©С.А. Лысенко, 2013
УДК 616.24.006.6

Вопросы онкологии, 2013. Том 59, № 6

С.А. Лысенко

ВЛИЯНИЕ ПАРАНЕОПЛАСТИЧЕСКОГО РЕВМАТОЛОГИЧЕСКОГО СИНДРОМА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО НА ОПУХОЛЕВУЮ ЭКСПРЕССИЮ BCL-2

Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Украина

Произведена качественная и количественная иммуногистохимическая оценка экспрессии Bcl-2 у 140 больных раком легкого (РЛ): 57 пациентов с паранеопластическим ревматологическим синдромом (ПНРС) и 83 — без проявлений данного синдрома. Установлено, что у категории больных РЛ с проявлениями ПНРС значительно реже отмечается экспрессия Bcl-2, а также наблюдается достоверно более низкий средний уровень экспрессии Bcl-2 в отличие от больных РЛ без симптомов данного синдрома. Возникновение ПНРС у больных РЛ ведет к понижению опухолевой экспрессии Bcl-2, что свидетельствует о более высокой злокачественности и агрессивности опухолей.

Ключевые слова: **рак легкого, протеин Bcl-2, экспрессия, паранеопластический ревматологический синдром**

Апоптоз представляет собой физиологический процесс гибели клеток, направленный на поддержание клеточного гомеостаза в различных тканях. Не исключается, что опухолевый рост может быть связан с дисбалансом между пролиферацией клеток и их запрограммированной гибелью [2, 6].

В регуляции процессов апоптоза участвует множество различных факторов, в том числе биологические маркеры процесса клеточной гибели: ген p53 и белок Bcl-2 [16]. Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2) в настоящее время считают одним из основных ингибиторов или негативных регуляторов апоптоза. Кодирующий его ген впервые описан на фоне хромосомной транслокации в В-клеточной фолликулярной лимфоме человека [13], локализуется в 18-й хромосоме. Этот ген кодирует образование белка, накапливающегося в митохондриях. Bcl-2 контролирует проницаемость митохондриальной мембраны, тем самым, регулируя клеточную смерть. Он также предотвращает выход цитохрома С из митохондрий и связывает фактор, активирующий апоптоз — APAF1, что ведет к ингибированию каспаз. Кроме того, Bcl-2 связан со стволовыми клетками, коммитирующими дифференцировку и морфогенез. Уменьшение концентрации Bcl-2 приводит клетки к апоптозу [7, 12].

Bcl-2 — протеин служит фактором выживания клетки, защищая ее от программированной гибели, и проявляет онкогенный эффект, так как угнетает апоптоз. Этот белок экспрессируется рядом гемопоэтических клеток, малигнизированным и несвязанным с опухолью эпителием. С другой стороны, сверхэкспрессия Bcl-2 защищает клетки от гибели, но это не приводит к бессмертию нормальных клеток и не является причиной их опухолевой трансформации. Гетерогенность экспрессии Bcl-2 в опухолях предполагает разные пути регуляции гена [3, 15].

Белок Bcl-2 также связан с резистентностью опухоли к терапии. К тому же, экспрессия белка, ассоциированная с предраковыми поражениями, чаще всего связана с ранней стадией образования опухоли. Нарушение регуляции экспрессии Bcl-2 наблюдается у больных острым миелолейкозом и множественной миеломой. Исследованиями последних лет доказано прогностическое значение экспрессии Bcl-2 для таких опухолей, как неходжкинская лимфома, тимома, плоскоклеточная карцинома, рак молочной железы, желчного пузыря, гортани, легкого (РЛ) [5, 8, 10, 14].

С РЛ связано большое количество различных паранеопластических синдромов. В клинической практике очень частыми бывают различные ревматологические проявления, которые объединяют термином паранеопластический ревматологический синдром (ПНРС). Спектр симптомов и симптомокомплексов данного синдрома самый разнообразный — от локальных (артралгии или артриты) к системным воспалительным реакциям. Наиболее типичным и частым проявлением паранеопластического синдрома ревматологической группы считается гипертрофическая остеоартропатия — синдром Мари-Бамбергера [9, 11].

Интересными в данной ситуации являются изменения различных молекулярно-генетических маркеров, особенно тех, которые имеют

прогностическое значение. Следует отметить, что до сих пор не проводилось исследования экспрессии Bcl-2 у больных РЛ с проявлениями ПНРС. Известно лишь об общих исследованиях экспрессии данного протеина у больных РЛ, ее связи со степенью злокачественности, распространенностью процесса, прогнозом и выживаемостью больных [1, 4, 5, 8].

