

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА BRCA1 В ТКАНИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

Т.А. Богущ, Е.А. Дудко, Е.А. Шестакова, А.Н. Гришанина, Е.А. Богущ, В.Ю. Кирсанов, О.М. Рябинина, Н.О. Вихлянцева

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Татьяна Анатольевна Богущ labmedchem@mail.ru

Введение. Нарушение функционирования BRCA1 приводит к развитию ряда онкологических заболеваний, включая рак молочной железы (РМЖ), рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак поджелудочной железы. Недавно продемонстрирована прогностическая и предиктивная значимость BRCA1, белка репарации ДНК ERCC1 в плане характера течения заболевания и чувствительности/резистентности к химиотерапии, но заключения неоднозначны.

Цель исследования – уточнение возможной прогностической значимости экспрессии в опухоли BRCA1 путем проведения строго количественной оценки уровня маркера в ткани РМЖ у пациентов с благоприятным и неблагоприятным прогнозом в соответствии со статусом рецепторов эстрогенов (РЭ) в опухолях, различающихся по чувствительности к препаратам платины.

Материалы и методы. Оценка экспрессии BRCA1 проведена в 50 хирургических образцах РМЖ (40 – с положительным статусом РЭ и 10 – с отрицательным) с использованием количественного иммунофлуоресцентного метода, сопряженного с проточной цитофлуориметрией. Суспензии клеток опухоли инкубировали с первичными антителами к BRCA1 (SD118, Calbiochem) и со вторичными флуоресцентными антителами (DyLight650, ab98729, Abcam). Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с применением программного обеспечения FACSDiva 6.0. Показатели экспрессии BRCA1 анализировали с помощью программы FlowJo 10.0 с использованием статистического метода Колмогорова – Смирнова. Уровень экспрессии BRCA1 определяли как количество специфически флуоресцирующих клеток относительно общего количества исследованных.

Результаты. Экспрессия BRCA1 идентифицирована во всех исследованных образцах ткани РМЖ со средним значением уровня экспрессии $36,8 \pm 7,6$ % и медианой 37 %. При расчете t-критерия Стьюдента отмечено статистически значимое различие средних значений уровня экспрессии BRCA1 ($p = 0,02$) в группах больных с положительным и больных с отрицательным статусом РЭ ($38,0 \pm 7,5$ и $32,0 \pm 6,3$ % соответственно). Сравнение уровня экспрессии BRCA1 с использованием теста Манна – Уитни также выявило статистически значимое различие ($p = 0,016$). Различия в средних значениях уровня экспрессии BRCA1 оказались особенно выраженными ($p = 0,007$) при сравнении групп пациентов с положительным и с отрицательным статусом РЭ со значениями экспрессии BRCA1 меньше медианы ($32,4 \pm 5,0$ и $26,8 \pm 2,9$ % соответственно). При сравнении показателей экспрессии BRCA1 в опухолях с негативным статусом РЭ и медианы уровня экспрессии BRCA1 по всей группе исследованных опухолей (37 %) выявлена корреляция сниженного уровня экспрессии BRCA1 с отрицательным статусом РЭ в опухоли. Значения уровня экспрессии белка BRCA1 ниже медианы выявлены у 80 % пациентов с отрицательным статусом РЭ в опухоли, выше медианы – в 20 % случаев соответственно.

Выводы. Результаты исследований показали, что белок BRCA1 экспрессируется на различном уровне в опухолевой ткани у всех пациентов с РМЖ. Пониженный уровень экспрессии BRCA1 выявляется чаще в РЭ-негативных по сравнению с РЭ-положительными опухолями, а отсутствие РЭ в ткани РМЖ является неблагоприятным фактором прогноза, соответственно пониженный уровень экспрессии BRCA1 имеет неблагоприятное прогностическое значение.

Ключевые слова: BRCA1, рецепторы эстрогенов, рак молочной железы, проточная цитофлуориметрия, прогноз

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-49-52

QUANTITATIVE ESTIMATION OF BRCA1 PROTEIN EXPRESSION IN BREAST CANCER TISSUE USING THE METHOD OF FLOW CYTOMETRY

T.A. Bogush, E.A. Dudko, E.A. Shestakova, A.N. Grishanina, E.A. Bogush, V.Ju. Kirsanov, O.M. Ryabinina, N.O. Vichljantzeva

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Introduction. The disruption of BRCA1 function leads to the development of several cancers including breast cancer, ovarian cancer, non-small cell lung cancer, gastric cancer, pancreatic cancer. Recently it was demonstrated that BRCA1 protein as well as another DNA repair protein, ERCC1, could be prognostic markers of the course of the disease and predictive markers of platinum-based chemotherapy efficiency. Nevertheless, the obtained data are controversial.

