

Засадевич Ю.М.^{1,2}, Бриллиант А.А.¹, Сазонов С.В.^{1,2}

Особенности экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимального перехода E-кадгерина и виментина при разных иммуногистохимических вариантах карциномы молочной железы

1 - ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий; 2 - ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Екатеринбург

Zasadkevich Y.M., Brilliant A.A., Sazonov S.V.

Features of expression of epithelial-mesenchymal transition markers E-cadherin and Vimentin in different immunohistochemical subtypes of breast cancer

Резюме

Целью исследования стало изучение маркеров эпителиально-мезенхимального перехода E-кадгерина и виментина в разных иммуногистохимических подтипах инфильтративной дольковой карциномы молочной железы. Было выявлено снижение экспрессии E-кадгерина в подтипе Luminal A в 21%, Luminal B в 18%, Basal-like в 8% случаев и отсутствие снижения экспрессии E-кадгерина в подтипе HER-2 overexpression. Появление экспрессии виментина отмечалось в 76% случаев подтипе Luminal A, в 65% случаев подтипе Luminal B, в 60% случаев в подтипе HER-2 overexpression, в 24% случаев в подтипе Basal-like. Уровень экспрессии E-кадгерина связан с наличием экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона. **Ключевые слова:** рак молочной железы, эпителиально-мезенхимальный переход, E-кадгерин, виментин

Summary

The aim of the research was to study markers of epithelial-mesenchymal transition E-cadherin and vimentin in different immunohistochemical subtypes of infiltrative lobular breast carcinoma. We found decrease of E-cadherin expression in 21% of Luminal A, in 18% of Luminal B and in 8% cases of Basal-like subtypes. We did not find any decrease of E-cadherin expression in HER-2 overexpression subtype. Presence of vimentin expression was found in 76% cases of Luminal A, 65% cases in Luminal B, 60% cases in HER-2 overexpression and 24% cases of Basal-like subtypes. Level of E-cadherin expression associates with presence of ER and PR expression.

Key words: breast cancer, epithelial-mesenchymal transition, E-cadherin, Vimentin

Введение

В структуре онкологической заболеваемости рак молочной железы (РМЖ) у женщин экономически развитых стран занимает I место. В мире ежегодно выявляется около 1 млн. новых случаев этого заболевания [1,2].

Особое значение в прогнозировании выживаемости при РМЖ уделяется выявлению отдаленных метастазов, которые считаются главной причиной смерти пациенток с этой патологией [3].

Метастазирование является многоступенчатым процессом, включающим отделение опухолевых клеток от первичной опухоли, инвазию во внеклеточный матрикс, интраваскцию в кровяное русло, распространение с кровотоком, экстравазацию в органы-мишени и формирование отдаленных метастатических очагов [4,5]. Для

успешного осуществления этапов инвазии и интраваскциии опухолевым клеткам необходимо изменить свой гистогенетический тип с эпителиального на мезенхимальный. При этом запускается механизм, известный как эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), осуществляемый во время нормального эмбрионального развития на этапе формирования мезодермы. Первым этапом ЭМП является снижение экспрессии молекул – маркеров эпителиальных тканей, таких как E-кадгерин и увеличение экспрессии мезенхимальных маркеров, таких как виментин [6].

Важной особенностью метастазирования является потеря адгезии опухолевых клеток, опосредованная снижением экспрессии молекул E-кадгерина, что способствует активации ряда сигнальных механизмов, при-

водящих к увеличению подвижности и инвазивной способности опухолевых клеток [4]. E-кадгерин относится к молекулам клеточной адгезии и способствует гомофильной связи между двумя эпителиальными клетками. По данным некоторых авторов, при РМЖ снижение уровня E-кадгерина выявляется приблизительно в 50% случаев при инвазивной протоковой карциноме, и до 90% при инвазивной дольковой карциноме, в первую очередь, в опухолях с тройным негативным фенотипом (подтип Basal-like по иммуногистохимической классификации, характеризующийся отсутствием экспрессии мембранного рецептора HER-2/neu, а также ядерных рецепторов эстрогена (ER) и прогестерона (PR)) [4,7,8]. Некоторые авторы также отмечают, что aberrантная экспрессия E-кадгерина связана с более поздней стадией опухолевого процесса и развитием метастазов, а также часто сочетается с отсутствием экспрессии ER [9].

Виментин – белок промежуточныхфиламентов, который экспрессируется преимущественно мезенхимальных клетках соединительной ткани. В последнее время, виментин рассматривается как маркер ЭМП, наличие экспрессии которого на опухолевых клетках отражает финальную стадию опухолевой дедифференцировки, что связано с высоким уровнем инвазии [10]. По данным некоторых авторов, наличие экспрессии виментина опухолевыми клетками карцином молочной железы отмечается в 7-8% случаев [10-12].

