

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ РАСТВОРИМОГО Fas У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

УДК 618.19—006—037

Поступила 04.10.2010 г.

© **А.С. Ожерельев**, д.м.н., ведущий научный сотрудник отделения диагностики опухолей НИИ клинической онкологии¹;
Д.В. Комов, д.м.н., профессор, зав. отделением диагностики опухолей НИИ клинической онкологии¹;
С.Г. Аббасова, д.б.н., старший научный сотрудник²;
М.Б. Ориновский, д.м.н., врач отделения диагностики опухолей НИИ клинической онкологии¹;
И.В. Колядина, к.м.н., ассистент кафедры онкологии³, врач отделения диагностики опухолей НИИ клинической онкологии¹;
Л.К. Овчинникова, к.м.н., зав. отделением опухолей молочных желез⁴;
А.А. Тулеуова, к.м.н., докторант кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФПДО⁵;
М.В. Гришкевич, соискатель кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФПДО⁵;
У.Р. Мамедов, к.м.н., научный сотрудник отделения опухолей молочных желез НИИ клинической онкологии¹;
З.К. Карабекова, к.м.н., докторант кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФПДО⁵;
И.К. Воротников, д.м.н., профессор, зав. отделением опухолей молочных желез НИИ клинической онкологии¹

¹Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва;

²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;

³Российская медицинская академия последипломного образования, Москва;

⁴Московский областной онкологический диспансер, Балашиха;

⁵Московский государственный стоматологический университет, Москва

Представлены результаты сравнительного изучения уровней растворимого Fas (sFas) в сыворотке крови здоровых женщин (n=55) и больных раком молочной железы (РМЖ) в стадии T₁N₀M₀ (n=76) и T₂N₀M₀ (n=172), связей sFas с основными клинико-морфологическими факторами и прогнозом болезни. sFas выявлен с одинаковой частотой в сыворотке крови и больных РМЖ (как в стадии T₁N₀M₀ (53,9%), так и в стадии T₂N₀M₀ (59,3%)), и здоровых женщин (48,1%), однако его уровни были достоверно ниже у здоровых (0,73±0,10 нг/мл) по сравнению с общей группой больных (0,97±0,10 нг/мл). При этом не установлено связи исходных показателей sFas с возрастом и репродуктивной функцией пациенток, со стадией заболевания и рецепторным статусом опухоли, но обнаружена тесная связь со степенью злокачественности РМЖ. Обсуждается возможная связь sFas с прогнозом безрецидивной выживаемости больных РМЖ при T₂N₀M₀-стадии.

Ключевые слова: рак молочной железы, T₁₋₂N₀M₀-стадии рака, sFas.

English

Prognostic role of a soluble Fas in patients with a mammary gland cancer

A.S. Ozhereliev, M.D., leading scientific worker of the clinical oncology SRI tumor diagnosis department¹;

D.V. Komov, M.D., professor, head of the clinical oncology SRI tumor diagnosis department¹;

S.G. Abbasova, B.D., senior scientific worker²;

M.B. Orinovsky, M.D., physician of the clinical oncology SRI tumor diagnosis department¹;

I.V. Kolyadina, c.m.s., assistant of oncology chair³, physician of the clinical oncology SRI tumor diagnosis department¹;

L.K. Ovtchinnikova, c.m.s., head of the mammary gland tumor department⁴;

A.A. Tuleuova, c.m.s., aspirant of the post-graduate education faculty (PGEF) clinical biochemistry and laboratory diagnosis chair⁵;

M.V. Grishkevich, submitter for a doctor's thesis of the PGEF clinical biochemistry and laboratory diagnosis chair⁵;

Для контактов: Колядина Ирина Владимировна, тел. раб. 8(495)324-19-24, тел. моб. +7 906-792-66-94; e-mail: irinakolyadina@yandex.ru.

U.R. Mamedov, c.m.s., scientific worker of the mammary gland tumor department of the clinical oncology SRI¹;
Z.K. Karabeckova, c.m.s., aspirant of the PGEF clinical biochemistry and laboratory diagnosis chair⁵;
I.K. Vorotnickov, M.D., professor, head of the clinical oncology SRI mammary gland tumor department¹

¹N.N. Blokhin Russian oncologic scientific center of the RAMS, Moscow;

²M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovtchinnikov Institute of bioorganic chemistry, Moscow;

³Russian medical academy of post-graduate education, Moscow;

⁴Moscow regional oncologic dispensary, Balashikha;

