

*В.Е. Чешук
А.Я. Яремчук
Е.В. Ковальчук
Л.М. Захарцева
В.М. Дроздов
С.И. Спивак
Ю.Д. Винничук
А.В. Козленко
Н.М. Березная*

*Институт экспериментальной
патологии, онкологии
и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины*

*Национальный медицинский
университет
им. А.А. Богомольца*

*Киевская городская
онкологическая больница, Киев,
Украина*

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К ВЫБОРУ ГОРМОНОТЕРАПИИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Резюме. *Проведен сравнительный анализ экспрессии гормональных рецепторов в клетках рака молочной железы и реакции взаимодействия культур эксплантатов опухоли в диффузионных камерах в среде с гормонами. Корреляция между уровнем экспрессии рецепторов гормонов и характером роста опухолевых эксплантатов под действием гормональных препаратов выявлена не во всех случаях. Использование методики изучения роста эксплантатов опухолей рака молочной железы в диффузионных камерах и определение рецепторов эстрогенов и прогестерона в клетках опухоли позволяют выбрать индивидуальный подход к гормональной терапии больных.*

Ключевые слова: *рак молочной железы, рецепторы эстрогенов и прогестерона, гормональная терапия, эксплантаты опухоли, культивирование, диффузионные камеры.*

В большинстве стран мира, в том числе в Украине, рак молочной железы (РМЖ) занимает ведущее место в структуре онкологических заболеваний у женщин [1, 2].

Более чем столетний опыт изучения различных аспектов этиопатогенеза РМЖ и эффективности методов его лечения свидетельствует о том, что эстрогены (Э) относятся к ведущим факторам развития опухолей молочной железы. Состояние и функционирование молочных желез на протяжении всей жизни женщины регулируются с помощью ряда гормонов. С наступлением половой зрелости в женском организме повышается концентрация Э, что предопределяет рост и функциональное созревание молочных желез. Инволюция желез в период менопаузы наступает в связи с прекращением функционирования яичников — основных продуцентов Э у женщин детородного возраста. Однако и в менопаузальный период в результате процессов ароматизации андрогенов в организме женщины образуется некоторое количество Э.

Пик заболеваемости РМЖ наблюдается в возрасте 40–70 лет на фоне инволюции половых желез [3]. Известны работы, в которых описано, что проведение заместительной гормонотерапии (ЗГТ) у женщин в климактерический период позволяет снизить

заболеваемость РМЖ и улучшить качество жизни [4]. Отмечено также, что у женщин, получавших ЗГТ и в дальнейшем заболевших РМЖ, прогноз был более благоприятен, чем у женщин, которым не проводили ЗГТ. Возможно, это объясняется более тщательным наблюдением и соответственно ранней диагностикой заболевания [5]. Однако до настоящего времени вопрос о проведении ЗГТ у женщин после лечения РМЖ является открытым.

Гормональная терапия (ГТ) является важной составляющей комплексного лечения больных РМЖ [6]. Гормональные препараты применяют на разных этапах комбинированного и комплексного лечения больных с операбельными формами РМЖ; особое место занимает ГТ при генерализации опухолевого процесса [7–9].

Значительный вклад в ГТ больных РМЖ внесли исследования по выявлению и количественному определению на опухолевых клетках рецепторов к эстрогенам и прогестерону (РЭ, РП) [10]. Установлено, что опухоли, клетки которых экспрессируют гормональные рецепторы, являются чувствительными к ГТ в 50–65% случаев [11]. Выявлено также, что чувствительность к действию препаратов зависит от того, сколько типов гормональных рецепторов экспрессируют клетки. Так, если опухоль име-

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ет один тип рецепторов, то чувствительность значительно снижается. Однако около 20% опухолей, несмотря на наличие РЭ и РП, нечувствительны к ГТ, а в 15% случаев при отсутствии таких рецепторов ГТ оказывается эффективной. Кроме изучения экспрессии рецепторов опухолевых клеток при определении показателей к проведению ГТ учитывают патогенетический тип РМЖ, возраст больной, менструальную функцию, состояния желез внутренней секреции [13, 14], уровень половых гормонов в крови [15].