Цель настоящего исследования — изучение экспрессии Bcl-2 у больных РЛ при наличии у них проявлений ПНРС.

Материалы и методика

Для исследования использованы фрагменты опухолей 140 больных РЛ, которые находились на лечении в Винницком областном клиническом онкологическом диспансере в 2011–2012 гг. Первая группа — операционный или биопсийный материал 57 больных РЛ с проявлениями ПНРС, вторая группа — фрагменты опухолей 83 больных РЛ без данного синдрома. Среди всех больных, опухоли которых исследовали, было 122 (87,1%) мужчины и 18 (12,9%) женщин. Возраст пациентов колебался от 40 до 78 лет.

Больные обеих групп были обследованы клиническим, как одним из самых известных способов диагностики ПНРС у больных злокачественными опухолями, в частности и РЛ. Он базируется на оценке ревматологического синдрома с помощью объективного обследования и европейского опросника с определением индекса HAQ (Health Assessment Questionnaire).

Автором получено согласие Этического Комитета ВНМУ им. Н.И. Пирогова на проведение такого рода исследований.

Опухолевый материал фиксировали в 10,0% растворе нейтрального забуференного формалина и заключали в парафин. Гистологическое исследование проводили на срезах толщиной 4–5 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином.

Определение экспрессии белка Bcl-2 проводили на депарафинированных срезах с предварительной демаскировкой антигена в цитратном буфере (pH 6,0) на водяной бане на протяжении 30 мин. Оценку результатов иммуногистохимической окраски и фотографирование проводили с помощью светового микроскопа (увеличение ×100 и ×400). В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела (клон 124) фирмы «DAKO Cytomation», Дания. Для визуализации продуктов реакции использовали систему EnVision+ (DAKO) и хромоген DAB+ (DAKO).

Иммуногистохимическую реакцию оценивали по наличию мембраноцитоплазматического окрашивания. При этом количество положительных клеток подсчитывали в зонах, содержащих их максимальное количество. Уровень экспрессии Bcl-2 определяли по соотношению окрашенных хромогеном DAB+ ядер к неокрашенным в 10 полях зрения и выражали в процентах. При этом подсчитывали количество позитивно окрашенных клеток, приходящееся на 800–1000 опухолевых клеток. Мембраноцитоплазматическое окрашивание меньше чем в 10% клеток оценивалось как отрицательная реакция, больше чем в 10% клеток — как положительная реакция.

Статистическую обработку количественных показателей проводили с использованием параметрического критерия Стьюдента. Для проверки достоверности различий значений признаков в группах использовали точный критерий Фишера. Различия считались статистически достоверными при $p<0,05$ (95% точности). В работе использовали компьютерное программное обеспечение «Biostat» и «Excel 7.0».

Результаты и обсуждение

С I стадией РЛ было 33 пациента (23,6%), II стадию диагностировали у 47 (33,6%) и III стадию — у 60 (42,8%) больных.

По гистологическим формам исследуемые опухоли распределились следующим образом (рис. 1): немелкоклеточный РЛ (111 случаев — 79,3%), мелкоклеточный РЛ (29 случаев — 20,7%). В 36 случаях немелкоклеточного РЛ наблюдались аденокарциномы (25,7%) и в 75 случаях — плоскоклеточный рак (53,6%).

