

THE EXPRESSION OF APOPTOSIS CONTROLLING PROTEINS AND DNA INDEX OF BREAST CANCER PATIENTS CELLS

E. I. Glukhova, M. I. Lukashina, V. N. Bogatyrev, A. Yu. Baryshnikov
Russian N.N. Blokhin memorial cancer research center RAMS

ABSTRACT

The permanent consistency of cell cycle and death is provided by cell apoptosis. The regulation of apoptosis process is controlled by such genes as p53, bcl-2, bax, etc. Changes of DNA content in living cells leads to increasing of genetic destabilization. So the investigation of correlation of expression of controlling apoptosis genes p53, bcl-2, bax, CD95 and ploidy of tumor cells were the goal of the current study. We have analyzed 128 tissue samples of breast cancer patients. For the assessment of expression of p53, bcl-2, bax, CD95 the immunofluorescence reaction and immunofluorescence analysis (ABC-method) were used; the ploidy of cells were measured by flow cytometry. It was showed that the expression of bax is increased and the expression of CD95 is decreased accordingly to the stage of disease development and malignancy of the tumor ($p=0.05$ and $p=0.006$, respectively). The expression of p53 has grown accordingly to the stage of disease development but there was not significant statistic value in results. The analysis of marker's expression in dependence on ploidy has demonstrated the same tendency as in the whole group. So, aneuploidy, increasing of bax and p53 expression, decreasing of CD95 expression can be assessed as indexes of malignant aggression measurement.

Экспрессия белков, контролирующих апоптоз, и индекс ДНК опухолевых клеток рака молочной железы

Е.И.Глухова, М.И.Лукашина, В.Н.Богатырев, А.Ю.Барышников
Российский онкологический научный центр им.Н.Н.Блохина РАМН

РЕЗЮМЕ

Сохранение клеточного баланса в организме поддерживается за счет апоптоза. Апоптоз регулируют такие гены, как p53, bcl-2, bax и др. Изменение содержания ДНК в клетках ведет к нарастанию генетической нестабильности. Поэтому изучение взаимосвязи экспрессии p53, bcl-2, bax и CD95, контролирующих апоптоз, и ploidy опухолевых клеток являлось целью данной работы. Было исследовано 128 образцов ткани, полученных от больных раком молочной железы. Для определения экспрессии p53, bcl-2, bax и CD95 использовали реакцию иммунофлуоресценции и иммуноферментный анализ (ABC-метод), ploidy оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Полученные результаты свидетельствуют, что экспрессия bax нарастает, а CD95 – снижается в зависимости от стадии за-

болевания и степени злокачественности ($p=0,05$ and $p=0,006$, соответственно). Экспрессия p53 нарастала в зависимости от стадии заболевания, но статистической значимости достигнуто не было. Анализ экспрессии маркеров в зависимости от ploidy клеток показал такую же тенденцию, что и в целом по группе. По результатам исследования можно сделать вывод, что анеуплоидия, увеличение экспрессии bax и p53, снижение экспрессии CD95 являются показателями агрессивности опухолевого процесса.

Введение

В онкологической практике к группе прогностических факторов рака молочной железы (РМЖ) относят такие клинические признаки, как возраст больной, менструальный статус, размер первичного очага, гис-

тологический тип опухоли, стадию заболевания. Однако, как показывает анализ материалов по раку молочной железы, только клинические признаки не дают четкого ответа на вопросы, связанные с прогнозом [3, 10]. Уровень рецепторов стероидных гормонов – эстрогенов, прогестерона, андрогенов и глюкокортикоидов также влияет на прогноз и чувствительность РМЖ к гормональному лечению [17]. И тем не менее, клинический опыт свидетельствует о том, что даже в однородных по этим параметрам группах больных, течение опухолевого процесса существенно различается, и поиск дополнительных критериев, отражающих агрессивность опухоли, ее биологические особенности, попрежнему актуален [1, 4]. В последние годы поиск факторов прогноза сосредоточен на клеточном и субклеточном (молекулярном) уровне. Большое внимание в последние несколько лет уделяют изучению функционирования антионкогенов и онкогенов, таких как bcl-2, bax, p53, c-erbB-2, c-мус, int-2 [2, 21]. Особое место принадлежит P53, изменения в котором, как предполагают, запускают развитие опухоли [7, 16].

