[1]Національний інститут раку, Київ
[2]Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

РОЛЬ ГЕНА ІНТЕРСЕКТИНУ-2 У ПРОГНОЗУВАННІ ПЕРЕБІГУ РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ



І.А. Крячок[1], Л.А. Сивак[1], Г.О. Губарева[1], С.А. Лялькін[1], Н.М. Майданевич[1], М.Ю. Кліманов[1], А.В. Аскольський[1], Н.В. Касап[1], І.І. Смоланка[1], О.О. Грабовий[1], Л.А. Циба[2], О.В. Новохацька[2], С.В. Кропивко[2], А.В. Риндич[2]

Адреса:
Сивак Любов Андріївна
Національний інститут раку
03022, Київ, вул. Ломоносова, 33/43
Тел.: (044) 259-93-64
E-mail: lsyv@rambler.ru

Ключові слова: *рак грудної залози, інтерсектин-2, фактор прогнозу.*

У статті наведено дані стосовно дослідження рівня експресії гена інтерсектину-2 (короткої та довгої ізоформ) у пухлинних клітинах хворих на рак грудної залози. Досліджено, що низький рівень експресії гена інтерсектину-2 визначали в пацієнтів з раком грудної залози з несприятливим прогнозом (ER–PR–HER2/neu–; ER–PR–HER2/neu+; ER — естроген, PR — прогестерон), а високий — у хворих зі сприятливим прогнозом (ER+PR+HER2/neu–). Дослідження значення рівня експресії гена інтерсектину-2 у пацієнтів з даною онкологічною патологією потребує подальшого вивчення.

Незважаючи на значний прогрес у лікуванні та вивченні біологічних основ виникнення раку грудної залози, це захворювання залишається основною причиною смертності жінок від злоякісних пухлин [1]. Одним із завдань сучасної онкології є пошук прогностичних і предиктивних маркерів перебігу хвороби, ризику виникнення віддалених метастазів та ефективності терапії.

Відомо, що рак грудної залози — клінічно та генетично високогетерогенна група захворювань. Значного прогресу в діагностиці цієї патології досягнуто за останні 10 років завдяки розвитку технологій із профілювання експресії генів [3–6, 9].

Інтерсектин-2 (ITSN-2) є представником родини інтерсектинів (ITSN-1 та ITSN-2), що функціонують як адаптери, збираючи білкові комплекси при клатринопосередкованому ендоцитозі, передачі внутрішньоклітинного сигналу та перебудовах актинового цитоскелета [2, 5, 7].

За даними авторів [10], в експерименті виявлено, що ген ITSN-2 є одним з небагатьох генів, рівень експресії якого суттєво відрізняється в зразках пухлини грудної залози у пацієнтів, у яких виникали рецидиви захворювання, та у тих, що залишалися здоровими після видалення пухлини й проведення хіміотерапії з використанням препаратів циклофосфаміду, метотрексату та флуороурацилу (CMF). Високий рівень експресії ITSN-2 корелював з відсутністю віддалених метастазів упродовж тривалого періоду [4, 10].

Нині функція та особливості експресії гена ITSN-2 як у нормальних, так і в пухлинних клітинах грудної залози залишаються маловивченими. Отримання даних про експресію альтернативно сплайсованих ізоформ ITSN-2 та особливостей взаємодії їх із білками крові у хворих на рак грудної залози з різною відповіддю на лікування дозволить встановити роль окремих ізоформ гена ITSN-2 у процесі метастазування та прогресування захворювання.

Тому метою нашої роботи було визначення рівня експресії короткої та довгої ізоформ гена ITSN-2 в пухлинних клітинах хворих на рак грудної залози та його взаємозв'язок з морфологічним та імуногістохімічним варіантом пухлини.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідженням охоплено 36 хворих на рак грудної залози віком від 32 до 75 років, середній вік становив 52 роки. До призначення лікування всім пацієнтам проводили рутинне клініколабораторне, рентгенологічне обстеження, морфологічне та імуногістохімічне дослідження пухлинних клітин.

