх хворих, пухлини яких досліджувались, було 114 чоловіків (86,4%) та 18 жінок (13,6%). Вік пацієнтів коливався від 41 до 76 років. Досліджувані хворі були схожі за стадіями та гістологічними формами і відповідним чином рандомізовані.

Пухлинний матеріал спочатку фіксували в 10,0% розчині нейтрального забуференого формаліну, а потім заливали у парафін. Гістологічні зрізи завтовшки 4–5 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозинном.

Оцінку результатів імуногістохімічного забарвлення та фотографування проводили за допомогою світлового мікроскопа, використовуючи збільшення у 400 разів (ок. $\times 10$, об. $\times 40$). Визначення експресії антигена HER2/neu проводили на депарафінованих зрізах із попередньою демаскіровкою антигену у цитратному буфері (pH 6,0) на водяній бані протягом 30 хв. Для візуалізації продуктів реакції застосовували систему EnVision™ FLEX. В якості первинних ан-

титіл використовували поліклональні антитіла (Polyclonal Rabbit Anti-Human) до c-erbB-2 Onco-protein (HER2/neu) із застосуванням наборів DAKO Cytomation.

Імуногістохімічну реакцію оцінювали з урахуванням особливостей забарвлення мембран пухлинних клітин:

– низька експресія HER2/neu⁺ – при частковому забарвленні мембран – більше ніж у 10,0% клітин;

– висока експресія або гіперекспресія HER2/neu⁺⁺ – повне мембранне забарвлення більше ніж у 10,0%;

– гіперекспресія або оверекспресія HER2/neu⁺⁺⁺ – повне мембранне забарвлення більше ніж в 30,0% пухлинних клітин.

Статистичне опрацювання кількісних показників проводили з використанням параметричного критерія Ст'юдента. В роботі використано комп'ютерне програмне забезпечення "Biostat" та "Excel 7.0".

Результати досліджень та їх обговорення. Розподіл пацієнтів в залежності від стадії захворювання виявив такі відмінності. Всього з I стадією раку легені було 32 пацієнти (24,2%), II стадію діагностовано у 46 хворих (34,9%) та III стадію – у 54 (40,9%) відповідно.

За гістологічними формами (табл. 1) всі пухлини розподілились на: дрібноклітинний рак легені (24 випадки – 18,2%), недрібноклітинний рак легені (108 випадків – 81,8%), в т.ч. аденокарцинома легені (32 випадки – 24,2%) та плоскоклітинний рак легені (76 випадків – 57,6%).

Таблиця 1

Гістологічні форми пухлин хворих на рак легені

Гістологічні форми	Групи хворих		Всього
	З проявами паранеопластичного ревматологічного синдрому	Без паранеопластичного ревматологічного синдрому	
Дрібноклітинний	9 (17,7%)	15 (18,5%)	24 (18,2%)
Аденокарцинома	14 (27,5%)	18 (22,2%)	32 (24,2%)
Плоскоклітинний	28 (54,8%)	48 (59,3%)	76 (57,6%)
Всього	51 (100%)	81 (100%)	132 (100%)

При аналізі гістологічних форм первинних пухлин легені хворих першої групи з проявами паранеопластичного ревматологічного синдрому, слід відмітити, що недрібноклітинний рак зустрічався у 42 випадках (82,3% по відношенню до всіх хворих з паранеопластичним ревматологічним синдромом) та дрібноклітинний – у 9 осіб (17,7%). З недрібноклітинних варіантів переважав плоскоклітинний рак – у 28 пацієнтів (54,8%), аденокарцинома спостерігалась у 14 осіб (27,5%) відповідно. В другій групі хворих без проявів паранеопластичного ревматологічного синдрому значну кількість гістологічних форм складав плоскоклітинний рак (59,3%), потім аденокарцинома (22,2%) та дрібноклітинний рак (18,5%).

Встановлено, що в пухлинних клітинах всіх 24 хворих (18,8%), у яких був дрібноклітинний рак легені, не виявлено експресії та гіперекспресії білка HER2/neu. Це підтверджує дані літератури про те, що при дрібноклітинному раку легені не спостерігалось ні ампліфікації гена HER2/neu, ні гіперекспресії онкопротеїну HER2/neu, що підтверджує принципові відмінності у канцерогенезі дрібноклітинної та недрібноклітинної форм раку легені [9]. Наявність чи відсутність симптомів паранеопластичного ревматологічного синдрому не впливала на гіперекспресію білка HER2/neu в пухлинних клітинах хворих на дрібноклітинний рак легені (рис. 1).

