



УДК 616–006.6–091

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ
АНТИАПОПТОТИЧЕСКОГО БЕЛКА BCL₂ ПРИ СПОРАДИЧЕСКОМ
И АССОЦИИРОВАННОМ С МУТАЦИЕЙ 5382 INSC ГЕНА BRCA1 РАКЕ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

**COMPARATIVE STUDY OF ANTIAPOPTOTIC PROTEIN BCL₂ EXPRESSION IN
SPORADIC AND ASSOCIATED WITH 5382 INSC MUTATION OF BRCA1
GENE BREAST CANCERS**

**И.К. Аристова, А.А. Должиков, М.И. Чурносков, Т.С. Мухина,
Н.В. Павлова, Р.Р. Хабибуллин
I.K. Aristova, A.A. Dolzhikov, M.I. Churnosov, T.S. Mukhina,
N.V. Pavlova, R.R. Khabibulin**

*Белгородский государственный национальный исследовательский университет
Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, д. 85*

*Belgorod National Research University
Russia, 308015, Belgorod, Pobedy St., 85*

E-mail: dolzhikov@bsu.edu.ru

Аннотация. Проведено исследование частоты мутаций гена BRCA1 у пациенток с раком молочной железы и в популяционном контроле и анализ ассоциации экспрессии антиапоптотического белка bcl2 с выявленным вариантом мутации 5382 insC, частота которого составила 3,2%. При гистологическом и иммуногистохимическом исследовании установлено, что опухоли при наличии данной мутации характеризуются высокой пролиферативной активностью клеток и выраженностью апоптоза. В сравнении со спорадическими опухолями в них достоверно снижен уровень экспрессии антиапоптотического белка bcl2. Иммуногистохимическое определение содержания данного белка может служить дополнительным косвенным методом при генетическом анализе и целесообразно при наличии других клинических признаков, указывающих на вероятность наличия мутации для оптимизации скрининга мутаций гена BRCA1, особенно у пациенток молодого возраста.

Resume. A BRCA1 gene frequencies among breast cancer patients (n=217) and in population control (n=160) were studied. A 5382insC BRCA1 gene's mutation frequency was 3.2 % in breast cancer patients group. The analysis of association of bcl2 expression with 5382insC BRCA1 was performed. Also, the bcl2 expression among sporadic tumors group (n=66) was studied.

Histological and immunohistochemical methods with computer assisted analysis were used. The data show that 5382insC variant of BRCA1 gene mutation associated tumors are characterized by high proliferative and apoptotic activity. Comparing with sporadic tumors in mutation associated cases the expression of bcl2 is significantly decreased. Immunohistochemical reaction on bcl2-protein may be a sign of BRCA1 mutation, if other clinical indicators of its possibility are present, and, on our opinion, is reasonable to optimize the screening of mutations, especially in young patients.

Ключевые слова: рак молочной железы, BRCA1 мутации, белок bcl2.
Keywords: breast cancer, BRCA1 mutations, bcl2 protein.

Введение

Рак молочной железы является основным в структуре онкологической заболеваемости среди женщин. 10% составляет наследственный рак, связанный с дефектами генов BRCA1 и BRCA2. В настоящее время описано более 1000 мутаций гена BRCA1. До 90% из них в различных географических регионах составляет вариант 5382insC. Данный аллель обнаруживается в 2-5% в структуре общей заболеваемости раком молочной железы [Бит-Сава и др., 2010]. Охарактеризованы клинические, морфологические и биологические особенности BRCA1-ассоциированных карцином молочной железы [Бит-Сава и др., 2014, Имянитов Е.Н. 2010, Da Silva L., lakhani S.R. 2010]. Опухоли, ассоциированные с мутациями генов BRCA1 и BRCA2, выделены в

отдельные категории, называемые BRCA1 и BRCA2 синдромами [WHO classification, 2012, p176]. При этом молекулярно-биологические характеристики наследственных карцином, имеющие значение для прогноза эффективности терапии и течения заболевания, остаются предметом исследований отечественных и зарубежных авторов.

Цель

Изучение частоты мутаций генов BRCA1 и BRCA2 среди больных раком молочной железы в Белгородской области; сравнительный анализ экспрессии белка-регулятора апоптоза bcl2 в спорадических и BRCA1-ассоциированных опухолях для оптимизации скрининга мутаций, определяющих риск развития рака молочной железы.