У всіх пацієнток перед початком терапії визначали рівень експресії гена ITSN-2 в клітинах пухлини методом полімеразної ланцюгової реакції. Дослідження проводили в Інституті молекулярної генетики Національної академії наук України.

Полімеразну ланцюгову реакцію реалізували з використанням однієї пари праймерів та Taq-Man-зонда [8] в 25 мкл суміші, яка містила 0,2 мкМ кожного специфічного праймера та 0,1 мкМ Taq-Man зонда; 1,5 мМ $MgCl_2$; 0,2 мМ dNTP; 2,5 од. Taq ДНК-полімерази «Fermentas» і відповідний буфер. Ампліфікацію здійснювали за таких умов: денатурація — +94 °С протягом 15 с (у першому циклі — 2 хв); температура реасоціації праймерів — +57 °С, час реасоціації праймерів та синтезу об'єднували — 1 хв, протягом 60 циклів. Полімеразну лан-

цюгову реакцію проводили на приладі iQ5 «BioRad».

Для обчислення результатів використовували формулу 1:

$$Exp = E_{target}^{-Ct(target)} / E_{ref}^{-Ct(ref)}, \quad (1)$$

де E_{target} — ефективність полімеразної ланцюгової реакції досліджуваного гена;

E_{ref} — ефективність полімеразної ланцюгової реакції референсного гена;

Ct(target) — середнє значення циклів досліджуваного гена;

Ct(ref) — середнє значення циклів референсного гена.

Тотальну РНК зі зразків пухлин виділяли гуанідин-ізотіоціанатним методом, рівень експресії ITSN-2 визначали за допомогою кількісної зворотнотранскипційної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі з використанням TaqMan-проб. Як контрольний використовували ген «домашнього господарства» *TBP*, для якого характерним є постійний рівень експресії в пухлинах грудної залози.

Кожна хвора на рак грудної залози в плані комплексного лікування отримала від 4 до 6 курсів поліхіміотерапії за схемою FAC (циклофосфамід 500 мг/м^2 внутрішньовенно в 1-й день, доксорубіцин 50 мг/м^2 внутрішньовенно в 1-й день, флуороурацил 500 мг/м^2 внутрішньовенно в 1-й та 8-й дні циклу). Усього проведено 187 курсів поліхіміотерапії за схемою FAC.

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням пакета прикладних статистичних програм «Statistica v.6» із застосуванням методу варіаційної статистики з критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За стадіями хворих розподілили таким чином: I стадія (T1N0M0) — 12 пацієнток, IIa стадія (T2N0M0) — 11, IIb (T2N1M0) — 5, IIIa-б (T3N1M0, T3N2M0, T4N1M0) — 5, IV стадія процесу (T4N1M1) — 3 пацієнтки.

Віддалені метастази зареєстровано у 3 хворих, серед яких у 2 пацієнток мало місце ураження кісток і кісткового мозку, у 1 — легені та лімфовузлів середостіння.

За морфологічною будовою пухлини в усіх хворих діагностували інфільтруючу аденокарциному. Імуногістохімічне дослідження та визначення ступеня диференціювання пухлини проведено в 36 хворих, серед яких у 12 пацієнток діагностовано III ступінь диференціювання (G3), а у більшості (24 хворих) — II ступінь (G2). При вивченні рецепторного статусу пухлини виявлено, що рецептори естрогену (ER) та прогестерону (PR) були у 19 хворих. Відсутність на пухлинних клітинах ER та PR виявлено у 17 пацієнток. Високу експресію HER-2/neu визначено у 9 хворих.

Розподіл зареєстрованих факторів ризику несприятливого прогнозу перебігу захворювання представлено в таблиці.

Найнижчий рівень експресії гена ITSN-2 (сумарна кількість довгої та короткої ізоформ) виявлено у хворих на рак грудної залози, що мали HER2/neu-позитивний статус (ER–PR–HER2/neu+++), відносна кількість ITSN-2 у цих зразках становила 19% від максимальної. Найвищий рівень експресії гена ITSN-2 зафіксовано у хворих з люмінальним А варіантом раку грудної залози (ER+PR–HER2/neu–).

