

**REPERE IMUNOHORMONALE, MORFOLOGICE
ȘI IMUNOCHISTOCIMICE ÎN OPTIMIZAREA TRATAMENTULUI
CANCERULUI GLANDEI MAMARE LA PACIENTELE
CU DIABET ZAHARAT**

L. Sofroni, dr. hab. în med., conferențiar cercetător, șef de laborator Mamologie Oncologică, V. Jovmir, dr. hab. în med., profesor cercetător, D.Tcaciuc, colaborator științific stagiar, V. Stratan, dr. în med., șef laborator imunogenetic, P. Pihut, dr. în med., conferențiar cercetător, V. Machidon, dr. în med., conferențiar cercetător, E. Cudina, dr. în med., conferențiar cercetător, A. Cotruță, dr. în med., cercetător științific, N. Botnariuc, dr. în med., cercetător științific, I. Chemencedji, medic ordinator, V. Ghervas, doctorand

Rezumat

Cancerul glandei mamare (CGM) este cel mai frecvent tip de cancer la femei, incidența sa fiind în continuă creștere. În ultimii ani se remarcă o creștere continuă a incidenței și a morbidității prin diabet zaharat (DZ), fiind considerată drept o „epidemie diabetică”. Patologiile prezintă factori comuni de risc atât în categoria factorilor modificabili, cât și în categoria celor nemodificabili, precum și multiple interdependențe etiopatogenetice și particularități ale evoluției clinice. Analiza particularităților acestei interdependențe ne permite de a stabili o tactică individualizată la această categorie de pacienți.

Summary. Immuno-hormonal, morphological and immunohistochemical parameters while optimizing the treatment of breast cancer in patients with diabetes mellitus

Breast cancer is the most common type of cancer in women, incidence is growing. In recent years there has been

a continued increase in the incidence of diabetes mellitus which is considered as a “diabetic epidemic”. Pathologies presents both risk factors common modifiable factors category and the category of non-modifiable and multiple interdependencies ethiopathogenetic and features of the clinical course. The peculiarity of this interdependency analysis allows us to establish an individualized tactic in this population.

Резюме. Основные иммуно-гормональные, морфологические и иммуногистохимические параметры при оптимизации лечения рака молочной железы у пациенток с сахарным диабетом

Рак молочной железы является наиболее распространенным типом рака у женщин, заболеваемость которого имеет постоянную тенденцию к росту. В последние годы наблюдается выраженный рост заболеваемости и при сахарном диабете, который рассматривается как „диабетическая эпидемия”. Обе патологии имеют общие факторы риска в категории модифицируемых и немодифицируемых, некоторые этиопатогенетические взаимозависимости и особенности клинического течения. Анализ этих взаимозависимых факторов позволяет установить индивидуальную тактику лечения у данной категории больных.

Introducere

Cancerul glandei mamare este cel mai frecvent tip de cancer la femei, incidența sa fiind în continuă creștere. Anual sunt înregistrate peste 250.000 de cazuri noi în Europa și peste 175.000 - în SUA. Actualmente în RM stau la evidență 9199 paciente cu CGM, ce constituie 46,2 ‰. În ultimii ani se remarcă o creștere continuă a incidenței și a morbidității DZ, fiind considerată drept o „epidemie diabetică”. În RM în anul 2013 au fost înregistrați 45.900 pacienți cu DZ, dintre care 37.095 (85,9%) – de tip 2.

CGM și DZ tip 2 prezintă factori comuni de risc atât în categoria factorilor modificabili (obezitate, dislipidemie, hipertensiune arterială, reducerea toleranței la glucoză, factori comportamentali), cât și în categoria celor nemodificabili (vârstă, sex, ereditate agravată etc.). Este recunoscut rolul insulinorezistenței, hiperestrogeniei și hiperandrogenizării în predispunerea către CGM. Actualmente există multiple studii care demonstrează asocierea DZ tip 2 cu un risc elevat de CGM. Sunt postulate 4 mecanisme care asociază CGM și DZ tip 2.

- Activarea căii insulinei.
- Reglarea hormonilor sexuali endogeni.
- Acțiunea anti-apoptozică a insulinei.
- Activarea factorilor de creștere „insulin-like” (IGF).