Aim. In current study the comparison of BRCA1 expression in breast cancer with favorable and unfavorable prognosis based on estrogen receptor status (ER⁺ and ER⁻) was carried out to evaluate its potential prognostic significance for subsets of breast cancer with different platinum chemotherapy sensitivity.

Materials and methods. The estimation of BRCA1 expression was made in 50 samples of breast cancer tissue (40 ER⁺ and 10 ER⁻) using the quantitative immunofluorescent method coupled with flow cytometry. Tumor cell suspensions were incubated with primary anti-BRCA1 antibodies (Abs) (SD118, Calbiochem) and secondary fluorescent Abs (DyLight650, ab98729). Cell fluorescence was measured at the Flow Cytometer FACSCanto II (Becton Dickinson, USA) using the program FACSDiva 6.0. The level of BRCA1 expression was analyzed using the program FlowJo 10.0 with statistical approach of Kolmogorov-Smirnov. The level of BRCA1 expression was determined as the ratio of specifically fluorescent cells to the total number of cells.

Results. 1. The expression of BRCA1 was revealed in all breast cancer samples with mean expression level 36.8 ± 7.6 % and median 37 %. 2. Using the method of Student t-test statistically significant difference in mean value of BRCA1 expression level ($p = 0.02$) was revealed between ER⁺ and ER⁻ breast cancer groups (38.0 ± 7.5 % and 32.0 ± 6.3 %, respectively) 3. Comparison of BRCA1 expression level in ER⁺ and ER⁻ breast cancer groups using Mann – Whitney test also demonstrated statistically significant difference ($p = 0.016$). 4. These differences in mean value of BRCA1 expression level were especially prominent ($p = 0.007$) upon the comparison of ER⁺ and ER⁻ breast cancer groups with BRCA1 expression levels below median (32.4 ± 5.0 % and 26.8 ± 2.9 %, respectively). 5. Comparison of BRCA1 expression levels in ER⁻ breast tumors and the median for all studied breast cancer samples (37 %) demonstrated the correlation of decreased level of BRCA1 expression and negative ER status of the tumor. BRCA1 expression levels below the median were shown for 80 % of breast cancer patients with negative ER status in tumor, and over the median – in 20 % of cases, respectively.

Conclusion. The results of current studies demonstrated that BRCA1 protein is expressed at different levels in the tumor tissue of all breast cancer patients. Lower level of BRCA1 expression in ER-negative as compared to ER-positive tumors, and established unfavorable prognostic value of ER-negative breast cancer status point to poor prognostic value of lower level of BRCA1 expression.

Key words: BRCA1, estrogen receptors, breast cancer, flow cytometry, prognosis

Введение

Нарушение функционирования BRCA1 приводит к развитию ряда онкологических заболеваний [1]. Кроме того, продемонстрирована прогностическая и предиктивная значимость показателей экспрессии белка BRCA1 при лечении рака молочной железы (PMЖ) [2, 4] и опухолей других локализаций [3, 5]. Однако данные эти немногочисленны и часто противоречивы, поэтому до настоящего времени, в отличие от генетических характеристик BRCA1, оценка BRCA1 в клинической практике не проводится. В то же время определение белка BRCA1 имеет важное преимущество, поскольку учитывает не только наличие мутации, приводящей к дисфункции белка, но и эпигенетические механизмы, ведущие к уменьшению экспрессии этого опухолевого маркера.

Цель исследования – уточнение возможной прогностической значимости экспрессии в опухоли BRCA1 путем проведения строго количественной оценки уровня маркера в ткани PMЖ в группах с благоприятным и неблагоприятным прогнозом в соответствии со статусом рецепторов эстрогенов (PЭ) в опухоли.