⁵Moscow state stomatologic university, Moscow

The results of a comparative study of the soluble Fas (sFas) levels in a blood serum of the healthy females (n=55) and patients with a mammary gland cancer (MGC) in a stage of T₁N₀M₀ (n=76) and T₂N₀M₀ (n=172), the connections of sFas with the basic clinicomorphologic factors and a disease prognosis are presented. The sFas is revealed with a similar rate in a blood serum and patients with a mammary gland cancer both in a stage of T₁N₀M₀ (53.9%) and in a stage of T₂N₀M₀ (59.3%), and in healthy females (48.1%), however its levels were trustworthy lower than in healthy ones (0.73±0.10 ng/ml) compared to a general group of patients (0.97±0.10 ng/ml). Besides, the sFas initial value connection with an age and reproductive function of patients, with a disease stage and a tumor receptor status is not established, but a tight connection with a degree of the mammary gland cancer malignancy is found. A possible connection of sFas with a prognosis of the mammary gland cancer patient survival rate without recurrence at a stage T₂N₀M₀ is discussed.

Key words: mammary gland cancer, stages T₁₋₂N₀M₀, sFas, prognosis.

Одним из основных условий элиминации опасных для организма клеток, к числу которых относятся вирусинфицированные, опухолевые клетки, а также клетки, закончившие свой жизненный цикл, является апоптоз, или запрограммированная клеточная гибель [1]. В механизмах апоптоза на различных этапах задействованы многочисленные факторы и рецепторы клеточной гибели, а также ряд адапторных белков, приводящих в конечном итоге к активации внутриклеточных протеаз и самоуничтожению опасной для организма клетки. Любые сбои в этом сложном процессе приводят к развитию серьезных патологий, таких как болезнь Альцгеймера, множественный рассеянный склероз, амиотрофический склероз, некоторые лимфопролиферативные нарушения, а также к росту злокачественных опухолей [2]. Известно, что прогноз злокачественных опухолей связан с пролиферативным потенциалом составляющих их клеток [3, 4], устойчивостью этих клеток к действию факторов, регулирующих процессы дифференцировки и клеточной гибели [5, 6], а также чувствительностью к лекарственной терапии [7].

Fas/APO-1/CD95 является одним из ключевых рецепторов, запускающих апоптоз в клетке. Устойчивость клеток к Fas-зависимому апоптозу определяется как нарушениями в экспрессии, структуре и функционировании белков, опосредующих Fas-зависимый апоптоз, так и повышенной продукцией растворимого Fas (sFas) этими клетками. sFas (sCD95) является продуктом альтернативного сплайсинга полноразмерной мРНК Fas или протеолитического отщепления мембранной молекулы с поверхности клетки [8]. sFas дистантно ингибирует действие FasL, позволяя клеткам-продуцентам sFas уйти от противоопухолевой защиты организма [1, 9]. Идентифицировано несколько растворимых изоформ Fas, среди которых преобладает одна — Fas-delTM, или FasExo6Del, остальные изоформы продуцируются в незначительных количествах. Все изоформы способны модулировать апоптоз [2, 3].

Нарушения Fas-зависимого апоптоза выявлены при меланоме, раке прямой кишки и молочной железы, гепатоцеллюлярной карциноме, аденокарциноме легких и многих других злокачественных опухолях [2]. Повышенная концентрация sFas обнаружена у больных неходжкинской лимфомой [5], раком предстательной железы [10], мочевого пузыря [11] и молочной железы [12]. При этом показано, что высокий уровень sFas является независимым фактором неблагоприятного прогноза болезни при этих патологиях [6, 10, 11, 13]. Кроме того, уровень sFas в сыворотке крови может быть связан с эффективностью проводимой химиотерапии при злокачественных новообразованиях различной природы, а некоторые препараты способны повышать концентрацию sFas, усиливая антиапоптотический эффект и тем самым снижая эффективность проводимой терапии. По мнению исследователей, мониторинг концентрации sFas в процессе лечения необходим для выбора индивидуальной схемы терапии онкологических больных [7, 14].

Цель исследования — сравнительный анализ исходных (до лечения) уровней sFas в сыворотке крови больных раком молочной железы с T₁₋₂N₀M₀-стадиями и практически здоровых людей и его связь с основными клинико-морфологическими критериями заболевания и прогнозом.