В настоящее время сложилось мнение, что опухоли, более 10% клеток которых экспрессируют РЭ или РП, следует считать гормонально-зависимыми [11]. И тем не менее, к сожалению, определение рецепторов гормонов в клетках РМЖ не всегда является достаточно точным прогностическим критерием эффективности ГТ. Это обусловлено тем, что первичная опухоль состоит из биологически различных популяций клеток с разным содержанием рецепторов и соответственно с неодинаковой чувствительностью к ГТ [12]. Изложенное свидетельствует, что оценка наличия или отсутствия гормональных рецепторов не всегда однозначна и достаточна для выбора оптимальной лечебной тактики. Этим оправдан поиск новых подходов к определению гормончувствительности клеток РМЖ. Одним из таких подходов может быть изучение чувствительности культивируемых эксплантатов опухоли молочной железы к действию гормональных препаратов, а также определение рецепторов гормонов на опухолевых клетках, что и явилось целью данного исследования.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Были обследованы 20 больных с опухолью молочной железы: стадия T1N0M0 выявлена у 11, T1N1M0 — у 5, T2N1M0 — у 2; T2N1M1 — у 1 и T2N2M1 — у 1. Возраст пациенток — от 35 до 74 лет. Лечение начинали с осуществления секторальной резекции молочной железы и экспресс-патогистологического исследования опухоли без проведения предоперационной лучевой, химиотерапии и ГТ. Чувствительность опухолевых клеток к гормональным препаратам определяли с помощью двух методов: культивирования эксплантатов опухолей (ЭО) в диффузионных камерах с препаратами группы эстрогенов или прогестинов; определения экспрессии рецепторов на опухолевых клетках с использованием иммуногистохимического метода.

Из удаленной при операции опухоли в стерильных условиях вырезали фрагменты ткани, лишённые сосудов и очагов некроза, измельчали их (до диаметра около 1 мм), помещали на миллипорные фильтры (диаметр пор 0,22–0,23 мкм) диффузионной камеры, состоящей из двух плотно входящих друг в друга тефлоновых колец. Диффузионные камеры помещали в 24-луночные планшеты с культуральной средой RPMI-1640 (с добавлением L-глутамина, 20% эмбриональной телячьей сыворотки,

40 мг/л гентамицина) и культивировали на протяжении 6 сут при температуре 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO₂. После окончания культивирования фильтры фиксировали спирт-фармолем, окрашивали гематоксилином по Караччи, просветляли в ксилоле и заключали в канадский бальзам [16]. Результаты культивирования оценивали по обнаружению сфероидов и с учетом разработанной нами морфологической 9-балльной системы оценки роста ЭО *in vitro* [17]. Использовали следующие варианты культивирования ЭО: в полной культуральной среде RPMI-1640 (контроль); в полной культуральной среде с добавлением этинилэстрадиола (ЭЭ) (0,000025 мг/2 мл среды, что эквивалентно применяемой в клинических условиях дозе препарата 0,001 мг/кг); в полной культуральной среде с добавлением медроксипрогестеронацетата (МОПА) (0,2 мг/2 мл среды, что соответствует дозе 10 мг/кг). Определяли рецепторы иммуногистохимическим методом с использованием стандартного комплекса стрептовидин—биотин—пероксидаза и МКАТ к РП (клон PgR 636) или РЭ (клон 1D5) («DACO», Дания) на депарафиновых тканевых срезах, предварительно обработанных на водяной бане в течение 40 мин [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Под влиянием обоих гормональных препаратов наблюдали различные варианты ответа ЭО: 1) стимуляцию роста, 2) ингибицию роста, 3) отсутствие изменений роста по сравнению с контролем (таблица). В зависимости от характера реакции ЭО на каждый из препаратов больных распределили на 6 групп (см. таблицу).

