

## Определение прогностических тканевых маркеров при раке молочной железы

А.Г.Мкртчян

Центр медицинской генетики НАН РА

375010, Ереван, ул. Закияна, 5/1

**Ключевые слова:** иммуногистохимия, EGFR, HER2, Vcl-2, рак молочной железы

Благодаря успехам молекулярной биологии, биохимии и иммуногистохимии, в настоящее время в арсенале исследователей и клиницистов имеется огромное количество биологически значимых показателей, которые могут помочь в прогнозе раннего рака молочной железы (РМЖ) и выборе адъювантной терапии при распространенном процессе [1].

Количество показателей, рассматриваемых в качестве потенциальных молекулярных маркеров, стремительно увеличивается, отражая достижения в области изучения механизмов регуляции пролиферации и дифференцировки опухолевых клеток. Выполнение молекулярно-биологических исследований требует больших материальных затрат, и ни одно медицинское учреждение не может позволить себе одновременное определение всех тканевых маркеров. Рутинное применение в клинике пока нашли только методики определения рецепторов стероидных гормонов (эстрогенов (ЭР) и прогестерона (ПР)) [2].

В настоящее время огромное число фундаментальных исследований сфокусировано на поиске но-

вых рациональных подходов к противоопухолевой терапии. Понимание молекулярных механизмов, ответственных за митогенную активность трансформированных клеток, открывает новые пути контроля опухолевого роста. Одним из объектов, активно изучаемых в последние годы в качестве новой противоопухолевой мишени, является семейство рецепторов эпидермального фактора роста, которое включает EGFR (или HER1); erbB2/HER2; erbB3/HER3 и erbB4/HER4.

EGFR – трансмембранный гликопротеин молекулярной массой 170 kD, обладающий тирозинкиназной активностью. EGFR экспрессируется на поверхности как нормальных, так и трансформированных эпителиальных клеток и участвует в регуляции клеточного роста и дифференцировки. Как и все рецепторные тирозинкиназы, EGFR состоит из трех участков: внеклеточный лиганд-связывающий домен, трансмембранный гидрофобный участок и внутриклеточный тирозинкиназный домен (рис.)

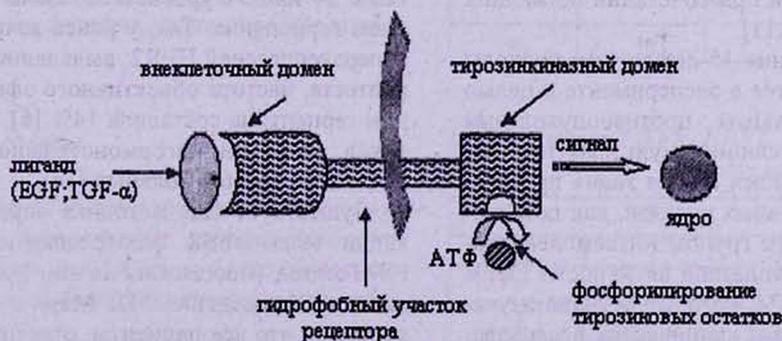


Рис. Схематическое строение EGFR

В роли лигандов выступают секретируемые нормальными и/или опухолевыми клетками ростовые факторы EGF и TGF- $\alpha$ , которые аутокринным и/или паракринным путем регулируют активность рецепто-

ра эпидермального фактора роста. Активация EGFR происходит после связывания одного из специфических лигандов с внеклеточным доменом, последовательных конформационных изменений в виде димеризации

рецептора и реакции фосфорилирования тирозиновых остатков внутриклеточного домена. На этапе взаимодействия с факторами роста существует возможность не только гомодимеризации EGFR, т.е. образования двух идентичных рецепторов EGFR, связанных с общим лигандом, но может произойти и гетеродимеризация EGFR с другими представителями семейства *erbB*, в частности с рецептором HER2 и *erbB3*. Образование гетеродимера приводит к значительному усилению внутриклеточных сигнальных импульсов. В результате всех этих взаимодействий активированная тирозинкиназа через специальные белки запускает целый каскад внутриклеточных процессов, передающих импульс к ядру клетки и тем самым инициирует клеточную пролиферацию и ряд других биологических эффектов, ответственных за опухолевую прогрессию: адгезию и инвазию трансформированных клеток, включение антиапоптотических механизмов [15].