Datorită faptului că insulina este un hormon de creștere, se consideră că hiperinsulinemia cronică are un efect cancerigen, receptorii insuliniici fiind hiperexprimați de către celulele neoplazice. Necesitatea studiului a fost indusă de lipsa datelor certe ce țin de dereglările statusului hormonal, a imunității celulare și umorale la pacientele cu CGM și DZ.

Se cunoaște, că DZ condiționează restricții vădite la toate etapele tratamentului datorită complicațiilor specifice: cardio-, nefro-,neuropatii. Aspectele tratamentului chirurgical prezintă particularități: evoluția procesului chirurgical se agravează constant, patologia de bază poate iniția trecerea DZ latent în cel

manifest sau îl decompensează pe cel existent. Date contradictorii sunt și în privința expresiei ReEs, RePg și Her 2/neu în tumorile maligne ale pacientelor cu CGM și DZ tip 2, care se presupune că ar corela cu stadiul clinic al maladiei, varianta morfopatologică a tumorilor, cu nivelul Es și al Pg în serul sangvin. Vitalizarea precară a plăgii în 30-40% se complică cu limforee abundentă, ce mărește durata spitalizării cu dezavantaj economic considerabil. Aceste argumente ne-au indus ideia de a iniția un studiu cu abordări specifice, multilaterale în vederea individualizării tratamentului pacientelor cu CGM și DZ tip 2.

Scopul studiului a constat în efectuarea unei analize multilaterale în vederea optimizării tacticii de tratament a pacientelor cu CGM și DZ tip 2.

Material și metode

În studiu au fost incluse 426 paciente cu CGM, care au primit tratament în IMSP IO în a.2011-2014. Lotul de bază a inclus 161 de paciente cu CGM și DZ tip 2, iar lotul de control a constituit 265 paciente cu CGM fără DZ.

La toate pacientele s-au determinat următorii indici:

- statusul hormonal (Prolactina; LH; FSH; Progesteron; Estradiol; Cortizol; T3, T4, TSH; DHEAS, Somatotropina);
- indicii imunologici ai claselor limfocitare conform determinantelor clonale CD 3 (precursoare), CD 4 (helperi), CD 5 (helper citotoxic), CD 8 (supresori), CD 16 (killeri naturali), CD 19 (B limfocite) în serul sangvin la lotul de paciente sus-menționat;
- expresia ReEs, Re Pg și HER/ 2 neu în tumorile maligne la pacientele investigate.

Din cele 426 paciente cu CGM la 201 (89 cu DZ și 112 - fără DZ tip 2) s-au apreciat receptorii tumoral: ReEs, RePg și Her2/neu. S-a folosit metoda imunohistochimică standardă cu utilizarea anticorpilor: ReEs – clonul 1D5 RePg -, RePg-clonul 636 și Her 2/neu – clonul CB11 de la firma DAKO LSAB 2 System HRP.

Rezultate

Numeroși autori susțin că la baza apariției tumorilor maligne în general și, în special, ale celor hormonal dependente stă starea imună a organismului. Sistemul de supraveghere imunologică a organismului este sensibilizat de neoantigenele care apar pe suprafața celulelor transformate malign și printr-o serie de mecanisme imunologice celulare și umorale provoacă distrugerea lor.

Conform acestei teorii o imunitate deficientă ar cauza apariția neoplaziilor și chiar generalizarea lor, iar o imunitate activă, eficientă ar reține dezvoltarea lor, determinată de acțiunea diverșilor factori cancerigeni, ar produce regresivitatea lor sau evoluția lentă a maladiei.

Este cunoscut, că imunitatea celulară (T-limfocitele) are câteva funcții importante:

- răspunde de dezvoltarea reacțiilor imunologice celulare de hipersensibilitate cu acțiune întârziată;
- efectuează reacția imunității transplantationale;
- răspunde de rezistența contra unor infecții bacteriale;
- efectuează protecția contra cancerului;
- reglează principalele funcții ale organismului cu ajutorul T-supresorilor.

Răspunzătoare de imunitatea organismului este și imunitatea umorală – imunoglobulinele și B-limfocitele. Antigenele umorale corespund structurilor particulare de tumori, ele se pot localiza intracelular, extracelular sau pe membrana celulei tumorale, cea din urmă fiind mai importantă din punct de vedere imunologic, deoarece organismul poate recunoaște asemenea antigene drept «non- self», dezvoltând reacția imună.

