

Н.Ю. Лук'янова  
О.В. Юрченко  
В.С. Свінцицький  
В.Ф. Чехун

Інститут експериментальної  
патології, онкології та  
радіобіології ім. Р.Є. Кавецького  
НАН України

Інститут онкології  
АМН України, Київ, Україна

**Ключові слова:** рак яєчника,  
прогноз, молекулярні маркери,  
лікарська резистентність,  
апоптоз.

## ПРОГНОСТИЧНІ МОЛЕКУЛЯРНІ МАРКЕРИ У ХВОРИХ НА РАК ЯЄЧНИКА

**Резюме.** Проведено імуногістохімічне вивчення маркерних білків у пухлинах хворих на розповсюджений рак яєчника (РЯ). Встановлено, що експресія білків лікарської резистентності (P-gp та GST) і білків-регуляторів апоптозу (p53 та Bcl-2) чітко корелює з виживаністю хворих. На основі імуногістохімічного вивчення експресії молекулярних маркерів апоптозу та лікарської резистентності визначені прогностичні фактори перебігу захворювання, які дадуть можливість адекватно спланувати ад'ювантне лікування у хворих на розповсюджений РЯ.

### ВСТУП

Рак яєчника (РЯ) — основна причина смертності серед хворих на злоякісні новоутворення жіночих статевих органів [1]. Не зважаючи на удосконалення методів діагностики та лікування пацієток із злоякісними епітеліальними пухлинами яєчника, віддалені результати лікування все ще лишаються незадовільними. На сьогодні проводять дослідження, які направлені на пошук та вивчення можливих прогностичних факторів з метою оптимізації та максимальної індивідуалізації лікування [2]. Протягом багатьох років вважали, що основною прогностичною ознакою, яка визначає клінічний перебіг, особливості метастазування, а також віддалені результати лікування (виживаність) є гістологічний тип РЯ. Разом з тим у хворих, що мають пухлини однакової гістологічної будови та стадії поширення, результати лікування варіюють у широких межах, що зумовлено, значною мірою, різним ступенем диференціювання пухлинних структур. З огляду на складну будову, гістогенез і величезну різноманітність РЯ, встановлення ступеня їх диференціювання являє собою у деяких випадках складну проблему [3, 4]. Досягнення сучасної генетики та молекулярної біології значно вплинули на проблему виявлення прогностичних факторів в онкології, становище у корені змінилося, головним чином завдяки широкому впровадженню у патологоанатомічну практику імуногістохімічних методів дослідження [5, 6]. Поряд з діагностикою цілого ряду захворювань ці методи дозволяють визначати геномні порушення, які детермінують розвиток пухлини, рівень її чутливості до протипухлинної терапії, ступінь злоякісності та метастатичний потенціал. Зокрема експресія ряду білків лікарської резистентності таких як Р-глікопротеїн (P-gp) та глутатіон-S-трансфераза (GST) у злоякісних пухлинах є причиною їх резистентності до хіміотерапії (ХТ) [7, 8]; рівень експресії білків-регуляторів апоптозу (p53 та Bcl-2) деякі автори пов'язують з агресивністю перебігу захворювання та

низькою виживаністю хворих [9–11]. Хоча у деяких дослідженнях підтверджується значення GST, P-gp і білків-регуляторів апоптозу як маркерів ефективності протипухлинної терапії та агресивності перебігу захворювання при злоякісних пухлинах яєчників, зв'язок рівня експресії цих молекул з іншими прогностичними факторами, а також з виживаністю хворих ще недостатньо вивчений.

У зв'язку з цим, мета роботи — встановлення факторів прогнозу перебігу захворювання та чутливості до хіміотерапевтичних препаратів пацієток з РЯ на основі вивчення молекулярних маркерів лікарської резистентності й апоптозу.

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проведено ретроспективне вивчення біологічних параметрів зразків пухлин яєчника у 61 хворій на розповсюджений РЯ, яким проведено комплексне лікування в онкогінекологічному відділенні Інституту онкології АМН України. Залежно від виживаності хворі розподілені на 4 групи:

1-ша група — 23 пацієтки з III стадією РЯ, які мали сприятливий перебіг захворювання, показники виживаності значно вищі ніж загальнопопуляційні; 2-га — 14 пацієток з IV стадією РЯ, які також мали відносно сприятливий перебіг захворювання, показники виживаності значно вищі ніж загальнопопуляційні; 3-тя — 14 пацієток з III–IV стадією захворювання, у яких крім розповсюдженого РЯ виявлені інші синхронні пухлини геніталій; 4-та — 10 пацієток з III–IV стадією РЯ, які мали вкрай несприятливий перебіг захворювання, показники виживаності значно гірші ніж загальнопопуляційні.

