

# ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРВИЧНО-ДИССЕМИНИРОВАННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С МЕТАСТАЗАМИ В КОСТИ СКЕЛЕТА

Гафур-Ахунова К.М., Нишонов Д.А.

Ташкентский областной филиал Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра онкологии и радиологии

## Аннотация

В представленной статье рассмотрены результаты иммуногистохимического анализа экспрессии белков p53 и Bcl-2 у пациенток с первично-диссеминированным раком молочной железы (ПДРМЖ) с метастазами в кости скелета. Сравнительный анализ проведён между двумя группами больных: получавшими хирургическое лечение первичного очага и не оперированными. У оперированных пациенток (n=20) экспрессия p53 имела следующий характер: низкопозитивная — у 8 (40%), среднепозитивная — у 10 (50%) и высокопозитивная — у 2 (10%). Экспрессия Bcl-2 в данной группе была низкопозитивной у 10 (50%), среднепозитивной у 3 (15%), высокопозитивной у 1 (5%) и отсутствовала у 6 (30%). В группе без хирургического вмешательства (n=20) преобладала высокопозитивная реакция p53 — у 14 (70%), при этом низкопозитивная реакция отмечена у 2 (10%), среднепозитивная — у 4 (20%). Экспрессия Bcl-2 в этой группе выявлялась как низкопозитивная у 1 (5%), среднепозитивная — у 7 (35%) и высокопозитивная — у 12 (60%). Полученные данные свидетельствуют о том, что у не оперированных пациенток чаще наблюдается высокая экспрессия p53 и низкая экспрессия Bcl-2, что может указывать на более агрессивное течение опухолевого процесса и высокую метастатическую активность.

*Ключевые слова:* рак молочной железы, метастазы в кости, p53, Bcl-2, иммуногистохимия, хирургическое лечение, агрессивность опухоли.

# SKELET SUYAGIDAGI METASTAZLAR BILAN BIRLAMCHI DISSEMINIRLANGAN SUT BEZI RAKINI IMMUNOGISTOKIMYOVIY TEKSHIRISH

Gafur-Axunova K.M., Nishonov D.A.

Respublika ixtisoslashtirilgan onkologiya va radiologiya ilmiy-amaliy tibbiyot markazining Toshkent viloyati filiali

## Annotatsiya

Taqdim etilgan maqolada skelet suyaklarida metastazlari bo'lgan birlamchi tarqoq sut bezi saratoni (BSTK) bilan og'riqan bemorlarda p53 va Bcl-2 oqsillari ekspressiyasining immunogistokimyoviy tahlili natijalari ko'rib chiqilgan. Qiyosiy tahlil bemorlarning ikki guruhi o'rtasida o'tkazildi: birlamchi o'choqni jarrohlik yo'li bilan davolaganlar va operatsiya qilinmaganlar. Operatsiya qilingan bemorlarda (n=20) p53 ekspressiyasi quyidagi xarakterga ega bo'ldi: past ijobiy - 8 (40%), o'rtacha ijobiy - 10 (50%) va yuqori ijobiy - 2 (10%). Ushbu guruhda Bcl-2 ekspressiyasi 10 (50%) da past ijobiy, 3 (15%) da o'rtacha ijobiy, 1 (5%) da yuqori ijobiy va 6 (30%) da yo'q edi. Jarrohlik aralashuvizis guruhda (n=20) yuqori ijobiy p53 reaksiyasi ustunlik qildi - 14 (70%), shu bilan birga past ijobiy reaksiya 2 (10%), o'rtacha ijobiy - 4 (20%) da qayd etilgan. Ushbu guruhda Bcl-2 ekspressiyasi 1 (5%) da past ijobiy, 7 (35%) da o'rtacha ijobiy va 12 (60%) da yuqori ijobiy ekanligi aniqlandi. Olingan ma'lumotlar shuni ko'rsatadiki, operatsiya qilinmagan bemorlarda ko'pincha p53 ning yuqori ekspressiyasi va Bcl-2 ning past ekspressiyasi kuzatiladi, bu esa o'sma jarayonining yanada agressiv kechishi va yuqori metastatik faolligni ko'rsatishi mumkin.

*Kalit so'zlar:* ko'krak bezi saratoni, suyakdagi metastazlar, p53, Bcl-2, immunogistokimyo, jarrohlik yo'li bilan davolash, o'smaning agressivligi.

