На правах рукописи

Троценко Иван Дмитриевич

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

14.01.12-онкология

11 ОКТ 2012



Москва-2012

Работа выполнена в ФГБОУ Российский университет дружбы народов (ректор – доктор физ-мат. наук, профессор, академик РАО В.М. Филиппов) и ФГБУ Российский научный центр рентгенорадиологии Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (директор – д.м.н., профессор, член–корреспондент РАМН, В.А.Солодкий.)

Научный руководитель
Доктор медицинских наук, профессор Н.В. Харченко
Научный консультант
Доктор медицинских наук, профессор В.К. Боженко

Официальные оппоненты: Член-корр. РАМН, профессор
Ашрафян Лев Андреевич
Руководитель лаборатории комбинированных методов лечения гинекологических заболеваний хирургического отдела

Доктор медицинских наук
Бабкина Ирина Валентиновна
ведущий научный сотрудник лаборатории клинической биохимии РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН

Ведущая организация: ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Защита состоится «___»_____2012 года на заседании Диссертационного совета при ФГБУ Российский научный центр рентгенорадиологии Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 86)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Российский университет дружбы народов и ФГБУ Российский научный центр рентгенорадиологии Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Автореферат разослан «___»_____2012 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
Доктор медицинских наук, профессор З.С. Цаллагова

Актуальность проблемы

Рак молочной железы (РМЖ) в настоящее время является наиболее распространенным онкологическим заболеванием в женской популяции, составляя 20,5% от всех онкологических заболеваний (Давыдов М.И., Аксель Е.М., 2011). Одновременно достаточно высокими, до 70%, являются показатели выявляемости заболевания на ранних (I-II) стадиях, что позволяет использовать менее токсичные программы лечения (Харченко В.П., Рожкова Н.И., 2010). С другой стороны, излишне щадящая тактика в отношении онкологических больных связана с риском рецидивирования заболевания.

Выбор тактики лечения при раке молочной железы определяется сочетанием факторов, описывающих такие особенности опухоли как размер образования, наличие метастазов в регионарные лифоузлы, степень злокачественности, пролиферативная активность, оцениваемая по уровню экспрессии белка Ki67 (Jalava P., et al., 2006) и т.д (A. Goldhirsch, W. C. Wood, 2009). При этом, однозначными показаниями для адьювантной химиотерапии принято считать большой размер опухоли (T>5 см), более 4 метастазов в регионарные лимфоузлы (N2-N3), высокая степень злокачественности (G3) и высокая пролиферативная активность (экспрессия Ki67 более 30%), минимальные значения по данным критериям (T<2 см, N0, G1, Ki67≤15%) представляют собой относительные показания для адьювантной гормонотерапии. Однако при размере опухоли от 2.1 до 5 см, наличии метастазов в 1-3 регионарных лимфоузлах (N1), 2 степени злокачественности (G2), экспрессии Ki67 16-30%енобходимость назначения адьювантной химиотерапии является недоказанной. Таким образом, использование «классических» факторов прогноза не всегда позволяет адекватно выделить группу высокого риска рецидивирования.

В многочисленных исследованиях сказано, что исследование экспрессии одного или комплекса генов в ткани опухоли имеет независимое прогностическое значение (Chang, 2007, Cobliegh, 2005, Esteva, 2005, Gianni, 2005, Habel, 2006, Mina, 2006, Paik, 2004, и Paik, 2006). В частности, эксперты конференции StGallen 2011 признают, что использование профиля экспрессии генов OncotypeDX^{TM}, в основе которого лежит оценка экспрессии мРНК 16 генов, участвующих в процессах пролиферации, апоптоза и клеточной дифференцировки, адекватно отражает биологическую гетерогенность рака молочной железы и может применяться для определения прогноза заболевания и рекомендации назначения химиотерапии (Gnant M., 2011). Таким образом, выявление закономерностей экспрессии генов, участвующих в процессах пролиферации, апоптоза, клеточной дифференцировки и межклеточных взаимодействий в ткани доброкачественных и злокачественных образований может дать новые, более достоверные факторы прогноза и повысить эффективность дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных образований молочной железы.

Цель работы

Исследовать экспрессию комплекса генов, участвующих в процессах пролиферации, апоптоза, клеточной дифференцировки и межклеточных взаимодействий в морфологически неизмененной ткани молочной железы при фиброаденоме и инвазивном раке молочной железы, и определить взаимосвязь их

экспрессии с клинико-морфологическими характеристиками доброкачественных и злокачественных опухолей.

Задачи исследования

- Провести сравнительный анализ экспрессии генов в неизмененной ткани и при раке молочной железы
- Провести сравнительный анализ экспрессии генов в неизмененной ткани и при фиброаденоме молочной железы
- Провести сравнительный анализ экспрессии генов в образцах рака молочной железы в зависимости от клинико-морфологических характеристик опухоли

Научная новизна

Количественно определена экспрессия мРНК 17 генов маркеров пролиферации, апоптоза, клеточной дифференцировки и межклеточных взаимодействий в неизмененной ткани молочной железы, в ткани фиброаденомы и рака молочной железы на различных стадиях заболевания. Изучена взаимосвязь относительного содержания мРНК исследуемых генов в ткани опухоли молочной железы с основными клинико-морфологическими особенностями опухоли. Впервые оценена связь уровня экспрессии генов в морфологически неизмененной ткани с морфологическими особенностями рака молочных желез. Получены статистически значимые отличия экспрессии исследуемых генов в зависимости от типа опухоли, а также в зависимости от клинико-морфологических характеристик рака молочной железы. На основании определения и сравнения уровня экспрессии мРНК рецептора прогестерона PGR в ткани рака молочной железы разработан алгоритм, позволяющий выявлять опухоли, имеющие неблагоприятные молекулярно-биологические характеристики.

Научно-практическая значимость

В результате проведенного исследования оценена клиническая значимость и информативность определения уровня экспрессии мРНК комплекса генов в ткани фиброаденомы молочной железы и ткани рака молочной железы. Разработан алгоритм определения изменения направления экспрессии мРНК рецептора прогестерона PGR при раке молочной железы как дополнительный диагностический критерий в комплексной диагностики потенциально более злокачественных опухолей.