Усім хворим на першому етапі лікування виконані циторедуктивні хірургічні втручання. У післяопераційний період на 7–8-му добу проведено курси ХТ за схемою РС (цисплатин 100 мг/м<sup>2</sup> ендодомінально перші 2 цикли, потім довенно; циклофосфамід 600 мг/м<sup>2</sup> довенно) або СС (карбоплатин 400 мг/м<sup>2</sup> ендодомінально перші 2 цикли, потім

довенно; циклофосфамід 600 мг/м<sup>2</sup> довенно) кожні 3 тиж, усього 6 циклів.

Статистичну обробку одержаних даних проводили на основі використання стандартних математичних програм медико-біологічної статистики. Для проведення багатофакторного аналізу дані історії хвороб та усіх досліджень були занесені у базу даних Національного канцер-реєстру України. Виживаність хворих визначали за допомогою програми «Statistica» за методом Каплана — Мейера. Для розширення уявлень про кінетику виживаності використовували медіану виживаності (МВ), що визначали як показник часу, протягом якого вмирає половина хворих досліджуваної групи. Обчислення та порівняння достовірності відмінностей середніх величин (з використанням критерію Стюдента) проводили за допомогою пакета програм SAS. При цьому достовірним вважали відмінності з вірогідністю не нижче 95% ( $p < 0,05$ ).

Імуногістохімічне дослідження експресії білків p53, Vcl-2, P-gp, GST проводили на парафінових зрізах тканини пухлин за стандартним методом [11]. За позитивну реакцію вважали забарвлення з інтенсивністю 2+/3+ більш ніж у 10% пухлинних клітин.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Характеристика хворих 1-ї групи: середній вік становив — 50,6 ± 3,3 року (від 23 до 74 років); у 7 хворих під час хірургічного втручання встановлена IIIA стадія захворювання (імплантаційні метастази на сальнику, парієтальній очеревині, діафрагмі, серозних оболонках товстого та тонкого кишечника були мікроскопічними), у 3 — IIIB стадія (імплантаційні метастази на сальнику, парієтальній очеревині, серозних оболонках товстого та тонкого кишечника були менші 2 см у найбільшому вимірі), у 13 — IIIC стадія (імплантаційні метастази на сальнику, парієтальній очеревині, серозних оболонках товстого та тонкого кишечника були більші 2 см у найбільшому вимірі), у 3 хворих виявлені метастази у парааортальних та здухвинних лімфатичних вузлах. Усім хворим цієї групи проведено хірургічне втручання в обсязі пангістеректомії, видалення великого сальника, у 3 хворих проведена парааортальна або здухвинна лімфаденектомія, у 3 виконана додатково тазова перитонектомія. 13 хворим виконана оптимальна циторедуктивна операція без клінічних ознак залишкової пухлини, 7 — субоптимальна циторедуктивна операція (залишкова пухлина менша 1 см у найбільшому вимірі); у 13 хворих залишкова пухлина була більшою 1 см у найбільшому вимірі. Гістологічно у 13 хворих виявлено серозний рак, у 4 — муцинозний, у 3 — солідний рак, у 1 хворої — плоскоклітинний РЯ.

Вік хворих 2-ї групи становив від 27 до 60 років, середній вік — 46,1 ± 3,3 року У всіх 14 хворих, крім розповсюдженого пухлинного ураження яєчників та інших органів черевної порожнини, у процесі обстеження та хірургічного лікування виявлені віддалені

метастази: у 7 хворих був цитологічно верифікований плеврит, у 3 — метастази у печінці, у 3 — у пупку, у 1 — у легенях, що відповідає IV стадії захворювання. Усім хворим цієї групи проведено хірургічне втручання в обсязі пангістеректомії, видалення великого сальника, у 2 хворих проведена парааортальна або здухвинна лімфаденектомія, у 2 виконана додатково тазова перитонектомія; у 1 хворої — атипова резекція печінки. У 7 хворих залишкова пухлина була меншою 1 см, у 7 — більшою 1 см у найбільшому вимірі. Гістологічно у 13 випадках виявлено серозний рак, у 1 — плоскоклітинний РЯ.