# IMMUNOGYSTOCHEMICAL EXAMINATION OF PRIMARY DISSEMINATED MORTAL CANCER WITH METASTASES IN THE SKELETAL BONE

Gafur-Akhunova K.M., Nishonov D.A.

Tashkent Regional Branch of the Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Oncology and Radiology

## Abstract

The presented article examines the results of immunohistochemical analysis of the expression of p53 and Bcl-2 proteins in patients with primary disseminated breast cancer (PDBR) with skeletal metastases. A comparative analysis was conducted between two groups of patients: those receiving surgical treatment of the primary focus and those not operated on. In the operated patients (n=20), p53 expression had the following character: low-positive - in 8 (40%), medium-positive - in 10 (50%), and high-positive - in 2 (10%). The expression of Bcl-2 in this group was low-positive in 10 (50%), medium-positive in 3 (15%), highly-positive in 1 (5%), and absent in 6 (30%). In the group without surgical intervention (n=20), a highly positive p53 reaction prevailed in 14 (70%), while a low-positive reaction was noted in 2 (10%), and a moderately positive reaction in 4 (20%). The expression of Bcl-2 in this group was found to be low-positive in 1 (5%), medium-positive in 7 (35%), and highly-positive in 12 (60%). The obtained data indicate that in unoperated patients, high p53 expression and low Bcl-2 expression are more common, which may indicate a more aggressive course of the tumor process and high metastatic activity.

*Keywords: breast cancer, bone metastases, p53, Bcl-2, immunohistochemistry, surgical treatment, tumor aggressiveness.*

**Актуальность.** Рак молочной железы (PMЖ) относится к наиболее распространённой формы злокачественных новообразований в мире. Если в мире (по данным ВОЗ, 2022) ежегодно регистрируется около 20 млн новых случаев различных форм злокачественных новообразований, а 2,4 млн (11,3%) – это случаи PMЖ. К сожалению, число больных с этим заболеванием увеличивается с каждым годом. Это происходит несмотря на то, что во многих странах мира широко проводятся скрининговые исследования [9]. Статистика ЗН свидетельствует о приросте заболеваемости PMЖ в России за последние годы более чем на 8,9%, а смертности – около 3% [1].

В Республике Узбекистан по данным 2022 года зарегистрировано 4415 больных с раком молочной железы (12,8 на 100тыс.населения), из них I стадия выявлена у 518 (11,8%), II стадия 2472 (56%), III стадия 990 (22,4%) и IV стадия 410 (9,3%) больных [4].

PMЖ является гетерогенным заболеванием, выявление молекулярно-генетических и иммуногистохимических маркеров и их корреляций позволяет индивидуализировать тактику лечения больных. Ключевыми белками, участвующими в управлении апоптозом, являются белки семейства BCL-2 и супрессор опухолевого роста p53. P53 — это фактор транскрипции, регулирующий клеточный цикл и выполняет функцию стимулятора формирования злокачественных опухолей.

Наблюдатель за «здоровьем» клетки передает сигналы о «неисправностях» белку w p53 множества внутриклеточных систем. С его помощью он принимает решение о том, делиться клеткой или нет. Если клетка подвергается непоправимому повреждению, то клетка с белком w p53 вызывает цепь событий, приводящую к "самоубийству," иначе называемую апоптозом. Клетки, не имеющие w p53 или неправильно функционирующие, не способны к такой саморегуляции и продолжают делиться даже тогда, когда они опасны для тела [10].

Bcl 2 – подавляет апоптоз в многоклеточных системах, включая лимфогематопэтические и нейронные клетки. Регулирует гибель клеток, контролируя проницаемость митохондриальных мембран. Предотвращение высвобождения цитохрома C из митохондрий

ингибирует фосфатазы путем связывания фактора, активирующего апоптоз.