Апоптоз играет важную роль в поддержании гомеостаза, сохранении клеточного баланса, при удалении клеток с генетическими повреждениями, росте и терминальной дифференцировке. До конца не ясен механизм запуска и исполнения запрограммированной клеточной смерти, хотя имеются доказательства, что апоптоз регулируют гены p53, bcl-2, bax и другие. Обнаружено также, что процесс ДНК фрагментации ассоциирован с ненормальной экспрессией таких генов, как Fas, ICE (интерлейкин 1 бетта-конвергируемый энзим), p53 и c-мус или bcl-2 [8, 9, 26].

Одним из следствий нарушения прохождения фаз клеточного цикла в опухолевых клетках является изменение содержания ДНК (анеуплоидия, полиплоидия), что ведет к нарастанию генетической гетерогенности клеточной популяции. Оценка распределения опухолевых клеток новообразований человека по содержанию ДНК является дополнительным маркером злокачественности карцином человека [18, 19].

Некоторые авторы в своих работах подчеркивают значимость изучения корреляции экспрессии P53, Bcl-2 и плоидности опухолевых клеток в оценке злокачественного потенциала новообразований [13, 24, 25].

В последние годы сложилось стойкое мотивированное мнение о том, что некоторые биологические характеристики опухоли, например, способность клеток к пролиферации, содержание ДНК, экспрессия некоторых онкогенов и антионкогенов и кодируемых ими белков, несут в себе наравне с классическими клиническими и морфологическими признаками важную дополнительную прогностическую информацию об агрессивности опухолевого процесса.

Материалы и методы исследования

Настоящее исследование основано на анализе данных 128 образцов больных раком молочной железы, получавших лечение в клинике РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН в период с 1999 по 2000год. В исследование включены данные о больных, получивших оперативное лечение в объеме радикальной мастэктомии в различных ее модификациях.

Основную возрастную группу составили больные в возрасте от 31 до 79 лет, средний возраст 53,03±11,92. Менструальный статус сохранен у 51 женщины (39,5%), не регулярный у 10 женщин (7,8%), менопауза у 68 женщин (52,7%).

Были исследованы 128 образцов ткани рака молочной железы. Из них 85 (66,4%) – инфильтративного протокового рака (ИПР); 19 (14,8%) – инфильтративного долькового рака (ИДР); 24 (18,8%) – редкие формы рака.

Исследуемый материал - кусочки ткани молочной железы, полученные во время операции, биопсии или трепанобиопсии (94 – полученный при оперативном вмешательстве; 25 – при биопсии опухоли; 10 – трепанобиопсии опухоли). В дальнейшем из этого материала готовили цитопрепараты и суспензию клеток. Клеточную суспензию фиксировали в 70% этаноле для определения плоидности клеток. Цитологические препараты красили по Лейшману для верификации материала. Цитопрепараты хранили при -20°C, после чего их фиксировали в охлажденном (-20°C) 96% этиловом спирте и затем в охлажденном ацетоне и использовали для определения экспрессии биомаркеров Bcl-2, Bax, P53pan, P53mt, ICO 160 (CD95), (таблица 1).

Таблица 1. Характеристика антител, использованных в работе на цитопрепаратах

Маркер	□ араерка ае□	каа□ аее□		па□ р□
□	М□ □□	еа□ р□ □□□	ек□ аа□ □	□□□ □
□ □	□ □	к□а□ аа□ □	□	□□□ □
□ □□□	М□ □	еа□ р□ □□□□	р□ рек□ аа□	□□□□ □
□ □	М□ □ □	еа□ р□ □□ □□	р□ □	□□ □ □□□ □
□ □	М□ □□	р□а□ еа□ □□ □□□ □□□	е□ паа□ аа□	□□□□ □ □Me□ ек□

Реакция иммунофлуоресценции

Для определения экспрессии поверхностных маркеров, таких как IC0160 (CD95), цитопрепараты обрабатывали 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA) в течение 15-20 минут. Удаляли р-р BSA и не промывая, наносили первичные МКАТ, инкубировали во влажной камере 1 час при комнатной температуре. После инкубации отмывали дважды в PBS (5-10 минут) и наносили F(ab)2-фрагменты антител против мышиных иммуноглобулинов, конъюгированных с Fite в рабочем разведении (1:200). После 30 минутной инкубации в холодильнике при +4°C трижды отмывали в PBS 5-10 минут, покрывали нефлуоресцирующей средой (50% глицерином).

Для определения экспрессии внутриклеточных биомаркеров, таких как Bcl-2, P53pan, P53mt, Вах, проводили дополнительную обработку охлажденным 1% тритоном-X-100 при +4°C в течение 1-2 минут, затем дважды отмывали в PBS. Далее цитопрепараты окрашивали и оценивали по методике, описанной выше.