Вік хворих 3-ї групи становив від 24 до 69 років, середній вік 56,4 ± 2,7 року. Розповсюджений РЯ у 1 пацієнтки мав перебіг на фоні раку шийки матки T1B1 стадії, у 3 — раку молочної залози стадії T1B, у інших 10 — раку тіла матки стадії T1B. У 9 хворих РЯ діагностовано на IIIA–IIIB стадії розвитку пухлинного процесу, у 5 — на IIIC стадії, у 3 — на IV стадії. Усім хворим цієї групи проведено хірургічне втручання в обсязі пангістеректомії, видалення великого сальника, 4 — парааортальну або здухвинну лімфаденектомію, 2 — виконано додатково тазову перитонектомію; 3 хворим на рак молочної залози — синхронні мастектомії. 9 хворим виконана оптимальна циторедуктивна операція без клінічних ознак залишкової пухлини, 3 хворим — субоптимальна циторедуктивна операція — залишкова пухлина менша 1 см у найбільшому вимірі; у 2 хворих залишкова пухлина була більшою 1 см у найбільшому вимірі. Гістологічно у 13 хворих виявлений серозний РЯ, у 1 — муцинозний РЯ.

Вік хворих 4-ї групи становив від 29 до 74 років, середній вік — 63,3 ± 3,3 року. З 10 хворих у 8 під час хірургічного втручання встановлена IIIC стадія захворювання, у 3 пацієнток виявлені метастази у парааортальних та здухвинних лімфатичних вузлах; у 2 — діагностовані віддалені метастази у печінці, що відповідає IV стадії поширення пухлинного процесу. Усім хворим цієї групи проведено хірургічне втручання в обсязі пангістеректомії, видалення великого сальника, 2 пацієнткам — парааортальну або здухвинну лімфаденектомію, 2 виконано додатково тазову перитонектомію, 1 — атипову резекцію печінки. У 7 хворих залишкова пухлина була меншою 1 см, у 3 — більшою 1 см у найбільшому вимірі. Гістологічно у всіх 10 хворих виявлено серозний РЯ. Показники виживаності хворих на розповсюджений РЯ у досліджуваних групах наведені у табл. 1.

Таблиця 1

Показники виживаності у хворих на розповсюджений РЯ

Термін спостереження, міс.	Виживаність, %			
	1-ша група (n = 23)	2-га група (n = 14)	3-тя група (n = 14)	4-та група (n = 10)
12	97,8 ± 3,0	96,4 ± 5,0	92,9 ± 6,9	66,7 ± 9,7
24	95,7 ± 4,2	93,0 ± 6,8	71,4 ± 12,1	18,3 ± 11,7
36	93,6 ± 5,0	89,7 ± 8,0	50,0 ± 13,4	0
48	91,9 ± 5,7	86,5 ± 8,9	28,6 ± 12,1	0
60	87,6 ± 6,7	67,9 ± 11,8	14,3 ± 9,4	0

При вивченні залежності між експресією досліджуваних маркерів та виживаністю хворих на РЯ вста-

новлено, що пухлини хворих 1-ї групи з високою МВ (95,08 міс) відрізнялися відсутністю експресії маркерів лікарської резистентності та білків-регуляторів апоптозу у більшості випадків (табл. 2). Зокрема експресію Р-гр та GST відзначали тільки у 2 хворих, менш ніж у 10% злоякісних клітин. Експресію р53 відзначали у пухлинних клітинах 26% хворих цієї групи, що може бути пов'язано з III стадією розповсюдженості пухлинного процесу за класифікацією Figo. За даними літератури [9], експресія р53 корелює із стадією хвороби, пухлини більш пізніх стадій мають більш високу вірогідність наявності мутованого р53. В протилежність цьому, експресію антиапоптичного онкопротеїну Bcl-2 відзначали тільки у 2 з 23 досліджуваних пухлин.

Таблиця 2

**Зв'язок експресії маркерів лікарської резистентності та білків-регуляторів апоптозу і показників виживаності хворих на РЯ**

Групи хворих	МВ, (міс)	Позитивна експресія досліджуваних маркерів, %			
		Р-гр	GST	р53	Bcl-2
1-ша (n = 23)	95,08	8,6	8,6	26	8,6
2-га (n = 14)	76,38	21,4	21,4	28,5	21,4
3-тя (n = 14)	25,02	85,7	85,7	78,5	90,0
4-та (n = 10)	44,98	90,0	90,0	80,0	95,0

Не зважаючи на те, що хворі 2-ї групи мали IV стадію розповсюдженості пухлинного процесу, МВ у них була високою і становила 76,38 міс; слабку експресію досліджуваних маркерів відзначено менш як у третини хворих (табл. 2). Р-гр та GST (забарвлення 5,0% злоякісних клітин) відзначали у 3 з 14 досліджених пухлин (21,4%). Експресію р53 відзначали у 28,5% випадків, але кількість позитивно забарвлених клітин не перевищувала 10,0%. Експресія антиапоптичного білку Bcl-2 знайдена лише в поодиноких клітинах у 21,4% хворих.