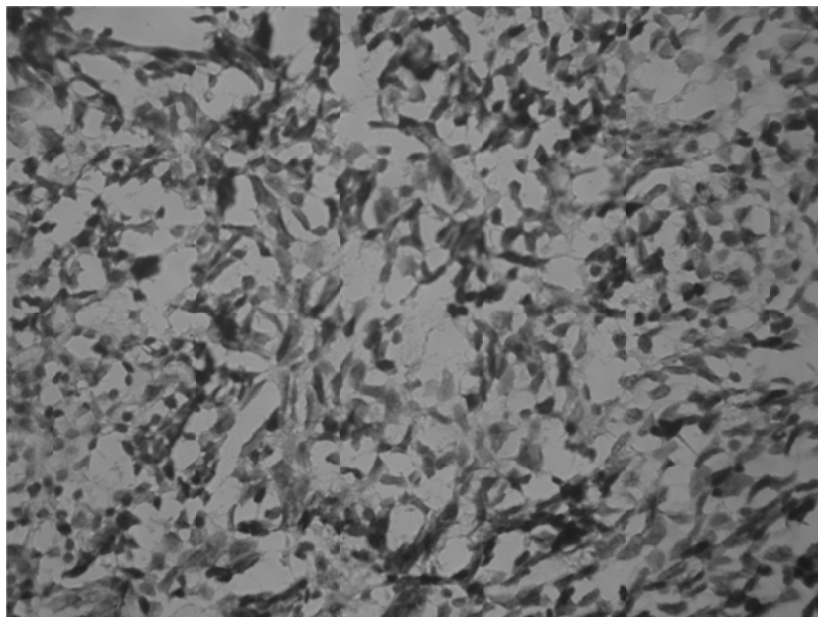


Рис. 1. Відсутність експресії HER2/neu в пухлинних клітинах дрібноклітинного раку легені у хворого Х. з проявами паранеопластичного ревматологічного синдрому. Імуногістохімічне забарвлення, система візуалізації EnVision™ FLEX, хромоген DAB, x 100.

У хворих на недрібноклітинний рак легені гіперекспресію HER2/neu⁺⁺ та HER2/neu⁺⁺⁺ встановлено у 29 випадках (26,9% по відношенні до всіх хворих з недрібноклітинним раком легені). Так експресія HER2/neu⁺⁺ спостерігалась в пухлинних клітинах 19 хворих (17,6%), а експресія HER2/neu⁺⁺⁺ – 10 хворих (9,3%) відповідно.

Серед хворих першої групи із недрібноклітинним раком легені з проявами паранеопластичного ревматологічного синдрому (42 пацієнти; 38,9% по

відношенню до всіх хворих із недрібноклітинним раком легені) оверекспресія HER2/neu відмічена в пухлинних клітинах 15 пацієнтів (35,7% випадків по відношенню до всіх хворих першої групи із недрібноклітинним раком легені).

Водночас, в другій групі, серед хворих без проявів ревматологічної паранеоплазії (64 пацієнти; 59,3%) гіперекспресія HER2/neu (рис. 2) виявлена в пухлинних клітинах 14 пацієнтів (21,9% випадків по відношенню до всіх хворих другої групи із недрібноклітинним раком легені).

