

УДК 616-006.552,618.19, 546.23

<sup>1,3</sup>Самойлова С.И., <sup>1,2</sup>Хышиктуев Б.С., <sup>1,3</sup>Чарторижская Н.Н., <sup>3</sup>Конюкова С.Н.**ИЗМЕНЕНИЯ СЕЛЕНОВОГО СТАТУСА ПРИ ФИБРОАДЕНОМАХ МОЛОЧНЫХ ЖЕЛЕЗ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИММУНОФЕНОТИПА ОПУХОЛИ**<sup>1</sup>ГБОУ ВПО "Читинская государственная медицинская академия", г. Чита<sup>2</sup>ФБГОУ ВПО "Забайкальский государственный университет" г. Чита<sup>3</sup>ГУЗ "Краевая клиническая больница", г. Чита

*В рамках исследования проведена оценка селенового статуса у женщин Забайкалья с доброкачественными опухолями молочных желез. Показано, что при этой патологии молочных желез происходит накопление селена в опухолевом локусе и снижение его элиминации с мочой. Представлены результаты иммуногистохимического исследования рецепторов эстрогенов (ER), прогестерона (PR), Ki-67 (Mib-1) в фиброаденомах. Выявлены особенности распределения микроэлемента в опухолевой ткани в зависимости от иммунофенотипа.*

**Ключевые слова:** селен, доброкачественные опухоли молочных желез, фиброаденома.

<sup>1,3</sup>Samoilova S.I., <sup>1,2</sup>Khyshiktuev B.S., <sup>1,3</sup>Chartorizhskaya N.N., <sup>1,3</sup>Konyukova S.N.**DEVELOPMENTS IN SELENIUM STATUS FIBROADENOMAS****MAMMAS DEPENDING ON IMMUNOPHENOTYPE OF THE TUMOR**

*The study evaluated selenium status in women with benign tumors of the Transbaikal mammary glands. It is shown that this pathology is the accumulation of mammary tumor locus in selenium and decrease its elimination in the urine. Presents the results of immunohistochemical studies of estrogen receptors (ER), progesterone (PR), Ki-67 (Mib-1) in fibroadenoma. Specific features of trace element distribution in tumor tissue, depending on the immunophenotype.*

**Key words:** selenium, benign tumors of the breast, fibroadenoma.

Во всем мире отмечается рост заболеваемости женской репродуктивной системы, в том числе молочных желез, представляющих собой одно из самых уязвимых мест женского организма [9]. Среди доброкачественных опухолей этого органа фиброаденома - самая частая опухоль. Она является третьей по частоте в группе опухолей и опухолеподобных поражений молочных желез после рака молочной железы (РМЖ) и фиброзно-кистозной болезни (ФКБ) [7]. Чаще всего фиброаденомы встречаются в гормонально активном возрасте - от 16 до 50 лет, что совпадает с одним из пиков заболеваемости РМЖ (между 40 и 50 годами). Однако, в последние годы регистрируется рост злокачественных новообразований молочных желез в возрасте 35-40 лет [13].

По данным литературы, малигнизация фиброаденом развивается редко, не более чем в 1-3% случаев [13, 15]. Однако, в исследовании С.А. Величко и соавт. (2011) этот процесс описан в 13% случаев [3]. В

фиброаденомах чаще всего диагностируется рак *in situ*, преимущественно долькового [15] и протокового типа [13]. Риск возникновения РМЖ многократно увеличивается при наличии тяжелых диспластических изменений эпителия молочных желез, поэтому пролиферативные формы мастопатий рассматриваются как потенциальный источник развития злокачественного процесса [8]. Наличие в фиброаденомах участков атипической протоковой пролиферации ассоциируется с высоким риском развития инвазивной карциномы молочной железы [13].

Основным этиологическим фактором, провоцирующим начало диспластических изменений молочных желез, признано изменение баланса эстрогенов и прогестерона с развитием абсолютной или относительной гиперэстрогении [6]. Стероидные гормоны в некоторых ситуациях являются преинициаторами и промоутерами развития РМЖ, стимулируют пролиферацию клеток, индуцируют факторы роста и их

рецепторы [2]. Эффект любого гормона зависит не только от его концентрации, но и состояния рецепторного аппарата клетки. Так, при атипической гиперплазии и внутриэпителиальном раке экспрессия рецепторов эстрогенов отмечается в 78-100% случаев, а коэкспрессия рецепторов к ним и маркера пролиферации связывается с риском развития РМЖ [4]. Фиброаденомы молочных желез - гормонозависимые опухоли, однако сведения о количестве в них и локализации рецепторов стероидных гормонов, факторов эпидермального роста, пролиферативной активности единичны [4, 7].