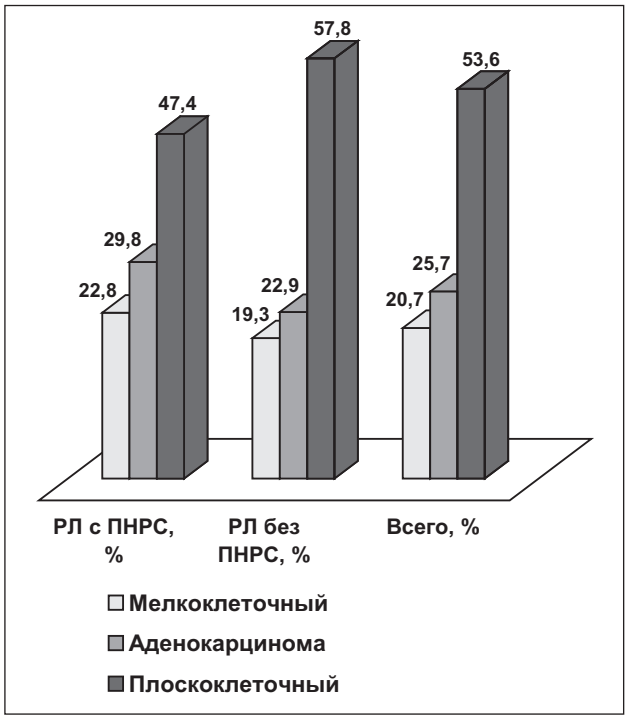

Рис. 1. Распределение больных РЛ по наличию ПНРС и гистологической форме

В первой группе больных плоскоклеточный рак составлял 47,4%, аденокарцинома — 29,8% и мелкоклеточный рак — 22,8%. Во второй группе больных немелкоклеточный рак встречался в 80,7% по отношению ко всем больным без ПНРС, а мелкоклеточный — в 19,3%. Среди немелкоклеточных вариантов плоскоклеточный рак был в 57,8%, аденокарцинома наблюдалась в 22,9%.

В целом экспрессия онкопротеина Bcl-2 (табл. 1) отмечалась у 54 больных (38,6% от общего количества всех больных РЛ — 140 случаев). Установлено, что при мелкоклеточном РЛ опухолевая экспрессия Bcl-2 наблюдалась реже, чем при немелкоклеточном: у 10 больных (34,5%) из 29. При немелкоклеточном РЛ экспрессия Bcl-2 обнаружена в опухолевых клетках 44 больных (39,6%).

Частота экспрессии онкопротеина Bcl-2 у больных РЛ с ПНРС (рис. 2) составляет 28,1%

Таблица 1

Экспрессия Bcl-2 у больных РЛ в зависимости от наличия ПНРС и гистологической формы

Гистологическая форма	Экспрессия Bcl-2			
	Больные с ПНРС (первая группа)		Больные без ПНРС (вторая группа)	
	Абс. число	Частота экспрессии, %	Абс. число	Частота экспрессии, %
Мелкоклеточный	3	23,1	5	31,3
Аденокарцинома	4	23,5	11	57,9*
Плоскоклеточный	9	33,3	22	45,8
Всего	16	28,1	38	45,8*

* — p<0,05 относительно первой исследуемой группы.

и соответственно, ниже в 1,63 раза, чем у больных РЛ без ПНРС (рис. 3), у которых этот показатель — 45,8%, разница между группами статистически значима (точный критерий Фишера, p<0,05).

Как видно из таблицы 1, у больных мелкоклеточным РЛ с ПНРС экспрессия Bcl-2 наблюдалась у 30,8% (4 случая из 13), у больных без ПНРС она составила 37,5% — разница между группами статистически недостоверна (p>0,1).

Случаи немелкоклеточного РЛ у больных с ПНРС с выявленной экспрессией Bcl-2 (12 больных, 21,1% ко всем больным первой группы) по гистологическим типам опухолей распределились следующим образом: 4 аденокарциномы (7,0%) и 8 плоскоклеточных карцином (14,0%). Среди больных немелкоклеточным РЛ без ПНРС опухолевая экспрессия Bcl-2 была отмечена у 32 пациентов (38,6% случаев ко всем больным второй группы). Среди них наблюдалось 11 аденокарцином (13,3%) и 21 плоскоклеточная карцинома (25,3%).

Существенная разница в экспрессии Bcl-2 в опухолевых клетках больных РЛ двух групп ассоциировалась с аденокарциномой (рис. 4). Число аденокарцином у больных РЛ с проявлениями ПНРС (4 случая) и выявленной экспрессией Bcl-2 по отношению ко всем аденокарциномам первой группы (17 случаев) составило 23,5%, что в 2,46 раза меньше чем аденокарцином с экспрессией Bcl-2 (57,9%) у больных без ПНРС, p<0,05) (табл.1).

Статистически недостоверным было различие в опухолевой экспрессии Bcl-2 между больными первой и второй групп (p>0,1) при плоскоклеточном раке (см. табл.).

У больных РЛ с ПНРС частота экспрессии Bcl-2 составила 52,3±6,9%. В то же время у больных РЛ без проявлений ПНРС этот показатель был значительно выше — 73,4±7,4%, p<0,05.

