



Алимходжаева Л.Т.✉, Бозорова Л.М., Зиеведенова С.С.
Республиканский специализированный научно-практический центр онкологии
и радиологии, Ташкент, Узбекистан

Результаты иммуногистохимических исследований экспрессии маркеров регуляции клеточного цикла, пролиферации и апоптоза при различных видах неоплазий добавочной доли молочной железы

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Алимходжаева Л.Т. – идея написания статьи; Бозорова Л.Т. – сбор данных; Зиеведенова С.С. – анализ и статистическая обработка данных.

Подана: 19.02.2024

Принята: 21.03.2024

Контакты: doclola_71@mail.ru

Резюме

Цель. Определение экспрессии маркеров регуляции клеточного цикла, пролиферации и апоптоза (p53, Ki-67, Bcl-2) при различных видах неоплазий добавочной доли молочной железы.

Материалы и методы. Исследование основано на результатах ретроспективного обследования 182 пациенток, проходивших лечение заболеваний добавочной доли молочной железы в РСНПМЦОиР и в Наманганском филиале РСНПМЦОиР с 2010 по 2022 г. Пациентки были разделены на 4 группы в соответствии с результатами морфологического обследования.

Результаты. В целом сопоставление профилей экспрессии маркеров p53, Ki-67, Bcl-2 показало, что для микроинвазивного рака добавочной доли было характерно сочетание повышения экспрессии p53 и Ki-67. Реже всего экспрессия p53 и Ki-67 определялась у пациентов с высокодифференцированным интритипротокальным раком, внутридольковым раком и дисплазией добавочной доли молочной железы. В то же время Bcl-2 экспрессировался при этих видах неоплазии значительно чаще, демонстрируя разнонаправленные тенденции с p53 и Ki-67.

Выводы. Гистологическое исследование при неоплазиях добавочной доли молочной железы следует дополнять иммуногистохимическим анализом, результаты которого позволяют осуществлять дифференциальную диагностику различных видов неоплазий в добавочной доле молочной железы и дают возможность уточнения прогноза заболевания. Для оценки инвазивного потенциала неоплазий добавочной доли молочной железы целесообразно использовать следующие гистологические и иммуногистохимические признаки: степень дифференцировки клеток; наличие некроза; наличие поляризации; экспрессию эстрогеновых и прогестероновых рецепторов; экспрессию p53, Bcl-2, Ki-67.

Ключевые слова: рак добавочной доли молочной железы, иммуногистохимия

Alimkhodzhaeva L., Bozorova L., Zievedenova S.
Republican Specialized Scientific and Practical Center for Oncology and Radiology,
Tashkent, Uzbekistan

Results of Immunohistochemical Studies of Expression of Markers of Cell Cycle Regulation, Proliferation and Apoptosis in Different Types of Neoplasia of the Accessory Lobe of the Mammary Gland

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Alimkhodzhaeva L. – the idea of writing an article; Bozorova L. – data collection; Zievedenova S. – analysis and statistical processing of data.

Submitted: 19.02.2024

Accepted: 21.03.2024

Contacts: doclola_71@mail.ru

Abstract

Purpose. To determine the expression of markers of cell cycle regulation, proliferation and apoptosis (p53, Ki-67, Bcl-2) in various types of neoplasia of the accessory lobe of the mammary gland.

Materials and methods. The study is based on the results of a retrospective examination of 182 patients who were treated for diseases of the accessory lobe of the mammary gland at the Russian National Medical Research and Medical Center and in the Namangan branch of the Russian National Medical Research and Medical Center from 2010 to 2022. The patients were divided into 4 groups according to the results of the morphological examination.

Results. In general, a comparison of the expression profiles of markers p53, Ki-67, Bcl-2 showed that microinvasive cancer of the accessory lobe was characterized by a combination of increased expression of p53 and Ki-67. The expression of p53 and Ki-67 was determined least often in patients with well-differentiated intraductal cancer, intralobular cancer and dysplasia of the accessory lobe of the mammary gland. At the same time, Bcl-2 was expressed significantly more often in these types of neoplasia, demonstrating opposite trends with p53 and Ki-67.

Conclusions. Histological examination of neoplasia of the accessory lobe of the mammary gland should be supplemented with immunohistochemical analysis, the results of which allow for differential diagnosis of various types of neoplasia in the accessory lobe of the mammary gland and make it possible to clarify the prognosis of the disease.

To assess the invasive potential of neoplasia of the accessory lobe of the mammary gland, it is advisable to use the following histological and immunohistochemical signs: degree of cell differentiation; presence of necrosis; presence of polarization; expression of p53, Bcl-2, Ki-67.