Таблиця. Несприятливі фактори прогнозу у хворих зі злоякісними пухлинами грудної залози (n=36)

Фактори прогнозу	Кількість випадків, n (%)
Негативні рецептори ER та PR	17 (47,2)
Наявність уражених лімфатичних вузлів	12 (33,3)
Розмір первинної пухлини ⩾2 см	20 (55,6)
Вік хворих <35 років	3 (8,3)
Гіперекспресія HER-2/neu	9 (25,0)

Визначено співвідношення ізоформ гена ITSN-2 у досліджуваних зразках раку грудної залози. Відношення кількості короткої ізоформи до довгої ізоформи гена ITSN-2 варіювало від 1,2 до 7,9. При цьому найбільший відносний вміст довгої ізоформи (відношення ITSN-2-S/ITSN-2-L становило 1,2) виявлено у хворих на рак грудної залози з несприятливим прогнозом (ER–PR–HER2/neu+++), а найменший (відношення ITSN-2-S/ITSN-2-L наближається до 8) — у 19 пацієнток, що мали сприятливий прогноз (ER+PR+HER2/neu–).

У всіх проаналізованих зразках ER- і PR-позитивних HER2/neu-негативних пухлин пацієнтів без метастазів у лімфатичних вузлах вміст короткої форми мікро-РНК ITSN2 в 2–30 разів перевищував кількість довгої форми. Навпаки, у 57% HER2/neu-позитивних і HER2/neu-негативних пухлин у разі наявності метастазів у лімфатичні вузли кількість довгої ізоформи гена ITSN-2 перевищувала кількість короткої в 1,3–6,6 разу.

Середній вміст короткої та довгої ізоформ у зразках ER- і PR-позитивних пухлин без метастазів становила 4,75 і 0,45 умовних одиниць відповідно, а в зразках HER2/neu-позитивних пухлин та/або з метастазами в лімфатичні вузли — 2,35 умовних одиниць для короткої ізоформи гена ITSN-2 і 5,03 умовних одиниць — для довгої.

Відомо, що до складу довгої ізоформи гена ITSN-2 входять домени DH, PH і C2, що беруть участь в активації полімеризації актину та відсутні в її короткій лізоформі [2, 5, 10]. Враховуючи важливість перебудов актинового цитоскелета для міграції клітин, можна припустити, що існує зв'язок між збільшенням вмісту ITSN-2-L і підвищенням інвазивних властивостей злоякісних клітин та їх здатністю до метастазування. Підвищений вміст довгої ізоформи гена ITSN-2 в зразках пухлин пацієнток з несприятливим прогнозом може бути додатковим прогностичним фактором, що потребує подальшого вивчення.

ВИСНОВКИ

1. Визначено, що пухлинні клітини хворих на рак грудної залози є гетерогенними не тільки за імуногістохімічним профілем, а й за кількістю ізоформ гена ITSN-2 та їх співвідношенням.

2. Найнижчий рівень експресії гена ITSN-2 виявлено у хворих на рак грудної залози з несприятливим прогнозом (ER–PR–HER2/neu–; ER–PR–HER2/neu+); найвищі рівні експресії гена ITSN-2 зафіксовано у пацієнток, що мали сприятливий прогноз (ER+PR+HER2/neu–).

3. Досліджено, що в злоякісних пухлинах грудної залози ER(+)PR(+) HER2/neu(–) у пацієнток без метастазів у лімфатичних вузлах вміст короткої ізоформи ITSN-2 в 2–30 разів перевищує кількість довгої ізоформи, що може вважатися фактором прогнозу перебігу ER-позитивного раку грудної залози.

Отже, виявлення особливостей експресії гена ITSN-2 у хворих на рак грудної залози дасть можливість розширити існуючі знання про участь адаптерних білків у розвитку пухлини та сприятиме визначенню ролі гена ITSN-2 як прогностичного маркера раку грудної залози.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Федоренко З.П., Гайсенко А.В., Гулак Л.О. та ін. (2011) Рак в Україні, 2008–2009. Захворюваність, смертність, виживаність, показники діяльності онкологічної служби. Бюл. Нац. канцер-реєстру України, 12: 55–56.

