УДК 618.19-006.6-091.8

# Bcl-2 как прогностический фактор в различных молекулярно-генетических подтипах рака молочной железы

И.А. ПАВЛЕНКО[1], П.Е. ПОВИЛАЙТИТЕ[1], М.З. ГОРЕЛИК[2], А.В. ПЕТРОВ[1]

[1]ГБУ Ростовской области «Патологоанатомическое бюро», Ростов-на-Дону; [2]ГБУЗ «Приморское краевое патологоанатомическое бюро», Владивосток

# Bcl-2 as a prognostic factor in different molecular genetic subtypes of breast cancer

I.A. PAVLENKO[1], P.E. POVILAITITE[1], M.Z. GORELIK[2], A.V. PETROV[1]

[1]Morbid Anatomy Bureau of the Rostov Region, Rostov-on-Don; [2]Primorye Territorial Morbid Anatomy Bureau, Vladivostok

**Хорошо известно, что все случаи рака молочной железы (РМЖ) можно распределить по четырем молекулярно-генетическим подгруппам (люминальные А и В опухоли, HER2/neu(+) и тройные негативные РМЖ). Целью нашего исследования была сравнительная оценка характера экспрессии Bcl-2, известного как благоприятный прогностический маркер РМЖ, в различных молекулярно-генетических подгруппах, а также изучение связи этого белка с индексом пролиферативной активности и наличием генетических аберраций на хромосоме 17. В исследование были включены 290 образцов инвазивного протокового РМЖ. Экспрессия Bcl-2 была обнаружена в 14% HER2/neu(+) и трижды-негативных РМЖ, в то же время 77% люминальных В и 100% люминальных А опухолей экспрессировали Bcl-2. Потеря экспрессии Bcl-2 наблюдалась в клинически более агрессивных РМЖ, обладающих высокой пролиферативной активностью и наличием амплификаций HER2/neu и центромеры 17-й хромосомы. Это может свидетельствовать о плохом прогнозе люминальных В, HER2/neu(+) и тройных негативных РМЖ с отсутствием экспрессии Bcl-2 и требует дальнейшего изучения на выборках большего объема.**

*Ключевые слова: рак молочной железы, Bcl-2, пролиферация, прогноз.*

**It is well known that breast cancers (BC) are divided into 4 molecular genetic subgroups (luminal A, luminal B, HER2/neu-positive, and triple-negative (TNBC). The purpose of the investigation was to comparatively estimate the pattern of expression of Bcl-2, known as a good prognostic marker of BC, in different molecular genetic subgroups and to study the correlation of this protein with proliferative activity index and genetic aberrations on chromosome 17. The investigation covered 290 samples of invasive ductal BC. Bcl-2 expression was identified in 14% of HER2/neu-positive and TNBC cases while 77% of luminal B tumors and 100% of luminal A ones expressed Bcl-2. Loss of Bcl-2 expression correlated with clinically more aggressive BCs having a high proliferative activity and amplification of HER2/neu and chromosome 17 centromere. This may suggest the poor prognosis of luminal B, HER2/neu-positive and TNBC with no Bcl-2 expression and calls for further investigations on larger samples.**

*Key words: breast cancer, Bcl-2, proliferation, prognosis.*

В последние 10 лет достигнут большой прогресс в области понимания биологических механизмов канцерогенеза при раке молочной железы (РМЖ). Описание C. Perou [15] молекулярно-генетических подтипов РМЖ позволило добавить к «классическим» факторам прогноза (возраст, размер опухоли, стадия заболевания, количество лимфатических узлов с метастазами) параметры генной экспрессии. Это приблизило клиницистов к возможности индивидуализации схем терапии РМЖ. Впоследствии в работах T. Sorlie и C. Cheang была предложена суррогатная молекулярно-генетическая классификация РМЖ на основе иммуногистохимического определения четырех различных маркеров — рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PgR), HER2/neu и пролиферативной активности на основании экспрессии белка Ki-67 [5]. В том виде, в каком она была одобрена экспертами на 12-й Международной Сент-Галленской конференции в 2011 г., эта классификация выглядит следующим образом [9]:

1. Люминальный А — ER(+) и/или PgR(+), HER2/neu(–), Ki-67 <14%.
2. Люминальный В — ER(+) и/или PgR(+), HER2/neu(–), Ki-67 >14% либо HER2/neu(+).
3. HER2-положительный — ER(–), PgR(–), HER2/neu(+).
4. Тройной негативный — ER(–), PgR(–), HER2/neu(–).