Keywords: cancer of the accessory lobe of the mammary gland, immunohistochemistry

■ ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы – одно из самых распространенных онкологических заболеваний, ежегодно в мире регистрируется более 2 млн случаев, 800 000 из которых умирают в течение первого года. В Узбекистане в 2022 г. зарегистрировано 22 443 пациента с раком молочной железы. Уровень заболеваемости раком молочной железы составляет 12,0. Впервые выявленные случаи в год составляют 4 164. 5-летняя выживаемость 45,1. Смертность 5,2. В последние годы отмечается прогресс в понимании молекулярной биологии гистогенеза опухолей с разработкой современных методов морфологической, иммуногистохимической, биологической, цитогенетической и молекулярной диагностики [1, 2]. Многообразие механизмов развития рака добавочной доли молочной железы и рака молочной железы усложняет средства профилактики и лечения, но тем не менее прогноз на ранних стадиях заболевания относительно благоприятен, тогда как верификация процесса на поздних стадиях по наличию отдаленных метастазов приводит к высокой инвалидизации и смертности пациентов, снижая эффективность всех подходов в лечебной тактике [3–5].

Молекулярные маркеры, в частности митотический индекс, Her2/neu, Ki-67, Bcl-2, p53, в настоящее время находятся в центре внимания отечественной и зарубежной литературы. Регулятор апоптоза Bcl-2 – внутриклеточный белковый фактор и главный представитель семейства Bcl-2. Он ингибирует апоптоз во многих клеточных системах, включая лимфогематопозитические и нейрональные клетки, регулирует гибель клеток, контролируя проницаемость митохондриальной мембраны, ингибирует каспазы, предотвращая выход цитохромов из митохондрий и/или связывая факторы, активирующие апоптоз. Белок p53 является продуктом гена-супрессора опухоли p53 и экспрессируется во всех клетках организма. В отсутствие повреждений генетического аппарата белок p53 находится в неактивном состоянии, но активируется при повреждении ДНК [5]. Под активацией понимается способность белка связываться с ДНК и активировать транскрипцию генов, содержащих последовательности из регуляторной области, называемые элементом ответа p53-response element (участок ДНК, с которым связывается белок p53). Таким образом, p53 является индуктором транскрипции, обширного набора генов и активируется при накоплении повреждений ДНК. Активация p53 приводит к остановке клеточного цикла и репликации ДНК и индуцирует апоптоз при сильных стрессовых сигналах. Возрастающий интерес клиницистов и патологов к предопухолевым новообразованиям привел к морфологической и клинической классификации заболевания и патологических процессов, особенно предшествующих развитию рака и других злокачественных опухолей. В связи с трудностями диагностики неинвазивные формы РДДМЖ, в частности протоковая карцинома *in situ*, являются первыми мишенями. Остается неясным, как часто непальпируемые DCIS, выявляемые исключительно с помощью маммографии, прогрессируют в инвазивный рак [6, 7]. Последние исследования показывают, что прогноз DCIS в значительной степени зависит от его класса. Поэтому скрининг очень полезен для женщин с определенными типами DCIS. Для других видов DCIS стоит вопрос о том, перевешивают ли потенциальные преимущества выявления рака побочные эффекты скрининга (тревога, ненужная операция, лучевая терапия). Общеизвестно, что определение прогноза любого опухолевого заболевания, в том числе и рака добавочной доли молочной железы, по сути, требует идентификации маркеров, которые так или иначе связаны с биологией опухоли, прогнозируют ее естественную



историю и могут предсказать выбор оптимальной тактики лечения и его эффективность.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение экспрессии маркеров регуляции клеточного цикла, пролиферации и апоптоза (p53, Ki-67, Bcl-2) при различных видах неоплазий добавочной доли молочной железы.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование основано на результатах ретроспективного обследования 182 пациенток, проходивших лечение заболеваний добавочной доли молочной железы в РСНПМЦОиР и в Наманганском филиале РСНПМЦОиР с 2010 по 2022 г. Пациентки были разделены на 4 группы в соответствии с результатами морфологического обследования.

В первую группу вошли 62 пациентки (34,1%) с дисплазией добавочной доли молочной железы. Вторую группу составила 71 пациентка (39,0%) с протоковой карциномой *in situ* добавочной доли молочной железы. В третью группу были включены 28 женщин (15,4%) с дольковой карциномой *in situ* в добавочной доле. В четвертую группу вошла 21 пациентка (11,5%) с карциномой *in situ* и микроинвазией в добавочной доле.

Средний возраст пациентов, включенных в исследование, составлял 56,4 года (20–75 лет). 75 (41,2%) пациенток находились в менопаузе, 107 (58,8%) – в репродуктивном периоде.