Положения, выносимые на защиту

1. Экспрессия активаторов пролиферации, ингибиторов апоптоза, клеточных рецепторов и генов межклеточных взаимодействий в образцах инвазивного рака молочной железы значительно повышена по сравнению с морфологически неизмененной тканью и фиброаденомой.
2. В образцах инвазивного РМЖ при большом размере опухоли, наличии регионарных и отдаленных метастазов повышена экспрессия активаторов пролиферации, ингибиторов апоптоза и генов межклеточных взаимодействий.
3. Активность процессов пролиферации и апоптоза в морфологически неизмененной ткани связана с уровнем экспрессии рецепторов стероидных гормонов и HER2/neu опухоли при раке молочной железы.

4. Сравнительная индивидуальная оценка экспрессии генов в образцах опухоли и морфологически неизмененной ткани дает дополнительную информацию для выявления потенциально более злокачественных опухолей.

Апробация материалов диссертации.

Материалы диссертации были доложены: на II Междисциплинарном форуме «Медицина молочной железы: на стыке специальностей», Москва в 2012 году; Worldwide Innovative Networking in personalized cancer medicine (WIN) 2012, Париж. Апробация работы прошла в ФГУ Российском научном центре рентгенорадиологии Росмедтехнологий 09 апреля 2012 года.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 работ, из них 4 в журналах, рецензируемых ВАК.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 105 страницах и состоит из введения, трех глав, а также выводов и списка литературы. Указатель литературы содержит ссылки на 12 отечественных и 220 зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 23 таблицами и 14 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика обследованных пациентов.

Исследован уровень экспрессии 21 гена в 190 образцах ткани молочной железы, из них 57 образцов рака молочной железы (РМЖ), 38 образцов фиброаденомы (ФА) молочной железы и 95 образцов морфологически неизмененной ткани. Средний возраст больных ФА составил 33,1±10,6 лет, средний размер опухоли 3,2±2,9 $см^3$. В 65% опухоль локализовалась в верхне-наружном квадранте молочной железы.

Средний возраст больных РМЖ составил 57,1±11 лет. В 63,1% (36 из 57 случаев) гистологически опухоль была представлена инфильтративным протоковым раком, в 19,2% (11 из 57) – инфильтративным дольковым, в 8,7% (10 из 57) наблюдались прочие формы (муцинозный рак и др.). В 75,3% (43 из 57 случаев) размер опухоли не превышал 5 см, в 10,5% (11 из 57) наблюдалось распространение опухоли на кожу молочной железы, грудную стенку, инфильтративные отечные формы (T4). Регионарные метастазы (N1 – N3) наблюдались в 46,6% (26 из 57 случаев), отдаленные (на момент операции) в 7,1% (4 из 57). Опухоли I, II и III степени злокачественности встречались в 14% (8 из 57), 56,1% (32 из 57) и 29,9% (17 из 57), соответственно. Экспрессия рецепторов эстрогена наблюдалась в 66,7% (38 из 57), прогестерона в 63,2% (36 из 57), гиперэкспрессия HER2/neu (3+) в 14% (8 из 57), амплификация c-erbB2 в 29,2% (9 из 32 случаев).

Все пациентки проходили обследование и получали лечение в хирургических отделениях ФГБУ «РНЦРР» Минздравсоцразвития в период с ноября 2009 по июль 2011 года. Гистологические заключения давались в соответствии с гистологической

классификацией опухолей молочной железы (ВОЗ, 2003г.) (F.A. Tavassoli, P. Devilee "Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs". - IARC, Lyon.- 2003: 432). Оценка степени злокачественности рака молочной железы давалась в соответствие с критериями Elston-Ellis (Elston C.W., Ellis I.O. "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up."- Histopathology.- 1991. - v.19.- №5.- p.403–410.).

Для иммуногистохимического (ИГХ) определения экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона использовались антитела (NCL-L-ER-6F11, NCL-L-PGR-312, Leica, Великобритания). Для ИГХ определения экспрессии онкобелка C-erbB2 использованы моноклональные мышиные антитела NCL-L-CB11 производства фирмы Leica, Великобритания. Результаты иммуногистохимических реакций экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона оценивались полуколичественным способом (Allred D.C., et al., 1998). Оценка экспрессии онкобелка C-erbB2 выполнялась согласно рекомендациям A. C. Wolff и соавт. 2007.

Анализ уровня экспрессии генов проводился на основании количественного измерения мРНК методом ПЦР с обратной транскрипцией. Для каждого образца анализировалась экспрессия 21 гена (17 функциональных генов и 5 референсных). Для удобства интерпретации результатов функциональные гены были объединены в 5 групп: гены -маркеры пролиферации (*KI67, STK15, CCNB1*) и ингибитор пролиферации PTEN, гены ингибиторы апоптоза (*BIRC5, BCL2, BAG1, TERT*) и активаторы апоптоза(*BAX, NDRG1*), гены клеточной дифференцировки: рецептор эстрогена *ESR*, рецептор прогестерона *PGR*, рецептор эпидермального фактора роста *C-erbB2* и его гомолог *GRB7*, а также маммаглобин *MGB1*, и гены межклеточных взаимодействий (*MMP11, CTSL2*). В качестве референсных использовали гены GUSB, B2M, ABL, HPRT и TBP.

Забор исследуемого материала для молекулярно-генетического анализа проводился сразу после операции по поводу рака молочной железы или фиброаденомы. После получения ткани она немедленно помещалась в стабилизирующий раствор (EverFresh RNA, «Клоноген», Россия) и хранилась при -70°С. В каждом случае одновременно производился забор морфологически неизмененной ткани молочной железы. Выделение РНК проводили согласно инструкции с помощью наборов реагентов для выделения РНК RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, USA). Реакции обратной транскрипции и ПЦР ставили, используя наборы и оборудование НПО «ДНК Технология» согласно протоколу производителя. Уровень экспрессии мРНК измеряли в относительных единицах, определяемых методом сравнения индикаторных циклов (Ср).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием методов непараметрического и параметрического анализа. Различие групп полагали статистически значимым при $P<0,05$. Обработку полученных результатов проводили в программном пакете Statistica 6.0 (StatSoft, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительная оценка экспрессии генов в образцах морфологически неизмененной ткани, фиброаденомы и рака молочной железы.

I. Анализ изменения экспрессии генов в зависимости от типа ткани.

1.1. Сравнение морфологически неизмененной ткани (МНТ) и ткани рака молочной железы (РМЖ)

При сравнительном анализе экспрессии 17 генов в морфологически неизмененной ткани и образцах инвазивного РМЖ был выявлен ряд достоверных отличий. В таблице 1 представлены значения экспрессии генов, для которых отличия статистически значимы.