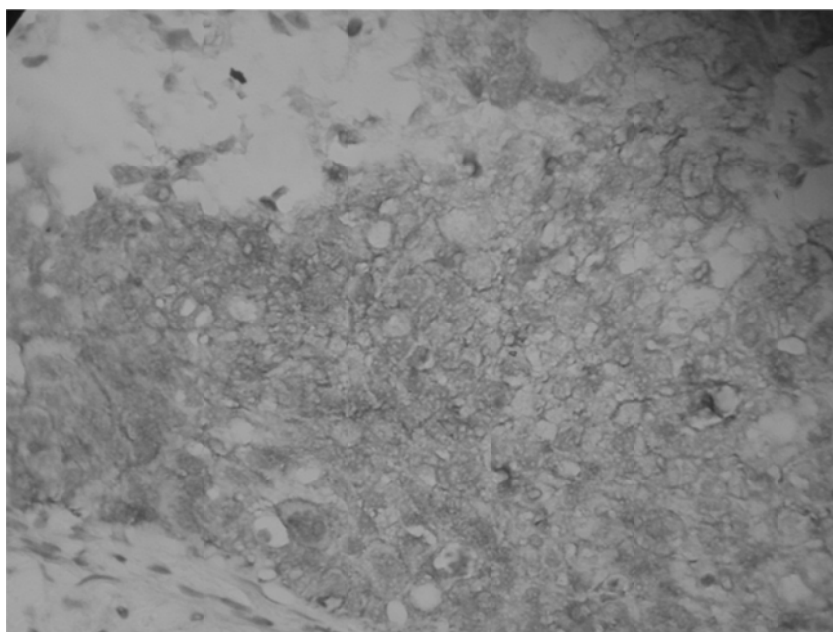


Рис. 2. Гіперекспресія HER2/neu в пухлинних клітинах плоскоклітинного раку легені у хворого М. без проявів паранеопластичного ревматологічного синдрому. Імуногістохімічне забарвлення, система візуалізації EnVision™ FLEX, хромоген DAB, x 400.

Всі випадки недрібноклітинного раку легені у хворих без паранеопластичного ревматологічного синдрому з виявленою гіперекспресією HER2/neu по гістологічним типам пухлин розподілились наступним чином: 8 аденокарцином (12,5%) та 6 плоскоклітинних карцином (9,4%).

Резюмуючи вищенаведені дані, слід відмітити, що частота гіперекспресії HER2/neu в хворих на недрібноклітинний рак легені з проявами паранеопластичного ревматологічного синдрому на 63,0% більше (35,7% проти 21,9%) на відміну від аналогічних хворих без ревматологічної паранеоплазії.

Крім цього, було визначено, що гіперекспресія онкопротеїну HER2/neu в пухлинних клітинах хворих на рак легені з проявами паранеопластичного ревматологічного синдрому частіше асоціюється з таким гістотипом пухлини, як аденокарцинома (рис. 3). Так, серед всіх випадків недрібноклітинного раку легені у хворих з паранеопластичним ревматологічним синдромом з виявленою гіперекспресією HER2/neu, – було 11 аденокарцином (26,2%), що у 2,8 рази більше ніж плоскоклітинних карцином легені (4 випадки; 9,5%).

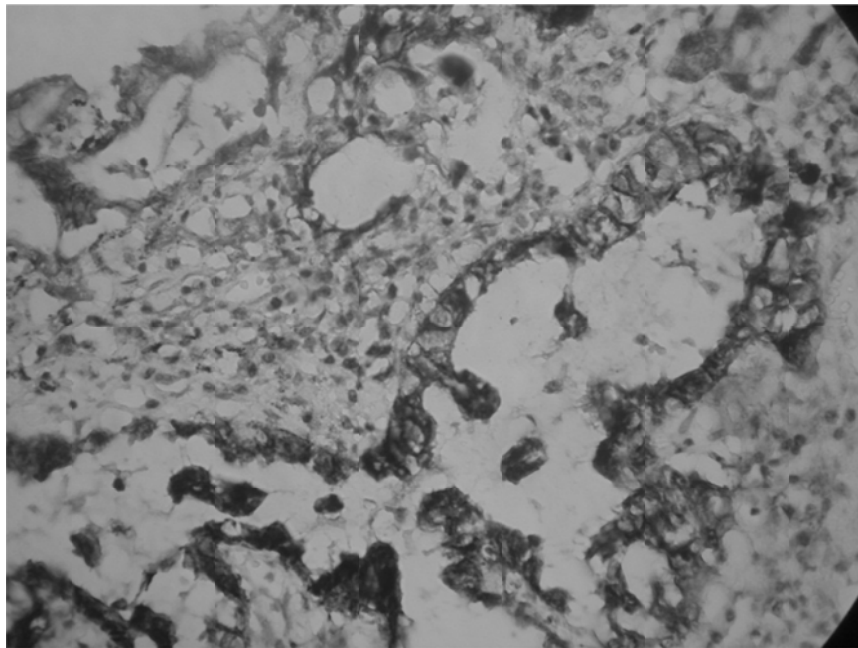


Рис. 3. Гіперекспресія HER2/neu в пухлинних клітинах аденокарциноми легені у хворого К. з наявністю паранеопластичного ревматологічного синдрому. Імуногістохімічне забарвлення, система візуалізації EnVision™ FLEX, хромоген DAB, х 400.

Висновки. 1. Наявність експресії онкопротеїна HER2/neu при раку легені залежить як від гістологічної будови пухлини, так і від клінічних характеристик хворого.