Критерии исключения из данного исследования следующие:

- возраст старше или равный 80 годам;
- сочетание предраковых поражений и инвазивного рака молочной железы. При дисплазии ДДМЖ в 31 случае (50,0%) поражение располагалось в правой доле молочной железы, у 27 женщин (43,6%) – в левой доле молочной железы и в 4 случаях (6,4%) – в обеих долях. При внутрипротоковой карциноме существенных отличий в расположении процесса поражения не наблюдалось, у 35 пациенток (49,3%) поражение было обнаружено в левой молочной железе и в 36 случаях (50,7%) – в правой. Аналогичная картина наблюдалась и при микроинвазивном раке *in situ*: в 10 (47,6%) случаях очаг поражения располагался слева, в 10 (47,6%) – справа и в 1 случае (4,8%) поражение было двусторонним. При внутридольковом раке добавочной доли в 12 случаях (42,9%) патологический процесс располагался слева, а в 16 случаях (57,1%) – справа.

Для иммуногистохимического исследования были использованы 15 коммерческих наборов моно- и поликлональных антител, которые по функциональной значимости распределялись следующим образом:

- маркеры пролиферативной активности Ki-67;
- маркеры апоптоза Bcl-2;
- супрессоры опухолевого роста p53.

Методом иммуногистохимии фиксировали исследуемый материал в 10% нейтральном формалине в течение 24 ч, далее заливали в парафин и готовили срезы толщиной 4 мкм, которые наносились на высокоадгезивные стекла и высушивали при температуре 37 °С в течение 18 ч. Антигенную активность восстанавливали

в миниавтоклаве 2100 Retrieval (Pick Cell) при 121 °С в течение 20 мин и при последующем остывании в течение 90 мин. Восстановление проводилось в цитратном буфере pH 6,0 или в трис-ЭДТА-буфере pH 9,0, для некоторых антител использовали протеазную обработку. В качестве детекционной системы применяли систему EnVision (Dako), в качестве хромогена – диаминобензидин и АЕС. Для получения результатов, пригодных для количественной обработки, реакции проводили с помощью автоматического иммуногистостейнера Autostainer Dako.

Интенсивность реакций, локализованных в цитоплазме и на мембранах клеток, оценивали полуколичественным способом по балльной шкале от 0 до 3 с помощью анализатора изображения Leica Q550:

- 0 – отсутствие реакции;
- 1 – слабая реакция;
- 2 – умеренная реакция;
- 3 – сильная реакция.

Результаты реакций с антигенами, которые имеют ядерную локализацию (Ki67, p53, Bcl-2, рецепторы эстрогенов и прогестеронов), оценивались подсчетом количества окрашенных ядер на 100 ядер в 3 полях зрения, полученные результаты выражались в процентах. Результаты реакции для рецепторов эстрогенов и прогестерона оценивались по 8-балльной шкале.

Обработка данных проводилась на персональном компьютере в программе «Статистика» (Statsoft, Inc). Сравнительный анализ параметрических признаков проводился с помощью теста Стьюдента, непараметрических количественных признаков – с помощью теста Манна – Уитни. Для сравнения качественных признаков использовали критерии хи-квадрат (χ^2) и Фишера. Корреляционный анализ с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена проводили для определения наличия и количественной характеристики выраженности связи между отдельными структурно-функциональными показателями.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия p53 реже всего встречалась у пациентов с дисплазией, дольковым и высокодифференцированным внутрипротоковым раком добавочной доли, составляя 1,6; 3,5 и 14,7% соответственно. Значение этого показателя было достоверно меньше ($p < 0,05$) соответствующих уровней у пациентов с низкодифференцированным внутрипротоковым раком (40,5%) и внутрипротоковым раком с микроинвазией (47,6%). Наиболее выражена была экспрессия маркера у пациентов с микроинвазивным раком добавочной доли, однако значение этого показателя достоверно не отличалось ($p = 0,9024$) от такового в группе низкодифференцированной протоковой карциномы (рис. 1).

Сопоставление значений экспрессии маркера апоптоза Bcl-2 показало, что наиболее часто этот показатель выявляется у пациентов с дисплазией, внутридольковым раком и высокодифференцированным внутрипротоковым раком (85,5; 89,3 и 87,5% случаев). У пациенток с низкодифференцированным внутрипротоковым раком и микроинвазией добавочной доли экспрессия этого маркера определялась значительно реже (39,4 и 39%), что достоверно отличалось от показателей предыдущих групп ($p = 0,0005$). Полученные результаты отражены на рис. 2.