Реакцию оценивали в полях с максимальной экспрессией маркеров на флуоресцентном микроскопе "Opton" при увеличении x400 в течение 24 часов после постановки, предохраняя от воздействия прямого интенсивного света.

Имуноферментный анализ (АВС-метод)

Экспрессию Вах в опухолевых клетках оценивали с помощью пероксидазной реакции.

После обработки цитопрепаратов охлажденным 1% тритоном-X-100 в течении 1-2 мин при +4°C, блокирование эндогенной пероксидазы проводили 3% перекисью водорода в темноте при комнатной температуре в течении 20 минут, затем отмывали дважды в PBS по 5 минут. После 20 минутной инкубации с 1% BSA наносили первичные МКАТ и инкубировали 16-18 часов в холоде при +4°C. Дважды отмывали в PBS по 5-10 минут. Для визуализации реакции применяли систему LSAB+Detection System (Dako Corp) согласно инструкции, выявление пероксидазной активности проводили с помощью 3,3-диаминобензидина (DAB). Докрашивали ядра гематооксилином Эрлиха 1-2 минуты, отмывали, заключали в бальзам. Реакцию оценивали на световом микроскопе "Axiolab" (Zeiss, Германия). Подсчет проводили в областях с максимальным окрашиванием.

Методика лазерной ДНК-проточной цитофлуориметрии

Для лазерной ДНК-проточной цитофлуориметрии использовали суспензию клеток, фиксированную холодным забуференным 70° этанолом (рН=7,2-7,4) (в соотношении 1:3) в течении 24 часов и более. После фиксации клетки окрашивали флуорохромом – пропиридиум йодидом. Фиксированную этанолом клеточную суспензию отмывали трис-НСI-буфером (рН=7,4), центрифугируя 10 минут при 1000 об\мин. К осадку добавляли 1,0 мл трис-НСI-буфера, тщательно ресуспендировали. Отбирали 0,4 мл суспензии и добавляли 1,0

мл красителя.

Исследование ДНК проводили на проточном анализаторе EPICS-XL (Coulter, США) с лазерным источником излучения.

Методика анализа клеток в фазах клеточного цикла

Для характеристики степени анеуплоидии клеток опухоли с помощью компьютерных программ анализатора EPICS-XL (Coulter, США) и Multicycle (Phoenix Flow Systems, США) вычисляли индекс ДНК (ИДНК), который характеризовал отношения интенсивности флуоресценции пика анеуплоидных клеток (его номер канала) к диплоидному. Диплоидными опухолями мы считали новообразования, у которых G0/1 пик находится в пределах контрольного пика диплоидных стандартов и соответственно их ИДНК всегда равен 1.0. В анеуплоидных новообразованиях он был больше или меньше 1.0.

В полученной ДНК-гистограмме процент клеточных ядер с различным содержанием ДНК вычисляли по отношению к общему числу исследованных клеток с помощью компьютерной программы Multicycle (Phoenix Flow systems, США, 1994). Программа автоматически рассчитывала плоидность опухоли и число клеток в S-фаза клеточного цикла.

Статистическая обработка полученных данных

Статистическую обработку данных проводили на персональном компьютере с использованием пакета программ Statistica v5.5.A. Непараметрические данные в зависимости от количества наблюдений анализировали с использованием теста χ^2 или точного критерия Фишера. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Экспрессию онкомаркеров (CD95, Bcl-2, Вах, P53pan, P53mt) оценивали на 128 образцах РМЖ, она различалась по интенсивности и локализации окрашивания. За положительную реакцию принимали окрашивание с интенсивностью 2+/3+ более чем в 10% опухолевых клеток. Окрашивание со слабой интенсивностью и с несоответствующей локализацией относили к отрицательной реакции.

В ходе исследований установили, что наблюдается низкая экспрессия CD95 (*puc1*). Этот маркер отсутствует в 94 случаях из 124 (75,8%), а обнаружен лишь в 30 (24,2%) случаях (таблица 2). Bcl-2 (*puc 2*) экспрессировался в 85 случаях из 128 (66,4%). Гиперэкспрессию Вах наблюдали в 33 случаях из 75 (44%). Положительную экспрессию P53pan (*puc 3*) и P53mt наблюдали в 42 из 119 (35,3%) и в 50 из 74 (67,6%) случаях соответственно.