Таблица 1. Уровни экспрессии генов в образцах морфологически неизмененной ткани (МНТ) и при раке молочной железы (РМЖ). Статистически значимые отличия отмечены *.

Ген	n - МНТ	n - РМЖ	Среднее - МНТ	Среднее - РМЖ	p
KI 67	57	57	16,24	115,34	0,000001*
STK15	57	57	52,29	230,16	0,000011*
CCNB1	57	57	11,03	54,45	0,000004*
PTEN	57	57	10,95	7,31	0,000314*
BCL2	57	57	65,00	38,99	0,008238*
NDRG1	57	57	490,11	175,43	0,000012*
BIRC5	57	57	24,29	113,66	0,000086*
ESR	57	57	170,86	375,36	0,002346*
PRG	57	57	1953,76	4241,21	0,013229*
GRB7	57	57	394,06	1991,66	0,027666*
MGB1	57	57	23351,24	91731,80	0,012923*
MMP11	57	57	25,94	237,78	0,000062*

p*- отличия меньше 0,05

Для генов-маркеров пролиферации (*KI67, CCNB1, STK15*) отмечено значительное повышение уровня экспрессии в образцах РМЖ по сравнению с неизмененной тканью. Для опухолевого супрессора *PTEN* получены достоверно более высокий уровень экспрессии в МНТ по сравнению с РМЖ. Таким образом, для ткани РМЖ характерно значительное повышение пролиферативной активности по сравнению с МНТ.

При определении экспрессии генов контроля апоптоза для ингибитора апоптоза BCL2 отмечено снижение экспрессии в образцах РМЖ по сравнению с МНТ. Для генов, участвующих в регуляции внешнего пути апоптоза (*BIRC5* и *NDRG1*), наблюдается повышение экспрессии ингибитора апоптоза *BIRC5* и снижение уровня экспрессии активатора каспаз *NDRG1* при РМЖ по сравнению с МНТ. Разнонаправленность изменения экспрессии генов контролирующих апоптоз может свидетельствовать о дискоординации процессов апоптоза при РМЖ.

При анализе экспрессии генов клеточной дифференцировки отмечено статистически значимое повышение экспрессии мРНК *ESR, PGR, GRB7* и *MGB1* при РМЖ.

При анализе генов, включенных в кластер межклеточных взаимодействий, достоверные отличия получены для *MMP11*, матриксной металлопротеиназы, разрушающей межклеточный матрикс. Ее экспрессия существенно повышена при инвазивном РМЖ, что может быть связано с повышенной протеолитической активностью клеток опухоли.

Таким образом, клетки рака молочной железы отличаются повышенной пролиферативной и протеолитической активностью по сравнению с морфологически неизмененной тканью молочной железы. Кроме того, в целом в образцах РМЖ снижена экспрессия активаторов апоптоза и повышен уровень экспрессии рецепторов стероидных гормонов.

1.2 Анализ изменения экспрессии генов в ткани фиброаденомы молочной железы.

При сравнительном анализе экспрессии генов в образцах морфологически неизмененной ткани и фиброаденомы статистически значимых отличий экспрессии для генов-маркеров пролиферации и апоптоза получено не было, за исключением активатора апоптоза *BAX*, экспрессия которого была снижена в образцах ФА (Таблица 2). В группе генов клеточной дифференцировки в образцах ФА по сравнению с МНТ была повышена экспрессия *ESR, C-erbB2* и *MGB1*, а также матриксной металлопротеиназа *MMP11*.

Таблица 2. Уровни экспрессии генов в образцах неизмененной ткани и при фиброаденоме ФА

Ген	n - МНТ	n - ФА	Среднее МНТ	Среднее ФА	p
BAX	38	38	21,63	11,52	0,031106*
ESR	38	38	58,41	592,22	0,001124*
C-erbB2	38	38	23,38	63,70	0,108310
MGB1	38	38	5695,54	24790,50	0,092220
MMP11	38	38	3,36	13,74	0,092982

Отсутствие статистически значимых отличий экспрессии генов-маркеров пролиферации и апоптоза в образцах МНТ и ФА может свидетельствовать о сохранении баланса этих процессов в ткани фиброаденомы, а одновременное повышение экспрессии мРНК рецепторов эстрогена, *C-erbB2* и *MMP11* отличает ФА от морфологически неизмененной ткани.

1.3 Сравнение экспрессии генов в ткани фиброаденомы и рака молочной железы.

Поиск молекулярных отличий доброкачественных и злокачественных новообразований представляет клинический интерес, т.к. морфологическая картина не всегда дает исчерпывающую информацию.

В образцах РМЖ по сравнению с ФА был отмечен значительно более высокий уровень экспрессии маркеров пролиферации (*KI67, STK15* и *CCNB1*) и ингибитора апоптоза *BIRC5*. Одновременно в образцах ФА экспрессия ингибитора пролиферации *PTEN* и активатора апоптоза *NDRG1* была выше, а экспрессия матриксной

металлопротеиназы *MMP11*, наоборот, ниже по сравнению с образцами РМЖ. В таблице 3 приведены данные только для генов, экспрессия которых в образцах отличается статистически значимо или имеет выраженную тенденцию.

Таблица 3. Сравнение уровня экспрессии генов в образцах ткани фиброаденомы и рака молочной железы.

Ген	n ФА	n РМЖ	Среднее ФА	Среднее РМЖ	p
KI 67	38	57	22,45	115,34	0,006858*
STK15	38	57	52,70	230,16	0,050340
CCNB1	38	57	14,08	54,45	0,060180
PTEN	38	57	11,70	7,31	0,003554*
NDRG1	38	57	342,06	175,43	0,037029*
BIRC5	38	56	16,79	113,66	0,052468
MMP11	38	57	16,83	237,78	0,051963

Таким образом, в образцах РМЖ наблюдается значительно более высокий уровень пролиферативной, антиапоптотической и протеолитической активности по сравнению с ФА при отсутствии статистически значимых отличий экспрессии рецепторов стероидных гормонов и эпидермального фактора роста (*C-erbB2*).