Полученные данные по экспрессии маркеров ЭМП E-кадгерина и виментина разнятся и интерпретируются по-разному. Это может быть связано с гетерогенностью карцином молочной железы, отличающихся по рецепторному статусу и имеющих разные свойства. Опухоли одной гистологической группы часто имеют разное клиническое течение. В связи с этим, считается целесообразным изучать экспрессию маркеров ЭМП (E-кадгерина и виментина) в разных иммуногистохимических группах согласно иммуногистохимической классификации, основанной на экспрессии рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR) и HER-2, по которой выделяют 4 подтипа карцином молочной железы: Luminal A (ER+,PR+,HER-2+), Luminal B (ER+,PR+,HER-2-), HER-2-overexpression (ER-,PR-,HER-2+), Basal-like (ER-,PR-,HER-2-)[13].

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий, г.Екатеринбург. Исследованы 152 случая инфильтративной дольковой карциномы молочной железы. Во всех случаях иммуногистохимическим методом определялась экспрессия ER, PR, HER-2/neu, а также E-кадгерина и виментина. Определение экспрессии E-кадгерина на клетках карциномы молочной железы проводилось с использованием антител MonoclonalMouseAnti-Human E-cadherinClone NCH-38 (Dako, Дания), виментина с использованием антител MonoclonalMouseAnti-SwineVimentinClone V9 (Dako, Дания). Экспрессия E-кадгерина оценивалась как положительная при окрашивании $\geq 70\%$ исследуемых клеток [9], виментина – при любом положительном ци-

топлазматическом окрашивании опухолевых клеток [10]. Определение экспрессии HER-2/neu на клетках опухоли осуществлялось с помощью поликлональных антител PolyclonalRabbitAnti-Human c-erb-2 Oncoprotein (DAKO, Дания), рецепторов ER и PR на ядрах клеток опухоли с помощью антител MonoclonalMouseAnti-HumanEstrogenReceptor и MonoclonalMouseAnti-HumanProgesteroneReceptor (DAKO, Дания) соответственно. Оценка уровней мембранной экспрессии HER-2/neu на опухолевых клетках производилась по шкале от 0 до 3+[14]. Уровень экспрессии ER и PR определялся по шкале от 0 до 8 [15]. Иммуногистохимические реакции проводились в автостейнере "DAKO" (Дания) с использованием буфера DakoWashBuffer, системы визуализации DakoEnVision+DualLinkSystem-HRP, хромогена DakoLiquid DAB+ SubstrateChromogenSystem фирмы (DAKO, Дания). Для оценки реакций использовался микроскоп "ZeissImager M" (Германия).

Для статистической обработки полученных данных, а также построения соответствующих графиков и таблиц использовались программные продукты «Statistica 6», «MS Excel 2007». Достоверность различий сравнимых показателей определяли по t-критерию Стьюдента, используемого для нормального распределения данных. Различия средних величин считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Снижение экспрессии эпителиального маркера E-кадгерина было выявлено в 22 (14%) всех случаев, в то время как появление экспрессии мезенхимального маркера виментина отмечалось в 78 (51%) исследованных случаев.

На основании определения рецепторного статуса (наличия экспрессии ER, PR, HER-2/neu) опухолевых клеток, все случаи были поделены на 4 группы в соответствии с иммуногистохимическими подтипами. К подтипу Luminal A отнесли 58 (38%) случаев, к подтипу Luminal B – 34 (22%) случая, к подтипу HER-2 overexpression – 10 (7%), к подтипу Basal-like – 50 (33%)(Рисунок 1).

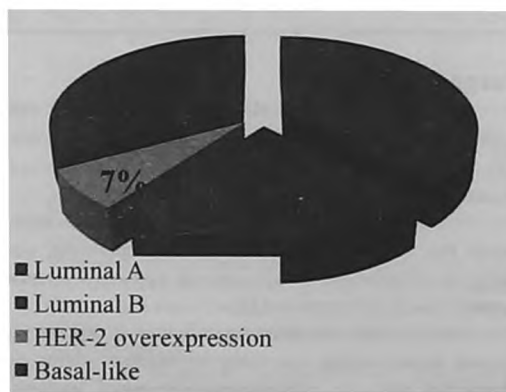


Рисунок 1. Распределение случаев инфильтративной карциномы молочной железы по иммуногистохимическим подтипам

Таблица 1. Распределение значений уровня экспрессии маркеров ЭМП по иммуногистохимическим подтипам

	Снижение экспрессии Е-кадгерина	Появление экспрессии виментина
Все случаи	22 (14%)	78 (51%)
Luminal A	12 (21%)	38 (76%)
Luminal B	6 (18%)	22 (65%)
HER-2 overexpression	0 (0%)	6 (60%)
Basal-like	4 (8%)	12 (24%)

При разделении всех случаев по иммуногистохимическим подтипам мы получили следующие результаты (таблица 1):

При сравнении с группой, включающей все случаи, отмечалось достоверное увеличение процента случаев со сниженной экспрессией Е-кадгерина в 1,5 раза ($p < 0,05$) в подтипе Luminal A, в 1,3 раза ($p < 0,05$) в подтипе Luminal B и уменьшение процента случаев со сниженной экспрессией Е-кадгерина в 1,75 раза ($p < 0,05$) при подтипе Basal-like. Ни в одном случае подтипа HER-2 overexpression не наблюдалось снижение экспрессии Е-кадгерина.