При анализе экспрессии биомаркеров установили прямую корреляцию между экспрессией Bcl-2 и Вах ($r=0,40$; $p<0,05$), P53pan и P53mt ($r=0,50$; $p<0,05$), Вах и CD95 ($r=0,33$; $p<0,05$), P53pan и Вах ($r=0,32$; $p<0,05$), прямую связь между наличием уровнем рецепторов эс-

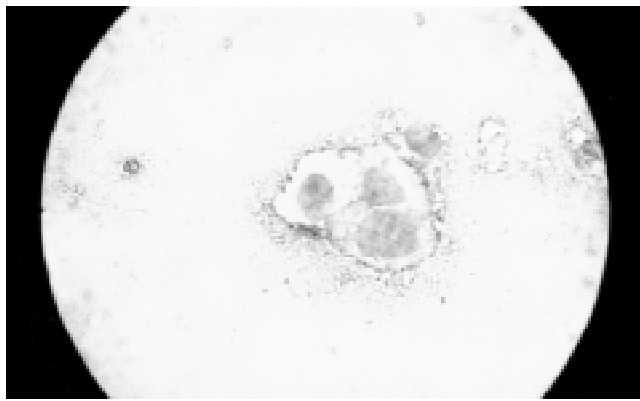


Рис. 1. Экспрессия CD95, окрашивание мембраны опухолевых клеток рака молочной железы, x400.

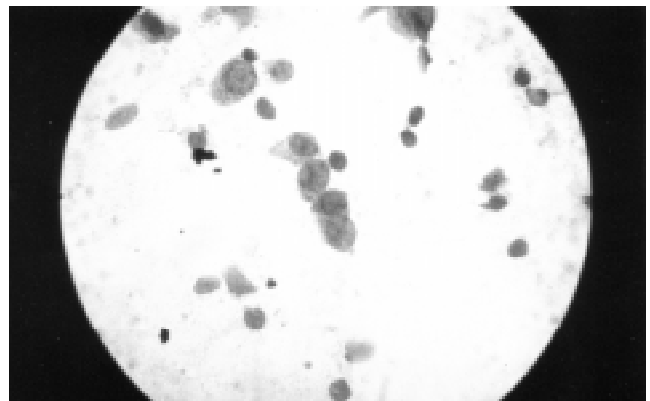


Рис. 2. Цитоплазматическое окрашивание Bcl-2 клеток рака молочной железы, x400.

Таблица 2. Экспрессия онкобелков при РМЖ

экспрессия	□□□□□□	к□□□□□□	п□□□□□□	и□□□□□□	е□□□□□□
□□□□□□	к□□□□□□	с□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□
□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□
□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□
□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□
□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□

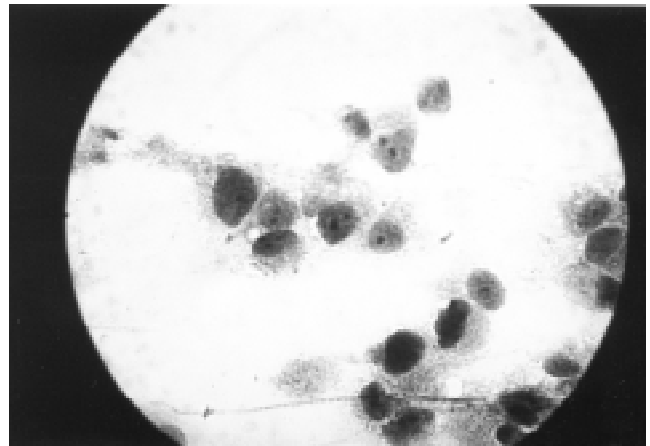


Рис. 3. Экспрессия P53, опухолевые клетки рака молочной железы окрашены с различной интенсивностью, x400.

трогена и экспрессией CD95 ($r=0,3$; $p<0,05$). Зависимость экспрессии онкобелков от возраста и менструального статуса не наблюдали.

При анализе экспрессии биомаркеров, контролирующих апоптоз, в зависимости от TNM-стадии, в соответствии с классификацией ВОЗ (таблица 3) отмечали тенденцию увеличения экспрессии Вах в зависимости от прогрессирования заболевания ($p=0,054$). При I стадии Вах экспрессировался в 1 случае из 8 (12,5%), II стадии – в 11 из 33 (38,2%), III стадии – в 17 из 28 (60,7%), IV стадии – в 2 случаях из 3 (66,7%). Отметим общую тенденцию к увеличению экспрессии P53mt в зависимости от увеличения стадии: при I стадии положительных было 8 из 12 (66,7%), а IV – 12 случаев из 14 (85,7%).