Все четыре подтипа РМЖ характеризуются совершенно различной биологией, прогнозом и требуют особых терапевтических подходов. Самым прогностически благоприятным является люминальный А подтип РМЖ, к которому относятся 60—65% от общего количества больных. Прогноз в отношении люминальных В опухолей яв-

© Коллектив авторов, 2012

*Павленко Ирина Аркадьевна* — биолог отд. экспериментальной патоморфологии; 344015 Ростов-на-Дону, ул. Благодатная, 170А; e-mail: foxxtrot@mail.ru

ляется менее благоприятным и одновременно менее определенным. Это обусловлено гетерогенностью опухолей, составляющих данный подтип. Только 30% случаев люминальных В опухолей являются HER2(+), еще 70% имеют формальные признаки люминального А варианта [ER/PgR(+); HER2/neu(–)], но при этом отличаются от него высоким индексом пролиферации (Ki-67 >14%). По-видимому, нельзя считать эти два параметра (HER2/neu и Ki-67) в полной мере определяющими прогноз люминальных В опухолей. Представляется целесообразным поиск дополнительных молекулярных маркеров, уточняющих прогноз течения заболевания рецидива и у больных РМЖ HER2-положительного подтипа. В особенности же это необходимо для тройных негативных РМЖ, наиболее агрессивной группы опухолей с отсутствием экспрессии белков, определяющих прогноз в остальных молекулярно-генетических подтипах.

Одним из кандидатов на роль дополнительного прогностического фактора при РМЖ является антиапоптотический белок Bcl-2. Основным механизмом его действия считается инактивация проапоптотических гомологов семейства Bcl-2 путем димеризации с ними и, как следствие, подавление выхода из митохондрий цитохрома С, необходимого для активации каспаз [2]. Однако анализ клинических данных свидетельствует, что повышенная экспрессия Bcl-2 при РМЖ коррелирует с низким уровнем пролиферации, наличием в опухоли ER и с благоприятным прогнозом в целом [4, 7, 14]. Этот парадоксальный факт объясняли положительной ER-зависимой регуляцией экспрессии Bcl-2 [4]. Получены данные, свидетельствующие о том, что ER(+) РМЖ с отсутствием экспрессии Bcl-2 имеют худший прогноз по сравнению с ER(–) опухолями, клетки которых экспрессируют Bcl-2 [7]. Поэтому, несмотря на то что некоторые тесты, определяющие прогноз для ER(+) пациентов, основаны в том числе на определении уровня мРНК Bcl-2 в опухоли (тест Oncotype DX), оценка уровня экспрессии белка Bcl-2 может предоставить дополнительную информацию для прогноза и ER(–) РМЖ.