Забайкалье традиционно относится в селенодефицитным регионам Российской Федерации [1]. Многочисленными исследованиями показано, что существует обратно пропорциональная зависимость между содержанием селена во внешней среде и частотой поражения населения злокачественными опухолями [10]. Механизм антибластического действия селена разнообразен. Селен в составе глутатионпероксидазы, подавляет метаболическую активацию проканцерогенов в клетке, стимулирует репаративный синтез ДНК, поврежденной канцерогенами. Ряд экспериментальных работ свидетельствует о том, что данный микроэлемент может угнетать пролиферацию, блокируя опухолевые клетки в фазе клеточного цикла G1, индуцировать апоптоз и активировать антиоксидантные ферменты [12]. Влияние селена на рецепторы эстрогенов и кодирующие их гены описано при раке молочной и предстательной желез. Селен, участвуя в катализе образования дисульфидного мостика, связывается с сульфгидрильными группами в факторах транскрипции, изменяет их связь с ДНК, тем самым регулируя экспрессию генов. Кроме того, селен в составе метилселенистой кислоты блокирует экстрадиолзависимый рост опухолевых клеток и экспрессию гена эстрогена при раке молочной железы [14]. Однако в литературе отсутствуют публикации об изменениях метаболизма этого микроэлемента при доброкачественных опухолях молочных желез.

В связи с вышеизложенным, целью нашей работы явилось изучение селенового

статуса у женщин с фиброаденомами молочных желез, проживающих в Забайкалье, в зависимости от иммунофенотипа опухоли.

#### **Материал и методы:**

Исследованы образцы опухолевой ткани 23 женщин с клиническим и морфологическим диагнозом "фиброаденома" молочных желез в возрасте от 22 до 74 лет. Все пациентки лечились в ГУЗ "Краевой онкологический диспансер"; проживали на территории Забайкальского края 5 и более лет. В качестве контроля служила ткань молочной железы, кровь и моча 16 женщин аналогичного возраста, умерших от насильственных причин, без патологии молочных желез.

Фрагменты ткани фиксировались в нейтральном забуференном формалине в течение 16-24 ч с последующей заливкой в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивались гематоксилин-эозином. Для иммуногистохимического анализа срезы толщиной 4-5 мкм монтировали на высокоадгезивные стекла. Иммуногистохимическое исследование выполнялось по стандартной методике, рекомендованной ФГУ "МНИОИ им. П.А.Герцена Росмедтехнологий" [11]. Для выявления тканевых антигенов использовались моноклональные мышиные антитела к рецепторам эстрогена (ER; клон 1D5 "Dako", RTU) и прогестерона (PR; клон PgR 636, "Dako" RTU), маркер пролиферативной активности Ki-67 (клон Mib-1, "Dako" RTU). Визуализация реакции произведена с использованием системы ENVIZIONDualLink "Dako"; изучение пероксидазной активности проводилось с помощью 3,3-диаминобензидина (ДАВ). При оценке результатов рецепторного статуса суммировали балльные показатели интенсивности окраски и количества окрашенных ядер [11]. При суммарной балльной оценке менее 3 баллов опухоль считалась гормон-негативной, а 3 и более баллов - гормон-позитивной [11]. В соответствие с этим были сформированы две группы: 1-ая включала в себя рецептор-негативные опухоли: ER-(n=8), PR- (n=7); 2-ая - рецептор-позитивные: ER+ (n=15), PR+ (n=16).

Пролиферативная активность опухоли рассчитывалась путем определения отно-

шения количества ядер с экспрессией Ki-67 (Mib-1) на 100 ядер опухолевых клеток (при учете не менее 500 клеток), результат выражался в процентах. Пролиферативная активность опухоли оценивалась как низкая при экспрессии Ki-67 (Mib-1) в 10% опухолевых клеток, умеренная - 11-24% и высокая - 25% и более процентов [11]. Опухоли с низкой пролиферативной активностью включены в 1-ую группу (n=9), с умеренной - во 2-ую группу (n=14). Образцов с высокой пролиферативной активностью в нашем исследовании не было.