Таблица 3. Экспрессия Вах при РМЖ в зависимости от TNM-стадии

□□□□□□	I □□□□□□	□□□□□□	II □□□□□□	□□□□□□	III □□□□□□	□□□□□□	IV □□□□□□	□□□□□□
□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□
□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□
□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□

“+” – положительная экспрессия; “-” - отрицательная экспрессия

В зависимости от стадии заболевания наблюдали достоверное различие в экспрессии CD95 ($p=0,006$), Вах ($p=0,05$). При чем с увеличением распространенности заболевания экспрессия Вах возрастала: с 12,5% случаев на I стадии до 66,7% на IV стадии, для экспрессии CD95 какой-либо закономерности распределения не наблюдали.

В зависимости от степени злокачественности наблюдали достоверное отличие экспрессии CD95 ($p=0,006$) и Вах ($p=0,049$) (таблица 4). Наблюдали возрастающий уровень экспрессии Вах с увеличением степени злокачественности при РМЖ. Для CD95 четкой зависимости нет, при низкой степени злокачественности положительную экспрессию наблюдали в 18,8% случаев, при умеренной – лишь в 6,3% случаев, при высокой – в 32,4% случаев.

При анализе данных в зависимости от метастазирования исследованный материал разделили на 2 группы: I – без метастазов, II – с метастазами (таблица 5). Отметим достоверное отличие экспрессии Вах ($p=0,038$) при сравнении этих групп: с появлением метастазов увеличивается уровень экспрессии данного маркера. Так в группе без метастазов положительную экспрессию Вах наблюдали в 3 (18,8%) случаях, а в группе с метастазами – в 22 (51,2%) случаях. Экспрес-

Таблица 4. Экспрессия CD95 и Вах при РМЖ в зависимости от степени злокачественности

Группа	I		II		III		Итого
	CD95	Вах	CD95	Вах	CD95	Вах	
Экспрессия CD95	+	+	+	+	+	+	+
Экспрессия Вах	+	+	+	+	+	+	+
Отрицательная экспрессия CD95	-	-	-	-	-	-	-
Отрицательная экспрессия Вах	-	-	-	-	-	-	-

“+” – положительная экспрессия; “-” - отрицательная экспрессия.

сию CD95 в I группе обнаруживали в 5 (12,5%) случаях, а во II группе – в 23 (30,3%) случаях (p=0,058). Уровень Bcl-2, P53rap, P53mt в обеих группах практически не отличался (62,5% и 64,9%, 30,8% и 37,3%, 71% и 65,1% соответственно). При дальнейшем анализе экспрессии онкобелков II группу разделили на 2 подгруппы: 1 – метастазы в регионарные лимфоузлы и 2 –отдаленные метастазы (печень, легкие, кости и пр.), но каких-либо дополнительных закономерностей и взаимосвязей выявлено не было.

В зависимости от гистологической формы РМЖ отметили достоверное отличие экспрессии P53mt (p=0,014) (таблица 6), при ИПР и ИДР экспрессию p53 наблюдали значительно чаще, чем в группе редких форм рака. При ИПР CD95 экспрессировался в 21 случае из 82 (25,6%), Bcl-2 – в 57 случаях из 85 (67,1%), Вах – в 17 случаях из 44 (40%), P53rap – в 28 из 79 (35,4%), P53mt – в 36 случаях из 56 (68,3%). При ИДР CD95 экспрессировался лишь в 4 случаях из 18 (22,2%), положительную экспрессию Bcl-2 отмечали в 14 случаях из 19 (73,7%), Вах – в 7 случаях из 12 (58,3%), P53rap – в 4 из 16 (25%), P53mt – в 5 случаях из 7 (71,4%). В группе редких форм рака молочной железы CD95 экспрессировался в 4 случаях из 21 (19%), Bcl-2 – в 14 из 24 (58,3%), Вах – в 7 из 16 (43,7%), P53rap – в 8 случаях из 21 (38,1%), P53mt - в 2 случаях из 11 (18,2%).

В дальнейшем анализировали экспрессию онкобелков внутри групп, разделенных по гистологической форме РМЖ. В группе ИПР экспрессия CD95 различалась в зависимости от степени злокачественности, но статистической достоверности достигнуто не было (p=0,073). В данной группе экспрессия Вах подчинялась тенденции, обнаруженной при анализе всех случаев, т.е., увеличение экспрессии Вах при прогрессировании заболевания (p=0,062). Анализ экспрессии P53rap в зависимости от степени злокачественности показал, что между I и II степенью различий нет, а между II и III – наблюдали статистически значимые различия (p=0,04), при увеличении злокачественности возрастает экспрессия P53rap. Анализ экспрессии онкобелков при ИДР и редких формах рака в зависимости от стадии заболевания и степени злокачественности, достоверных различий не показал.