Limfocitele B sunt celule limfode cu origine în măduva osoasă, principala lor funcție este de recunoaștere a antigenelor și, ca urmare, de diferențiere în celulele secretoare de imunoglobuline – anticorpi.

Cercetările asupra capacității reactive a organismului la pacientele noastre a inclus studiul imunității celulare și a celei umorale.

Statusul imun a pacientelor lotului de studiu este caracterizat prin scăderea progresivă a numărului total de limfocite precursori CD3, reducerea funcției

helper CD4, a imunității anticelulare CD19 și CD16 la pacientele cu CGM și DZ tip 2, iar, pe de altă parte, cu accelerarea supresiei generale exprimate prin valori semnificativ crescute a CD8 și CD5 - în CGM și DZ tip 2.

Este cunoscut că în centrul reglării funcțiilor gonadice se află hipotalamusul, care transformă impulsurile în semnale neurohormonale (*releasing hormones*). Acestea din urmă, acționând asupra hipofizei, provoacă sinteza și secreția hormonilor gonadotropi, care stimulează gonadele endocrine periferice. Ultimele produc, la rândul lor, hormoni cu acțiuni metabolice specifice generale asupra organelor „țintă”.

Deregările funcționale ale sistemului hipotalamo-hipofizar conduc, de regulă, la dereglări ale nivelului nu numai al unui singur hormon, dar foarte frecvent și al nivelului celorlalți hormoni produși de lobul anterior al hipofizei.

În urma analizei cumulative corelaționale (CC) a cancerului mamar și a concentrațiilor de hormoni, am constatat că valorile tuturor hormonilor sexuali statistic semnificativ s-au asociat cu valorile lor cumulative în ser și limfă.

Valoarea indicelui CC a cancerului mamar pentru pacientele ale căror niveluri de estradiol au fost crescute în ser comparativ cu nivelurile de estradiol în limfă au fost în tranșa de 2.00 (95% CI = 1.47 - 2.71, $p > 0,05$), adică fără valori de diferențiere statistic semnificativă. La fel, am efectuat analize similare pentru alți hormoni. Pentru fiecare dintre hormoni s-a estimat, că toate valorile CC s-au asociat cu o dublare a concentrației lor peste 1,0 ($p > 0,05$). Nu a fost nici o eterogenitate statistic semnificativă între valorile hormonilor sexuali în ser și limfă la pacientele cu cancer mamar.

Am examinat indicele CC între cancer mamar asociat cu o dublare a concentrației de estradiol în funcție de testosteron. Nu au existat diferențe statistic semnificative în aceste CC în conformitate cu metoda de test folosită. Indicele de CC asociat cu o dublare a nivelurilor de estradiol au fost 1,35 (95% CI = 1.15 - 1.58, utilizând un test care a încorporat o etapă de purificare (4,5,9,12,14) și 1,23 (95% ÎI = 1.04 - 1.44), pentru cele care au folosit un test direct (2,6,8,11). Indicele CC asociat cu o dublare a nivelului de tes-

Tabelul 1

Caracteristica statusului imun al pacientelor cu CGM

	CD 19 B limfocit		CD3 precursori		CD 4 helper		CD 8 supresor		CD 5 helper citotoxic		CD 16 killer natural	
	Valoare	p	Valoare	p	Valoare	p	Valoare	p	Valoare	p	Valoare	p
CGM-cu DZ tip 2	4,55±0,02	<0,05	48,84±0,03	<0,05	27,63±0,01	<0,01	25,44±0,04	<0,01	38,42±0,02	<0,05	12,68±0,01	<0,01
CGM fără DZ tip 2	5,67±0,01		54,16±0,02		38,16±0,02		18,68±0,02		34,88±0,06		19,04±0,02	

tosteron au fost 1.37 (95% CI = 1.15 - 1.65), folosind un test care a încorporat o etapă de purificare (5,9,12) și 1.44 (95% CI = 1.21-1.72), cu test direct (2,4,7,8).