При ряде опухолей эпителиальной природы (раке легкого, яичников, толстой кишки, предстательной железы, плоскоклеточном раке головы и шеи) обнаруживается избыточная экспрессия EGFR и/или одного из его лигандов (EGF; TGF- $\alpha$ ), что может служить причиной повышенной пролиферативной активности трансформированных клеток [4,12]. Гиперэкспрессия EGFR опухолевыми клетками, как правило, ассоциируется с поздними стадиями и метастатическим фенотипом заболевания и, соответственно, коррелирует с плохим прогнозом [10].

В итоге выбор EGFR в качестве противоопухолевой мишени выглядит вполне обоснованным и логичным. Помимо этого результаты экспериментальных исследований указывают на возможность усиления цитотоксического действия других противоопухолевых агентов: платиновых производных, доксорубина, гемцитабина и таксанов при сочетании последних с ингибиторами EGFR [3,5,11].

На протяжении последних 15 лет все эти подходы интенсивно разрабатываются в эксперименте с целью поиска новых потенциальных противоопухолевых агентов и внедрения их в клиническую практику. Результатом этого поиска явился синтез таких препаратов из группы моноклональных антител, как цетуксимаб (C225), и препаратов из группы низкомолекулярных ингибиторов тирозинкиназной активности EGFR - иресса (ZD1839) и OSI-774, которые активно изучаются уже в рамках II и III фаз клинических исследований.

**HER2.** В настоящее время главное внимание исследователей сосредоточено на клиническом использовании моноклональных антител (МКАТ) к гену *erbB2* (герцептина) и поиске новых перспективных средств воздействия на его патологическую активацию преимущественно при РМЖ [16].

Оказалось, что определение избыточной экспрес-

сии HER2 имеет большое значение при РМЖ. Избыточная экспрессия HER2 в ткани РМЖ обнаружена у 25–30% больных. В этом случае выявление HER2 может быть независимым признаком, определяющим течение болезни и эффективность лечения.

Оценка уровня экспрессии продукта гена *erbB2* – белка HER2 сопряжена с рядом сложностей. Во-первых, подавляющее число соответствующих исследований выполнено методом иммуногистохимии, который является полуколичественным по своему характеру. Зачастую представляется довольно трудным провести грань между патологической активацией гена (резким увеличением его экспрессии) и "физиологическими" количествами белка HER2. Во-вторых, большинство иммуногистохимических работ проводилось на архивных патоморфологических срезах; хотя, теоретически, подобный материал является идеальным объектом для ретроспективных исследований, использование парафиновых блоков сопряжено с дополнительными техническими трудностями, такими как деградация антигена-мишени вследствие неадекватной консервации образцов, разная чувствительность различных антител и т.д. В-третьих, ранние работы не всегда дифференцировали между мембранным и цитоплазматическим окрашиванием HER2; по-видимому, клиническую значимость представляет только рецепторная форма белка [13]. В целом, тщательно проведенные исследования демонстрируют высокий уровень конкордантности между амплификацией гена *erbB2* и резким увеличением количества мембранного продукта HER2.

Вообще метод для определения HER2 в ткани опухоли окончательно не определен, и сегодня отбор пациентов для лечения герцептином осуществляется чаще всего с помощью одобренного FDA иммуногистохимического набора DAKO (Герцептест). Пациентам с 2+ или 3+ уровнем показано лечение с включением герцептина. Так, у ранее леченных пациентов с гиперэкспрессией HER2, выявленной с помощью Герцептеста, частота объективного эффекта при назначении герцептина составила 14% [6], а у тех, кто не получал ранее химиогормонотерапию, герцептин был эффективен у 26% больных [14].