Частота встречаемости экспрессии BCL2 (BCL2+) составляет, по данным разных авторов, от 54,1 % до 75,7 % [11]. Некоторыми авторами проведены исследования по ассоциации BCL2+ с тем или иным молекулярно-биологическим подтипом РМЖ. По мнению Abdel-Fatah T. Met all., (2013) [6] у 70 % больных с трижды негативным (ТНР) раком молочной железы выявлено отсутствие экспрессии BCL2 (BCL2-), что коррелировало с высокой пролиферативной активностью опухоли. Эти же данные о достаточно низкой экспрессии BCL2 подтверждены и в других исследованиях, где, помимо низкого уровня экспрессии BCL2, при ТНР отмечено высокое содержание p53 и высокая частота мутаций BRCA1. Повышенная экспрессия Bcl-2 при РМЖ коррелирует с наличием в опухоли рецепторов эстрогенов и прогестерона [8]. По мнению Callagy G. и соавторов, это объясняется положительной эстроген-рецептор-зависимой регуляцией экспрессии Bcl-2 [7]. Таким образом, данные литературы по частоте встречаемости и корреляции экспрессии BCL2 и p53 с молекулярно-биологическими подтипами РМЖ носят разрозненный характер и касаются в основном ТНР. Более того, результаты исследований часто мало сопоставимы ввиду того, что принципы деления РМЖ на подтипы менялись с течением времени [2].

Экспрессия p53 мутантного типа в опухолях больных РМЖ является неблагоприятным фактором прогноза. Уровень экспрессии p53 достоверно влияет на 3- и 5-летнюю ОВ (0,029) и БРВ (0,039) пациенток. При отсутствии экспрессии данного фактора (-) 3-летняя ОВ составляет  $93,1 \pm 4,7$ , а 5-летняя –  $87,6 \pm 6,9\%$ ; 3-летняя БРВ –  $86,2 \pm 6,4$ , а 5-летняя –  $74,6 \pm 8,4\%$ . С увеличением экспрессии p53 продолжительность жизни больных достоверно снижается: 3- и 5-летняя ОВ составляет  $63,6 \pm 14,5$ , а БРВ –  $45,5 \pm 15\%$  [5].

**Материал и методы исследования.** В наших исследованиях 40 пациентам с первично-диссеминированным раком молочной железы (ПДРМЖ) с поражением костей скелета, прошедших хирургические вмешательства, курсы химиотерапии, а также комбинированное и комплексное лечение в Ташкентском городском и областном филиале РСНПМЦХ в 2020-2024 годах проведено иммуногистохимическое исследование. 20 больным выполнены оперативные вмешательства на уровне первичного очага поражения и 20 больным не выполнены хирургические вмешательства. Результаты морфологического исследования были дополнительно изучены с помощью молекулярно-генетических маркеров P53 и Bcl 2 методом иммуногистохимического исследования, который в настоящее время признан золотым стандартом во всем мире. Этапы проведения иммуногистохимического исследования представлены в таблице 1.

У больных первично-диссеминированным раком молочной железы с поражением костей скелета, перенесших хирургические вмешательства - полученные результаты оценивали по методике "ALLRED", который рассматривает какой процент клеток является положительным для рецепторов, и какая реакция произойдет после окрашивания рецепторов. Эти данные объединяются для оценки образца по шкале от 1 до 3. При этом минимальный балл 0 (отрицательный), 1 балл (низкопозитивная реакция 10-30%), 2 балла (среднепозитивная реакция 30-60%), 3 балла (высокопозитивная реакция 60-100%). По данным иммуногистохимического анализа определяются гиперплазия ткани молочной железы, полиморфизм ядер злокачественной опухоли с внешней инвазией из железы, окрашивание ядер клеток темно-коричневого цвета, гиперхромные ядра и обильный митоз.

Этапы проведения иммуногистохимического (ИГХ) исследования.

№	Иммуногистохимия	Реактивы	Время
1	Приготовить срезы толщиной и 4 мкм	Полилизированные предметные стёкла	
2	Просушка срезов		24 час при комнатной температуре
3	Просушка в термостате		T-55-60° 60 минут
4	Депарафинизация	Орто-Ксилол	По 10 мин 3 раза
5	Дегидратация	Спирт 96%	По 3 мин 3 раза
6	Регидратация	Дистиллированная вода	10 мин
7	Демаскировка	Демаскирующий Буфер	В 98С воде 30-40 мин
8	Промывка среза	Раствор Трис - буфера (рН=7,5).	5 мин
9	Блокировка Эндоген пероксидазы	3% раствор Перекиси водорода	5 мин
10	Прмывка среза	Дистиллированная вода	3 мин
11	Визуализация антител (первичных), их инкубация	Специфические антитела	20-30мин
12	Промывка среза	Раствор Трис-буфера (рН=7,5).	5 мин
13	Визуализация антител (основных), их инкубация	Визуальная система	20-30мин
14	Промывка среза	Раствор Трис-буфера (рН=7,5).	5 мин
15	Визуализация с помощью Диаминбензидина	ДАБ-хромоген	5 мин
16	Промывка среза	Дистиллированная вода	3 мин
17	Окрашивание	Гемотоксилин Майера	5 мин
18	Промывка среза	Проточная вода	1 мин
19	Дегидратация	Спирт 96%	2 раза по 5 мин
20	Деспиртизация	Орто-ксилол	2 раза по 5 мин
21	Вывод	Бальзам, предметное стекло	