Материалы и методы. В исследование включены 248 больных раком молочной железы (РМЖ); I стадию болезни (T₁N₀M₀) имели 76 женщин (31%), стадию IIA (T₂N₀M₀) — 172 женщины (69%). Диагноз РМЖ установлен на основании клинико-рентгенологических данных и подтвержден данными гистологического исследования в соответствии с Международной гистологической классификацией опухолей молочных желез (ВОЗ, 2003). Дольковый инфильтративный РМЖ обнаружен у 27 женщин (11,0%), протоковый инфильтративный — у 106 (42,7%), смешанный — у 106 (42,7%), слизистый — у 9 пациенток (3,6%). Средний возраст

обследованных больных РМЖ составил 57,9±0,7 года (в среднем — 57,5 года). Средний возраст больных в группах с разными стадиями опухолевого процесса — T₁N₀M₀ и T₂N₀M₀ — не различался и составил соответственно 58,1±1,2 и 57,8±0,8 года. Возраст больных при учете гистологического варианта строения первичной опухоли статистически не различался. Группу контроля составили 55 практически здоровых женщин (средний возраст 55,9±2,7 года, в среднем — 54,0 года).

Определение концентрации sFas в сыворотке крови проводили до лечения иммуноферментным методом с помощью тест-системы, разработанной научными сотрудниками ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН [1, 9].

Статистический анализ изучаемых признаков проводили с помощью пакета программ «Statistica для Windows» и SPSS. При выборе статистических процедур учитывали методологические требования Международного конгресса по гармонизации GCP «Статистические принципы для клинических исследований».

Результаты и обсуждение. У 248 больных РМЖ sFas был выявлен в 143 случаях (57,7%), причем в 116 случаях (46,8%) концентрация его не превышала 2 нг/мл, а у 27 больных (10,9%) была 2 нг/мл и более. Среднее содержание sFas в сыворотке крови больных РМЖ составило 1,7±0,2 нг/мл (Me — 1,1 нг/мл). В дальнейшем все пациентки были разделены на три группы в зависимости от концентрации sFas в сыворотке крови: 1-я группа — sFas не выявлен; 2-я группа — sFas колебался от 0,3 до 1,9 нг/мл; 3-я группа — sFas составил 2,0 нг/мл и более. В группе контроля среднее содержание sFas в сыворотке крови составило 0,7±0,1 нг/мл (Me — 0,7 нг/мл) и отличалось не только по частоте выявления, но и по средним характеристикам от его уровня у больных РМЖ (табл. 1).

Исходные концентрации sFas у больных РМЖ в стадиях T₁N₀M₀ и T₂N₀M₀ статистически значимо отличались от показателя в контрольной группе (p=0,001). Вместе с тем между группами больных РМЖ T₁N₀M₀- и T₂N₀M₀-стадии не выявлено достоверных различий как по среднему содержанию sFas (соответственно 1,58±0,17 и 1,72±0,21 нг/мл), так и по медианам (соответственно 1,1 и 1,1 нг/мл). Частота выявления sFas между вышеуказанными группами пациенток также достоверно не различалась и равнялась соответственно 53,9% — при T₁N₀M₀-стадии и 59,3% — при T₂N₀M₀-стадии.

Исходная концентрация и частота выявления sFas

Таблица 1

Содержание sFas в группе больных РМЖ T₁₋₂N₀M₀-стадий (исходное) и в группе контроля (p<0,05)

| Группы сравнения | Частота выявления, абс. число/% | sFas, нг/мл | |
|--|---------------------------------|----------------|----------|
| | | M±m | размах |
| Контроль (n=55) | 20/36,3 | 0,7±0,1/0,7 | 0,3—3,6 |
| РМЖ, общая группа (n=248) | 143/57,6 | 1,70±0,2/1,10 | 0,4—17,0 |
| T ₁ N ₀ M ₀ -стадия (n=76) | 41/53,9 | 1,58±0,17/1,10 | 0,6—5,0 |
| T ₂ N ₀ M ₀ -стадия (n=172) | 102/59,3 | 1,72±0,21/1,10 | 0,4—17,0 |

в сыворотке крови больных РМЖ T₁₋₂N₀M₀-стадий не была связана с возрастом пациенток. Дисперсионный анализ уровней sFas также не показал статистически значимых различий в возрастных группах больных РМЖ.

Чаще sFas выявляли у больных дольковым инфильтративным РМЖ (83,7%), чем протоковым (51,4%). При этом достоверно высокие показатели sFas выявлены также в группе больных дольковым инфильтративным РМЖ (2,4±0,5 нг/мл, Me — 1,4), по сравнению с группой с протоковым РМЖ (1,3±0,1 нг/мл, Me — 1,0; p<0,05) (табл. 2). Следует отметить, что при T₂N₀M₀-стадии РМЖ чаще выявляли sFas, чем при T₁N₀M₀-стадии, независимо от гистологического варианта строения опухоли.