Tabelul 2

Caracteristica statusului hormonal al pacientelor cu CGM

Hormonii	Pacien-tele cu CGM și DZ	Pacien-tele cu CGM fără DZ	Valoarea lui p
Prolactina	17	14,9	p<0,05
LH	17,4	28,52	p<0,001
FSH	39,2	74,5	p<0,01
Progesteron	3,69	1,27	p<0,05
Cortizol	18,72	18,6	p<0,01
Estradiol	27,9	18,5	p<0,001
Testosteron	0,8	1,55	p<0,001
T3	15,6	6,75	p<0,05
T4	13,4	19,1	p<0,01
TSH	2,7	2,65	p>0,05
DHEA	1,5	1,8	p>0,05
Somatotropina	2,7	1,8	p<0,05

Corelațiile severe între nivelurile de estradiol și cele ale altor hormoni sexuali determină o influență reciprocă marcată în evoluția cancerului mamar. Pentru a examina asociațiile simultane între estradiol și fiecare dintre androgeni și riscul de cancer mamar, am calculat indicele CC asociat cu o dublare a estradiol și androgeni, cu și fără ajustări pentru fiecare androgen la rândul său. În toate cazurile, amploarea indicelui CC asociat cu o dublare a nivelurilor de estradiol au fost redusă după ajustare, dar au rămas statistic semnificative. În mod similar, indicele CC asociat cu o dublare a nivelurilor de androgeni, fie au rămas statistic semnificative ($p < 0,05$) sau apropiate de semnificație statistică, după ajustarea pentru estradiol, deși amploarea acestor asociații au fost, de asemenea, ușor redusă.

Repartizând pacientele conform formelor morfo-

logice ale tumorilor maligne am obținut următoarele date: în ambele loturi prevaia tipul histologic de carcinom ductal invaziv (66% lotul I vs 81% lotul II), carcinom lobular invaziv (13% vs 6%), ductal și lobular (11% vs 6%), carcinom medular (4% vs 3%), mucinos (4%vs 2%).

S-a efectuat o analiză a ReEs, RePg și a statusului Her 2/neu la pacientele cu CGM DZ tip 2. Pacientele au fost repartizate conform profilului imunohistochimic în următoarele grupuri:

1. ReEs+/RePg+/Her2 neu- negativ (tip luminal A).
2. ReEs+/RePg+/Her2 neu+pozitiv (tip luminal B).
3. Subtipul HER2 neu + pozitiv (HER2 neu + pozitiv).
4. Subtipul ReEs- /RePg-/Her2- (triplu negativ).

Subtipul molecular al ReEs+/RePg+/Her2 /neu negativ a fost stabilit la 42 ± 11 , 3% paciente cu CGM și DZ vs $59 \pm 6,5\%$ – la cele cu CGM fără DZ ($p < 0,05$). Subtipul molecular ReEs+/RePg+/Her2 /neu pozitiv a fost depistat la 11 ± 7 , 1% paciente cu CGM și DZ, vs $15 \pm 4,7\%$ - la lotul de control.

Subtipul HER/2 pozitiv a fost depistat la $26 \pm 10\%$ paciente cu DZ vs $16 \pm 4,8\%$ - la cele fără DZ tip 2 ($p < 0,05$).

Subtipul ReEs- /RePg-/Her2- (triplu negativ) a fost stabilit în $21 \pm 9,3\%$ cazuri în lotul I, vs 11 ± 4 , 1% - în lotul II ($p < 0,01$).

Discuții

Actualmente lumea științifică consideră indiscutabilă interdependența maladiilor oncologice și a diabetului zaharat, ambele având verigi etiopatogenetice comune. Incidența CGM și a DZ tip 2 are o creștere constantă în ultimele decenii. Analiza particularităților acestei interdependențe ne permite de a stabili o tactică individualizată la această categorie de paciente.

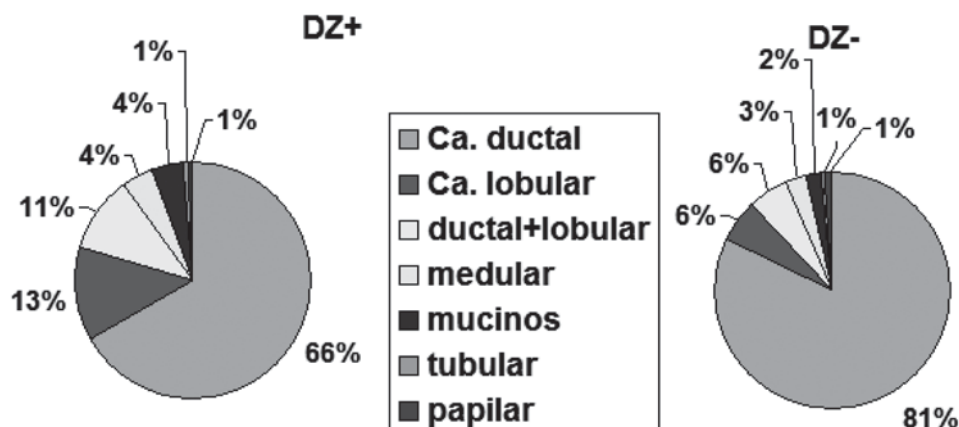


Fig. 1. Distribuția pacientelor cu CGM conform formelor morfologice ale tumorilor