Как уже ранее отмечалось, активность процессов пролиферации и апоптоза в клетках ФА сравнима с морфологически неизмененной тканью. При этом повышенная активность экспрессии рецепторов экстрогена и *C-erbB2* отличает ФА от неизмененной ткани. При сравнении ФА и РМЖ наблюдаются значительные отличия экспрессии маркеров пролиферации и апоптоза. Данные результаты могут свидетельствовать о различной природе механизмов контроля пролиферации и апоптоза в клетках фиброаденомы и рака молочной железы, чем, вероятно, и объясняются различия в морфологических проявлениях ФА и РМЖ. Отсутствие статистически значимых отличий экспрессии рецепторов стероидных гормонов и эпидермального фактора роста в образцах ФА и РМЖ на фоне значительного повышения пролиферативной активности в клетках злокачественной опухоли косвенно может указывать на фундаментальное свойство автономности опухолевого роста – отсутствие необходимости во внешних стимулах для поддержания высокого уровня пролиферации.

На рисунках 1 и 2 представлены сравнительные уровни экспрессии маркеров пролиферации (KI67, STK15 и CCNB1) и апоптоза (ингибитора апоптоза BIRC5 и проапоптотического NDRG1) в различных типах исследованной ткани (морфологически неизмененная ткань, фиброаденома, инвазивный рак молочной железы).

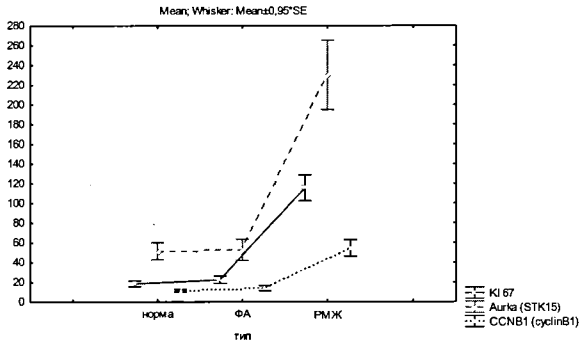


Рисунок 1. Сравнение уровня экспрессии генов пролиферации (KI67, AURKA, CCNB1) в зависимости от типа ткани

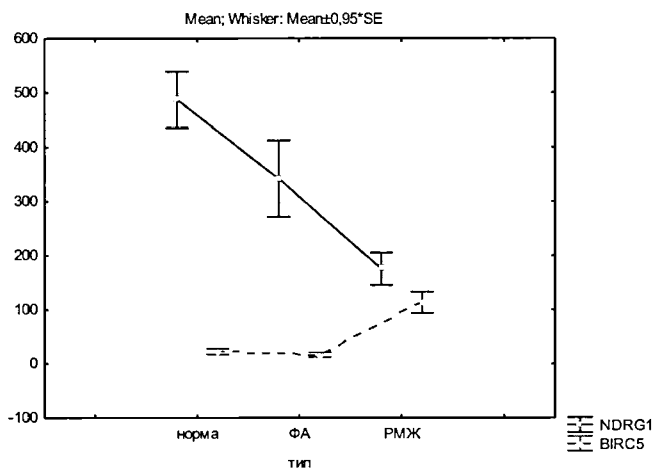


Рисунок 2. Сравнение уровня экспрессии генов контроля апоптоза (NDRG1 и BIRC5) в зависимости от типа ткани

3. Анализ экспрессии генов в зависимости от морфологических характеристик ткани в образцах рака молочной железы.

Увеличение размеров опухоли, появление или увеличение количества лимфогенных или появление гематогенных метастазов также может характеризоваться различными закономерностями экспрессии генов, описание которых может стать дополнительным диагностическим инструментом и позволит проводить более прецизионную оценку биологических свойств ткани опухоли.

3.1 Анализ экспрессии генов в зависимости от размеров опухоли

При сравнении уровня экспрессии исследуемых генов в образцах тканей РМЖ относительно размеров опухолевого узла по данным морфологического исследования наибольшее количество статистически значимых отличий экспрессии наблюдается при сравнении групп Т1 - Т2 (таблица 4).

Таблица 4. Отличия уровня экспрессии генов в зависимости от размеров опухоли в образцах РМЖ.

Ген	n – T1	n – T2	Среднее T1	Среднее T2	p
STK15	17	18	115,2	382,87	0,007009*
CCNB1	17	18	29,2	82,46	0,016579*
PTEN	17	18	7,8	5,51	0,014793*
BCL2	17	18	45,6	27,16	0,060804
BIRC5	17	18	56,1	151,79	0,003388*
MGB1	17	18	184654,0	51119,70	0,102752

При увеличении размеров опухоли отмечается статистически значимое повышение экспрессии генов маркеров пролиферации *STK15* и *CCNB1*, снижение экспрессии опухолевого супрессора *PTEN*. Для генов кластера апоптоза характерно повышение экспрессии *BIRC5* и снижение экспрессии *BCL2*. Экспрессия маммаглобина *MGB1* была снижена в опухолях Т2. Таким образом, увеличение размеров опухоли сопровождается повышением пролиферативной и антиапоптотической активности. На рисунке 3 представлен график, отражающий динамику изменения экспрессии маммглобина в зависимости от размера опухоли.

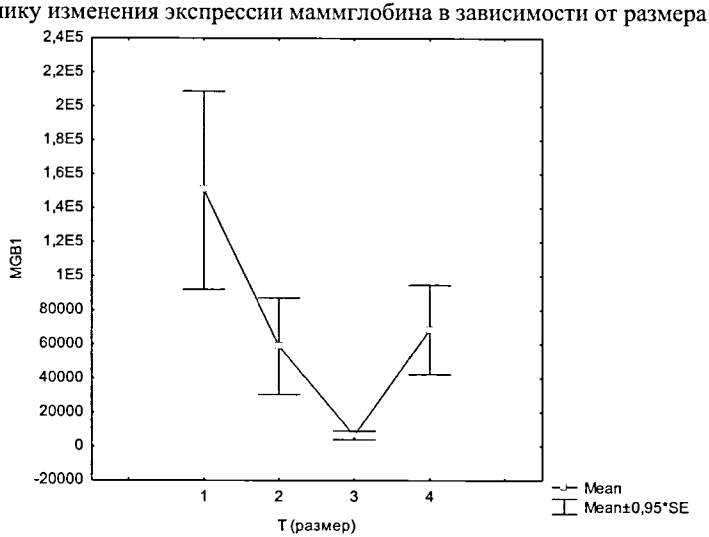


Рисунок 3. Изменение экспрессии маммаглобина (MGB) в зависимости от размера опухоли.

На графике видно, что изменение экспрессии маммаглобина обратно пропорционально увеличению размеров опухоли. Интересно, что закономерность нарушается для образцов Т4, экспрессия MGB в которых сравнима с образцами Т2; вероятным объяснением являются различные критерии классификации, применяемые для стадирования образцов Т1 – Т3 и образцов Т4.