Материалы и методы

Исследование выполнено в трех группах: две группы составили 377 женщин, у которых проведено скрининговое молекулярно-генетическое исследование наличия мутаций в генах BRCA1, BRCA2, из которых было 217 пациенток с раком молочной железы и 160 здоровых женщин; третью группу составили 66 случаев спорадического рака молочной железы. Молекулярно-генетическое исследование выполнено в лаборатории молекулярной генетики кафедры медико-биологических дисциплин. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование выполнено с помощью Real-time полимеразной цепной реакции с дискриминацией аллелей методом TaqMan зондов.

Белок bcl2 выявляли иммуногистохимическим методом с применением моноклональных антител (клон 124) в материале со стандартных архивных парафиновых блоков, а также с применением технологии Tissue Microarrays. С учетом возможной гетерогенности опухолей для изготовления мультиблоков из опухолевых узлов или лимфоузлов с метастазами брали по два образца из репрезентативных участков. Всего иммуногистохимически исследовано 47 образцов опухолей при наличии мутации и 66 образцов спорадических опухолей. В ходе исследования группа с наличием мутации была накоплена в количестве 15 наблюдений, в которых имелась полная клиническая информация и иммунофенотипирование опухолей (экспрессия рецепторов эстрогенов, прогестерона, белка Her2/neu). Полуколичественную оценку содержания белка осуществляли на компьютерных изображениях сканированных микропрепаратов. Внутренним контролем качества и интенсивности реакции служили лимфоциты. Количественные данные обработаны с применением параметрических и непараметрических (коэффициенты Пирсона, Фишера) статистических методов.

Результаты и обсуждение

Среди 217 пациенток с раком молочной железы у 7 (3.2%) выявлен 5382insC вариант мутации гена BRCA1. Ни в одном случае не выявлено 185delAG мутации в гене BRCA1 и 6174delT мутации в BRCA2. Скрининг этих мутаций у 160 здоровых женщин выявил гомозиготный статус.

Средний возраст пациенток с раком молочной железы при наличии мутации BRCA1 5382insC (41.2 года) достоверно ($p < 0.05$) меньше, чем при спорадическом раке (59.1 лет).

При наличии генетически доказанной мутации BRCA1 и клинических признаках, указывающих на высокую вероятность ее наличия (билатеральный рак) выявлена высокая пролиферативная активность опухолевых клеток как по количеству митозов, в том числе патологических (рис. 1), так и количеству клеток с экспрессией ядерного белка Ki67. В последнем случае индекс ki67 превышал 50% (рис. 1). Также выявлена высокая выраженность апоптоза опухолевых клеток (рис. 2). Гистологически все опухоли были инвазивными протоковыми карциномами.

В 66.7% BRCA1-ассоциированные опухоли были эстроген-рецепторнегативными, тогда как при спорадическом раке более 70% опухолей рецептор-позитивные. Гиперэкспрессия белка Her2/neu при наличии мутации выявлена только в 1 случае из 7. При иммуногистохимическом исследовании содержания белка bcl2 нами выявлены достоверные отличия между спорадическими и BRCA1-ассоциированными опухолями. При обоих типах опухолей выявлена связь с гистологическими вариантами, дифференцировкой опухолевых структур и их инвазивностью.

В BRCA1-ассоциированных опухолях в трети наблюдений экспрессия bcl2 не выявлена (в спорадических опухолях она отсутствовала только в 3.3%). В 60% она была низкой (в спорадических опухолях в 8.5%), средний (сопоставимый с содержанием в цитоплазме лимфоцитов) уровень экспрессии белка выявлен в 6.1% (в спорадических опухолях в 29.8%). Высокое содержание белка в цитоплазме опухолевых клеток выявлено в 57.4% в спорадических

опухолей и не наблюдалось в BRCA1-ассоциированных.

Показательными были иммуногистохимические отличия содержания bcl2 в метастатических клетках в сопоставлении с окружающими лимфоцитами (рис. 3), а также между опухолевыми клетками, в том числе при внутрипротоковых раках, и внутриопухолевыми лимфоцитами или миоэпителиальными клетками (рис. 4).