Существует еще методика определения амплификации гена *erbB2* флуоресцентным методом, т.н. FISH-метод (fluorescence in situ hybridization). Исследование, проведенное D. Mass и коллегами (2000), показало, что все пациенты, ответившие на терапию с включением герцептина имели гиперэкспрессию HER2, выявленную FISH-методом [9]. Частота объективного эффекта у ранее нелеченных FISH-позитивных больных составила 41%, а у получавших ранее химиотерапию – 20%, что ставит герцептин в ряд наиболее активных лекарственных препаратов, применяемых при РМЖ. При этом в группе ранее леченных больных, имевших гиперэкспрессию HER2 2+

или 3+, выявленную Герцептестом, но FISH-отрицательных, частота объективного эффекта была равна нулю. Другой важной находкой данного исследования стало то, что амплификация гена *erbB2* флюоресцентным методом обнаруживается у 3 % больных с отрицательным результатом иммуногистохимического исследования и у 7% больных с уровнем гиперэкспрессии 1+.

На практике до настоящего времени доминирующее положение принадлежит иммуногистохимическому определению HER2. Данная методика достаточно специфична, легко и быстро выполнима и доступна для большинства лабораторий. Поскольку чувствительность иммуногистохимического метода зависит от используемых моноклональных антител (МКАТ), рекомендуется работать со стандартными наборами антител, в частности с HerceptTest™ фирмы "DAKO" [7]. Не исключено, однако, что автоматизация FISH и приближение ПЦР-процедуры к практическим задачам могут изменить ситуацию, и эти методики придут на смену менее специфичной ИНС.

*Bcl-2* – онкоген определяет механизм клеточной смерти, подавляя апоптоз. Он также выявляется иммуногистохимически. Интенсивность реакции коррелирует с наличием ЭР, низкой степенью злокачественности. Таким образом, экспрессия *Bcl-2* связана с благоприятным прогнозом РМЖ. По данным Gasparini G. et al., высокая экспрессия этого онкогена является независимым показателем лучшей безрецидивной и общей выживаемости при РМЖ с метастазами в регионарных лимфатических узлах [8].

Для модуляции антиапоптотической функции *Bcl-2* был получен пептидный компонент *cmp* (cell permeable moiety)-1285 проапоптотического белка *Bad*, модифицированный присоединением молекулы жирной кислоты. Этот препарат хорошо проникает в клетку, где он связывается с белком *Bcl-2*, блокируя его взаимодействие с другими белками, ассоциированными с апоптозом.

## Материал и методы

В Центре медицинской генетики проведено иммуногистохимическое исследование парафиновых срезов РМЖ 30 пациенток в возрасте от 34 до 68 лет, находившихся на лечении в Национальном центре онкологии в 2003 году.

Имуногистохимические исследования проводили с использованием стандартного комплекса стрепто-видин-биотин-пероксидаза и МКАТ к рецепторам прогестерона (клон PgR 636), к ЭР (клон ID5), а также поликлональных кроличьих антител против онкобелков EGFR, HER2, *Bcl-2* («DAKO», Дания). Исследования проводили на депарафинированных тканевых срезах, предварительно обработанных на водяной бане в

течение 40 мин.

## Результаты и обсуждение

Было проведено иммуногистохимическое исследование архивного материала – парафиновых срезов больных РМЖ. На основании статуса стероидных гормонов все случаи были распределены на 4 группы: I группа – больные с ЭР<sup>+</sup> и ПР<sup>+</sup> опухолями (9 человек); II – больные с ЭР<sup>+</sup> и ПР<sup>-</sup> опухолями (9 человек); III – больные с ЭР<sup>+</sup> и ПР<sup>+</sup> опухолями (6 человек); IV – больные с ЭР<sup>-</sup> и ПР<sup>+</sup> опухолями (6 человек) (табл. 1–4).

Из 30 исследуемых препаратов экспрессия ЭР наблюдалась в 50% случаев; экспрессия ПР также в 50%; экспрессия *Bcl-2* – в 33%, а экспрессия EGFR и HER2 (1+, 2+) – в 43 и 47% случаев соответственно, гиперэкспрессии HER2 (3+) выявлено не было.

Была проанализирована частота экспрессии прогностических тканевых маркеров EGFR, HER2, *Bcl-2* в выделенных группах.