В 1-ю группу вошли 4 больных (№ № 1, 2, 9, 16), в ЭО которых наблюдалась стимуляция роста в ответ на действие ЭЭ. В опухолевых клетках больных этой группы во всех случаях выявляли РЭ, однако уровень экспрессии различался: был высоким (РЭ+++), у больных № 2 и № 16, средним (РЭ++) — № 1, низким (РЭ+) — № 9. При сравнении особенностей роста ЭО и уровня экспрессии РЭ не была установлена четкая связь между исследованными характеристиками. Так, у больной № 16 высокий уровень экспрессии РЭ сочетался со значительной стимуляцией роста ЭО под влиянием ЭЭ: наблюдалось образование конгломератов опухолевых клеток и начальные этапы сфероидообразования по сравнению с миграцией единичных клеток в контроле. У больной № 9 при аналогичной выраженности влияния

Таблица
Влияние гормональных препаратов на рост эксплантатов РМЖ *in vitro*

Группа	Препарат	Изменение роста ЭО	Количество больных	
			абс. число	%
1-я	ЭЭ	Стимуляция	4	20
2-я	ЭЭ	Ингибиция	7	35
3-я	ЭЭ	Отсутствие эффекта	9	45
4-я	МОПА	Стимуляция	6	30
5-я	МОПА	Ингибиция	6	30
6-я	МОПА	Отсутствие эффекта	8	40

ЭЭ на рост эксплантата отмечали низкий уровень экспрессии РЭ. Незначительную стимуляцию роста ЭО (начальные этапы образования монослоя по сравнению с миграцией единичных опухолевых клеток в контроле (№ 1); образование конгломератов опухолевых клеток и начальные этапы сфероидообразования по сравнению с образованием монослоя средней плотности в контроле (№ 2)) под влиянием ЭЭ наблюдали как при высоком (больная № 2), так и при среднем (больная № 1) уровне экспрессии РЭ.

Во 2-ю группу вошли 7 больных (№ № 4, 5, 6, 13, 19, 20, 22), у которых наблюдали ингибицию роста ЭО под влиянием ЭЭ. В большинстве случаев у больных этой группы ингибирующее влияние ЭЭ проявлялось подавлением миграции единичных опухолевых клеток и деструкцией участков ЭО; в 1 случае (больная № 5) отмечено значительное ингибирующее влияние гормона, которое проявлялось деструкцией опухолевой ткани, в то время как в контроле происходило образование сфероидов. Определение РЭ на опухолевых клетках больных этой группы показало в основном средний уровень экспрессии; в 2 случаях (№ 20, № 22) РЭ не были выявлены, в 1 (№ 19) — наблюдали высокий уровень (РЭ+++).

В 3-ю группу включено наибольшее количество больных (№ № 3, 7, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 21 — всего 9), на рост ЭО которых ЭЭ не оказывал влияния. Для больных этой группы характерными были миграция единичных опухолевых клеток или отсутствие роста как в контрольных эксплантатах, так и под влиянием ЭЭ. При определении РЭ выявлен либо незначительный уровень экспрессии, либо отсутствие таковой.

По чувствительности к действию МОПА исследованные эксплантаты РМЖ распределялись аналогичным образом. В 4-ю группу вошли 6 больных (№ № 1, 2, 3, 6, 9, 18), рост ЭО которых стимулировался под влиянием этого препарата. Как и при использовании ЭЭ, уровень стимуляции был различным: у больных № № 1, 3, 9, 18 выявлена незначительная стимуляция роста ЭО, проявляющаяся ускорением образования монослоя; № 2 — образование сфероидов по сравнению с монослоем средней плотности в контроле; № 6 — значительная стимуляция роста (образование конгломератов клеток и сфероидов при отсутствии признаков роста ЭО в контрольной пробе). При определении РЭ установлен различный уровень их экспрессии: высокий (больные № 2, 3, 18), средний (№ 6), низкий (№ 1), отсутствие экспрессии (№ 9). Так же, как и при изучении влияния ЭЭ, не отмечено четкой зависимости между уровнем экспрессии РП и степенью стимуляции роста эксплантатов. Например, у больной № 6 значительная стимуляция роста ЭО сочеталась со средним уровнем экспрессии РП; у больной № 3 наблюдался высокий уровень РП и незначительная стимуляция роста ЭО; у больной № 9 РП вообще не были выявлены при незначительной стимуляции роста ЭО.