## Материалы и методы

Материалом для исследования служили 290 образцов операционного материала инвазивного протокового РМЖ, отобранных из архивов ГБУ РО «ПАБ» и ГБУЗ «ПКПБ» за 2010—2011 гг. Для иммуногистохимического (ИГХ) исследования использовали ready-to-use FLEX антитела к рецепторам эстрогена (ER, клон 1D5), прогестерона (PR, клон PgR636), маркеру пролиферативной активности Ki-67 (клон MIB1) и белку Bcl-2 (клон 124), а также концентрированное поликлональное кроличье антитело к HER2/neu (разведение 1:500). Депарафинирование и демаскировку антигенов во всех случаях, за исключением HER2/neu-тестирования, проводили в модуле предварительной подготовки PT-Link. ИГХ-окрашивание выполняли на автоматическом иммуногистостейнере Dako с использованием системы визуализации EnVision FLEX. Результаты ИГХ-реакции с антителами к ER и PR интерпретировали путем подсчета количества окрашенных ядер опухолевых клеток. При этом, согласно рекомендациям ASCO/CAP, положительными считались такие опухоли, окрашивание в которых наблюдалось хотя бы в 1% клеток. Результаты реакций с анти-Ki-67 антителами оценивали, подсчитывая количество окрашенных ядер на 100 ядер в 3 полях зрения и выражая полученные результаты в процентах. Экспрессию Bcl-2 расценивали как положительную при цитоплазматическом окрашивании более 10% опухолевых клеток [4].

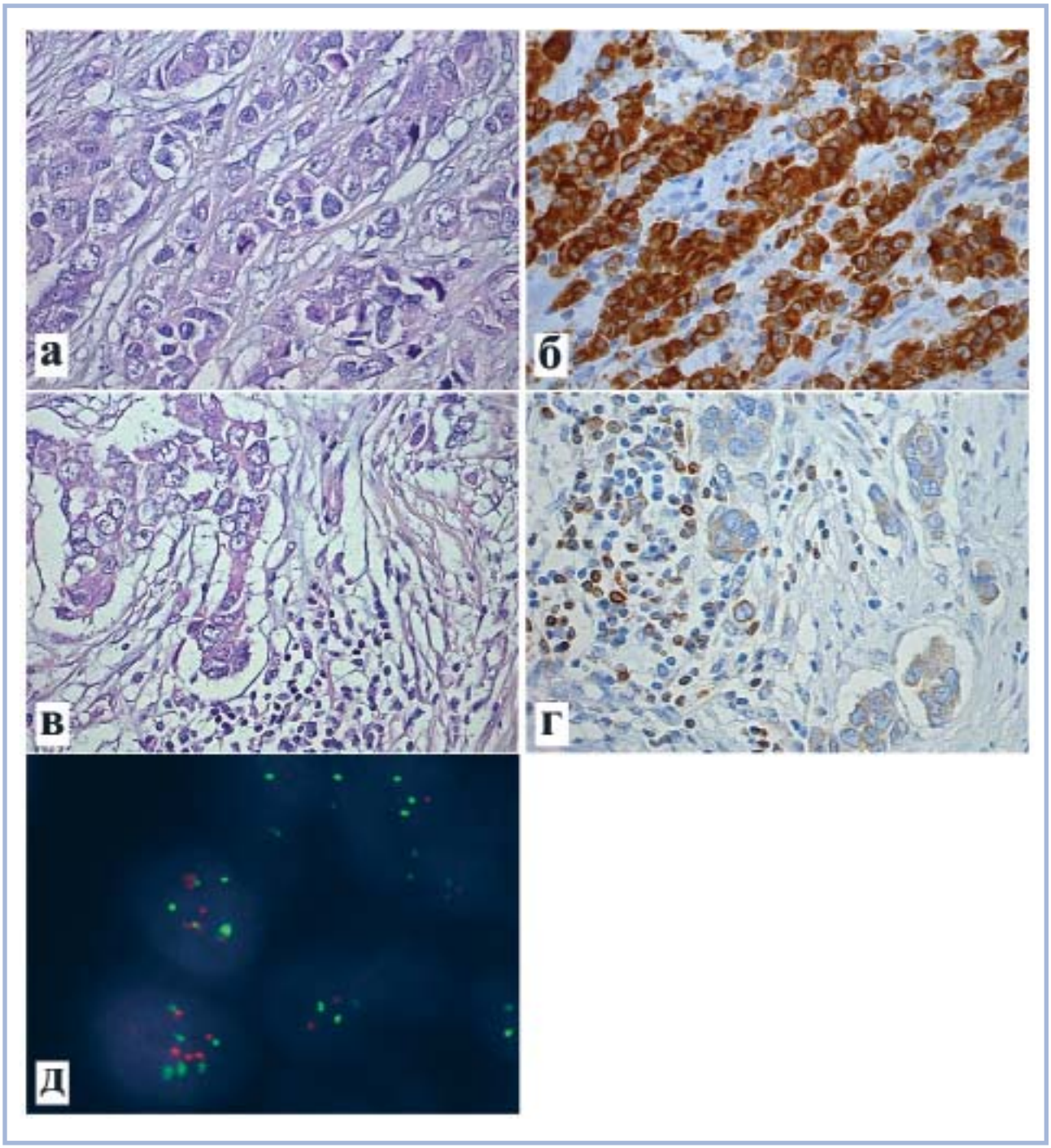
При выполнении HER2/neu-тестирования демаскировку антигенов проводили 40-минутной инкубацией в термостатированной водяной бане при 95 °С с использованием цитратного буфера (pH 6,0). Саму процедуру ИГХ-окрашивания осуществляли на автоматическом иммуногистостейнере Dako с использованием системы визуализации EnVision для кроличьих антител. При оценке реакции с антителами к HER2/neu использовали общепринятую для фармакодиагностики шкалу оценки от 0 до 3+ [1]. FISH-исследование проводили по стандартной методике к набору HER2 FISH pharm Dx™ Kit («Dako»). Для денатурации при 82 °С в течение 5 мин и гибридизации (45 °С, 20 ч) применяли автоматический гибридайзер («Dako»). Амплификацию оценивали с помощью флюоресцентного микроскопа Leica DM RXA при ×100. Оценку наличия/отсутствия амплификации проводили, подсчитывая соотношение красных и зеленых меток (соответствующих меченым участкам гена *HER2/neu* и CEP17) в 20 ядрах. При соотношении красных к зеленым меткам более 2,2 результат считали положительным.