Кроме того, у данных пациенток до оперативного лечения в крови, моче, ткани молочных желез определяли концентрацию селена флюорометрическим методом [5]. В молочной железе содержание микроэлемента исследовалось в самом опухолевом допуске и интактной ткани молочных желез.

Статистический анализ полученных данных выполнен с использованием пакета программ Statistica for Windows (версия 6.0, StatSoftInc). Описательная статистика представлена в виде Медианы, 25 и 75 перцентилей (Q25-Q75-й). Статистическую значимость различий оценивали с помощью критерия Манна-Уитни (Т-тест). Корреляционный анализ данных проводили с применением коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Различия между показателями считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

#### **Результаты и обсуждение:**

Морфологическая верификация доброкачественных опухолей молочных желез произведена в соответствии с гистологической классификацией опухолей молочных желез ВОЗ (2003) [7] и представлена фиброаденомами, имеющими различное микроскопическое строение: 35,7% имели строение листовидного, 28,5% - смешанного, 14,3% - периканаликулярного и интраканаликулярного типа. В одном из случаев диагностирована гамартома. Как правило, это хорошо очерченные подвижные узлы округлой формы, плотноэластичной консистенции. Размеры фиброаденом варьировали от 1,0 до 3 см.

При сходной морфологической картине опухоли имели различный иммунофенотип.

Опухоли с коэкспрессией рецепторов сразу к двум стероидным гормонам (ER+/PR+) составили 56,5% случаев. Рецептор-негативные опухоли с утратой одного из стероидных рецепторов обнаружены в 21,7%.

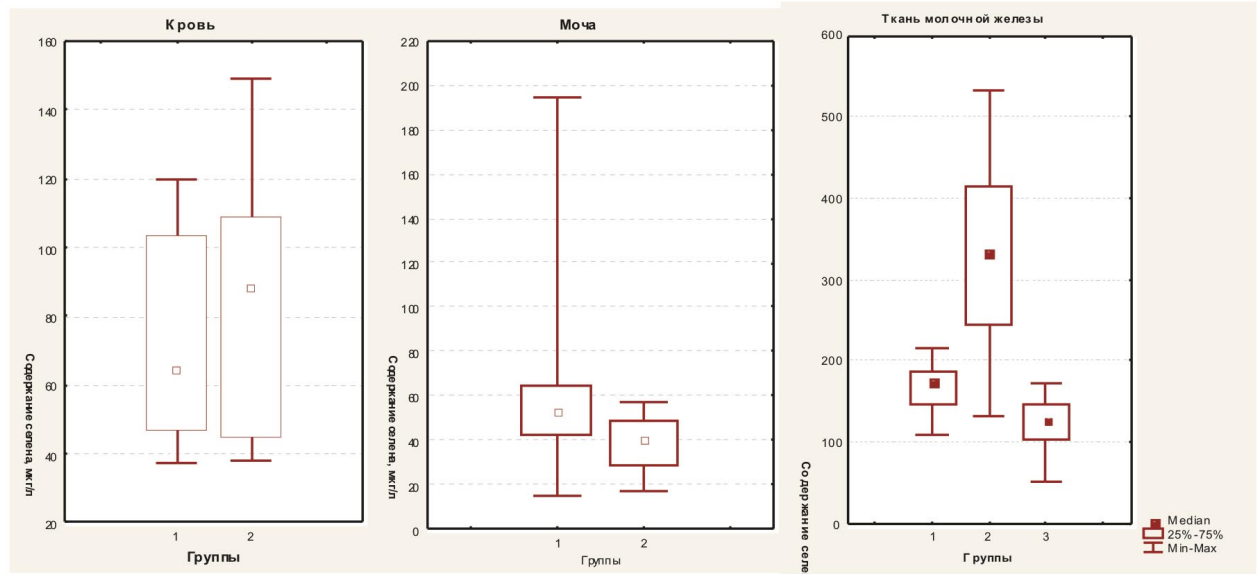
Рецепторы стероидных гормонов в доброкачественных опухолях молочных желез выявлены только в ядрах эпителиального компонента опухоли, что согласуется с данными других авторов [4, 6, 7]. Почти в 65% случаев наблюдалась экспрессия рецептора эстрогена, причем его количество достигало максимального значения в возрастных группах 20-29 и 30-39 лет (Q25-Q75-й=23-39 лет, медиана - 30 лет;  $p=0,026$ ) и имело отрицательную взаимосвязь с возрастом пациенток ( $r = -0,49$ ;  $p < 0,016$ ).