Ингибция роста ЭО под влиянием МОПА была выявлена также в 6 случаях (5-я группа — № № 4, 5, 13, 17, 19, 22). В большинстве проб отмечали незначительное ингибирующее влияние препарата, которое проявлялось подавлением миграции опухолевых клеток и появлением участков деструкции (№ № 4, 13, 17, 19, 22), в 1 пробе (№ 5) отмечена почти полная деструкция ЭО, в то время как в контроле наблюдали образование конгломератов клеток и сфероидов. Уровень экспрессии РП на опухолевых клетках больных этой группы также варьировал: был высоким (больные № 4, 19), низким (№ 5, 13) либо отсутствовал (№ 17, 22).

В 8 случаях (6-я группа) МОПА не оказывал влияния на рост ЭО (больные № 7, 11, 12, 14, 16, 20, 21, 15). В этой ситуации также не выявлено зависимости между реакцией ЭО на внесение гормонального препарата и уровнем экспрессии рецепторов к нему (например, у больных № 14 и № 16 отсутствие влияния МОПА на рост ЭО сочеталось с высоким уровнем экспрессии РП, а у больной № 7 — с отсутствием этих рецепторов на опухолевых клетках).

Обобщая полученные данные, можно сделать вывод, что в большинстве случаев (14 (70%) — из 20) характер реагирования ЭО *in vitro* на ЭЭ и МОПА был сходным. При сопоставлении результатов влияния гормонов на рост ЭО *in vitro* и уровня экспрессии соответствующих рецепторов на опухолевых клетках выявлено, что характер ответа ЭО мало зависел от уровня экспрессии РЭ или РП (рисунок). Можно отметить, что стимуляция роста ЭО под действием ЭЭ происходила только при наличии экспрессии РЭ, а отсутствие эффекта в большинстве случаев совпадало с отсутствием экспрессии РЭ. В то же время стимуляцию роста ЭО под действием МОПА в отдельных случаях наблюдали даже при отсутствии экспрессии РП. Полученные результаты, по нашему мнению, свидетельствуют, что методика изучения роста ЭО в диффузионных камерах может быть использована в клинической практике для обоснования индивидуального подхода к проведению гормональной терапии больных РМЖ.

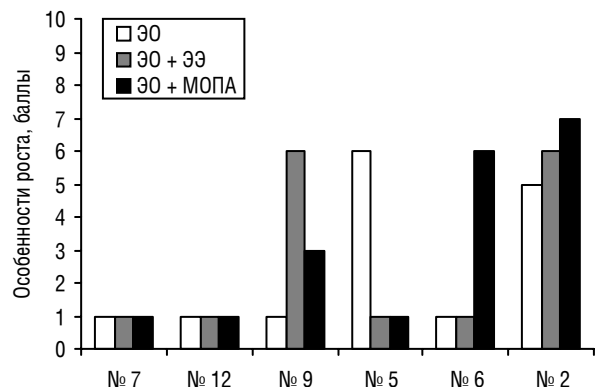


Рисунок. Характеристика роста *in vitro* ЭО, в клетках которых определяли разные уровни экспрессии РЭ и РП: № 7 (РЭ-, РП-), № 12 (РЭ+, РП-), № 9 (РЭ+, РП-), № 5 (РЭ+, РП+), № 6 (РЭ++, РП+++), № 2 (РЭ++++, РП++++)