3.2 Анализ экспрессии генов в зависимости от наличия метастатических лимфоузлов и отдаленных метастазов (N и M по классификации TNM)

Был проведен анализ экспрессии генов в образцах РМЖ в зависимости от наличия метастазов в регионарные лимфоузлы (N) и отдаленных метастазов (M). Получены достоверные отличия экспрессии *CCNB1, BAX, BIRC5, CTSL2, MMP11, C-erbB2* при сравнении уровня экспрессии генов между образцами N0 (отсутствуют метастазы в регионарных лимфоузлах) и образцами N2 (метастазы в 4-9 регионарных лимфоузлов) (таблица 5). Аналогично получены отличия уровня экспрессии *KI 67, CTSL2, BIRC5* при сравнении образцов M0 и M1 (таблица 6).

В образцах N2 повышена экспрессия маркера пролиферации *CCNB1* по сравнению с N0, ингибитора каспаз *BIRC5*, проапоптотического гена *BAX*, рецептора эридермального фактора роста *C-erbB2*, а также протеолитических ферментов *MMP11* и *CTSL2*.

Таблица 5. Отличия экспрессии генов в образцах РМЖ зависимости от наличия/отсутствия лимфогенных метастазов

Ген	n – N0	n – N2	Среднее N0	Среднее N2	p
CCNB1	31	8	43,4	96,01	0,050648
BAX	31	8	21,1	31,99	0,043132*
BIRC5	31	8	85,1	246,41	0,020292*
C-erbB2	31	8	37,7	109,09	0,079520
MMP11	31	8	169,9	440,78	0,088813
CTSL2	31	8	23,9	137,06	0,041970*

В образцах M1 по сравнению с M0 была повышена экспрессия маркера клеточной пролиферации *KI67* и ингибитора апоптоза *BIRC5*, а также протеиназы катепсина *CTSL2*. Таким образом, опухоли при наличии лимфогенных или гематогенных метастазов отличаются повышенной экспрессией маркеров пролиферации и ингибиторов апоптоза, а также повышением активности генов (*MMP11* и *CTSL2*), участвующих в процессах ремоделирования матрикса (таблица 6).

Таблица 6. Отличия экспрессии генов в образцах РМЖ зависимости от наличия/отсутствия гематогенных метастазов

Ген	n – M0	n – M1	Среднее M0	Среднее M1	p
KI 67	53	4	104,87	254,07	0,004816*
BIRC5	52	4	96,07	342,33	0,001441*
CTSL2	53	4	23,38	232,86	0,000328*

Согласно результатам ранее проведенного анализа пролиферативная и протеолитическая активность в злокачественной опухоли в целом выше по сравнению с морфологически неизмененной тканью. Прогрессирование заболевания (увеличении

размеров опухоли, наличии лимфогенных и гематогенных метастазов) сопровождается дальнейшим повышением пролиферативной и протеолитической активности клеток на фоне снижения апоптоза.

3.3 Анализ экспрессии генов в ткани РМЖ в зависимости от степени злокачественности, статуса рецепторов стероидных гормонов и эпидермального фактора роста HER2/neu.

Степень злокачественности, экспрессия рецепторов стероидных гормонов и эпидермального фактора роста HER2/neu в настоящее время являются критериями для молекулярного фенотипирования рака молочной железы, поэтому определение закономерностей экспрессии генов, участвующих в процессах пролиферации, апоптоза и т.д. является интересным.

3.3.1 Анализ экспрессии генов в ткани РМЖ в зависимости от степени злокачественности

Наибольшие отличия были получены при сравнении экспрессии генов в образцах первой (G1) и третьей (G3) степени злокачественности. В образцах G3 была повышена экспрессия генов маркеров пролиферации *STK15* и *CCNB1*, а также экспрессия катепсина *CTSL2*. Экспрессия *C-erbB2* и его гомолога *GRB7* также была повышена в этой группе, а экспрессия *ESR, PGR* и *MGB1* наоборот, снижена (Таблица 7).

Таблица 7. Экспрессия генов в образцах РМЖ зависимости от степени злокачественности опухоли

Ген	n G1	n G3	Среднее G1	Среднее G3	p
STK15	23	9	150,9	371,50	0,056505
CCNB1	23	9	34,6	55,51	0,062933
PRG	23	9	4347,9	951,11	0,068085
C-erbB2	23	9	17,7	84,25	0,004652*
GRB7	23	9	577,8	4837,16	0,041629*
MGB1	23	9	187572,2	17533,47	0,013123*
CTSL2	23	9	16,0	37,13	0,020145*

Повышение степени злокачественности на молекулярном уровне сопровождается повышением пролиферативной и протеолитической активности на фоне повышенной экспрессии мРНК рецепторов эпидермального фактора роста *C-erbB2* и его гомолога *GRB7*, опосредующих пролиферативные сигналы. При этом экспрессия маркеров дифференцировки (*PGR* и *MGB*) снижена в образцах G3. Для циклина В (*CCNB1*) и маммаглобина (*MGB*) характерно антибатное изменение экспрессии с ростом степени злокпчественности, что проиллюстрировано на рисунках 4 и 5, соответственно.

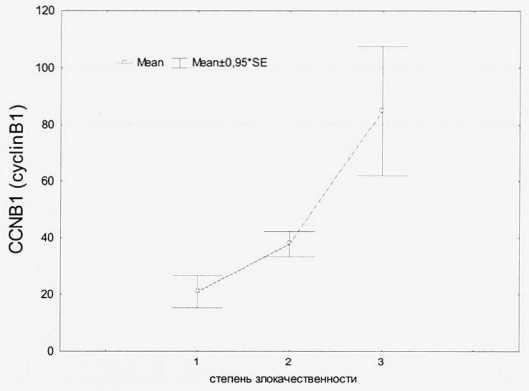


Рисунок 4. Изменение экспрессии мРНК циклина В (*CCNB1*) в опухолях различной степени злокачественности (G1-G3).

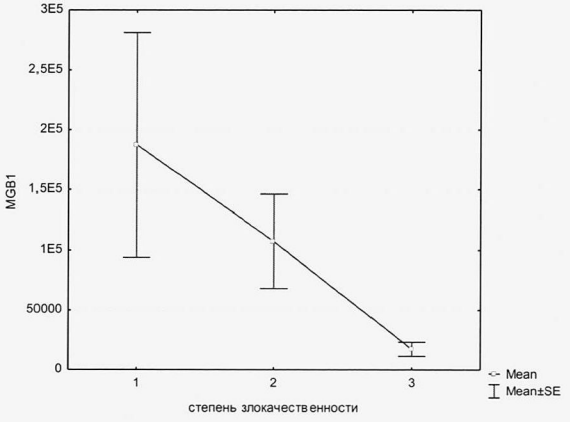


Рисунок 5. Изменение экспрессии мРНК маммаглобина (*MGB1*) в опухолях различной степени злокачественности (G1-G3).