Tabelul 3

Repartizarea pacientelor conform profilului imunohistochimic

Profilul imunohistochimic	CGM cu DZ+	CGM fără DZ	Valoarea lui p
RE+/RP+/Her2-	42±11.3%	59±6.5%	<0.05
RE+/RP+/Her2+	11±7.1%	15±4.7%	<0.05
HER2 pozitiv (expresia negativă al RE și RP)	26±10%	16±4.8%	<0.05
RE- /RP-/Her2- (triplu negativ)	21±9.3%	11±4.1%	<0.01

Statusul imun este caracterizat prin scăderea progresivă a numărului total de limfocite precursorare CD3 (48,84±0,03 vs 54,16±0,02, p<0,05), reducerea funcției helper CD4, 27,63±0,01 vs 38,16±0,02, p<0,01), a imunității anticelulare CD19 (4,55±0,02 vs 5,67±0,01, p<0,05) și CD16 (12,68±0,01 vs 19,04±0,02, p<0,01) la pacientele cu CGM și DZ tip 2, iar pe de altă parte, cu accelerarea supresiei generale exprimate prin valori semnificativ crescute ale CD8 (25,44±0,04 vs 18,68±0,02) (p<0,01) și CD5 (18,68±0,02 vs 34,88±0,06) (p< 0,05) la asocierea cu DZ. Corelarea tridimensională după Spearman a demonstrat prezența unei interrelații strânse între dinamica valorilor medii CD5, CD8 și CD16 la pacientele cu CGM și DZ tip 2 și poate fi considerat drept o particularitate specifică.

Printre particularitățile morfopatologice ale tumorilor maligne la pacientele cu CGM și DZ s-a remarcat o frecvență sporită a formelor rare. Așadar, carcinomul ductal invaziv a fost depistat în 66% cazuri în lotul I vs 81%-v lotul II p<0,05), carcinomul lobular invaziv în 13 % vs 6 %, p<0,05), ductal și lobular - în 11% vs 6%, p<0,05), carcinomul medular în 4% vs 3%, p>0,05), mucinos- în 4% vs 2% cazuri, p>0,05).

Importanța clinică a markerilor biologici moleculari - expresia (ReEs), progesteron (Re Pg) și supraexpresia Her 2/neu - în stabilirea prognosticului și conduitei terapeutice în CGM este incontestabilă. Pacientele cu CGM și DZ prezintă fenotipuri potențial nefavorabile și rezistente la scheme uzuale de tratament și hormonoterapie (subtipul triplu negativ 21±9,3% vs 11±4,1%, subtipul HER2 pozitiv - la 26±10 % paciente cu DZ vs 16±4,8%). Subtipul RE+/RP+/Her2- cu evoluție mai favorabilă prezintă doar 42±11, 3% paciente cu DZ, față de 59±6,5% - fără DZ tip 2. Prin urmare, pacientele cu CGM și DZ tip 2 prezintă factori de prognostic și predeictivi nefavorabili și vor necesita tratament mai agresiv și individualizat.

Concluzii

1. Pacientele cu CGM și DZ se caracterizează prin dereglări imune (scăderea progresivă a numărului total de limfocite precursorare CD#, reducerea funcției helper CD4, a imunității celulare CD 19, și CD 16) și hormonale vădite (majorarea de 1,5 ori a Estrogenului, Prolactinei, Somatotropinei, TSH) mai pronunțate decât pacientele cu CGM fără DZ.

2. Pentru hormonii sexuali există o corelare statistică semnificativă a concentrațiilor în ser și limfă, dar fără diferență statistică pentru valorile concentrațiilor medii. Nivelurile androgenilor au fost, de asemenea, asociate cu valorile estrogenului și prolactinei în ser și în limfă, deși am observat asociații mai semnificative pentru testosteron, decât pentru DHEA.