Эстрогенположительных опухолей было 74 случая (57,8%), а эстрогенотрицательных – 54 случая (42,2%). При анализе экспрессии онкобелков в зависимости от гормонального статуса не было обнаружено статистически достоверных различий.

Таблица 5. Экспрессия CD95 и Вах при РМЖ в зависимости от наличия метастазов

Группа	CD95	Количество случаев				Итого
		с метастазами		без метастазов		
		+	-	+	-	
Экспрессия CD95	+	+	+	+	+	+
Экспрессия Вах	+	+	+	+	+	+
Отрицательная экспрессия CD95	-	-	-	-	-	-
Отрицательная экспрессия Вах	-	-	-	-	-	-

Таблица 6. Экспрессия в зависимости от формы РМЖ

Группа	CD95	ИПР		ИДР		Итого
		+	-	+	-	
Экспрессия CD95	+	+	+	+	+	+
Экспрессия Вах	+	+	+	+	+	+
Отрицательная экспрессия CD95	-	-	-	-	-	-
Отрицательная экспрессия Вах	-	-	-	-	-	-

Диплоидных опухолей было 43 образца (40,6%), анеуплоидных – 63 образца (59,4%). Увеличение анеуплоидии наблюдали при увеличении распространенности процесса и злокачественности опухоли. При анализе зависимости плоидности опухолевых клеток и стадии установили достоверное различие (p=0,048) между этими параметрами. При прогрессировании и распространении опухолевого процесса увеличивается количество анеуплоидных опухолей (p=0,025) (таблица 7).

При ИПР наблюдали большее количество анеуплоидных опухолей (66,2%), чем при других гистологических формах (p=0,027) (таблица 8). При ИДР обнаруживали больше диплоидных случаев (71,1%), при редких формах рака количество диплоидных и анеуплоидных опухолей было примерно поровну. В ИПР эстрогенположительные опухоли были диплоидными в 10 случаях (23,8%), анеуплоидными – в 32 случаях (76,2%); эстрогенотрицательные опухоли были диплоидными в 14 случаях (45,2%), анеуплоидными – в 17 случаях (54,8%) (p=0,078).

Анализ взаимосвязи плоидности и метастазирования внутри одной гистологической группы показал, что в группе ИПР без метастазов диплоидных опухолей насчитывали 13 случаев (50%), анеуплоидных – 13

Таблица 7. Плоидность при РМЖ в зависимости от метастазирования

л□	л□ □	л□□	□	□
	□	□	□	
л□ □ □	□ □ □ □	□□ □□	□□ □ □	□□□□
□ л□ □	□ □ □□	□ □□□	□ □ □□	□

(50%); в группе с метастазами диплоидных было 12 (25%), анеуплоидных – 36 (75%) ($p=0,04$). В группе ИДР и редких форм достоверных отличий не обнаружили.

Анализ экспрессии онкобелков в группе диплоидных опухолей молочных желез в зависимости от степени злокачественности показал, что есть тенденция к повышению уровня экспрессии Вах и P53mt ($p=0,042$ и $p=0,042$ соответственно) с ростом злокачественности. В диплоидных опухолях увеличивалась экспрессия P53rap в зависимости от стадии ($p=0,037$), а экспрессия CD95 снижалась ($p=0,059$). Экспрессия CD95 в анеуплоидных опухолях достоверно снижалась в зависимости от роста степени злокачественности ($p=0,016$).

Обсуждение

Нарушение экспрессии онкогенов оказывает существенное влияние на нормальное развитие организма и его гомеостаз, а также вовлечено в различные патологические процессы, включая рак. Поэтому в настоящее время все больше работ посвящено детальному изучению их функционирования и экспрессии соответствующих белков.

Bcl-2 подавляет апоптоз в клетках и его соотношение с проапоптотическим гомологом Вах является важной определяющей клеточной чувствительности к индукции апоптоза. По данным литературы высокая экспрессия Bcl-2 ассоциируется с низким уровнем апоптоза ($p<0,001$), Вах не коррелирует с Bcl-2, а высокий уровень пролиферации и высокая степень злокачественности связаны с отсутствием экспрессии Bcl-2 ($p<0,001$) (van Slooten, 1996). По нашим данным существует корреляция между Bcl-2 и Вах ($r=0,40$; $p<0,05$).