Частота выявления sFas у больных с высокодифференцированным РМЖ составила 24% (11 из 47), с умеренно дифференцированным — 58,9% (89 из 151), с низкодифференцированным — 86% (43 из 50) (p=0,0001). При этом степень злокачественности в значительно большей степени, чем стадия РМЖ, определяла частоту выявления sFas в сыворотке крови этих пациенток. При увеличении степени злокачественности опухоли обнаружили также достоверное повышение содержания sFas в сыворотке крови больных (p=0,004) (табл. 3).

В исследовании не обнаружено различий в показателях частоты выявления и уровнях sFas в сыворотке крови больных РМЖ T₁₋₂N₀M₀-стадий у женщин с сохранной репродуктивной функцией и в постменопаузе, а также при учете длительности постменопаузального периода. Не выявлено связи между содержанием sFas

Таблица 2

Содержание sFas у больных РМЖ с учетом гистологического варианта строения опухоли и стадии заболевания, нг/мл (p<0,05)

| Гистологический вариант строения опухоли | T ₁ N ₀ M ₀ -стадия | | T ₂ N ₀ M ₀ -стадия | | Общая группа | |
|--|--|---------------|--|-----------------|--------------|---------------|
| | n | (M±m)/Me | N | (M±m)/Me | n | (M±m)/Me |
| Дольковый инфильтративный рак | 12 | (1,6±0,1)/0,7 | 29 | (2,70±0,10)/0,7 | 41 | (2,4±0,5)/1,4 |
| Протоковый инфильтративный рак | 25 | (1,5±0,2)/1,0 | 45 | (1,1±0,1)/1,0 | 70 | (1,3±0,1)/1,0 |
| Смешанный дольково-протоковый рак | 4 | (2,3±0,5)/2,2 | 23 | (1,8±0,2)/1,6 | 27 | (1,8±0,2)/1,6 |

Таблица 3

Содержание sFas в группе больных РМЖ с учетом степени злокачественности опухоли и стадии заболевания, нг/мл ($p < 0,05$)

| Степень дифференцировки опухоли | T ₁ N ₀ M ₀ -стадия | | T ₂ N ₀ M ₀ -стадия | | Общая группа | |
|---------------------------------|--|-----------------|--|---------------|--------------|-----------------|
| | n | (M±m)/Me | n | (M±m)/Me | n | (M±m)/Me |
| Высокодифференцированная | 4 | (0,73±0,10)/0,7 | 7 | (1,4±0,5)/0,7 | 11 | (1,15±0,30)/0,7 |
| Умеренно дифференцированная | 29 | (1,44±0,20)/1,1 | 60 | (1,2±0,1)/1,0 | 89 | (1,30±0,10)/1,0 |
| Низкодифференцированная | 8 | (2,49±0,60)/2,1 | 35 | (2,6±0,6)/1,5 | 43 | (2,60±0,50)/1,5 |

Таблица 4

Трехлетняя безрецидивная выживаемость больных РМЖ T₁₋₂N₀M₀-стадий с учетом концентрации sFas в сыворотке крови, % ($p < 0,05$)

| Содержание sFas, нг/мл | Показатели | T ₁ N ₀ M ₀ -стадия | T ₂ N ₀ M ₀ -стадия | Общая группа |
|------------------------|----------------------------|--|--|-------------------|
| sFas < 2,0 | Число больных | 64 | 152 | 216 |
| | Выживаемость, % Ме, мес | 84,1±6,1 Не достигнута | 81,4±4,2 52,4 | 83,9±3,1 53,0 |
| sFas ≥ 2,0 | Число больных | 12 | 20 | 32 |
| | Выживаемость, % Ме, мес | 53,5±18,7 36,6 | 39,7±13,4 34,2 | 50,8±10,8 36,3 |

в сыворотке крови больных РМЖ и рецепторным статусом опухоли. Так, в группе больных с положительным рецепторным статусом опухоли (РЭ+РП+) содержание маркера составило 1,5±0,3 нг/мл, в группе с отрицательным рецепторным статусом (РЭ-РП-) — 1,5±0,3 нг/мл, в группе со статусом РЭ+РП- — 1,1±0,2 нг/мл, со статусом РЭ-РП+ — 1,8±0,3 нг/мл, различия статистически недостоверны ($p = 0,5$).

Не выявлено также различий в содержании sFas в сыворотке крови у больных РМЖ с отсутствием экспрессии белка Her-2/neu в опухоли (Ме sFas — 1,3 нг/мл) и у больных с положительной экспрессией Her-2/neu (Ме sFas — 1,0 нг/мл) ($p = 0,6$).