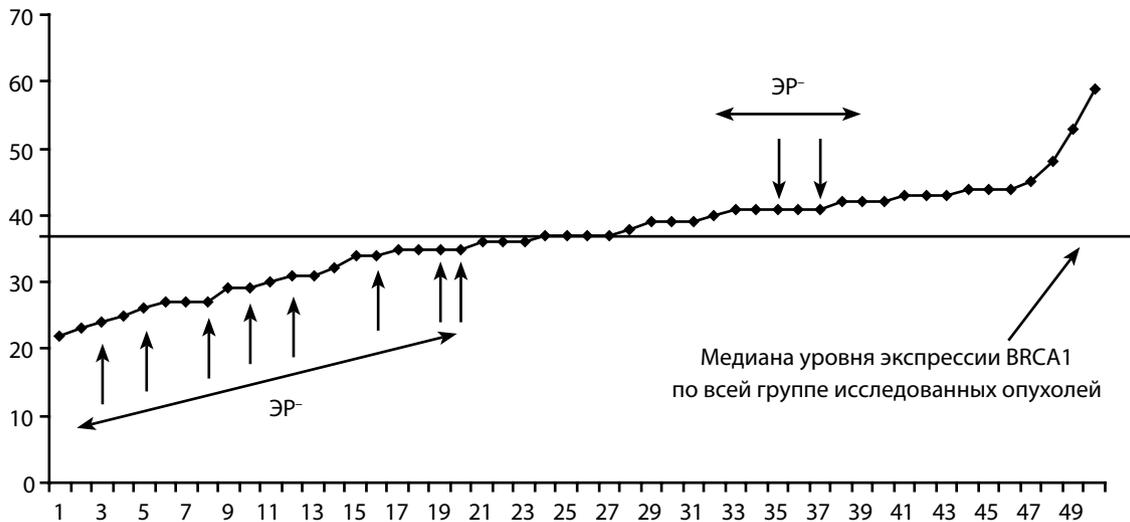
Материалы и методы

Оценка экспрессии BRCA1 проведена в 50 хирургических образцах PMЖ с использованием количественного иммунофлуоресцентного метода, сопряженного

с проточной цитофлуориметрией [6]. В работе использовали первичные антитела к BRCA1 (SD118, Calbiochem) в концентрации 0,025 мкг/мл и вторичные флуоресцентные антитела (DyLight650, ab98729, Abcam) в концентрации 0,5 мкг/мл. Для удаления из анализа дробиса и эритроцитов использовали специфический краситель ДНК Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1,2 мкг/мл. В анализ включали только клетки с окрашенными ядрами, исключая клеточные конгломераты, которые выводились из анализа путем дополнительного гейтирования.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с применением программного обеспечения FACSDiva 6.0. Использовали гелий-неоновый и диодный УФ- лазеры с длиной волны испускаемого света 633 и 405 нм соответственно. Регистрацию сигнала флуоресценции красителей DyLight 650 и Hoechst 33258 проводили по параметру APC-A и Pacific Blue соответственно. Значение порога по параметру FSC-A составляло 12,5 тыс., показатель «количество событий/с» – средний, число анализируемых событий – 5 тыс.

Уровень экспрессии BRCA1 (процентное содержание специфически окрашенных клеток) анализировали с помощью программы FlowJo 10.0 и статистического метода Колмогорова–Смирнова. Обработку



Уровень экспрессии BRCA1 в ткани рака молочной железы (PMЖ): по оси ординат – уровень экспрессии BRCA1 (процент клеток, экспрессирующих маркер); по оси абсцисс – номера исследованных образцов PMЖ, ранжированных по уровню экспрессии BRCA1 (от меньшего к большему). Горизонтальная линия – медиана значений уровня экспрессии BRCA1 в ткани PMЖ по всей группе исследованных образцов опухоли. ЭР– – PMЖ с отрицательным статусом эстрогеновых рецепторов. Стрелками отмечены значения уровня экспрессии BRCA1 в ткани PMЖ с отрицательным статусом рецепторов эстрогенов

количественных данных проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 фирмы StatSoft (США). Методы статистической обработки указаны при описании полученных результатов.

Результаты и обсуждение

Экспрессия BRCA1 идентифицирована во всех исследованных образцах ткани PMЖ со средним значением уровня экспрессии маркера $36,8 \pm 7,6$ % клеток, экспрессирующих маркер (см. рисунок). Отмечены значительные различия показателя у всех обследованных пациентов. Минимальный уровень экспрессии составил 22 %, максимальный – 59 % при медиане показателя – 37 % клеток, экспрессирующих BRCA1.