3.3.2 Анализ экспрессии генов в ткани РМЖ в зависимости от статуса рецепторов стероидных гормонов и HER2/neu по данным ИГХ исследования

При сравнительном анализе экспрессии в зависимости от статуса рецепторов стероидных гормонов по данным ИГХ в эстроген-позитивных опухолях повышена экспрессия ингибиторов апоптоза *BCL2* и *BAG*, кроме того, в РЭ+ опухолях снижена экспрессия мРНК эпидермального фактора роста и его гомолога *GRB7*, а также катепсина *CTSL2* (Таблица 8). Снижение экспрессии мРНК *C-erbB2* и *GRB7* в этой группе может указывать на антагонизм экспрессии рецепторов эстрогена и эпидермального фактора роста.

Таблица 8. Уровни экспрессии генов в образцах РМЖ в зависимости от статуса рецепторов эстрогена по данным ИГХ

Ген	n РЭ-	n РЭ+	Среднее РЭ-	Среднее РЭ+	p
BCL2	11	26	20,9	47,8	0,014204*
BAG	11	26	2,9	6,5	0,055183
ESR	11	26	44,1	475,7	0,003644*
PRG	11	26	1372,2	4857,9	0,058054
C-erbB2	11	26	67,3	19,0	0,019363*
GRB7	11	26	3945,0	598,8	0,062202
CTSL2	11	26	36,0	17,2	0,026759*

Сравнительный анализ экспрессии генов в прогестерон-позитивных и прогестерон-негативных опухолях показал, что в ПР+ опухолях снижена экспрессия ингибитора апоптоза *TERT* (12,6 относительных единиц в ПР+ по сравнению с 73,0 о.е. в ПР-; *P*=0,0279) и матриксной металлопротеиназы *MMP11* (136,5 о.е. по сравнению с 277,5 о.е.; *P*=0,0896). Также в опухолях с положительным статусом рецепторов стероидных гормонов (РЭ+/РП+) статистически значимо повышена экспрессия мРНК *ESR* и *PGR* (*P*<0,05).

В целом, при сравнительной оценке экспрессии генов в группах рецептор позитивных и негативных опухолей статистически значимых отличий экспрессии генов-маркеров пролиферации и апоптоза не получено, однако активность генов межклеточных взаимодействий (*MMP11* и *CTSL2*) была выше в рецептор-негативных опухолях. При сравнительном анализе экспрессии генов в образцах с минимальным (1+) и максимальным (3+) по данным ИГХ уровнем экспрессии HER2/neu в образцах 3+ статистически значимые отличия получены только для мРНК *C-erbB2* (93,3 о.е. при HER2/neu 3+ по сравнению с 12,2 о.е при HER2/neu 1+; *P*=0,00008) и его гомолога *GRB7* (1872,1 о.е. при HER2/neu 3+ по сравнению с 370,3 о.е при HER2/neu 1+; *P*=0,000002), экспрессия которых выше в образцах 3+.

Таким образом, в отличие от таких факторов прогноза как размер опухоли, наличие лимфогенных/гематогенных метастазов и степень злокачественности, где изменение пролиферативной и апоптотической активности опухоли было вполне объяснимым, при сравнительном анализе экспрессии генов в зависимости от статуса рецепторов стероидных гормонов и HER2/neu не получено статистически значимых отличий по уровню экспрессии генов-маркеров пролиферации и апоптоза. Эти результаты могут косвенно быть следствием феномена пролиферативнойт автономности опухоли. В тоже время, с учетом роли рецепторов стероидных гормонов и HER2/neu в процессах пролиферации и апоптоза в нормальной ткани молочной железы, мы провели сравнительную оценку экспрессии генов в МНТ в зависимости от ИГХ статуса рецепторов стероидных гормонов и HER2/neu в опухоли.

4. Анализ экспрессии генов в морфологически неизмененной ткани в зависимости от статуса стероидных гормонов и HER2/neu в образцах РМЖ по данным ИГХ

Мы провели анализ уровня экспрессии генов в морфологически неизмененной ткани молочной железы в зависимости от уровня экспрессии рецепторов в ткани опухоли. Были обнаружены достоверные отличия экспрессии генов в неизмененной ткани при сравнении таких фенотипических характеристик опухоли как статус рецепторов стероидных гормонов и HER2/neu. Если опухоль по данным ИГХ экспрессирует рецепторы эстрогена, в морфологически неизмененной ткани наблюдается более низкий уровень пролиферативной активности: снижение экспрессии маркеров пролиферации *KI67, STK15* и *CCNB1* при отсутствии достоверных отличий в уровне экспрессии мРНК самих рецепторов (Таблица 9).

Таблица 9. Анализ экспрессии генов в морфологически неизмененной ткани в зависимости от уровня рецепторов стероидных гормонов в ткани рака молочной железы по данным иммуногистохимического исследования.

Ген	n РЭ-	n РЭ+	Среднее РЭ-	Среднее РЭ+	p
KI 67	19	38	29,31	10,92	0,003994*
STK15	19	38	86,26	37,72	0,024436*
CCNB1	19	38	16,38	8,73	0,003210*

Аналогичная картина наблюдается в неизмененной ткани при прогестерон-позитивном по данным ИГХ фенотипе опухоли: снижение экспрессии *KI67, STK15, CCNB1,* ингибитора апоптоза *BIRC5*, а также *C-erbB2* и его гомолога *GRB7* (Таблица 10).

Таблица 10. Анализ экспрессии генов в морфологически неизмененной ткани в зависимости от уровня рецепторов стероидных гормонов в ткани рака молочной железы по данным иммуногистохимического исследования.