R.Silvestrini и соавторы (1994) указывали на взаимосвязь между Bcl-2-экспрессией и размером опухоли ((2 и 2) ($p=0,01$)). Van Slooten и соавторы (1996) установили обратную корреляцию между высокой Bcl-2-экспрессией и большими размерами опухоли ($p=0,006$). В отличие от других авторов (R.Silvestrini, 1994; van Slooten, 1996; Steck, 1996; Joosens, 1998), нам не удалось подтвердить связь между экспрессией Bcl-2, эстрогеновыми рецепторами, степенью злокачественности и размером опухоли.

Некоторые литературные данные указывают на связь между экспрессией Вах и стадией ($p<0,001$), эстрогеновым статусом ($p<0,001$), а также о незначительной взаимосвязи с метастазами в лимфоузлы (C.Binder, 1996). По этим же данным нет связи между Вах и различными гистологическими типами и размером опухоли. Нами же установлена зависимость меж-

Таблица 8. Распределение плоидности в зависимости от формы РМЖ

□□□□□□□□□□	ПИР	□ИР	□□□□□□□□	□
	□□□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	
□□□□□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□
□□□□□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□	□□□□□□

ду экспрессией Вах и стадией ($p=0,05$), степенью злокачественности ($p=0,05$), наличием метастазов ($p=0,038$); обнаружена прямая корреляция между экспрессией Вах и CD95 ($r=0,33$; $p<0,05$).

Анализируя экспрессию P53rap, мы обнаружили прямую связь с количеством пораженных лимфоузлов ($r=0,32$; $p<0,05$), экспрессией Вах ($r=0,32$; $p<0,05$) и P53mt ($r=0,50$; $p<0,05$). Экспрессия P53mt также коррелировала с количеством пораженных лимфоузлов ($r=0,46$; $p<0,05$).

По одним данным литературы нет достоверной связи P53 с возрастом, гистологической формой, размером, стадией (E.Ioachim, 1998; S.Regele, 1999), по другим — P53 коррелирует со стадией и степенью злокачественности ($p=0,002$ и $0,0025$) (Ioakim-Liossi, 1998; Hardy-Bessard, 1998). В работе van Slooten и соавт. (1996) установили негативную корреляцию между экспрессией P53 и Bcl-2.

Ioakim-Liossi (1997) утверждал о корреляции плоидности с гистологической формой и клинической стадией ($p=0,001$ и $0,05$); R.Silvestrini (1993) указывал на достоверность связи плоидности с размерами опухоли ($p=0,03$) и эстрогеновыми рецепторами ($p=0,05$). В нашей работе установлена зависимость плоидности и стадии заболевания ($p=0,048$), плоидности и наличия метастазов ($p=0,025$), плоидности и гистологической формы ($p=0,027$).

В заключении следует отметить, что анеуплоидия, увеличение экспрессии Вах и P53, снижение экспрессии CD95 являются показателями агрессивности опухолевого процесса. Опухолям молочных желез с такими параметрами необходимо уделять более пристальное внимание.

Список литературы

1. Двойрин В.В., Аксель Е.М., Трапезников Н.Н. Заболеваемость и смертность от злокачественных новообразований населения России и некоторых других стран СНГ в 1993г.// Москва, 1995.
2. Имянитов Е.Н., Князев П.Г. Активация онкогена ERB-b-2 и прогноз течения рака молочной железы у человека.// Вопр. онкологии, 1991, т.37, №5, С.527-534,.
3. Летагин В.П. Лечение первичного рака молочной железы, отдаленные результаты.// Терапевт.архив, 1992, т.64, №10, С.33-37,.
4. Albanell M., Belluht M., Sole S. Factores prognosticos del cancer de mama con ganglios negativos. / Med.Clin., 1992, V.99, N 17, P.668-674,.