Преобладание экспрессии рецепторов прогестерона при фиброаденомах описано в работе [7], что подтверждается нашими результатами. В 70% фиброаденом регистрируются рецепторы прогестерона, при этом преобладание экспрессии этого маркера отмечено у более молодых женщин (Q25-Q75-й=22-37,5 лет, медиана - 28,5 лет;  $p=0,005$ ). С увеличением возраста женщин экспрессия прогестерона утрачивается (Q25-Q75-й=41-51 лет, медиана - 42 года;  $p=0,005$ ). Таким образом, интенсивность экспрессии прогестерона имеет обратно пропорциональную взаимосвязь с возрастом женщин ( $r = -0,62$ ;  $p < 0,0015$ ).

Показатель пролиферативной активности фиброаденом, изученный по уровню экспрессии Ki-67 (Mib-1), в большинстве наблюдений (61%) расценен как умеренный.

В этом случае преобладали молодые женщины репродуктивного периода в возрастных группах до 20-29 и 30-39 лет (Q25-Q75-й=23-36, медиана - 29,5,  $p=0,015$ ). Низкий уровень пролиферативной активности зафиксирован у женщин старше 40 лет (Q25-Q75-й=41-42 года,  $p=0,015$ ). Между возрастом пациенток и пролиферативной активностью доброкачественных опухолей молочных желез регистрировалась обратная средней силы связь ( $r = -0,53$ ;  $p < 0,008$ ).

Концентрация селена крови в обследуемых группах не имела статистически значимых отличий (рис. 1), тогда как с мочой



Приложение: Кровь, моча: 1 - контроль; 2 - фиброаденома. Ткань молочной железы: 1 - контроль; 2 - опухолевый локус; 3 - интактная ткань

Рис. 1. Содержание селена в различных биологических объектах при фиброаденомах молочных желез.

элиминация микроэлемента у женщин с фиброаденомами была снижена на 19,3% (p=0,012) относительно контроля. В образцах ткани при доброкачественных опухолях молочных желез наблюдался своеобразный диссонанс: в интактных участках уровень

селена был меньше в 1,3 раза (p=0,0009) по сравнению с контрольной группой, а в опухолевом локусе превышал таковой как у здоровых лиц на 93% (p=0,0001), так и в непо- раженных процессом тканях - на 161% (p<0,0001) (рис. 1).

Таблица 1.

Содержание селена в различных биологических объектах при фиброаденоме молочных желез в зависимости от их пролиферативной активности (M/Q25-75)

Биологический объект		Контрольная группа (n=16)	Ki-67 (Mib-1)	
			1 группа Ki-67(Mib-1)<10% (n=9)	2 группа Ki-67(Mib1)>10 (n=14)
Кровь (мкг/л)	64,0/47,0-103,0	48,0/41,0-88,0	102,0/58,0-115,0	102,0/58,0-115,0
Моча (мкг/л)	52,5/42,7-52,5	40,0/29,0-46,0 p=0,04	40,0/35,0-48,5 p=0,03	40,0/35,0-48,5 p=0,03
Молочная железа (мкг/г)	Неизменная ткань	173,9/146,8-187,1	125,0/95,2-136,0 p=0,002	137,3/124,0-163,0 p=0,01
	Опухолевый локус		245,0/143,6-318,5 p=0,02 p <sub>2</sub> =0,003	408,8/309,5-483,3 p=0,00002 p <sub>1</sub> =0,004 p <sub>2</sub> =0,0001

Примечание: n - количество пациентов, M - медиана, Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub> - интерквартильный размах, p - уровень статистически значимых отличий по сравнению с контролем; p<sub>1</sub> - уровень статистически значимых отличия между 1 и 2 группами; p<sub>2</sub> - уровень статистически значимых отличий между опухолевым локусом и интактной тканью при фиброаденомах.