Проведенные нами исследования дают возможность утверждать, что экспрессия Bcl-2 при РЛ зависит как от клинических характеристик

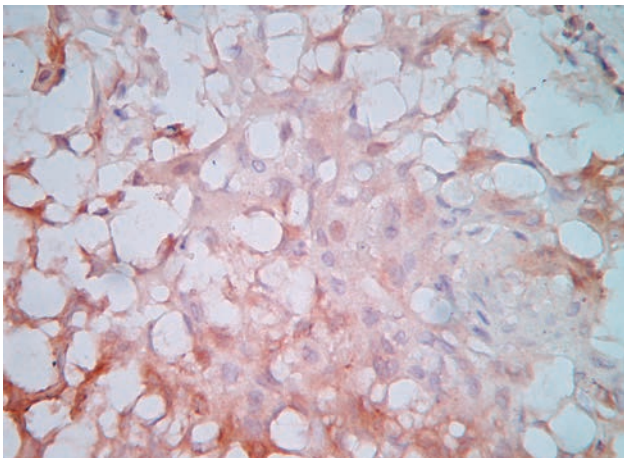

Рис. 2. Слабая экспрессия Bcl-2 в клетках плоскоклеточного РЛ с ПНРС ×400

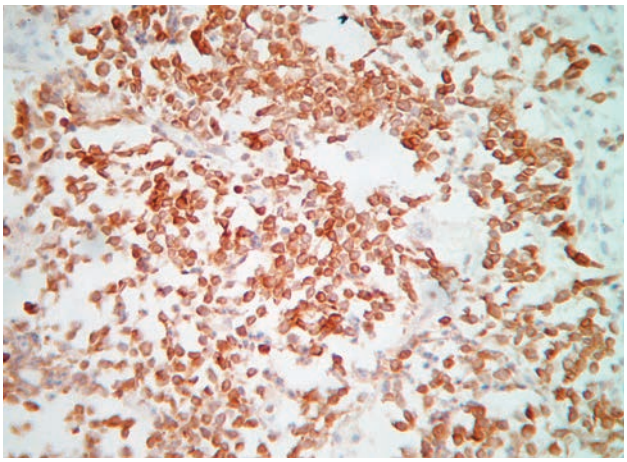

Рис. 3. Высокая экспрессия Bcl-2 в клетках плоскоклеточного РЛ без проявлений ПНРС ×400

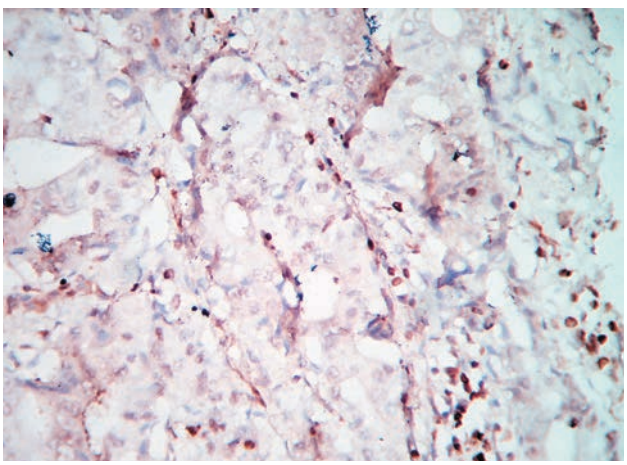

Рис. 4. Bcl-2-негативные опухолевые клетки

больного, в частности от наличия ПНРС, так и от гистологического типа опухоли. Так, у категории больных РЛ с проявлениями ПНРС значительно реже отмечается экспрессия Bcl-2, чем у больных РЛ без симптомов ПНРС. Это свидетельствует о наличии у данных пациентов потенциально более высокоагресивных опухолей. Пониженная экспрессия Bcl-2, как отмечают многие

исследователи [5, 8], служит негативным прогностическим фактором для больных РЛ. У больных РЛ с ПНРС наблюдается снижение степени выраженности экспрессии Bcl-2, по сравнению с пациентами без данного синдрома. Этот факт также свидетельствует о более высокой злокачественности РЛ у больных с проявлениями ПНРС.

В итоге, выявлена существенная разница в экспрессии Bcl-2 в клетках аденокарцином легкого у пациентов в сочетании с ПНРС и аденокарциномах у больных без данного синдрома. Полученные результаты дают возможность предположить взаимную связь пониженной экспрессии Bcl-2 и симптомов ПНРС при аденокарциномах, что способствует суммации их высокозлокачественных потенциалов.

Выводы

1. Частота экспрессии Bcl-2 у больных РЛ с проявлениями ПНРС в 1,63 раза меньше, чем у аналогических больных без ПНРС.
2. Пониженная экспрессия белка Bcl-2 в опухолевых клетках больных РЛ с проявлениями ПНРС чаще наблюдается при аденокарциномах и выявляется в 2,46 раза реже, чем экспрессия Bcl-2 в опухолевых клетках аденокарцином у больных без ПНРС.
3. Определение экспрессии Bcl-2 у больных РЛ может способствовать определению степени злокачественности новообразования, более эффективной оценке прогноза, индивидуализации лечения больных.