В метастатических клетках реакция на bcl2 была низкой или отсутствовала. Во внутрипротоковых опухолевых структурах также была низкой в BRCA1-ассоциированных карциномах. В спорадических карциномах низкий уровень экспрессии bcl2 выявлен в инвазивных структурах. При этом в неинвазивном внутрипротоковом компоненте интенсивность реакции была высокой (см.рис. 4). Таким образом, низкая интенсивность реакции на bcl2 или ее отсутствие характеризуют BRCA1-ассоциированные карциномы и более агрессивные инвазивные и метастатические структуры как в связанных с мутацией, так и спорадических карциномах.

Также выявлена связь экспрессии bcl2 с гистологическим типом и, соответственно, дифференцировкой опухолевых структур как при BRCA1-ассоциированных, так и спорадических карциномах (рис. 5). В более дифференцированных железистых структурах уровень экспрессии был выше, чем в менее дифференцированных трабекулярных структурах и разрозненно растущих опухолевых клетках.

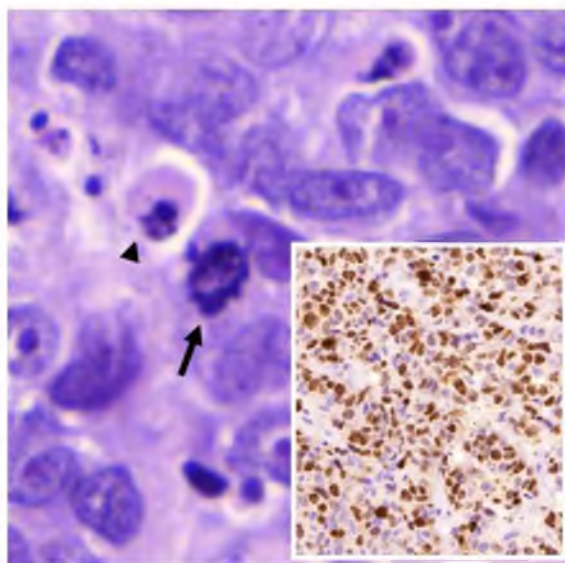


Рис. 1. Билатеральная инвазивная протоковая карцинома: высокая пролиферативная активность опухолевых клеток (на вставке-индекс Ki67 больше 50%), патологический митоз (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, иммуногистохимическая реакция на Ki67 (вставка). Микрофото×200

Fig. 1. Bilateral invasive ductal carcinoma: high proliferative activity of tumor cells (Ki67 index is higher than 50%-insertion) B – pathological mitosis (arrow). Hematoxylin and eosin stain, immunohistochemical reaction (insertion), ×200

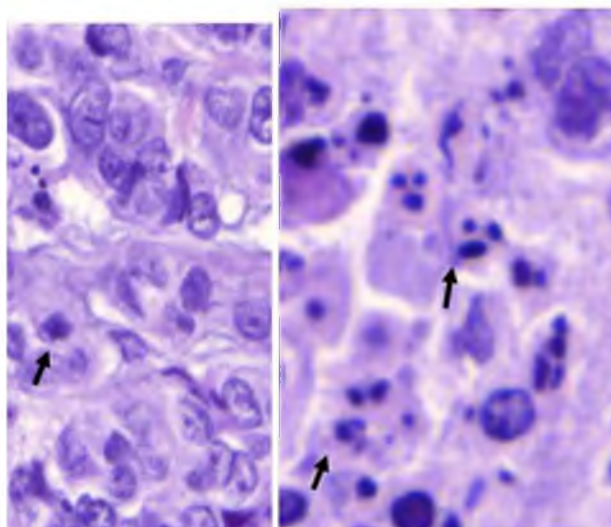


Рис. 2. Билатеральная инвазивная протоковая карцинома. Выраженный апоптоз опухолевых клеток (на стрелках). Окраска гематоксилином и эозином. Микрофото×400

Fig. 2. Bilateral invasive ductal carcinoma Multiple apoptotic cells (arrows). Hematoxylin and eosin stain×400