В зависимости от пролиферативной активности селеновый статус изменялся следующим образом: в крови наблюдалась лишь тенденция к росту микроэлемента во 2 группе, а в моче его содержание снижалось на 23,8% у лиц с низкой пролиферативной активностью по сравнению со здоровыми людьми (табл. 1). Концентрация селена в опухолевом локусе повышалась относительно контроля на 40,9% и 135,1% в 1 и 2 группах соответственно, а в интактной ткани при фиброаденомах, напротив, снижалась на 28,1% и 21,0% соответственно. Необходимо подчеркнуть, что в опухолевом локусе с высокой интенсивностью деления содержание микроэлемента было максимальным и статистически значимо превышало таковое как в незатронутых процессом тканях молочной железы у данных пациентов, так и в аналогичных участках у лиц 1 группы. Причем у последних уровень селена был также статистически значимо выше в опухолевом локусе (табл. 1.).

Интересными выглядят сдвиги в содержании селена в зависимости от рецепторного статуса фиброаденом. В крови его концентрация при эстроген-позитивных фиброаденомах в 2,5 раза больше таковой при ER-негативных опухолях, причем она также значимо превышает и контрольные цифры (табл. 2). Подобные изменения уровня микроэлемента в крови не характерны для прогесте-

рон-зависимых опухолей. Следует отметить, что элиминация селена с мочой зависела от наличия рецепторов к исследуемым гормонам (за исключением группы с ER<sup>-</sup>); и была снижена по сравнению со здоровыми людьми в случае их отсутствия в ткани опухоли. В образцах ткани с фиброаденомами прослеживались следующие закономерности: во-первых, в опухолевом локусе, независимо от наличия тех или иных рецепторов, происходит накопление микроэлемента как по сравнению с интактной тканью, так и с контролем (за исключением группы с PR); во-вторых, в непораженных участках молочной железы уровень селена снижается относительно здоровых лиц; в-третьих, в опухолях с наличием рецепторов к половым гормонам содержание биотика гораздо выше, чем в таковых без рецепторов (табл. 2).

Заключение: Доброкачественные опухоли молочных желез чаще диагностировались у женщин репродуктивного возраста и имели различный иммунофенотип при сходном морфологическом строении. Более высокий уровень пролиферативной активности и экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона наблюдался у молодых женщин.

Как правило, у женщин с фиброаденомами молочных желез происходило депонирование селена в опухоли на фоне снижения его элиминации с мочой. При этом распределение микроэлемента в биологи-

Таблица 2.

Содержание селена в различных биологических объектах у пациенток с опухолями молочных желез в зависимости от стероидного статуса фиброаденом (M/Q25-75)

Биологический объект		Контрольная группа (n=16)	ER		PR	
			1 группа ER- (n=8)	2 группа ER+ (n=15)	1 группа PR- (n=7)	2 группа PR+ (n=16)
Кровь (мкг/л)		64,0/47,0-103,0	40,5/40,0-46,5 p=0,004	103,0/88,0-122,0 p=0,02 p <sub>1</sub> =0,0001	48,0/40,0-60,0	99,5/69,0-118,5 p <sub>1</sub> =0,03
Моча (мкг/л)		52,5/42,7-52,5	37,5/27,0-50,0	40,0/35,0-48,5 p=0,02	29,0/27,0-45,7 p=0,02	42,5/36,5-51,2 p=0,05
Молочная железа (мкг/г)	Неизменная ткань	173,9/146,8-187,1	124,5/103,5-141,5 p=0,004	136,0/95,2-163,0 p=0,005	125,0/103,0-136,0 p=0,01	135,0/99,6-151,7 p=0,002
	Опухолевый локус		229,0/155,6-326,8 p=0,008 p <sub>2</sub> =0,004	397,7/308,8-483,3 p=0,00002 p <sub>1</sub> =0,02 p <sub>2</sub> =0,00001	167,6/139,8-245,5 p <sub>2</sub> =0,018	403,1/326,8-460,4 p=0,000001 p <sub>1</sub> =0,0002 p <sub>2</sub> =0,00001

Примечание: см. к табл. 1.

ческих объектах зависит от рецепторного статуса опухоли и ее пролиферативной активности. При утрате рецепторов стероидных гормонов в участках, пораженных доброкачественным процессом и интактной ткани молочных желез, а также в крови обнаружена меньшая концентрация селена по сравнению с стероид-позитивными опухолями. С повышением пролиферативной активности фиброаденом нарастает куммуляция микроэлемента в опухолевом локусе.