Для выявления возможной прогностической значимости BRCA1 в оценке агрессивности течения PMЖ проведено сравнение уровня маркера в подгруппах с разным прогнозом течения болезни по показателю статуса РЭ в опухоли. Учитывая малочисленность группы пациентов с отрицательным статусом РЭ в опухоли ($n = 10$), что не позволило точно установить нормальность распределения показателей, в работе использованы 2 статистических критерия (параметрический и непараметрический) с целью дополнительного уточнения значимости выявленных различий.

Так, при оценке с применением t-критерия Стьюдента выявлено статистически значимое ($p = 0,02$) различие в средних значениях уровня экспрессии BRCA1 при сравнении подгрупп с положительным и отрицательным статусом РЭ в опухоли – $38,0 \pm 7,5$

и $32,0 \pm 6,3$ % соответственно. Сходным был результат аналогичного сравнения при использовании теста Манна–Уитни ($p = 0,016$).

Высокозначимым оказалось различие между средними значениями уровня экспрессии BRCA1 меньше медианы (< 37 % клеток, экспрессирующих маркер) в подгруппах с положительным и с отрицательным рецепторным статусом опухоли – $32,4 \pm 5,0$ и $26,8 \pm 2,9$ % соответственно (t-критерий Стьюдента, $p = 0,007$).

И наконец, показано, что в подгруппе пациентов с уровнем BRCA1 ниже медианы показателя по всем обследованным пациентам количество случаев с отсутствием экспрессии РЭ в опухоли составило 80 %, тогда как в подгруппе с показателем экспрессии BRCA1 выше медианы – только 20 % (см. рисунок).

Выводы

Исследование показало, что в ткани PMЖ у разных пациентов белок BRCA1 экспрессируется на различном уровне. При этом средние значения экспрессии BRCA1 в опухолях с положительным статусом РЭ оказались выше по сравнению с уровнем маркера в опухолях с негативным рецепторным статусом. Более того, число опухолей с негативным статусом РЭ в подгруппе пациентов с экспрессией BRCA1 ниже медианы показателя в целом по всей группе исследованных опухолей в 4 раза превышает частоту таких опухолей при уровне BRCA1 выше медианы показателя по группе в целом.

Если принимать во внимание тот факт, что отсутствие РЭ в опухоли является общепризнанным неблагоприятным прогностическим маркером PMЖ,

полученные данные указывают на неблагоприятное прогностическое значение пониженного уровня экспрессии белка BRCA1 в опухолевой ткани.

Исследование поддержано грантами РФФИ (№ 15-04-06991-а и 16-34-01049-мол-а) и грантом Президента РФ МК-7709.2016.7.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Clark S., Rodriguez A.M., Snyder R.R. et al. Structure-function of the tumor suppressor BRCA1. *Comput Struct Biotechnol J* 2012;1(1).pii:e201204005. PMID: 22737296. PMCID: PMC3380633.
2. Mullan P.B., Gorski J.J., Harkin D.P. BRCA1 – a good predictive marker of drug sensitivity in breast cancer treatment? *Biochim Biophys Acta* 2006 Dec;1766(2):205–16. Epub 2006 Jul 12. PMID: 16919882.
3. Quinn J.E., James C.R., Stewart G.E. et al. BRCA1 mRNA expression levels predict for overall survival in ovarian cancer after chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2007;13(24):7413–20. PMID:18094425.
4. Silver D.P., Richardson A.L., Eklund A.C. et al. Efficacy of neoadjuvant cisplatin in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2010 Mar 1;28(7):1145–53. DOI: 10.1200/JCO.2009.22.4725. Epub 2010 Jan 25. PMID: 20100965. PMCID: PMC2834466.
5. Weberpals J.I., Tu D., Squire J.A. et al. Breast cancer 1 (BRCA1) protein expression as a prognostic marker in sporadic epithelial ovarian carcinoma: an NCIC CTG OV. 16 correlative study. *Ann Oncol* 2011 Nov;22(11):2403–10. DOI: 10.1093/annonc/mdq770. Epub 2011 Mar 2. PMID: 21368065.
6. Богуш Т.А., Шатунова А.С., Дудко Е.А. и др. Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов β в солидных опухолях человека. *Вестник Московского университета, сер. 2. Химия* 2011; 52(4):305–12.