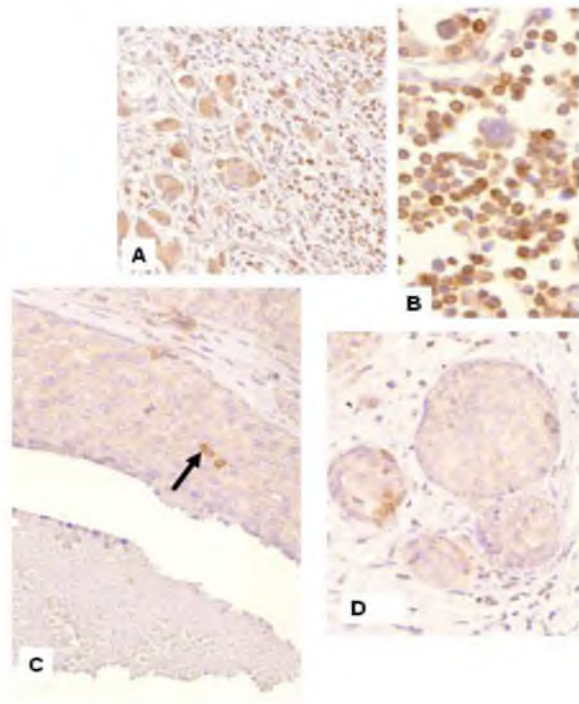


Рис. 3. Экспрессия bcl2 в BRCA1-ассоциированных карциномах молочной железы: низкий уровень (A) и отсутствие экспрессии (B) в метастатических клетках. C, D – низкий уровень экспрессии в карциномах in situ; стрелка указывает на внутриопухолевые лимфоциты со средним уровнем экспрессии.

Иммуногистохимические реакции. Микрофото $\times 200$ (C, D), $\times 400$ (A, B)

Fig. 3. Expression of bcl2 in BRCA1-associated breast carcinomas: low level (A) and no expression (B) in metastatic cells, C, D- low level in «in situ» carcinoma (arrow –intratumoral lymphocytes with moderate expression).

Immunohistochemical reaction $\times 200$

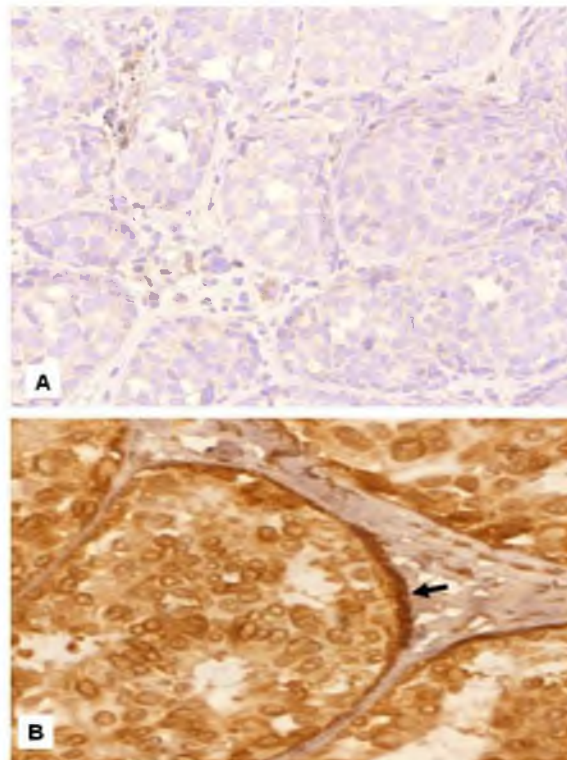


Рис. 4. Отсутствие экспрессии bcl2 в инфильтративно растущих структурах (A) и высокое его содержание при внутрипротоковом росте (B) в спорадической карциноме молочной железы (на стрелке - миоэпителиальная клетка с высоким уровнем экспрессии белка). Иммуногистохимическая реакция. Микрофото $\times 200$

Fig. 4. The absence of bcl2 expression in infiltrative structures (A) and high level of protein in intraductal growth (B) of sporadic breast cancer. Immunohistochemical reaction $\times 200$