2. Adams A., Thorn J.M., Yamabhai M. et al. (2000) Intersectin, an Adaptor Protein Involved in Clathrin-mediated Endocytosis, Activates Mitogenic Signaling Pathways. J. Biol. Chem., 275: 27414–27420.

3. Das M., Scappini E., Martin N.P. et al. (2007) Regulation of neuron survival through an intersectin-phosphoinositide 30-kinase C2beta-AKT pathway. Mol. Cell. Biol., 27: 7906–7917.

4. Drury S., Anderson H., Dowsett M. (2009) Selection of REFERENCE genes for normalization of qRT-PCR data derived from FFPE breast tumors. Diagn. Mol. Pathol., 18: 103–107.

5. Martin N.P., Mohney R.P., Dunn S. et al. (2006) Intersectin Regulates Epidermal Growth Factor Receptor Endocytosis, Ubiquitylation, and Signaling. Mol. Pharmacol., 70: 1643–1653.

6. Predescu S.A., Predescu D.N., Knezevic I. (2007) Intersectin-1s regulates the mitochondrial apoptotic pathway in endothelial cells. J. Biol. Chem., 282: 17166–17178.

7. Pucharcos C., Estivill X., de la Luna S. (2000) Intersectin 2, a new multimodular protein involved in clathrin-mediated endocytosis. FEBS Lett., 478: 43–51.

8. Radonic A., Thulke S., Mackay I.M. et al. (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. Biochem. Biophys. Res. Commun., 313: 856–862.

9. Sorkin A., Goh L.K. (2009) Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. Exp. Cell. Res., 315: 683–696.

10. Specht K., Harbeck N., Smida J. et al. (2008) Expression profiling identifies genes that predict recurrence of breast cancer after adjuvant CMF-based chemotherapy. Breast Cancer Res. Treat., 118: 45–56.

Роль гена интерсектина-2 в прогнозировании течения рака грудной железы

И.А. Крячок[1], Л.А. Сивак[1], А.А. Губарева[1], С.А. Лялькин[1], Н.Н. Майданевич[1], М.Ю. Климанов[1], А.В. Аскольский[1], Н.В. Касап[1], И.И. Смоланка[1], А.Н. Грабовой[1], Л.А. Циба[2], О.В. Новохацкая[2], С.В. Кропивко[2], А.В. Риндич[2]

[1]Национальный институт рака, Киев

[2]Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

Резюме. В статье приведены данные относительно исследования уровня экспрессии гена интерсектина-2 (короткой и длинной изоформ) в опухолевых клетках больных раком грудной железы. Доказано, что низкий уровень экспрессии гена интерсектина-2 определялся у пациентов с раком грудной железы с неблагоприятным прогнозом (ER-PR-HER2/neu-; ER-PR-HER2/neu+; ER — эстроген, PR— прогестерон), а высокий — у больных с благоприятным прогнозом (ER+PR+HER2/neu-). Исследование значения уровня экспрессии гена интерсектина-2 у пациентов с данной онкологической патологией требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: рак грудной железы, интерсектин-2, прогностический фактор.

Role of intersectin-2 gene in breast cancer prognosis

I.A. Kriachok[1], L.A. Syvak[1], G.O. Gubareva[1], S.A. Lyalkin[1], N.M. Maidanevich[1], M.Y. Klimanov[1], A.V. Askolsky[1], N.V. Kasap[1], I.I. Smolanka[1], A.N. Grabovoy[1], L.A. Ciba[2], O.V. Novohatskaya[2], S.V. Kropivko[2], A.V. Rindich[2]

[1]National Cancer institute, Kyiv

[2]Institute of molecular biology and genetics, Kyiv

Summary. The article presents data regarding study of intersectin-2 gene expression level (short and long izoform) in tumor cells of patients with breast cancer. Low expression of the gene intersectin-2 was determined in patients with breast cancer with a poor prognosis (ER-PR-HER2/neu-; ER-PR-HER2/neu +; ER — estrogen, PR — progesterone), and high expression — in patients with a favorable prognosis (ER+PR+HER2/neu-). The significance of the gene expression of intersectin-2 in patients with breast cancer requires further research.

Key words: breast cancer, intersectin-2, prognostic factor.