Перспективным для дальнейших исследований в данном направлении может быть иммуногистохимическое определение экспрессии таких молекулярных маркеров как Е-кадгерин, топоизомераза 2α в опухолевых клетках больных РЛ с проявлениями ПНРС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лактионов К.К., Давыдов М.И., Полоцкий Б.Е. и др. Прогностические и предсказывающие факторы у больных немелкоклеточным раком легкого // Практ. онкол. — 2006. — № 3. — С. 145–153.
2. Молекулярная диагностика опухолей: фундаментальные основы и практическое применение // Под ред. С.П. Осинского, Д.Ф. Глузмана, Й. Клиффа и др. — Киев: «ДІА». — 2007. — С. 248.
3. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека // Под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина. — Казань. — 2004. — С. 456.
4. Севостьянова Н.В., Малкова Е.М., Чойнозов Е.Л. и др. Особенности экспрессии молекулярно-биологических маркеров пролиферации и апоптоза у больных раком легкого // Бюлл. Сиб. Отд. РАМН. — 2004. — Т. 112. — С. 49–53.
5. Соболева Ю.В. Сравнительный анализ взаимодействия процессов пролиферации, апоптоза и межклеточной адгезии при центральном и периферическом плоскоклеточном раке легкого // Тихоок. мед. журн. — 2009. — №. 1. — С. 33–34.
6. Adams J.M., Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy // Oncogene. — 2007. — Vol. 26. — P. 1324–1337.
7. Brunelle J.K., Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family // J. Cell Sci. — 2009. — Vol. 122. — P. 437–441.
8. Chiappori A.A., Schreeder M.T., Moezi M.M. et al. A phase I trial of pan-Bcl-2 antagonist obatoclax administered as a 3-h or a 24-h infusion in combination with carboplatin and etoposide in patients with extensive-stage small cell lung cancer // Br. J. Cancer. — 2012. — Vol. 106. — P. 839–845.
9. Gheita T.A., Ezzat Y., Sayed S. et al. Musculoskeletal manifestations in patients with malignant disease // Clin. Rheumatol. — 2010. — Vol. 29. — P. 181–188.
10. Hussein M.R. Alterations of p53 and Bcl-2 protein expression in the laryngeal intraepithelial neoplasia // Cancer Biol. Ther. — 2005. — Vol. 4. — P. 213–217.
11. Jesus G., Barcelos A., Neves C. et al. Rheumatic manifestations and neoplasms // J. Acta Reumatol. Port. — 2006. — Vol. 31. — P. 305–321.
12. Kang M.H., Reynolds C.P. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy // Clin. Cancer Res. — 2009. — Vol. 15. — P. 1126–1132.
13. Oki Y., Copeland A., Hagemeister F. et al. Experience with obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist in patients with relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma // Blood. — 2012. — Vol. 119. — P. 2171–2172.
14. Smilek P., Dusek L., Vesely K. et al. Correlation of expression of Ki–67, EGFR, cerbB–2, MMP–9, p53, bcl–2, CD34 and cell cycle analysis with survival in head and neck squamous cell cancer // J. Exp. Clin. Cancer Res. — 2006. — Vol. 25. — P. 549–555.
15. Weyhenmeyer B., Murphy A.C., Prehn J.H.M., Murphy B.M. Targeting the anti-apoptotic BCL-2 family members for the treatment of cancer // Exp. Oncol. — 2012. — Vol. 34. — P. 192–199.
16. Youle R.J., Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. — 2008. — Vol. 9. — P. 47–59.

S.A.Lysenko

EFFECT OF PARANEOPLASTIC RHEUMATIC SYNDROME IN LUNG CANCER PATIENTS ON TUMOR EXPRESSION OF BCL-2

N.I.Pirogov Vinnitsa National Medical University, Ukraine

A qualitative and quantitative immunohistochemical evaluation of expression of oncoprotein Bcl-2 in 140 patients with lung cancer (LC) was performed: 57 patients with paraneoplastic rheumatic syndrome (PNRS) and 83 — without symptoms of the syndrome. It was established that in the group of lung cancer patients with manifestations of PNRS the expression of Bcl-2 was rarely observed, and the average level of expression of Bcl-2 was much lower when compared to similar patients with lung cancer but without symptoms of the given syndrome. The presence of PNRS in patients with lung cancer leads to reduced tumor expression by Bcl-2, indicating a higher malignancy and aggressive nature of the tumors.

Поступила в редакцию 03.04.2013