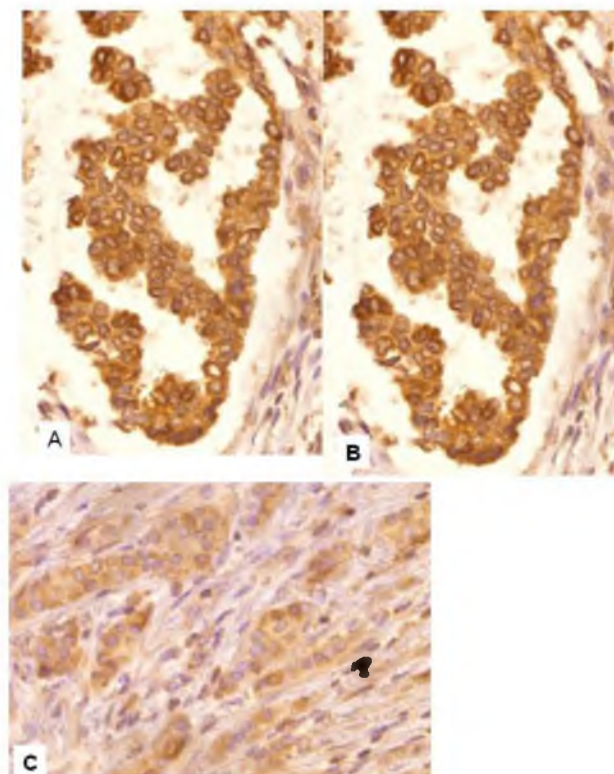


Рис. 5. Экспрессия bcl2 при различной гистологической структуре BRCA1-ассоциированной карциномы молочной железы. Среднее (А) и высокое (В) содержание белка в дифференцированных железистых структурах, низкое содержание белка в малодифференцированных трабекулярных структурах (С). Иммуногистохимическая реакция. Микрофото $\times 200$

Fig. 5. Expression of bcl2 in different histological structure of BRCA1 associated carcinomas. Moderate (A) and high (B) level of protein in differentiated glandular structures, low expression of protein in poorly differentiated trabecular structures (C). Immunohistochemical reaction $\times 200$

В литературе имеются исследования, которые свидетельствуют о прогностическом значении экспрессии белка bcl2 и ее связей с другими биологическими характеристиками карцином молочной железы [Hellemans et al, 1995; Larsen et al, 2012; Dong et al, 2013; Silverstrini et al, 2015].

Эстрогены инициируют транскрипцию гена bcl2, поэтому уровень синтеза белка в опухолевых клетках отражает активность рецепторов эстрогенов [Larsenet al.,2012]. Нами выявлена высокая частота рецептор-негативных опухолей, что согласуется с данными литературы о характерности низкого содержания рецепторов эстрогенов для BRCA1-ассоциированных опухолей [Da Silva, Lakhani, 2010]. Экспрессия bcl2 связана с молекулярно-генетическими (функциональными) подтипами рака молочной железы. В исследовании отечественных авторов [Павленко, 2012]. В люминальных типах А во всех случаях выявлена экспрессия bcl2 от умеренной до интенсивной с наличием ее в большинстве клеток, в люминальных В опухолях экспрессия выявлена в 77% случаев, отличаясь очаговым характером и интенсивностью реакции от слабой до интенсивной. Опухоли, не экспрессирующие bcl2, отличались достоверно большей пролиферативной активностью. Наличие экспрессии антиапоптотического белка bcl2 в карциномах люминального типа А и большая пролиферативная активность в рецептор-негативных опухолях свидетельствуют о наличии у данного белка также антипролиферативной активности. Об этом же свидетельствует значительное снижение экспрессии bcl2 в прогностически неблагоприятных Her2/neu-позитивных и тройных негативных карциномах молочной железы. Только в 14% опухолей данных подтипов выявлена экспрессия bcl2. В ряде других исследований также показано, что Her2/neu-позитивные и тройные негативные опухоли, экспрессирующие bcl2, отличаются лучшим прогнозом, чем опухоли люминального подтипа без экспрессии данного белка [8]. Вероятность возникновения амплификаций гена Her2/neu в 5,3 раза выше в опухолях с отсутствием экспрессии bcl2. Ряд авторов [Kumar et al., 2010, Laulier et al., 2011] установили ингибирующее влияние белка на репарацию двунитевых разрывов ДНК. Имеется данные и о влиянии мутаций в генах BRCA1,2 на регуляторы апоптоза, в том числе функции гена и белка bcl2. В исследовании Yang, et al [2002] выявлена положительная корреляция между экспрессией BRCA1 и bcl2, но не установлено связей с экспрессией Вах и р53. Утрата экспрессии bcl2 коррелировала с низкой дифференцировкой опухолей и метастазированием в лимфатические узлы. Авторы считают, что bcl2 может быть одним из генов-мишеней, вовлеченных в канцерогенез

при BRCA1-ассоциированном раке молочной железы. Имеются исследования, в которых установлено, что низкая экспрессия bcl2 характерна для большинства BRCA1-ассоциированных раков молочной железы, и с этим связана высокая активность апоптоза и пролиферации опухолевых клеток при данном варианте карцином [Freneaux, 2000].