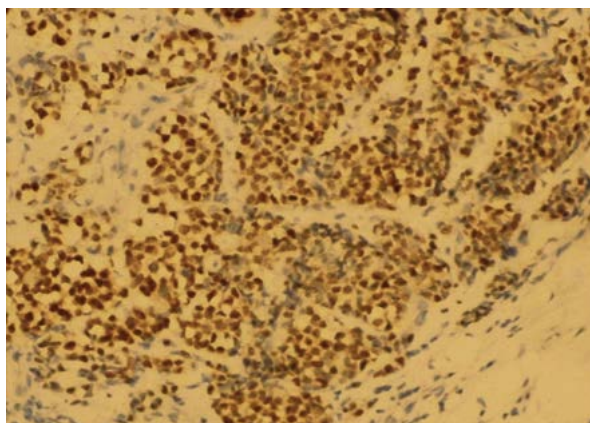


Рис. 1. Экспрессия p53 при различных видах неоплазии добавочной доли молочной железы. Окраска DAB-хромоген. Объектив 10х. Окуляр 40
Fig. 1. Expression of p53 in various types of neoplasia of the accessory lobe of the mammary gland. DAB chromagen stain. Lens 10х. Eyepiece 40

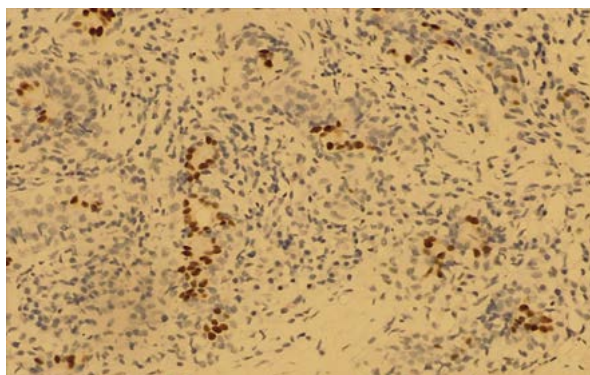


Рис. 2. Уровни экспрессии Bcl-2 при различных видах неоплазии добавочной доли молочной железы. Окраска DAB-хромоген. Объектив 10х. Окуляр 40
Fig. 2. Levels of Bcl-2 expression in various types of neoplasia of the accessory lobe of the mammary gland. DAB chromagen stain. Lens 10х. Eyepiece 40

Оценка значений экспрессии Ki-67 продемонстрировала, что максимально часто она встречалась у пациентов с низкодифференцированным внутрипротоковым раком добавочной доли и пациенток с микроинвазией добавочной доли, значения показателей при этом составили 24,3 и 50% соответственно. Уровни данных показателей были достоверно ($p < 0,05$) больше значений экспрессии маркера Ki-67 у пациентов с дисплазией, внутридольковым раком и высокодифференцированной протоковой карциномой добавочной доли молочной железы (1,6; 3,5; 2,9%) (рис. 3).

В целом сопоставление профилей экспрессии вышеописанных маркеров показало, что для микроинвазивного рака добавочной доли было характерно сочетание

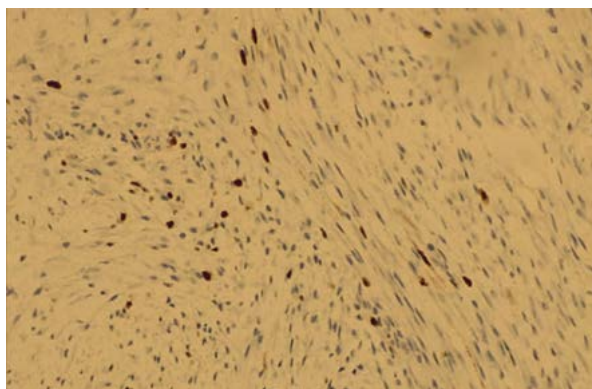


Рис. 3. Уровни экспрессии Ki-67 при различных видах неоплазии добавочной доли молочной железы. Окраска DAB-хромоген. Объектив 10х. Окуляр 40
Fig. 3. Ki-67 expression levels in various types of neoplasia of the accessory lobe of the mammary gland. DAB chromagen stain. Lens 10х. Eyepiece. 40

повышения экспрессии p53 и Ki-67. Реже всего экспрессия p53 и Ki-67 определялась у пациентов с высокодифференцированным внутрипротоковым раком, внутридольковым раком и дисплазией добавочной доли молочной железы. В то же время Bcl-2 экспрессировался при этих видах неоплазии значительно чаще, демонстрируя разнонаправленные тенденции с p53 и Ki-67.