При статистической обработке полученных результатов для оценки достоверности различий между группами использовали критерий $\chi^2$. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

## Результаты и обсуждение

Отобранные по иммунофенотипу и данным FISH-исследования 290 случаев инвазивного протокового РМЖ были разделены на четыре молекулярно-генетические подгруппы. Люминальные А опухоли составили 48,5%, люминальные В — 28,5%, HER2(+) — 8,6% и тройные негативные РМЖ — 14,4%. Все люминальные А РМЖ экспрессировали Bcl-2, причем интенсивность окрашивания колебалась от умеренной до интенсивной и наблюдалась в подавляющем большинстве опухолевых клеток **(см. рисунок а, б)**. Это не противоречит данным литературы, свидетельствующим о выраженной экспрессии Bcl-2 во многих опухолях, в том числе и при РМЖ [4, 7, 8]. Bcl-2 принадлежит к семейству белков, регулирующих уровень апоптоза в клетках [2]. Его хорошо известные антиапоптотические свойства позволяют считать Bcl-2 онкогенным белком. Поэтому на первый взгляд парадоксальным кажется факт наличия экспрессии Bcl-2 в 100% самых прогностически благоприятных люминальных А РМЖ. Однако есть данные, что, помимо антиапоптотических, Bcl-2 обладает и антипролиферативными свойствами. Так, было показано, что как в культивируемых клеточных линиях, так и в опухолях повышенная экспрессия Bcl-2 может удлинять фазу G1 клеточного цикла и замедлять выход покоящихся клеток в клеточный цикл после стимуляции пролиферации ростовыми факторами [16, 17].