**Результаты.** Результаты исследования ген-супрессора p53 у больных, перенесших хирургические вмешательства первично-диссеминированным раком молочной железы, показали, что из 20 больных у 8 (40%) наблюдалась низкопозитивная реакция, у 10 (50%) – среднепозитивная реакция и у 2 (10%) – высокопозитивная реакция. Негативной реакции не наблюдалось.

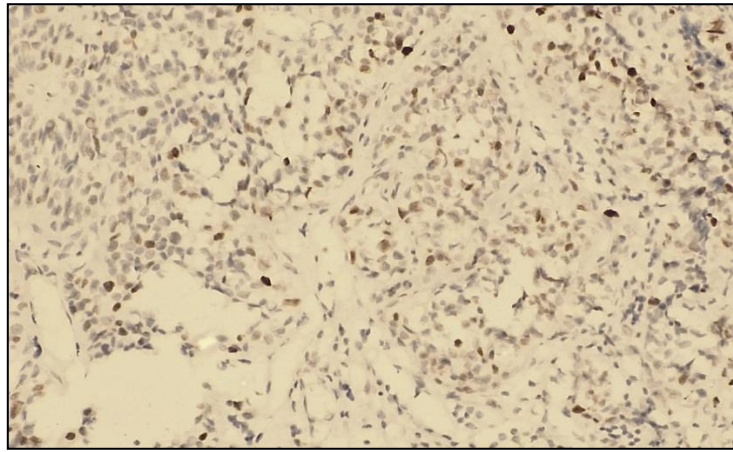


Рисунок 1. Низкопозитивная реакция ген-супрессора p53 у больных, перенесших хирургические вмешательства. Протоковый рак G-1. (20-25% положительная реакция). ИГХ - Dab хромаген. Об10хок40.

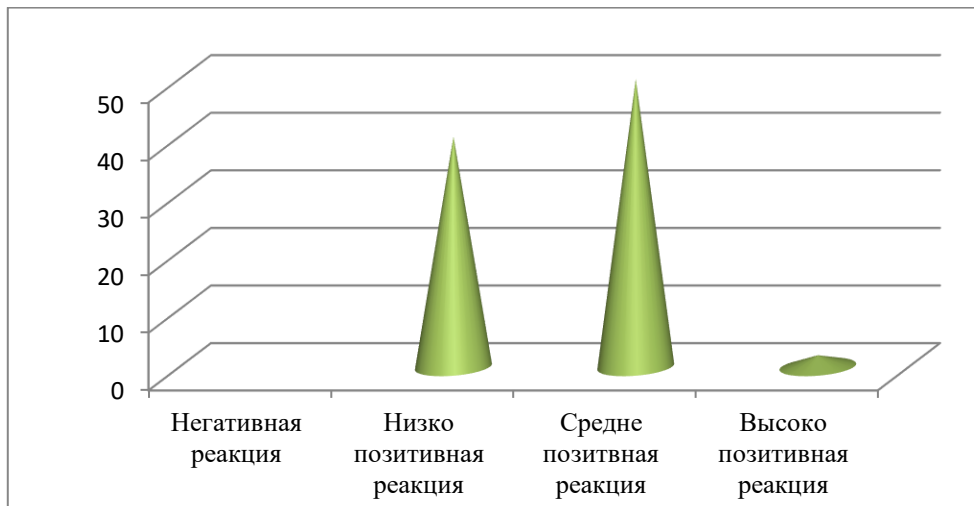


Рисунок 2. Показатели ген-супрессора p53 у больных раком молочной железы, перенесших хирургические вмешательства.

У больных, первично-диссеминированным раком молочной железы, перенесших хирургические вмешательства иммуногистохимическое исследование с определением Vcl 2 установлено, что по данным иммуногистохимического анализа отмечается гиперплазия протоков молочной железы, полиморфизм ядер клеток злокачественной опухоли с внешней инвазией протоков, окрашивание ядра темно-коричневого цвета, гиперхромные ядра и большое количество клеток злокачественной опухоли, подвергающихся митозу.