Таблица 1

Экспрессия EGFR, HER2, *Bcl-2* в группе с ЭР<sup>+</sup> и ПР<sup>+</sup> опухолями

ER	PR	Bcl-2	EGFR	HER2
+	+	+	-	-
+	+	+	-	+
+	+	-	-	+
+	+	+	-	+
+	+	-	-	-
+	+	+	+	+
+	+	-	-	+
+	+	+	+	+
+	+	-	-	-

Таблица 2

Экспрессия EGFR, HER2, *Bcl-2* в группе с ЭР<sup>-</sup> и ПР<sup>-</sup> опухолями

ER	PR	Bcl-2	EGFR	HER2
-	-	-	+	-
-	-	-	-	-
-	-	-	+	+
-	-	-	+	-
-	-	-	+	+
-	-	+	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	+	-

В группе с ЭР<sup>+</sup> и ПР<sup>+</sup> опухолями экспрессия Bcl-2 была выявлена в 56% случаев, EGFR – в 22%, HER2 (2+) выявлена в 56% и (1+) в 11% случаев.

В группе с ЭР<sup>-</sup> и ПР<sup>-</sup> опухолями экспрессия Bcl-2 была выявлена в 11% случаев, EGFR – в 67%, HER2 (2+) выявлена в 11% и (1+) в 22% случаев.

Таблица 3

Экспрессия EGFR, HER2, Bcl-2 в группе с ЭР<sup>+</sup> и ПР<sup>+</sup> опухолями

ER	PR	Bcl-2	EGFR	HER2
+	-	-	-	-
+	-	-	-	-
+	-	-	+	+
+	-	-	+	-
+	-	+	-	+
+	-	+	+	-

В группе с ЭР<sup>+</sup> и ПР<sup>-</sup> опухолями экспрессия Bcl-2 была выявлена в 33% случаев, EGFR – в 50%, HER2 (2+) выявлена в 50%.

Таблица 4

Экспрессия EGFR, HER2, Bcl-2 в группе с ЭР<sup>-</sup> и ПР<sup>+</sup> опухолями

ER	PR	Bcl-2	EGFR	HER2
-	+	+	-	+
-	+	-	-	+
-	+	+	-	-
-	+	-	+	-
-	+	-	+	-
-	+	-	-	+

В группе с ЭР<sup>-</sup> и ПР<sup>+</sup> опухолями экспрессия Bcl-2 была выявлена в 33% случаев, EGFR – в 33%, HER2 (2+) выявлена в 17% и (1+) в 33% случаев.

Таким образом, самая высокая экспрессия Bcl-2 (56%) выявлена в I группе (табл. 1), самая низкая – во II группе (табл. 2), группы III и IV занимают промежуточное положение (табл. 3, 4).

Далее, экспрессия EGFR была наиболее выраженной во II группе, а наименее выраженной – в I группе (табл. 2 и 1 соответственно).

Сложнее обстоит дело с уровнями экспрессии HER2(2+) и HER2(1+). В целом, в I и III группах отмечается почти одинаковый высокий уровень HER2(2+) (табл. 1 и 3). В то же время имеет место обратное соотношение уровней HER2(2+) и HER2(1+), с одной стороны, в I, с другой – во II и IV группах в пользу HER2(1+) (табл. 1, 2, 4). Что же касается III группы, то в ней не выявлено экспрессии HER2(1+) вообще.

Полученные результаты соответствуют литературным данным, в частности была выявлена корреляция между экспрессией Bcl-2 и положительным статусом стероидных гормонов, и наоборот – экспрессия EGFR была связана с отсутствием в опухоли ЭР и ПР. Экспрессия HER2 (1+ и 2+) в опухолях с положительным статусом стероидных гормонов, вероятнее всего, является следствием уровня специфичности иммуногистохимического анализа. Таким больным рекомендуется проведение оценки амплификации гена erbB2 методом FISH.

Данное исследование является первым шагом в изучении прогностических тканевых маркеров EGFR, HER2, Bcl-2 в Армении, однако уже сейчас можно сказать, что выявление уровня экспрессии и соотношения указанных маркеров позволит клиницистам внести коррективы в прогноз и лечение больных с РМЖ.