В люминальных В опухолях, так же являющихся ER(+), как и люминальные А, экспрессия Bcl-2 обнаруживалась только в 77% случаев, что свидетельствует о существовании в опухолевых клетках наряду с ER-зависимой регуляцией уровня Bcl-2 и других механизмов. Интересно, что в подавляющем большинстве люминальных В опухолей экспрессия Bcl-2 была очаговой, а




**Экспрессия Bcl-2 и генетические аберрации хромосомы 17 в различных молекулярно-генетических подтипах РМЖ.**
а — люминальный А РМЖ, окраска гематоксилином и эозином. ×400; б — люминальный А РМЖ, экспрессия Bcl-2 в цитоплазме опухолевых клеток, FLEX EnVision-DAB. ×400; в — люминальный В РМЖ, окраска гематоксилином и эозином. ×400; г — люминальный В РМЖ, экспрессия Bcl-2 в цитоплазме опухолевых клеток, FLEX EnVision-DAB. ×400; д — тройной негативный РМЖ, Bcl-2(–). Увеличение количества центромер хромосомы 17 (зеленые сигналы), амплификация гена *HER2/neu* (красные сигналы) в ядрах опухолевых клеток, FISH. ×1000.

интенсивность окрашивания колебалась от слабой до умеренно выраженной **(см. рисунок в, г)**. Люминальные В опухоли, не экспрессирующие Bcl-2, имели достоверно более высокий уровень пролиферативной активности по сравнению с Bcl-2-положительными ($p<0,05$), что подтверждает возможность существования у белка Bcl-2 дуалистических функций — не только антиапоптотической, но и антипролиферативной. И если в гемопоэтических опухолях, таких как лимфома зоны мантии или хронический лимфолейкоз, Bcl-2 выступает как ингибитор апоптоза, то в клетках РМЖ более выражен антипролиферативный эффект Bcl-2.

**Результаты FISH-исследования РМЖ с экспрессией Bcl-2 и без нее (*n*=92)**

| FISH-исследование | Экспрессия Bcl-2 | | $\chi^2$ | *p* |
|---|---|---|---|---|
| | + (*n*=69) | – (*n*=23) | | |
| Отсутствие амплификации *HER2/neu*, среднее CEP17 2 сигнала на ядро | 60 | 8 | 21,7227 | 0,0005 |
| Амплификация *HER2/neu* и/или увеличение количества CEP17 | 9 | 15 | | |

Это предположение подтверждается нашими наблюдениями, свидетельствующими о значительном снижении экспрессии Bcl-2 в прогностически неблагоприятных HER2/neu(+) и тройных негативных РМЖ. Только 14% случаев, отнесенных к данным подтипам, являлись Bcl-2-положительными.

Недавно было показано, что HER2/neu(+) и тройные негативные РМЖ с наличием экспрессии Bcl-2, являющиеся ER(–), обладают лучшим прогнозом по сравнению с эстрогенпозитивными люминальными опухолями, в которых экспрессии Bcl-2 не обнаруживается [10]. Более того, белок Bcl-2 может являться не только важным прогностическим, но и предсказательным фактором в HER2/neu(+) и тройных негативных РМЖ. Показано, что имеется прямая корреляционная связь между уровнем экспрессии Bcl-2 и резистентностью опухоли к химиотерапии и терапии трастузумабом [3, 6]. Данный факт свидетельствует о необходимости включения Bcl-2 в стандартную иммуногистохимическую панель тестирования РМЖ.

Замечено, что в дополнение к антиапоптотическим и антипролиферативным свойствам Bcl-2 оказывает влияние на генетическую стабильность в опухолях. Так, показано, что этот белок ингибирует репарацию двунитевых разрывов ДНК [11, 12]. Мы попытались оценить взаимосвязь Bcl-2 с другими генетическими аберрациями — амплификацией гена *HER2/neu* и центромерного региона хромосомы 17. Они могут быть выявлены при определении статуса HER2/neu в опухоли с помощью FISH. Принято считать, что, если количество центромерных сигналов в опухоли отличается от стандартных двух сигналов на ядро, это свидетельствует об анеуплоидии, чаще всего — полисомии хромосомы 17, хотя в последнее время появились сообщения, опровергающие данное положение [13, 18]. Так, I. Yeh и соавт. [18] с помощью полногеномного анализа показали, что полисомия хромосомы 17 — очень редкое явление при РМЖ, гораздо чаще наблюдается амплификация ее центромерного региона. В связи с этим мы не пользуемся термином «полисомия» в отношении наблюдающегося при РМЖ увеличения количества CEP17.