2. В пухлинних клітинах хворих на дрібноклітинний рак легені не виявлено гіперекспресії білка HER2/neu, що не залежить від наявності чи відсутності у хворих паранеопластичного ревматологічного синдрому.

3. Частота гіперекспресії HER2/neu в хворих на недрібноклітинний рак легені з проявами паранеопластичного ревматологічного синдрому на 63,0% більше на відміну від аналогічних хворих без ревматологічної паранеоплазії.

3. Гіперекспресія HER2/neu в пухлинних клітинах хворих з паранеопластичним ревматологічним синдромом спостерігається у 2,8 рази частіше при аденокарциномі легені ніж при плоскоклітинному раку.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Суховерша О. А. Експресія Her2/neu при недрібноклітинному раку легені та її прогностичне значення / О. А. Суховерша, В. А. Коссе // Онкологія. — 2007. — Т. 9, №1. — С. 38—42.
2. Експресія Her2/neu, Ki—67 и плоидность при раке молочной железы / М. И. Лукашина, Е. И. Глухова, Л. Г. Жукова [и др.] // Архив патол. — 2003. — Т. 5. — С. 25—29.
3. A phase II study of three-weekly docetaxel and weekly trastuzumab in HER2-overexpressing advanced breast cancer / F. Montemurro, G. Choa, R. Faggiuolo [et al.] // Oncology. — 2004. — Vol. 66. — P. 38—45.
4. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors / L.N. Klapper, M. H. Kirschbaum, M. Sela [et al.] // Adv. Cancer Res. — 2000. — Vol. 77. — P. 25—59.
5. Elevated HER2/neu level predicts decreased response to hormone therapy in metastatic breast cancer / A. Lipton, S. M. Ali [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2002. — Vol. 20. — P. 1467—1472.
6. Molecular biology of lung cancer: clinical Implications / K. M. Fong, Y. Sekido, A. F. Gazdar [et al.] // Thorax. — 2003. — Vol. 58. — P. 892—900.

7. Montgomery R. B. Endogenous anti—HER2 antibodies block HER2 phosphorylation and signaling through extracellular signalregulated kinase / R. B. Montgomery // *Cancer Res.* — 2005. — Vol. 65, Suppl. 2. — P. 650—656.
8. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of trastuzumab administered every three weeks in combination with paclitaxel / B. Leyland-Jones, K. Gelmon, J-P. Ayoub [et al.] // *J. Clin. Oncol.* — 2003. — Vol. 21. — P. 3965—71.
9. Quantitative analysis of Her2/neu expression in a small cell lung carcinoma (SCLC) tissue microarray / J. Giltane, M. Tomita, D. Rimm [et al.] // *Lung Cancer.* — 2005. — Vol. 49, Suppl. 2. — P.125.
10. Tumor biology: Herceptin acts as an anti—angiogenic cocktail / Y. Izumi, L. Xu, E. di Tomaso [et al.] // *Nature.* — 2002. — Vol. 416. — P. 279—280.

S.A. LYSENKO¹, S.I. KIRKILEVSKY²

¹*Vinnitsa National Pirogov Medical University, Vinnitsa;* ²*National Cancer Institute, Kyiv*

IMMUNOHISTOCHEMICAL ASSESSMENT OF EXPRESSION OF HER2/NEU ONCOPROTEIN IN TUMOR CELLS AMONG LUNG CANCER PATIENTS WITH RHEUMATOLOGICAL MANIFESTATIONS OF PARANEOPLASTIC SYNDROME

The article presents the results of research which is the level of expression of HER2/neu oncoprotein in tumor cells of 132 patients with lung cancer. For this purpose, 51 patients with lung cancer with paraneoplastic rheumatological syndrome and 81 without symptoms of the syndrome were considered. It was found that in tumor cells of patients with small cell lung cancer with the presence of paraneoplastic rheumatological syndrome, and among those without it, there was no overexpression of the protein HER2/neu. It was also proved that the frequency of HER2/neu overexpression in tumor cells of patients with non-small cell lung cancer with paraneoplastic manifestations of rheumatological syndrome was 63,0% more as compared to patients without this syndrome and moreover, it occurs 2,8 times more frequently in patients with lung adenocarcinoma than with squamous cell carcinoma. Therefore, the presence of HER2/neu oncoprotein expression in lung cancer depends on the histological structure of the tumor and the clinical characteristics of the patient.

Key words: lung cancer, paraneoplastic rheumatological syndrome, overexpression, oncoprotein HER2/neu

Стаття надійшла до редакції: 1.05.2012 р.