В мета анализе Dong Y., Li-Quang W. et al [2013]. показано, что хороший ответ на химиотерапию коррелирует с низкой экспрессией bcl2. Этому соответствует тот факт, что цитотоксические агенты, действующие через повреждение ДНК или микротрубочек, могут быть ингибированы bcl2.

В отечественных исследованиях [Бит-Сава и др., 2014] установлена эффективность неоадъювантной химиотерапии у больных с мутацией BRCA1 5382insC, что согласуется с приведенными выше данными о роли bcl2 и изменениях его экспрессии при BRCA1-ассоциированных карциномах.

Результаты выполненного нами генотипирования соответствуют имеющимся данным [Иьянитов, 2010] о наибольшей распространенности мутации 5382insC.

В исследованной нами выборке случаев BRCA1-ассоциированных карцином наблюдались характерные для данного варианта рака молочной железы особенности: меньший возраст пациенток в сопоставлении со случаями спорадических опухолей, протоковый гистологический вариант, высокая частота эстроген-рецептор-негативного статуса, высока пролиферативная активность и выраженность апоптоза.

Результаты иммуногистохимического исследования и их сопоставление с данными литературы свидетельствуют о наличии ассоциации между уровнем синтеза антиапоптотического белка bcl2 и мутацией 5382insC в гене BRCA1. Низкое содержание белка отражает выраженность апоптоза опухолевых клеток. С другой стороны, опухолевые клетки при этом приобретают более высокую пролиферативную активность, что определяет большую инвазивность и метастатический потенциал. Гипотетически механизм ассоциации уровня белка bcl2 с мутацией BRCA1 может быть обусловлен ролью продукта данного гена как транскрипционного регулятора. При наличии мутации, возможно, снижается транскрипция гена bcl2. Поскольку BRCA1-ассоциированные карциномы молочной железы в значительном числе случаев эстроген-рецептор негативные, а транскрипция bcl2 зависит от действия стероидных гормонов, можно допустить и эстроген-зависимые пути снижения экспрессии bcl2 при мутации в гене BRCA1.

В связи с указанным интерес представляет поиск прямых свидетельств гипотезированных взаимосвязей, а также изучение других регуляторов апоптоза, клеточного роста, факторов, определяющих инвазивный и метастатический потенциал карцином молочной железы.

Заключение

У пациенток с раком молочной железы в Белгородской области основным является 5382insC-вариант мутации гена BRCA1, частота которого составляет 3.2%.

Опухоли при наличии данной мутации характеризуются высокой пролиферативной активностью клеток и выраженностью апоптоза. В сравнении со спорадическими опухолями в них достоверно снижен уровень экспрессии антиапоптотического белка bcl2. Иммуногистохимическое определение содержания данного белка может служить дополнительным методом при генетическом анализе и целесообразно при наличии других клинических признаков, указывающих на вероятность наличия мутации для оптимизации скрининга мутаций гена BRCA1, особенно у пациенток молодого возраста.

Список литературы References

Бит-Сава Е.М., Семиглазов В.Ф., Имянитов Е.Н. 2014. Генотип-фенотипические корреляции к больных раком молочной железы с мутациями BRCA1 9 415 delA, 185delAG, 538 insC. Опухоли женской репродуктивной системы. 2: 8-11.

Bit-Sava E.M., Semiglazov V.F., Imjanitov E.N. 2014. Genotip-fenotipicheskie korreljacji k bol'nyh rakom molochnoj zhelezy s mutacijami BRCA1 9 415 delA, 185delAG, 538 insC. Opuholi zhenskoj reproduktivnoj sistemy [Genotype-phenotypical correlations to patients with cancer of a mammary gland with mutations of BRCA1 9 415 delA, 185delAG, 538 insC. Tumors of women's reproductive system]. 2: 8-11. (in Russian)

Имянитов Е.Н. 2010. Наследственный рак молочной железы. Практическая онкология, 11 (4): 259-266.