Поступила 10.02.05

## Կանխորոշիչ հյուսվածքային մարկերների որոշումը կրծքագեղձի քաղցկեղի ժամանակ Ա.Գ.Սկրտչյան

Ներկայացված են իմունահիստոքիմիական մեթոդով ստերոիդային հորմոնների, ինչպես նաև EGFR, HER2, Bcl-2 հյուսվածքային մարկերների էքսպրեսիայի որոշման արդյունքները կրծքի քաղցկեղով 30 կամանց մոտ, որոնք դիմել են Ազգային ուռուցքաբանության կենտրոն 2003թ: Էսթրոգենների ընկալիչների էքսպրեսիան հայտնաբերվել է 50% դեպքերում, պրոգեստերոնի ընկալիչներինը ևս 50% դեպքերում, իսկ ահա EGFR և HER2(2+,1+) էքսպրեսիան համապատասխանաբար 43 և 47%:

Յույց է տրված Bcl-2 էքսպրեսիայի և ստերոիդային հորմոնների դրական կարգավիճակի միջև եղած համապատասխանացումը, ինչպես նաև EGFR էքսպրեսիայի ժամանակ ստերոիդային հորմոնների ընկալիչների բացակայությունը: HER2(2+,1+) էքսպրեսիան ստերոիդային հորմոնների դրական

էքսպրեսիան ստերոիդային հորմոնների դրական

կարգավիճակի դեպքում բացատրվում է ինունաիստոքիմիական մեթոդի զգայունության աստիճանով:

Ցուցադրված հյուսվածքային մարկերների փոխհամագործակցության և էքսպրեսիայի մակարդակի

ուսումնասիրությունը հնարավորություն կտա բժշկներին որոշակի շտկումներ կատարել բուժման ընթացքում:

## Prognostic tissue markers detection in patients with breast cancer

A.G.Mkrtchyan

The paper presents the results of the immunohistochemical research of estrogen, progesterone receptors and EGFR, HER2, Bcl-2 oncoproteins hyperexpression in paraffin embedded blocks of 30 women diagnosed with breast cancer in the National Center of Oncology of Armenia in 2003. Estrogen receptors expression was observed in 50% of cases; progesterone receptors expression also in 50%; Bcl-2 expression – in 33% and expression of EGFR and HER2(2+,1+) – in 43 and 47% of cases accordingly.

It is shown the correlation between Bcl-2 expression and the positive status of steroid hormones and on the contrary – EGFR expression which has been connected with steroid hormones negative status. HER2 (2+ and 1+) expression in estrogen, progesterone positive cases apparently is consequence of the degree of the immunohistochemical analysis specificity.

Revealing the levels and parities of specified markers will allow to bring in corrective amendments to the forecast and treatment of patients with breast cancer.

## Литература

1. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Практическая онкология, 2002, т.3, 1, с. 38.
2. Семглазов В.Ф. Практическая онкология. 2000, 2, с. 26.
3. Baselga J. J. Nation. Cancer Insitute, 1993, 85: 1327.
4. Bridges A.J. Curr. Med. Chem., 1999, 6: 825.
5. Ciardiello F. et al. Clin. Cancer Res., 200, 6:2053.
6. Cobleigh M.A. Vogel C.L., Tripathy D. et al. Program and abstracts of the American Society of Clinical Oncology 34th Annual Meeting; May 16-19, 1998; Los Angeles, California, Abstract 376.
7. Espinoza F., Anguiano A. J. Clin. Oncol., 1999, v. 17, p. 2293.
8. Gasparini G., Barbaresch M., Doglioni C. et al. Clin. Cancer Res., 1995, v. 1, p. 189.
9. Mass R.D., Sander C., Charlene K., Johnson L., Everett T., Anderson S. Program and abstracts of the American Society of Clinical Oncology 36th Annual Meeting; May 20-23, 2000; New Orleans, Louisiana, Abstract 291.
10. Salomon D.S., Brandt R. et al. Crit. Rev. Oncol. Hematol., 1995, 19:183.
11. Sirotak F.M. et al. Proc. Am. Ass. Cancer Res., 41: 2000.
12. Todderud G., Carpenter G. Bio Factors, 1989, 2: 11.
13. van de Vijver M.J. Eur. J. Cancer, 2001, v. 37, Suppl 1, p. S11.
14. Vogel C., Cobleigh M., Tripathy D. et al. Program and abstracts of the American Society of Clinical Oncology 36th Annual Meeting; May 20-23, 2000; New Orleans, Louisiana, Abstract 275.
15. Woodburn J.R. Pharmacol. Ther., 1999, 82: 241.
16. Yu D., Hung M.C. Oncogene, 2000, v. 19, p. 6115.