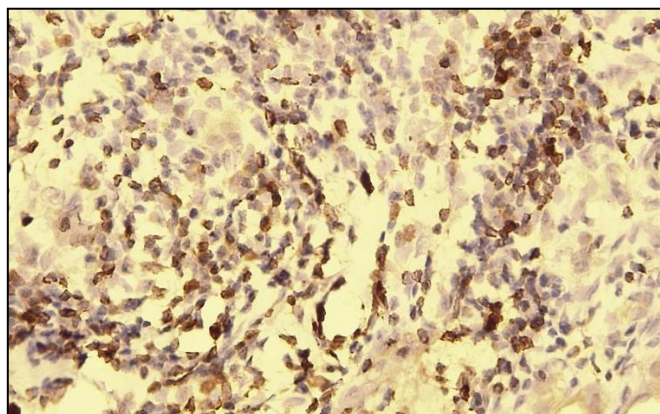


Рисунок 3. Показатель Vcl 2 у больных, перенесших хирургические вмешательства, среднепозитивная реакция. Протоковый рак G-3 (50-60% положительная реакция) ИГХ - Dab хромаген. Об10хок40.

Результаты исследования маркера Vcl 2 у больных первично-диссеминированным раком молочной железы, перенесших хирургические вмешательства, показали, что из 20 больных у 10 (50%) отмечена низкопозитивная реакция, у 3 (15%) – среднепозитивная реакция и у 1 (5%) – высокопозитивная реакция, а у 6 (30%) - отрицательная реакция.

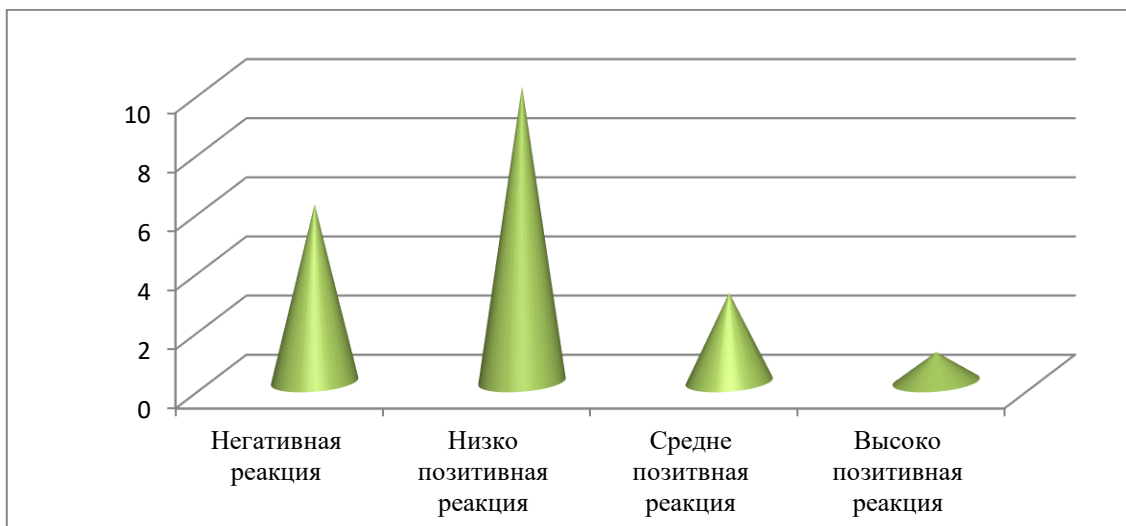


Рисунок 4. Показатели индекса апоптоза Vcl 2 у больных раком молочной железы, перенесших хирургически вмешательства.

У больных не перенесших хирургические вмешательства первично-диссеминированным раком молочной железы с метастазами в кости скелета при иммуногистохимическом исследовании ген-супрессора p53 выявлено, что определяется гиперплазия протоков молочной железы, полиморфизм ядер злокачественной опухоли с внешней инвазией из протоков, ядра тёмно-коричневого цвета, гиперхромные ядра и большое количество клеток злокачественной опухоли, подвергающихся митозу.