Imjanitov E.N. 2010. Nasledstvennyj rak molochnoj zhelezy [Hereditary breast cancer]. Prakticheskaja onkologija, 11 (4): 259-266. (in Russian)

Павленко И.А., Повилайтите В.Э., Горелик М.З., Петров А.В. 2012. Bcl-2 как прогностический фактор в различных молекулярно-генетических подтипах рака молочной железы. Архив патологии. 5: 36-40.

Pavlenko I.A., Povilajtite V.E., Gorelik M.Z., Petrov A.V. 2012. Bcl-2 kak prognosticheskij faktor v razlichnyh



molekuljarno-geneticheskikh podtipah raka molochnoj zhelezy [Bcl-2 as a predictive factor in various molecular and genetic subtypes of a breast cancer]. *Arhiv patologii*. 5: 36-40. (in Russian)

Castellsagué X, Coll T, Mañas S, Escobedo A, Moreno A, Fabra A. 1998. Expression of death-related genes and their relationship to loss of apoptosis in T1 ductal breast carcinomas. *Int J Cancer*. Apr 17; 79 (2):103-10.

Da Silva L., Lakhani S.R. 2010. Pathology of hereditary breast cancer. *Mod. Pathol.* 9 (23): 46-51.

Dong Y., Li-Quang W. 2013. Bcl-2 expression predicts sensitivity to chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of experimental and clinical cancer research*, 32:105.

Freneaux P., Stoppa-lyonnet D., Kambouhner M., Nicolas A., Zafrani B., Vincent-Salomon A. 2000. Low expression of bcl2 in Brcal-associated breast cancers. *Journal of cancer* 83910, 2316-1322.

Hassen H., Khabir A., Boujelbene N., Daoud J., Frikha M. 2011. Bcl-2 expression and triple negative profile in breast carcinoma. *Med. Oncol.* 28 (suppl.1): 55-61.

Hellemans P., van Dam D., Weyler Oosterom A., Buytatrt P., van Marck T. 1995. Prognostic value of bcl-2 expression in breast. *Cancer. Br. J Cancer* 72: 564-560.

Kallel-Bayouhd I., Hassen H., Khabir A., Boujelbene N., Daoud J., Frikha M. 2011. Bcl-2 expression and triple negative profile in breast carcinoma. *Med. Oncol.* 28 (suppl.1): 55-61

Kumar T., Kari V., Choudhary B., Nambiar A., Akila T., Raghavan S. 2010. Anti-apoptotic protein BCL2 down-regulates DNA end joining in cancer cells. *J. Biol. Chem.* 285 (42): 32657-70.

Larsen M.S., Bjerre K., Giobbie-Kurder A., Lenkholm A-V., Henriksen L., Filerten B., Lykesfeldt A.E. 2012. Prognostic value of bcl2 in two independent populations of estrogen positive breast cancer patients treated with adjuvant endocrine therapy. *Acta oncol* July, 51 (6): 781-789.

Lakhani S. R., Ellis I. O., Schnitt S.J., Hoon Tan P., Marc J. van de Vijver., 2012. WHO classification of tumours of the breast. Editors; IARC Lyon., p. 176.

Laulier C., Barascu A., Guirouilh-barbat J., Pamarun G., Le Chalony C., Chevalier F., 2011. Bcl-2 inhibits nuclear homologous recombination by localizing BRCA1 to the endomembranes. *Cancer Res.* 71 (10): 3590-602.

Leek R., Kaklamanis I., Pezzella F., Harris. A91994. Bcl-2 in normal breast and carcinoma, association with estrogen-receptor positive, epidermal growth factor receptor-negative tumors and in situ cancer. *Br J Cancer* 69: 235-139.

Silverstrini R., Veneroni S., Diadone M., Benini E., Borracchi P., Mezzetti m., Fronzo G., Rilke F., Veronezi K 1994. The BCL-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node negative cancer patients. *Natl cancer Inst* 86: 499-504.

Yang Q., Yoshimura G., Nakamura M., Nakamura Y., Suzuma T., Umemura T, Mori I, SakuraiT., Kakudo K. 2002. Correlation between BRCA1 expression and apoptosis-related biological parameters in sporadic breast carcinomas. *Anticancer Res.* Nov-Dec; 22 (6B):3615-9.