Ген	n РП-	n РП+	Среднее РП-	Среднее РП+	p
KI 67	21	36	25,18	12,31	0,043056*
STK15	21	36	84,22	36,21	0,022675*
CCNB1	21	36	14,57	9,36	0,044246*
BIRC5	20	35	44,86	13,36	0,016630*
C-erbB2	21	36	42,63	18,93	0,073629
GRB7	21	36	585,18	282,78	0,016074*

Анализ экспрессии генов в морфологически неизмененной ткани относительно интенсивности окрашивания клеток опухоли антителами к HER2/neu проводился в группах +1 и +3. В группе +3 повышена экспрессия ингибитора пролиферации *PTEN* (17,9 о.е. при HER2/neu+3 по сравнению с 10,7 о.е. HER2/neu+1; *P*=0,0257) и активатора каспаз *NDRG1* (1116,07 о.е. при HER2/neu+3 по сравнению с 441,82 о.е. HER2/neu+1; *P*=0,0011). Экспрессия мРНК самого *c-erbB2* (75,2 о.е. при HER2/neu+3 по сравнению с 16,2 о.е. HER2/neu+1; *P*=0,0145) и его гомолога *GRB7* (870,4 о.е. при

HER2/neu+3 по сравнению с 292,9 о.е. HER2/neu+1; P=0,009) также была повышена в группе HER2/neu+3. А экспрессия маммаглобина была, наоборот, снижена в этой группе (8949,7 о.е. при HER2/neu+3 по сравнению с 28807,2 о.е. HER2/neu+1; P=0,1019).

Согласно полученным результатам активность генов-маркеров пролиферации и ингибиторов апоптоза в морфологически неизмененной ткани ниже в случае рецептор-положительного фенотипа опухоли. А в случае HER2/neu -положительного фенотипа опухоли (3+) в окружающей ткани наблюдается повышение активности ингибиторов пролиферации.

Полученные отличия экспрессии генов пролиферации и апоптоза в морфологически неизмененной ткани позволяют предположить, что экспрессия рецепторов стероидных гормонов и эпидермального фактора роста является важной фенотипической особенностью не только самой опухоли, но и ткани молочной железы в целом, а наблюдаемые изменения экспрессии в морфологически неизмененной ткани являются проявлением системного характера онкологического заболевания. Отсутствие достоверных отличий экспрессии мРНК ESR и PGR в исследуемых группах, а также то, что в 79% (45 из 57 случаев) женщины в исследуемых группах находились в постменопаузе, свидетельствует о том, что данные отличия экспрессии не являются следствием влияния менструального цикла.

Таким образом, исследование экспрессии генов в морфологически неизмененной ткани при раке молочной железы может дать дополнительную информацию в оценке пролиферативной и апоптотической активности как самой опухоли, так и системного влияния опухоли на организм.

5. Анализ экспрессии генов маркеров пролиферации и апоптоза в зависимости от изменения уровня экспрессии мРНК рецепторов прогестерона в ткани опухоли

В настоящем исследовании мы обнаружили, что при сравнительной индивидуальной оценке экспрессии мРНК в клетках рака молочной железы уровень экспрессии всех 17 генов может как снижаться, так и повышаться относительно значений в морфологически неизмененной ткани, что может указывать на отличия молекулярно-биологических характеристик опухолей. Мы сравнили уровни экспрессии профиля генов в группах пациентов, у которых уровень экспрессии мРНК рецептора прогестерона в ткани опухоли был выше или ниже по сравнению с его экспрессией в нормальной ткани.

В качестве маркера активности пролиферации и апоптоза была выбрана экспрессия мРНК рецептора прогестерона *PGR*.

В 30% случаев, когда по результатам иммуногистохимической оценки опухоль считается прогестерон-позитивной, экспрессия мРНК рецептора прогестерона *PGR* в ней ниже по сравнению с уровнем экспрессии в образце морфологически неизмененной ткани, полученной у этого же пациента, аналогичная ситуация наблюдается и в случае прогестерон-негативных опухолей (рисунок 6).



Рисунок 6. Отличия экспрессии мРНК *PGR* в прогестерон-позитивных (А) и прогестерон-негативных (Б) опухолях по данным ИГХ.

Мы также сравнили уровень экспрессии генов пролиферации и апоптоза в зависимости от направленности изменения экспрессии мРНК рецепторов прогестерона в образцах рака молочной железы I-II стадии. В случае повышения экспрессии мРНК рецепторов прогестерона в ткани РМЖ по сравнению с неизмененной тканью отмечено статистически значимое снижение экспрессии маркеров пролиферации *KI67, CCNB1,* ингибиторов апоптоза *BIRC5* и *TERT* в клетках опухоли. Экспрессия ингибитора апоптоза *BCL2* повышена в *PGR+* образцах (таблица 11).

Таблица 11. Сравнительный анализ экспрессии генов в образцах РМЖ I-II стадии в зависимости от уровня экспрессии рецепторов прогестерона, оцениваемого по данным ОТ-ПЦР.

	n *PGR+*	n *PGR-*	Среднее *PGR+*	Среднее *PGR-*	p
KI 67	20	17	56,4	155,97	0,00037*
STK15	20	17	120,6	327,17	0,03347*
CCNB1	20	17	27,5	60,11	0,00511*
BCL2	20	17	50,1	27,64	0,02675*
BIRC5	20	17	50,1	131,13	0,00081*
TERT	16	12	11,8	48,94	0,08021

Таким образом, относительная оценка экспрессии мРНК рецепторов прогестерона *PGR* с учетом изменения направления его экспрессии относительно значений в морфологически неизмененной ткани обеспечивает выделение опухолей с неблагоприятным молекулярным фенотипом (высокая пролиферативная/низкая апоптотическая активность) среди образцов рака молочной железы I-II стадии.

Выводы

1. В образцах рака молочной железы выявлено статистически значимое повышение экспрессии активаторов пролиферации *KI67, STK15, CCNB1* и ингибитора апоптоза *BIRC5*; снижение экспрессии ингибиторов пролиферации *PTEN* и *NDRG1*. А также повышение экспрессии рецепторов *ESR, PGR, GRB7* и матриксной металлопротеиназы *MMP11*.

2. В образцах фиброаденомы по сравнению с морфологически неизмененной тканью снижена экспрессия активатора апоптоза *BAX*, повышена экспрессия мРНК рецепторов *ESR* и *C-erbB2*, а также матриксной металлопротеиназы *MMP11*.

3. В образцах инвазивного рака молочной железы по сравнению с образцами фиброаденомы статистически значимо повышена экспрессия мРНК маркеров пролиферации *KI67, STK15* и *CCNB1*, ингибитора апоптоза *BIRC5* и матриксной металлопротеиназы *MMP11*, снижена экспрессия ингибиторов пролиферации *PTEN* и *NDRG1*.