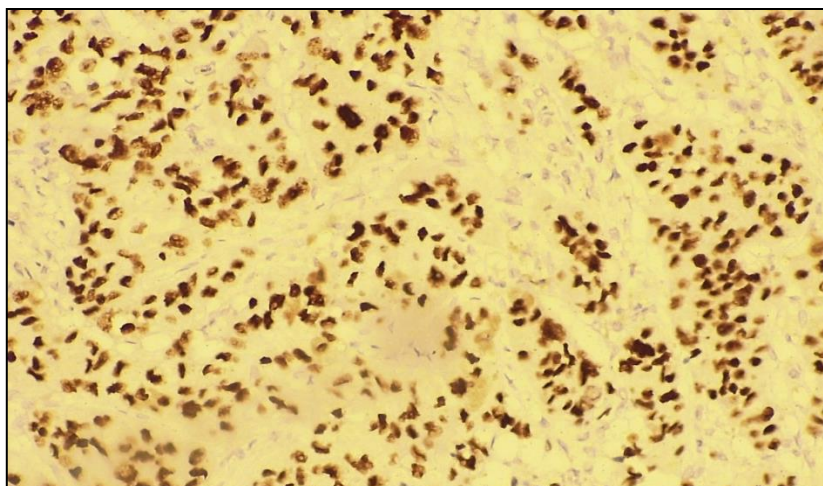


Рисунок 5. Высокопозитивная реакция ген-супрессора p53 у пациентов, не подвергшихся хирургическому вмешательству. Протоковый инвазивный рак G-3. (90% положительная реакция). ИГХ - Dab хромоген. Об10хок40.

Результаты исследования показали, что из 20 больных у 2 (10%) наблюдалась низкопозитивная реакция, у 4 (20%) - среднепозитивная реакция и у 14 (70%) - высокопозитивная реакция. Негативной реакции не наблюдалось.

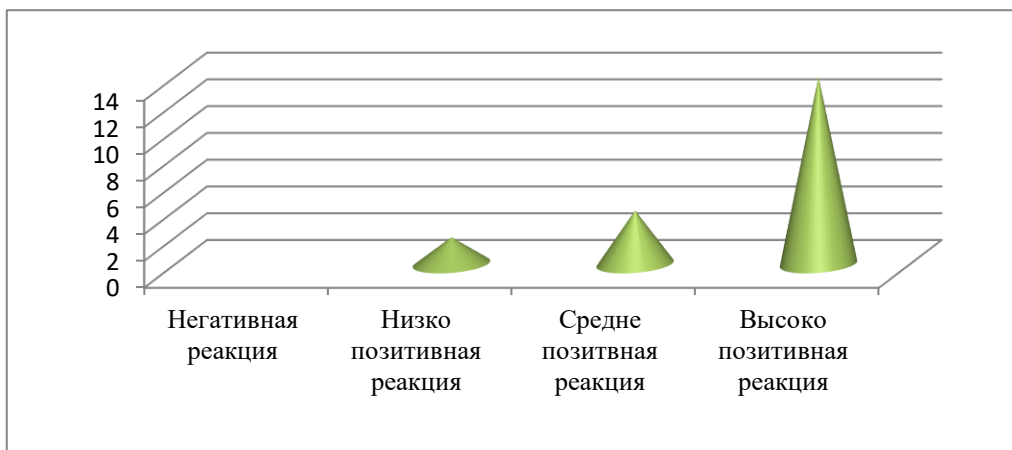


Рисунок 6. Показатели ген-супрессора p53 у больных первично-диссеминированным раком молочной железы, не перенесших хирургические вмешательства.

У больных первично-диссеминированным раком молочной железы, не перенесших хирургические вмешательства при иммуногистохимическом исследовании – Vcl 2 определяются гиперплазия протоков молочной железы, полиморфизм протоков с внешней инвазией, ядра злокачественных опухолей окрашены в тёмно-коричневый цвет, ядра гиперхромны, выявляются злокачественные опухолевые клетки, в большом количестве подвергающиеся митозу.