При сравнении с группой, включающей все случаи, отмечалось достоверное увеличение процента случаев с наличием экспрессии виментина в 1,5 раза ($p < 0,05$) в подтипе Luminal A, в 1,3 раза ($p < 0,05$) в подтипе Luminal B и в 1,75 раза ($p < 0,05$) при подтипе Basal-like. При анализе случаев из подтипа HER-2 overexpression было выявлено снижение процента случаев с наличием экспрессии виментина по сравнению с группой, включающей все исследуемые случаи в 2,1 раза ($p < 0,05$).

Заключение

Снижение экспрессии Е-кадгерина отмечалось во всех иммуногистохимических подтипах карциномы молочной железы кроме подтипа HER-2 overexpression, характеризующегося наличием экспрессии мембранного рецептора HER-2/neu и отсутствием экспрессии рецепторов стероидных гормонов ER и PR. Наибольшее число случаев с пониженной экспрессией Е-кадгерина относилось к подтипам Luminal A и Luminal B, характеризующимся наличием экспрессии ER и PR. Исходя из полученных данных видно, что снижение экспрессии Е-кадгерина ассоциировано с наличием экспрессии ре-

цепторов стероидных гормонов ER и/или PR.

Появление экспрессии мезенхимального маркера виментина отмечалось приблизительно в половине всех случаев, при этом значительно чаще в подтипах Luminal A, Luminal B и HER-2 overexpression, причем более выражена экспрессия виментина была в подтипах с наличием экспрессии рецепторов стероидных гормонов ER и/или PR. В подтипе Basal-like, характеризующимся отсутствием экспрессии мембранных рецепторов HER-2/neu и ядерных рецепторов ER и PR экспрессия виментина наблюдалась в два раза реже, чем в общей группе.

Одновременное снижение экспрессии Е-кадгерина и появление экспрессии виментина отмечено только в 8 (5%) случаях, что свидетельствует о том, что оба маркера могут не появляться одновременно и возможно существование нескольких механизмов для реализации ЭМП и запуска процесса метастазирования в отдаленные очаги. ■

Засадкевич Ю. М., научный сотрудник лаборатории патоморфологии ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий, аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО УГМУ, г. Екатеринбург; Бриллиант А.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории патоморфологии ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург; Сазонов С.В., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией патоморфологии ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО УГМУ, г. Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку - Засадкевич Ю.М., 620036, г. Екатеринбург, ул. Соболева, 25, тел. 8(343)3769828, yulka@bk.ru

Литература:

1. Леонтьев С.Л., Сазонов С.В. Создание системы пересмотра иммуногистохимических исследований при диагностике рака молочной железы // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2012. Т.38., ч1. С.18-22.
2. Пак Д.Д., Франк Г.А., Рябов И.И. Инвазивный дольковый рак молочной железы. Российский онкологический журнал. 2006; ч 2:52-56.
3. Weigelt B., Peterse J.L., and van't Veer L.J. Breast cancer metastasis: markers and models. Nature reviews/Cancer. 2005; Vol.5: 591-602
4. Makrilla N., Kollias A., Manolopoulos L., et al. Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. Cancer Investigation. 2009; 27: 1023-1037
5. Li D.-M., Feng Y.-M. Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets. Breast Cancer Res Treat. 2011; 128: 7-21
6. Yang J., Weinberg R.A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. Developmental Cell. 2008; 14: 818-829.
7. Франк Г.А., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю. Составление внеклеточного матрикса и маркеры адгезии в уротелиальном раке мочевого пузыря. Архив патологии. 2005; Т.67, ч3: 11-14.
8. Paredes J., Figueiredo J., Albergaria A., et al. Epithelial

- E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012; 1826: 297-311.
9. Kowalski P.J., Rubin M.A., Kleer C.G. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Research*. 2003; 5: 217-222.
 10. Korsching E., Packeisen J., Liedtke C., et al. The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J Pathol*. 2005; 206: 451-457.
 11. Satelli A., Li S. Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy or vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2011; 68 (8): 3033-3046.
 12. Brilliant A., Zasadkevich Y., Sazonov S. Features of vimentin and Ki67 expression in basal-like breast cancer. *The European Journal of Pathology Virchows Archiv*. 2013; V.463, N2: 250.
 13. Brilliant A.A., Zasadkevich Y.M., Sazonov S.V. Characteristics of the relation between epithelial-mesenchymal transition and proliferative activity in breast carcinomas. *European Journal of Cancer (EJC)*. 2013; Vol. 49, Supp.2: S216.
 14. Франк Г.А., Завалишина Л.Э., Данилова Н.В., Андреева Ю.Ю. Морфологическое исследование HER2-статуса рака молочной железы и желудка. Методические рекомендации и атлас. *Архив патологии*. 2013; Т.75, В.2.: 1-64.
 15. Allred D.C., Harvey J.M., Berardo M. et al. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod. Pathol*. 1998; 89: 111-117.