ЛИТЕРАТУРА

1. Рак в Україні, 1998–2000 р. Бюлетень національного канцер-реєстру України (Гол ред Шалімов СО). Київ, 2001. 54 с.
2. Maxwell P. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet, Oncology* 2001; 2: 533–43.
3. Britton LA, Schairer C. Postmenopausal hormone-replacement therapy: time for a reappraisal? *New Engl J Med* 1997; 336 (25): 1821–2.
4. Roy JA, Sawka CA, Pritchard KI. Hormone replacement therapy in women with breast cancer: do the risks outweigh the benefits? *J Clin Oncol* 1996; 14 (3): 997–1006.
5. Bonnier P, Romain S, Giacalone PL, et al. Clinical and biologic prognostic factors in breast cancer diagnosed during postmenopausal hormone replacement therapy. *Obstetrics and Gynecology* 1995; 85 (1): 11–7.
6. Beatson GT. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamm. Suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet* 1986; 2: 104–62.
7. Макаренко НП. Эндокринная терапия рака молочной железы у женщин. *Рус мед журн онкол* 1998; (10): 20–3.
8. Howell A, et al. Reviews on Endocrine-related Cancer. 1993; 43: 5–21.
9. Hortobagyi GN, Piccard-Gebhart MG. Current Management of advanced breast cancer. *Sem Oncol* 1996; 23 (5) (Suppl 11): 1–5.
10. Jensen EV, DeSombre ER, Jungblut PN. Estrogen receptors in hormone responsive tissues and tumors: Endogenous Factors Influencing Host-Tumor Balance. Chicago: University of Chicago Press, 1967. 15.
11. Mc Guire, et al. Evaluation of estrogen receptor assays in human breast cancer tissue. *Cancer Res* 1977; 37: 637–9.
12. Tubiana M. The scientific bases of cancer management: at the interface between fundamental research and clinical practice. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991; 117, 275.
13. Семиглазов ВФ, Винин АГ, Моисеенко ВМ. Минимальный рак молочной железы. Санкт-Петербург: Гиппократ, 1992. 240 с.
14. Тарутинов ВИ, Досенко ИВ, Верхушечная СИ. Принципы формирования индивидуальных планов этапного лечения больной на рак молочной железы с учетом основных патогенетических форм заболевания. Киев, 1999. 24 с.
15. Дрижак ВІ, Бабанлі ШР. Ад'ювантна гормонотерапія раку молочної залози. Матеріали респ наук-практ конф. К.: 1998: 28–9.
16. Якимович ЛВ, Бережная ЛМ, Семенова-Кобхарь РА и др. Использование метода диффузионных камер для выявления больных со злокачественными образованиями, подде-

жащих иммунотерапии рекомбинантным интерлейкином-2. Информ письмо Киев: 1988. 10 с.

17. Бережная НМ, Ковальчук ЕВ, Денисевич ТВ и др. Сравнительная оценка особенностей влияния иммуномодуляторов различного происхождения на рост эксплантатов и изолированных опухолевых клеток человека и животных. *Эксперим онкол*, 1996; 18 (3): 244–50.

18. Олійниченко ГП, Захарцева ЛМ, Дроздова ВМ и др. Клиническое значение рецепторов эстрогенов, прогестерона и онкобелка her-2/neu в клетках рака молочной железы. *Онкология* 2001; 4 (1): 33–6.

DEVELOPMENT OF APPROACHES TO CHOICE OF ENDOCRINOTHERAPY TACTICS IN BREAST CANCER

V.E. Cheshuk, A. Ya. Yaremchouk, E.V. Kovalchouk, L.M. Zakhartseva, V.M. Drozdov, S.I. Spivak, Yu.D. Vinnychouk, A.V. Kozlenko, N.M. Berezhnaya

Summary. The paper reports findings of a comparative analysis of the expression of hormone receptors on breast cancer cells and interaction responses of explants cultured in diffuse cameras with hormone-supplemented media. Correlation between the level of expression of hormone receptors and the growth pattern of tumor explants under the effect of hormone agents was identified not in all cases. Application of techniques designed for investigating the growth patterns of breast cancer explants in diffuse cameras allows to identify an individual endocrinotherapy approach for patients in clinical practice in addition to identifying estrogen and progesterone receptors on tumor cells.

Key Words: breast cancer, estrogen and progesterone receptors, endocrinotherapy, tumor explants, culturing, diffuse cameras.

Адрес для переписки:

Чешук В.Е.

01000, Киев, ул. Верховинная, 69

Киевская городская онкологическая больница, кафедра онкологии Национального медицинского университета