Морфологические характеристики и особенности экспрессии маркеров в зависимости от степени дифференцировки протоковой карциномы *in situ* добавочной доли молочной железы

Сравнение морфологических и иммуногистохимических характеристик в этой группе проводилось отдельно. В нашем исследовании число случаев с высокодифференцированным внутрипротоковым раком ДДМЖ составило 34 (48,9%), с низкодифференцированным – 37 (52,1%). Сравнение уровней исследуемых параметров в зависимости от степени дифференцировки опухоли добавочной доли позволило выявить ряд особенностей у пациентов с протоковым раком *in situ*. Так, некроз при внутрипротоковой карциноме встречался только при низкодифференцированных опухолях. При этом опухолевые пролифераты имели в основном угревидную структуру (64,5% случаев). Степень выраженности поляризации была наибольшей при высокодифференцированном внутрипротоковом раке, причем значение этого показателя не зависело от структуры опухоли. В целом показатели степени поляризации и выраженности некроза имели разнонаправленные тенденции при карциноме *in situ* с разной степенью дифференцировки.

Микрокальцинаты были обнаружены в 49% исследованных образцов, при этом в 16% они были множественными, что, как оказалось, характерно для низкой степени дифференцировки (60% случаев). В 75% случаев определялась угревидная и криброзная структура опухоли. Экспрессия рецепторов к эстрогенам была положительной в 95% случаев высокодифференцированного внутрипротокового рака и в 45%

низкодифференцированного, однако зависимости данного показателя от структурной характеристики внутрипротокового рака выявлено не было. Частота экспрессии прогестероновых рецепторов имела сходный характер (79% при высокодифференцированном протоковом раке и 27% при низкодифференцированном), этот показатель также не зависел от гистологической структуры опухолевых пролифератов.

Уровень экспрессии p53 был наименьшим в подгруппе с высокодифференцированным внутрипротоковым раком добавочной доли (14,7% случаев) и повышался при снижении степени дифференцировки опухоли (40,5%). При этом наибольшие показатели данного параметра встречались при криброзной и угревидной структуре опухоли добавочной доли. В то же время экспрессия маркера апоптоза Bcl-2 была существенным образом связана со степенью дифференцировки опухоли (87,5% при высокодифференцированном внутрипротоковом раке и 39,4% при низкодифференцированном) и ассоциировалась с солидной и папиллярной структурой соответственно. Максимальный уровень экспрессии маркера пролиферативной активности Ki-67 отмечался в подгруппе с низкой степенью дифференцировки (24,3%) и снижался с нарастанием степени дифференцировки (2,9%). Сопоставление уровней экспрессии маркеров апоптоза и пролиферативной активности явно указывает, что при нарастании уровня катаплазии клеточных элементов резко увеличивается уровень пролиферативной активности при одновременном падении уровня апоптоза. В то же время со снижением степени дифференцировки опухоли отмечается нарастание экспрессии белка p53, что является плохим прогностическим фактором, говорящим об увеличении количества активных атипичных клеток в опухолевых пролифератах. Наибольшие значения показателей пролиферативной активности и нарушений дифференцировки отмечались в угревидных и криброзных структурах.

■ ВЫВОДЫ

1. Гистологическое исследование при неоплазиях добавочной доли молочной железы следует дополнять иммуногистохимическим анализом, результаты которого позволяют осуществлять дифференциальную диагностику различных видов неоплазий в добавочной доле молочной железы и дают возможность уточнения прогноза заболевания.
2. Для оценки инвазивного потенциала неоплазий добавочной доли молочной железы целесообразно использовать следующие гистологические и иммуногистохимические признаки: степень дифференцировки клеток; наличие некроза; наличие поляризации; экспрессию p53, Bcl-2, Ki-67.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kamishov SV, Pulatov DA, Yuldasheva NS. Studying the role of molecular biological tumor markers in the choice of immunotherapy method in the accompanying treatment of ovarian and cervical cancer. *Eurasian J Oncol.* 2015;5(2):53–60.
2. Carrasco E, Alvarez PJ, Prados J. Cancer stem cells and their implication in breast cancer. *Eur J Clin Invest.* 2014;44(7):678–87.
3. Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell.* 2011;147:992–1009.
4. Giampieri S, Manning C, Hooper S, et al. Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol.* 2009;11:1287–1296.
5. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, et al. CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest.* 2013;123:2873–92.
6. Majidpoor J, Mortezaee K. Steps in metastasis: an updated review. *Med Oncol.* 2021;38:3.
7. Markl B, Wilhelms N, Anthuber M. Circulating cytokeratin-positive cells and tumor budding in colorectal cancer. *World J Clin Oncol.* 2016;7(6):433–440.