FISH-исследование было проведено на образцах опухолевой ткани 92 пациентов — случайным образом отобранных из всех молекулярно-генетических подгрупп в соответствии с их долями в выборке (45 люминальных A, 26 люминальных B, 8 HER2(+) и 13 тройных негативных РМЖ). Анализ полученных данных показал, что в Bcl-2(+) РМЖ очень редко (в 2,4% случаев) наблюдаются такие генетические аберрации, как амплификация *HER2/neu* в сочетании с увеличением CEP17 до 3 и более в одном ядре. Сравнительно редко (в 7,2 и 5,3% случаев) наблюдаются увеличение количества CEP17 и амплификация *HER2/neu* соответственно. Вместе с тем в опухолях с отсутствием экспрессии Bcl-2 сочетанные аберрации (как в центромерном регионе хромосомы 17, так и в гене *HER2/neu*) выявляются в 28% исследованных образцов **(см. рисунок, д)**, а общее количество случаев с тем или иным генетическим нарушением достигает 65%.

Если представить данные FISH-исследования в виде четырехпольной таблицы, вычисленному значению критерия $\chi^2$, равному 21,7227, будет отвечать уровень значимости *p*=0,0005 **(см. таблицу)**. Это означает, что существует статистическая взаимосвязь характера экспрессии Bcl-2 с наличием амплификаций на хромосоме 17, причем степень связи между этими признаками («фи»=0,49) позволяет расценивать ее как относительно сильную. И действительно, вероятность возникновения амплификаций в 5,3 раза (95% ДИ — 2,4—11,3) больше в опухолях с отсутствием экспрессии Bcl-2.

Таким образом, наши данные расходятся с имеющимися в литературе сведениями о сочетании экспрессии Bcl-2 с формированием генетически нестабильной популяции опухолевых клеток. Это требует дальнейшего изучения той роли, которую играет Bcl-2 в инициации и прогрессии различных молекулярно-генетических подгрупп РМЖ. Несомненно также, что Bcl-2, являясь центральной фигурой множества регуляторных систем клетки, таких как апоптоз, пролиферация и поддержание генетической стабильности в опухоли, заслуживает пристального внимания как возможный дополнительный прогностический и предсказательный фактор при РМЖ.

## Выводы

1. Bcl-2 влияет на такие важнейшие клеточные программы, как контроль над клеточным циклом и апоптоз. При РМЖ антипролиферативные функции Bcl-2 преобладают над антиапоптотическими, что проявляется статистически значимым повышением индекса Ki-67 в опухолях с отсутствием экспрессии Bcl-2 по сравнению с Bcl-2-положительными.

2. 14% всех Bcl-2-положительных РМЖ характеризуются отсутствием экспрессии ER. Они принадлежат к HER2/neu(+) и тройному негативному молекулярно-генетическим подтипам РМЖ. 33% опухолей с отсутствием экспрессии Bcl-2, наоборот, являются ER(+) и принадлежат к люминальному B подтипу. Среди люминальных A опухолей не обнаруживается случаев с потерей экспрессии Bcl-2.