4. В образцах инвазивного рака молочной железы большего размера, при наличии регионарных и гематогенных метастазов повышена экспрессия генов-маркеров пролиферации, ингибиторов апоптоза, а также генов MMP11 и CTSL2. Увеличение степени злокачественности РМЖ сопровождается повышением экспрессии *STK15, CCNB1* рецептора эпидермального фактора роста *c-erbB2, GRB7* и протеолитически активного *CTSL2* и снижением экспрессии *PGR* и маммаглобина *MGB1*.

5. Активность процессов пролиферации и апоптоза в морфологически неизмененной ткани связана с уровнем экспрессии рецепторов эстрогена, прогестерона и HER2/neu в ткани опухоли при раке молочной железы.

6. Сравнительная оценка уровня экспрессии мРНК рецептора прогестерона *PGR* в опухоли и морфологически неизмененной ткани может дать дополнительную информацию для выделения опухолей с неблагоприятными молекулярно-биологическими характеристиками при раке молочной железы I-II стадии.

Практические рекомендации

1. Определение уровня экспрессии мРНК генов-маркеров пролиферации (*KI67, STK15, CCNB1, PTEN*), апоптоза (*BIRC5, BCL2, NDRG1*), клеточной дифференцировки (*ESR, PGR, GRB7, MGB1*) межклеточных взаимодействий (*MMP11, CTSL2*) в ткани опухоли может быть использовано в качестве дополнительного метода в диагностике рака молочной железы.

2. Оценка изменения уровня экспрессии мРНК рецептора прогестерона (*PGR*) в ткани опухоли относительно морфологически неизмененной ткани целесообразно для выявления «неблагоприятного» молекулярного фенотипа опухоли при раке молочной железы.

Приложение. Список исследованных генов с кратким описанием их функции

Кластер	Ген	Функция
Пролиферация	*KI67*	Маркер клеточной пролиферации. Экспрессируется в фазы G1, S, G2, M и не экспрессируется в G0.
	STK15 (AURKA)	Кодирует серин-треонин киназу 6, участвующую в регуляции формирования веретена деления.
	CCNB1	Кодирует белок цикли B1 семейства циклинов, контролирующих смену фаз клеточного цикла. Активация комплекса циклин B-Cdk2 необходима для перехода фаз G2/M.
	PTEN	Кодирует белок с фосфотазной активностью, фосфорелирующий молекулярные мищени пролиферативного каскада Akt/PKB, чем и объясняются его антипролиферативные свойства как опухолевого супрессора.
Апоптоз	*BCL2*	Кодируемый белок обладает антиапоптотической активностью. Образуя комплекс с белком BAG, блокирует выделение цитохрома С из межмембранного пространства митохондрии.
	BAX	Белок этого гена положительно регулирует высвобождение цитохрома С и по сути является антагонистом BCL2 и BAG.
	BAG	Коактиватор BCL2, обладающий антиапоптотическими свойствами.
	NDRG1	Кодирует белок, необходимый для p53 опосредованной активации каспаз, чем и объясняются его выраженные проапоптотические свойства.
	BIRC5	Кодирует белок семейства ингибиторов апоптоза, непосредственно ингибирующий каспазы – мощный ингибитор апоптоза.
	TERT	Кодирует обратную транскриптазу теломеразы, фермент, необходимый для репликации концевых (теломерных) фрагментов хромосом.
Клеточная дифференцировка	*ESR*	Кодирует рецептор эстрогена альфа.
	PGR	Кодирует рецептор прогестерона А.
	c-erbB2	Кодирует рецептор эпидермального фактора роста HER2/*neu*.
	GRB7	Кодирует белок, активирующий рецепторы семейства эпидермального фактора роста при связывании с лигандами.
	MGB1	Кодирует белок маммаглобин.
Межклеточные взаимодействия	*MMP11*	Кодирует матриксную металлопротеиназу, участвующую в разрушении межклеточного матрикса.
	CTSL2	Кодирует белок катепсин с высокой пептидазной активностью.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Кудинова Е.А., Бурменская О.В., Боженко В.К., Васкевич Е.Ф., Непша О.С., Мельникова Н.В., Троценко И.Д., Трофимов Д.Ю., Сухих Г.Т. Экспрессия маркеров апоптоза при раке молочной железы// Технологии живых систем, 2011, Т. 8, № 7, Стр. 40-44.

2. Боженко В.К., Рожкова Н.И, Кудинова Е.А., Троценко И.Д. Профиль экспрессии генов как фактор прогноза при раке молочной железы. Вестник РНЦРР, 2011, Т. 11, URL http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v11/papers/bozh2_v11.htm

3. Боженко В.К., Харченко Н.В., Запиров Г.М., Кудинова Е.А., Троценко И.Д. Профиль экспрессии генов как фактор прогноза при пролиферативных заболеваниях органов репродуктивной системы.// Вестник РНЦРР, 2012, Т. 12, URL http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v12/papers/trots_v12.htm

4. Троценко И.Д., Рожкова Н.В., Харченко Н.В., Кудинова Е.А., Запиров Г.М., Боженко В.К.Оценка связи экспрессии рецепторов стероидных гормонов методом ОТ-ПЦР с уровнем пролиферации и апоптоза в ткани рака молочной железы.//Вестник РНЦРР, 2012, Т. 12, URL http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v12/papers/trots1_v12.htm

5. Солодкий В.А., Харченко Н.В.,Боженко В.К., Запиров Г.М., Васкевич Е.Н., Троценко И.Д. Роль определения мРНК маммаглобина в крови при диагностике рака молочной железы.// Материалы II Междисциплинарного форума "Медицина молочной железы: на стыке специальностей", 2012, с 56

6. Bozhenko V.K., Rozhkova N.I., Kudinova E.A., Vaskevich E. N., Bliznyukov O.P., Trotsenko I.D. Mammaglobin expression as a marker for early breast cancer.//Annals of oncology, 2012, V.23 (supl. 5), v 17.

Список сокращений

ИГХ - иммуногистохимическое исследование
МНТ - морфологически неизмененная ткань
мРНК - матричная РНК
ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
РМЖ – инвазивный рак молочной железы
РП - белок-рецептор прогестерона
РЭ - белок-рецептор эстрогена
ФА – фиброаденома
о.е. – относительные единицы экспрессии

Заказ № 54-А/09/2012 Подписано в печать 19.09.2012 Тираж 100 экз. Усл. п.л. 1



ООО "Цифровичок", тел. (495) 649-83-30
www.cfr.ru ; e-mail:zak@cfr.ru