Таким образом, исследование селенового статуса в зависимости от иммуногистохимического профиля фиброаденом раскрыло новые закономерности в распределении микроэлемента, что в дальнейшем можно использовать для изучения механизмов малигнизации доброкачественных опухолей, а также использовать для формирования групп риска по раку молочной железы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аникина Л.В. Селен. Экология, патология, коррекция / Л.В. Аникина, Л.П. Никитина. - Чита, 2002. - 400с.
2. Ароматаза и ее ингибиторы при различных онкологических заболеваниях помимо рака молочной железы / Л.М.Берштейн, А.С.Барчук, Э.Л.Гершфельд [и др.] // Вопросы онкологии. - 2007. - №1. - С. 7-13.
3. Величко С.А. Особенности диагностики рака молочной железы на фоне фиброзно-кистозной мастопатии // С.А.Величко, И.Г.Фролова, Д.Г. Бухарин // Сибирский онкологический журнал. -2011. - Приложение №2. - С.14-15.
4. Волченко Н.Н. Иммуноцитохимическое исследование при доброкачественных образованиях молочной железы / Н.Н.Волченко, М.В.Савостикова // Российский онкологический журнал. - 2006. - №3. - С.22-25.
5. Голубкина Н.А. Флуориметрический метод определения селена // Журнал аналитической химии. - 1995. - Т.50. - №5. - С.492-497.
6. Иммуногистохимический анализ рецепторов эстрогенов и прогестеронов, пролиферации в эпителиоцитах молочной железы / А.С.Шайкина, Б.Я.Рыжавский, С.В.Беков [и др.] // Теоретическая и экспериментальная медицина. - 2010 [Электронный ресурс] URL: <http://www.fesmu.ru/SITE/files/editore/file/dmj/2010/20102/fesmu.ru> (дата обращения: 12.12.2011г).
7. Иммуногистохимические особенности фиброаденом молочной железы / М.В. Самойлов., В.С. Бессмертная, И.И. Бабиченко // Архив патологии. -2007. - № 3. - С. 41-42.
8. Нераковые заболевания молочных желез и гинекологические заболевания. / В.Е. Радзинский, И.М. Ордянец, В.И. Зубкин В.И. [и др.] // Российский журнал акушеров-гинекологов. - 2006. - №2 - С.34-42.
9. Проблемы первично-множественных процессов у больных раком молочной железы / Ю.С. Сидоренко [и др.] // Сибирский онкологический журнал. - 2010. - №1(37). - С.18-22.
10. Селен. Некоторые аспекты химии, экологии и участия в развитии патологии / В.В. Вапиров, М.Э. Шубина, М.В. Вапирова [и др.] // Петрозаводский государственный университет. Кафедра неорганической химии. Кафедра профилактики внутренних болезней: обзор. - [Электронный ресурс]. URL:[http://www.petrus.ru/Chairs/Inorg\\_chem/SELEN.rtf](http://www.petrus.ru/Chairs/Inorg_chem/SELEN.rtf) (дата обращения 14.12.2012).
11. Франк Г.А., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю. Уточняющая диагностика рака с использованием иммуногистохимического определения маркеров: медицинская технология. М.:ФГУ"МНИОИ им. П.А.-Герцена Росмедтехнологий". -2009. -12с.
12. Diverse effects of methylseleninic acid on the transcriptional program of human prostate cancer cells / H. Zhao, M.L. Whitfield, T.Xu [et al.] // Mol. Biol. Cell. - 2004. - Vol. 15. - P. 506-519.
13. Moinfar F. Essentials of Diagnostic Breast Pathology / F. Moinfar. - Berlin Heidelberg: "Spinger-Verlag", 2007. - 508p.
14. Parker T.L. Estrogen receptor activation and estrogen-regulated gene expression are unaffected by methylseleninic acid in LNCaP prostate cancer cells. / P.L.Parcer, D.L. Egget, M.J. Christensen // J Nutr Biochem. - 2007- №11. - P.746-798.
15. WHO Classification of Tumours Pathology and Genetic Tumours of the Breast and Female Genital Organs ed F.A. Tavassolli, P.Devielee IARC. Press. Lyon. 2003.