3. Particularitățile morfologice ale tumorilor maligne în CGM se caracterizează prin frecvență mai mare a formelor rar întâlnite (carcinom lobular, mucinos), apriopri mai agresive din punct de vedere al evoluției locoregionale și sistemice, ce ar impune o tactică mai agresivă de tratament.

4. Corecția dereglărilor homeostaziei metabolice, hormonale și imunologice (locale și generale) și, nu în ultimul rând a glicemiei, la aceste paciente ar putea contribui semnificativ la ameliorarea vitalizării plăgilor.

5. Pacientele cu CGM și DZ prezintă fenotipuri potențial nefavorabile și rezistente la scheme uzuale de tratament, inclusiv hormonoterapie (subtipul triplu negativ 21±9,3% vs 11±4, 1%, subtipul HER2/ neu pozitiv - la 26±10 % paciente cu DZ vs 16±4,8%). Subtipul RE+/RP+/Her2/ neu - cu evoluție mai favorabilă prezintă doar 42±11, 3% paciente cu DZ, față de 59±6, 5% - fără DZ tip 2.

Bibliografie

1. American Cancer Society. Breast cancer facts & figures 2009-2010. Atlanta, GA: American Cancer Society Inc, 2010.
2. Centers for Disease Control and Prevention. National Diabetes Surveillance System, Clifton Rd. Atlanta, USA: prevalence of diabetes. Version current 6 October 2011.
3. Wolf I., Sadetzki S., Catane R., Karasik A., Kaufman B. Diabetes mellitus and breast cancer. *Lancet Oncol* 2006;6:103-11.
4. O'Mara B.A., Byers T., Schoenfeld E. Diabetes mellitus and cancer risk: a multisite case-control study. *J Chronic Dis* 1985;38:435-41.
5. Rapp K., Schroeder J., Klenk J. et al. Fasting blood glucose and cancer risk in a cohort of more than 140,000 adults in Austria. *Diabetologia* 2006;49:945-52.
6. Gupta, B. B. P. Mechanism of insulin action . Gupta [et al.] // *Curr. Science*. - 2000. - V. 73. - P. 993-1003.
7. Bernstein L., Ross R.K. Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 1993;15:48-65.

8. Dang C.V., Semenza G.L. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 1999;24:68–72.
9. Bordeleau L., Lipscombe L., Lubinski J. et al; Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group. Diabetes and breast cancer among women with BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Clin Oncol*. 2011; 29(1): 40-46.
10. Hjalgrim H., Frisch M., Ekblom A., Kyvik K.O., Melbye M., Green A. Cancer and diabetes—a follow-up study of two population-based cohorts of diabetic patients. *J Intern Med* 1997;241:471–5.
11. Franceschi S., la Vecchia C., Negri E., Parazzini F., Boyle P. Breast cancer risk and history of selected medical conditions linked with female hormones. *Eur J Cancer* 1990;26:781–5.
12. Swerdlow A.J., Laing S.P., Qiao Z. et al. Cancer incidence and mortality in patients with insulin-treated diabetes: a UK cohort study. *Br J Cancer* 2005;92:2070–5.
13. Fleming S.T., Pursley H.G., Newman B. et al. Comorbidity as a predictor of stage of illness for patients with breast cancer. *Med Care*. 2005;43:132–140.
14. Srokowski T.P., Fang S., Hortobagyi G.N. et al. Impact of diabetes mellitus on complications and outcomes of adjuvant chemotherapy in older patients with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:2170–2176.
15. Van de Poll-Franse L.V., Houterman S., Janssen-Heijnen M.L. et al. Less aggressive treatment and worse overall survival in cancer patients with diabetes: A large population based analysis. *Int J Cancer*. 2007;120:1986–1992.
16. Yancik R., Wesley M.N., Ries L.A. et al. Effect of age and comorbidity in postmenopausal breast cancer patients aged 55 years and older. *JAMA*. 2001;285:885–892.
17. Lipscombe L.L., Goodwin P.J., Zinman B. et al. The impact of diabetes on survival following breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;109:389–395.
18. Du W., Simon M.S. Racial disparities in treatment and survival of women with stage I-III breast cancer at a large academic medical center in metropolitan Detroit. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;91:243–248.
19. Bowker S.L., Yasui Y., Veugelers P. et al. Glucose-lowering agents and cancer mortality rates in type 2 diabetes: Assessing effects of time-varying exposure. *Diabetologia*. 2010;53:1631–1637.