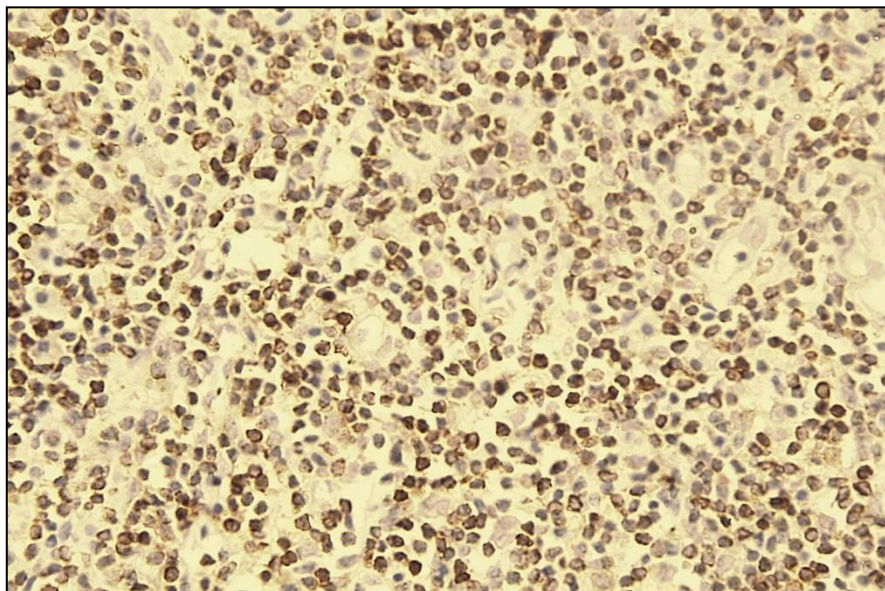


Рисунок 7. Индекс апоптоза Vcl 2 высокопозитивная реакция у больных, не перенесших хирургические вмешательства. Протоковый инвазивный рак G-3. (90% позитивная реакция) ИГХ - Dab хромаген. Об10хок40.

Результаты исследования Vcl 2 у больных первично-диссеминированным раком молочной железы, не перенесших хирургические вмешательства, показали, что из 20 больных у 1 (5%) наблюдалась низкопозитивная реакция, у 7 (35%) – среднепозитивная реакция и у 12 (60%) - высокопозитивная реакция. Отрицательной реакции не наблюдалось.

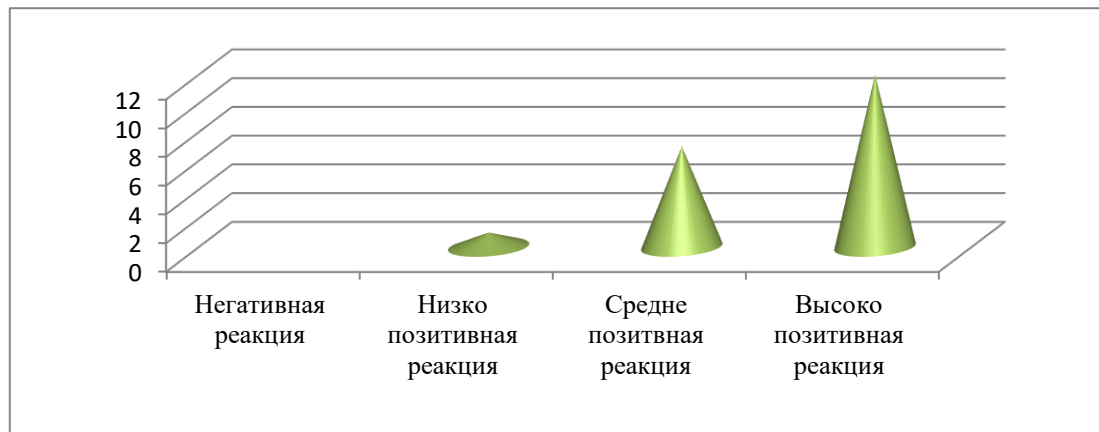


Рисунок 8. Индекс апоптоза Vcl 2 у больных не перенесших хирургические вмешательства рака молочной железы.

**Заключение.** Результаты иммуногистохимического исследования ген-супрессора p53 у больных, перенесших хирургические вмешательства первично-диссеминированным раком молочной железы с метастазами в кости скелета, показали, что из 20 больных у 8 (40%) наблюдалась низкопозитивная реакция, у 10 (50%) - среднепозитивная реакция и у 2 (10%) - высокопозитивная реакция. При изучении показатели Vcl 2 выявлено, что из 20 больных у 10 (50%) наблюдалась низкопозитивная реакция, у 3 (15%) - среднепозитивная реакция, у 1 (5%) – высокопозитивная реакция и у 6 (30%) - негативная реакция.