3. Утрата экспрессии Bcl-2 люминальными B опухолями может свидетельствовать о неблагоприятном прогнозе, так как наряду с увеличением уровня пролиферации в клетках этих опухолей нарастает и генетическая нестабильность, маркером которой служат комплексные генетические перестройки на хромосоме 17, такие как амплификация *HER2/neu* и/или региона CEP17.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Рязанцева А.А., Франк Г.А.* Исследование HER2/neu-статуса рака молочной железы. Методические аспекты. Архив патологии. 2011; 1: 51—4.
2. *Райхлин Н.Т., Райхлин А.Н.* Регуляция апоптоза в физиологических условиях и в опухолях. Вопросы онкологии. 2002; 48 (2): 159—71.
3. *Abdel-Fatah T., Dickinson P., Moseley P.* Bcl2 as a surrogate prognostic and predictive marker in triple-negative breast cancer. J. Clin. Oncol. 2011; 29 (suppl.): abstr 1024.
4. *Callagy G., Pharoah P., Pinder S., Hsu F., Nielsen T., Ragaz J. et al.* Bcl-2 Is a prognostic marker in breast cancer independently of the nottingham prognostic index. Clin. Cancer. Res. 2006; 12 (8): 2468—75.
5. *Cheang M., Chia S., Voduc D., Gao D., Leung S., Snider J. et al.* Ki-67 index, HER2/neu status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. J. Natl. Cancer Inst. 2009; 101 (10): 736—50.
6. *Crawford A., Nahta R.* Targeting Bcl-2 in herceptin-resistant breast cancer cell lines. Curr. Pharm. Person. Med. 2011; 9 (3): 184—90.
7. *Dawson S., Makretsov N., Blows F., Driver K., Provenzano E., Le Quesne J. et al.* BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. Br. J. Cancer. 2010; 103 (5): 668—75.
8. *Frenzel A., Grespi F., Chmelewskij W., Villunger A.* Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. Apoptosis. 2009; 14 (4): 584—96.
9. *Goldhirsch A., Wood W., Coates A., Gelber R., ThÜrlimann B., Senn H.* Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Ann. Oncol. 2011; 22 (8): 1736—47.
10. *Kallel-Bayoudh I., Hassen H., Khabir A., Boujelbene N., Daoud J., Frikha M. et al.* Bcl-2 expression and triple negative profile in breast carcinoma. Med. Oncol. 2011; 28 (suppl. 1): 55—61.
11. *Kumar T., Kari V., Choudhary B., Nambiar M., Akila T., Raghavan S.* Anti-apoptotic protein BCL2 down-regulates DNA end joining in cancer cells. J. Biol. Chem. 2010; 285 (42): 32657—70.
12. *Laulier C., Barascu A., Guirouilh-Barbat J., Pennarun G., Le Chalony C., Chevalier F. et al.* Bcl-2 inhibits nuclear homologous recombination by localizing BRCA1 to the endomembranes. Cancer Res. 2011; 71 (10): 3590—602.
13. *Marchio C., Lambros M.B., Gugliotta P., Di Cantogno L., Botta C., Pasini B. et al.* Does chromosome 17 centromere copy number predict polysomy in breast cancer? A fluorescence in situ hybridization and microarray-based CGH analysis. J. Pathol. 2009; 219 (1): 16—24.
14. *Martinez-Arribas F., Alvarez T., Del Val G., Martín-Garabato E., Núñez-Villar M., Lucas R. et al.* Bcl-2 expression in breast cancer: A comparative study at the mRNA and protein level. Anticancer Res. 2007; 27 (1A): 219—22.
15. *Perou C., Sørlie T., Elsen M., van de Rijn M., Jeffrey S., Rees C. et al.* Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000; 406 (6797): 747—52.
16. *Rossiter H., Beissert S., Mayer C., Schön M., Wienrich B., Tschachler E. et al.* Targeted expression of bcl-2 to murine basal epidermal keratinocytes results in paradoxical retardation of ultraviolet- and chemical-induced tumorigenesis. Cancer Res. 2001; 61 (9); 3619—26.
17. *Vairo G., Soos T., Upton T., Zalvide J., DeCaprio J., Ewen M. et al.* Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. Mol. Cell Biol. 2000; 20 (13): 4745—53.
18. *Yeh I.T., Martin M.A., Robetorye R.S., Bolla A.R., McCaskill C., Shah R.K. et al.* Clinical validation of an array CGH test for HER2/neu status in breast cancer reveals that polysomy 17 is a rare event. Mod. Pathol. 2009; 22 (9): 1169—75.


Поступила 02.04.2012