У больных РМЖ T₁₋₂N₀M₀-стадий со значением sFas < 2,0 нг/мл в сыворотке крови частота выявления раннего рецидива составила 33 из 90 (36,7%), при концентрации sFas ≥ 2,0 нг/мл ранний рецидив выявлен у 20 из 21 (95,2%) ($p = 0,0001$). Указанная закономерность характерна для больных РМЖ как при T₁N₀M₀-стадии (29,6 и 85,7% соответственно), так и при T₂N₀M₀-стадии (41,0 и 100% соответственно).

При определении трехлетней безрецидивной выживаемости больных РМЖ с учетом стадии процесса и исходных уровней sFas в сыворотке крови (табл. 4) установлено, что у половины пациенток этой группы с уровнем sFas ≥ 2,0 нг/мл рецидив заболевания развился в первые 3 года наблюдения (Ме — 34,2 мес) и количество таких пациенток составляло 20 из 172 (11,6%).

Заключение. Ключевой ингибитор Fas-опосредованного апоптоза sFas выявлен с одинаковой частотой в сыворотке крови больных раком молочной железы T₁₋₂N₀M₀-стадий и у практически здоровых женщин, причем уровни его были статистически значимо ниже у здоровых женщин по сравнению с исходными (до ле-

чения) уровнями у больных РМЖ. Не обнаружено связи исходных значений sFas в сыворотке крови с возрастом, репродуктивной функцией пациенток, стадией заболевания, рецепторным статусом опухоли. Вместе с тем установлена тесная связь уровней sFas со степенью злокачественности опухоли, а исходные показатели sFas (≥ 2,0 нг/мл) в сыворотке крови больных при T₂N₀M₀-стадии могут служить маркерами неблагоприятного прогноза трехлетней безрецидивной выживаемости.

Литература

1. Аббасова С.Г., Кушлинский Н.Е., Липкин В.М. и др. Факты и перспективы изучения Fas-FasL-системы в норме и при патологии. Успехи современной биологии 2000; 120(3): 303—318.
2. Reichmann E. The biological role of the Fas/FasL system during tumor formation and progression. Cancer Biol 2002(12): 309—315.
3. Пирогов А.В., Аббасова С.Г., Дьякова Н.А. и др. Изменения в соотношении мембраносвязанной и растворимой форм CD95 (Fas) при отборе опухолевых клеток *in vivo*. Биохимия 2002; 67(2): 286—292.
4. Cascino I., Papoff G., Eramo A. et al. Soluble Fas/Apo-1 splicing variants and apoptosis. J Frontiers in bioscience: a journal and virtual library 1996; 1(1): 12—18.
5. Hara T., Tsurumi H., Takemura M. et al. Serum-soluble Fas level determines clinical symptoms and outcome of patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Am J Hematol 2000; 64(4): 257—261.
6. Konno R., Takano T., Sato S. et al. Serum soluble Fas level as a prognostic factor in patients with gynecological malignancies. Clin Cancer Res 2000; 6(9): 3576—3580.
7. Chaudhry P., Srinivasan R., Patel F.D. et al. Serum soluble

- Fas levels and prediction of response to platinum-based chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2008; 122(8): 1716—1721.
8. Cheng J., Zhou T., Liu C. *et al.* Protection from fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994; 263: 1759—1762.
 9. Аббасова С.Г., Щепрова Ж.М., Ламан А.Г. и др. Эпитопное картирование человеческого Fas с помощью пептидного фагового дисплея. *Бюлл экспер биол медицины* 2007; 44(10): 395—400.
 10. Furuya Y., Nagakawa O., Fuse H. Prognostic significance of serum soluble Fas level and its change during regression and progression of advanced prostate cancer. *Endocr J* 2003; 50(5): 629—633.
 11. Mizutani Y., Yoshida O., Ukimura O. *et al.* Prognostic significance of a combination of soluble Fas and soluble Fas ligand in the serum of patients with Ta bladder cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2002; 17(5): 563—567.
 12. Perik P.J., van der Graaf W.T., de Vries E.G. *et al.* Circulating apoptotic proteins are increased in long-term disease-free breast cancer survivors. *Acta Oncol* 2006; 45(2): 175—183.
 13. Niitsu N., Sasaki K., Umeda M. A high serum soluble Fas/APO-1 level is associated with a poor outcome of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 1999; 13(9): 1434—1440.
 14. Pichon M.F., Labroquere M., Rezai K. *et al.* Variations of soluble fas and cytokeratin 18-Asp 396 neo-epitope in different cancers during chemotherapy. *Anticancer Res* 2006; 26(3B): 2387—2392.