У больных, не перенесших хирургические вмешательства первично-диссеминированным раком молочной железы с метастазами в кости скелета, исследование ген-супрессора p53 показало, что из 20 больных у 2 (10%) наблюдалась низкопозитивная реакция, у 4 (20%) - среднепозитивная реакция и у 14 (70%) - высокопозитивная реакция. При изучении показатели Vcl 2 выявлено, что из 20 больных у 1 (5%) наблюдалась низкопозитивная реакция, у 7 (35%) - среднепозитивная реакция и у 12 (60%) - высокопозитивная реакция. Негативной реакции не наблюдалось.

Полученные результаты показали, что при первично-диссеминированном раке молочной железы у больных, не перенесших хирургические вмешательства на первичном очаге поражения отмечается высокая позитивная реакция на p53 и низкая позитивная реакция на Vcl 2. Это свидетельствует об агрессивном течении опухолевого процесса у этих больных и на высоком уровне метастазирования в отдалённые органы.

#### Использованная литература:

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. – илл. – 239 с. ISBN 978-5-85502-283-4
2. Кит О.И., Шатова Ю.С., Новикова И.А., Владимирова Л.Ю., Ульянова Е.П., Комова Е.А., Кечеджиева Э.Э. Экспрессия p53 и VCL2 при различных подтипах рака молочной железы. ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: rnoi@list.ru, shat5@rambler.ru
3. Семиглазов В. Ф., Палтуев Р. М., Семиглазов В. В. Общие рекомендации по лечению рака молочной железы (позиция Панели экспертов St. Gallen 16-й

- Международной конференции по терапии рака молочной железы). <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2019-15-4-50-57>
4. Тилляшайхов М.Н., Ибрагимова Ш.Н., Джанклич С.М.. Состояние онкологической помощи населению Республики Узбекистан в 2019 году. МЗ РУз, РСНПМЦОиР, Издат. Фан, Академия наук РУз, 2022.
  5. Цой Л.К., Богатырев В.Н., Летягин В.П., Вишневская Я.В., Платова А.М. Клиническое значение p53 и показателей ДНК-проточной цитофлуорометрии в сочетании с клиничко-морфологическими факторами прогноза при раке молочной железы. ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва Контакты: Лина Константиновна Цой [linatsoy@yandex.ru](mailto:linatsoy@yandex.ru).
  6. Abdel-Fatah T.M., Perry C., Dickinson P., Ball G., Moseley P., Madhusudan S., Ellis I.O., Chan S.Y. Bcl2 is an independent prognostic marker of triple negative breast cancer (TNBC) and predicts response to anthracycline combination (ATC) chemotherapy (CT) in adjuvant and neoadjuvant settings. *Annals of Oncology* 2013 Nov; 24(11):2801-7. doi: 10.1093/annonc/mdt277. Epub 2013 Aug 1.
  7. Callagy G.M., Pharoah P.D., Pinder S.E., Hsu F.D., Nielsen T.O., Ragaz J., Ellis I.O., Huntsman D., Caldas C. Bcl-2 Is a prognostic marker in breast cancer independently of the nottingham prognostic index. *Clinical Cancer Research* 2006; 12 (8): 2468–75.
  8. Dawson S.J., Makretsov N., Blows F.M., Driver K.E., Provenzano E., Le Quesne J., Baglietto L., Severi G., Giles G.G, McLean C.A., Callagy G., Green A.R., Ellis I., Gelmon K., Turashvili G., Leung S., Aparicio S., Huntsman D., Caldas C., Pharoah P. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *British Journal of Cancer*. 2010; 103 (5): 668–75.
  9. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. First published: 04 April 2024. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>. Citations: 349
  10. Hayes D.F. Tumor markers for breast cancer. *Ann Oncol* 2003;4:807–19.
  11. Hwang K.T., Woo J.W., Shin H.C., Kim H.S., Ahn S.K., Moon H.G., Han W., Park I.A., Noh D.Y. Prognostic influence of BCL2 expression in breast cancer. *International Journal of Cancer* – Oct 2012; 131(7); E1109–19.
  12. Kallel-Bayouhd I., Hassen H.B., Khabir A., Boujelbene N., Daoud J., Frikha M., Sallemi-Boudawara T., Aifa S., Rebaï A. Bcl-2 expression and triple negative profile in breast carcinoma. *Medical Oncology*. – Dec 2011; 28 Suppl 10; pp. 55–61.