5. Binder C., Hiddemann W. Programmed cell death - many questions still to be answered // *Ann. Hematol.* 1994. **V.69**, №1. P. 45-55.
6. Binder C., Marx D., Binder L., et al. Expression of Bax in relation to Bcl-2 and other predictive parameters in breast cancer. // *Annals of Oncology*, 1996, **V7**, P.129-133..
7. Eriksson E.T. Immunohistochemical expression of the mutant p53 protein and nuclear DNA content during the transition from benign to malignant breast disease. // *Human Pathol.*, 1994, **V.25**, N11, P.1228-1233..
8. Evan G.I., Wyllie A.H., Gilbert C.S., et al. // *Cell*. 1992, **V.69**, P.119-128.
9. Fernandes-Alhemri T., Litwack G., Alnemri E.S. // *J.Biol.Chem.* 1994, **V.269**, P.30761-30764.
10. Garne J.P., Aspegren K., Linell F. Primary prognostic factors in invasive breast cancer with special reference to ductal carcinoma and histologic malignancy grade. // *Cancer*, 1994, **V.73**, N5, p.1438-1448.
11. Hardy-Bessard A.C., De Roquancourt A., De Cremoux P., et al. Prognostic value of p53 and Her-2 (over) expression in premenopausal women with node negative breast cancer prospectively treated with no or adjuvant CMF // *Annals of Oncology*, 1998 **V.9**, supp 4.
12. Ioachim E., Skopelidou A., Kamina S., et al. p53 protein expression in human breast cancer: an immunohistochemical study including correlation with steroid receptor status, proliferation indices, collagen type IV, laminin, C-erbB2 oncoprotein and cathepsin. // *D. Off. J. of the European Society of Mastology the Breast*. 1998. **V.7**, p.42-48.
13. Ioachim-Liossi A., Karakitsos P., Aroni K., et al. p53 Protein expression and DNA ploidy in common epithelial tumors of the ovary. // *Acta Cytol*, 1997; **V41**, P.1714-1718.
14. Ioachim-Liossi A., Markopoulos C., Karakitsos P., et al. P53 Protein Expression in Benign and Malignant Breast Lesions. // *Acta Cytol*, 1998; **V.42**, P.918-922.
15. Joosens E., Makar A., Van Leuven H., et al. Bcl-2 expression and apoptosis in ductal breast cancer. // *Annals of Oncology*, 1998, **V.9**, supp. 4.
16. Keiichi I., Hitochi T., Hiraide H., et al. Nuclear p53 immunoreaction associated with poor prognosis of breast cancer. // *Jap.J.Cancer Res.*, 1991, **V.82**, N 7, P.835-840.
17. Kommos F., Pfisteres J., Idris T. Steroid receptors in carcinoma of the breast: Results of immunocytochemical and biochemical determination and their effects on short-term prognosis. // *Anal.Quant.Cytol.Histol*, 1994, **V.16**, N3, P.203-210.
18. O'Reilly S.M., Campeljoh R.S., Barnes D.M., Milis R.R., Allen D., Rubens R.D., Richards M.A. DNA index, S-phase fraction, histological grade and prognosis in breast cancer. // *Br.J.Cancer*, 1990, **V.61**, N5, P.671-674.
19. Raju U., Zarbo R.J., Kubus J., Schultz D.S. The histologic spectrum of apocrine breast proliferations: A comparative study of morphology and DNA content by Image analysis. // *Hum-Pathol*, 1993, **V.24**, N2, P.173-181.
20. Regele S., Kohlberger P., Vogl F.D., et al. Serum p53 autoantibodies in patients with minimal lesions of ductal carcinoma in situ of the breast. // *Br.J. Cancer*, 1999, **V.81**, P.702-704.
21. Sellers H.T., Bunken S.W., Crowe D.R., Conner M.M. Multivariate analysis of clinical and molecular prognostic factors in breast cancer: a 16- year follow-up. // *South.Med*, 1994, **V.87**, N9, P.117.
22. Silvestrini R., Daidone M.G., et al. Prognostic significance of proliferative activity and ploidy in node-negative breast cancer. // *Annals of Oncology*, 1993, **V.4**, P.213-219.
23. Silvestrini R., Veneroni S., Daidone M.G., et al. The bcl-2 protein: A prognostic indicator strongly related to p53 in lymph node-negative breast cancer patients. // *J.Nat.Cancer Inst*, 1994, **V.86**, P.499-504.
24. Stek K., McDonnelly T., Sneige N., El-Naggar A. Flow cytometric analysis of apoptosis and bcl-2 in primary breast carcinomas: Clinical and biological implications. // *Cytometry*, 1996, **V.24**, N 2, P.116-122.
25. Van Slooten H-J., Clahnen P.C., van Dierendonck J.H., et al. Expression of bcl-2 in node-negative breast cancer is associated with various prognostic factors, but does not predict response to one course of perioperative chemotherapy. // *Br J Cancer*, 1996, **V.74**, P.78-85.
26. Yonish-Rouss E., Grunwald D., Wilder S. et al. P53-mediated cell death: relationship to cell cycle control. // *Mol Cell Biol*, 1993, **V.13**, P.1415-1423.