На противагу цьому пухлини хворих 3-ї та 4-ї груп відрізнялися гіперекспресією Р-гр та GST (табл. 2). Експресію цих білків відзначали у більшості пухлинних клітин у 85,7% хворих 3-ї та у 90,0% хворих 4-ї груп. Ці результати співпадають з даними клінічних спостережень [12, 13] і свідчать, що віддалені результати лікування істотно гірші, ніж за відсутності експресії Р-гр та GST у злоякісних клітинах. Пухлини хворих 3-ї та 4-ї груп відрізнялися також гіперекспресією білків-регуляторів апоптозу. Гіперекспресія р53 відзначена у 78,5% пацієнтів 3-ї та у 90,0% пацієнтів 4-ї групи. Слід відзначити, що МкАТ проти р53, які були використані у нашому дослідженні, визначали експресію як дикої, так і мутантної форми білка. Але враховуючи, що період існування дикого типу онкобілка становить до 20 хв, можна припустити, що ідентифікований р53 у більшості злоякісних клітин — мутована форма [14]. Відомо, що підвищення рівня експресії мутантних форм р53, нездатних до виконання функції «арешту» клітинного циклу при пошкодженні ДНК, супроводжується накопиченням пухлинними клітинами мутацій, деякі з них можуть призвести до виникнення більш агресивних форм раку [15]. Гіперекспресію Bcl-2 відзначали у цитоплазмі

практично всіх пухлинних клітин у 90,0–95,0% хворих 3-ї та 4-ї груп. Основна функція Bcl-2 полягає у захисті клітини від апоптозу, шляхом інактивації проапоптичного комплексу, до складу якого входять прокаспаза-9 (Araf-3), адаптер Araf-1, флавопротеїн AIF, цитохром С (Araf-2) та інші фактори [16, 17]; результати чисельних клінічних спостережень останніх років переконливо доводять, що підвищена експресія Bcl-2 є маркером несприятливого прогнозу при пухлинах багатьох локалізацій, у тому числі і при злоякісних пухлинах яєчника [2, 11]. Це співпадає з отриманими нами даними, оскільки МВ хворих 3-ї та 4-ї груп була низькою та становила 25,02 та 44,98 міс відповідно.

Таким чином, встановлено зв'язок між експресією досліджених молекулярних маркерів та виживаністю хворих на розповсюджений РЯ. Підвищена експресія білків лікарської резистентності та білків-регуляторів апоптозу супроводжується несприятливим перебігом захворювання. Ці дані добре узгоджуються з результатами, що отримані нами у попередніх дослідженнях при вивченні зв'язку експресії зазначених білків у клітинах РЯ з індивідуальною чутливістю до протипухлинних препаратів [18]. Було показано, що експресія Р-гр є характерною ознакою нечутливості пухлин до цитотоксичної дії доксорубіцину, а підвищений вміст Bcl-2 та GST з високою вірогідністю свідчить про резистентність до цисплатину та карбоплатину відповідно. Тобто підвищений рівень експресії Р-гр, GST та Bcl-2 характерний для хворих на РЯ з низькою МВ та свідчить про резистентність пухлин до цитотоксичної терапії. Враховуючи це, таким хворим необхідно проводити хіміотерапію за схемами 2-ї лінії (використовуючи таксани, гемцитабін, топотекан та ін.); доцільне також включення у схеми їх лікування променевої терапії та призначення антиангіогенних чинників і вакцинотерапії. Проведені тільки поодинокі дослідження, що свідчать про зв'язок експресії р53 у пухлинних клітинах з чутливістю хворих на РЯ до протипухлинної терапії [2, 19]. Мутації р53 відбуваються у пізніх стадіях розвитку РЯ і є прогностичною ознакою агресивності, вони також чітко корелюють із ступенем розповсюдженості пухлинного процесу, що певно і зумовило виявлену нами експресію даного онкопротеїну у хворих усіх 4 досліджених груп.

## ВИСНОВОК

1. На основі комплексного клінічного, гістологічного та імуногістохімічного дослідження встановлено, що білки Р-гр, GST, р53 та Bcl-2 можуть слугувати не тільки маркерами резистентності пухлин до протипухлинної терапії, а також і маркерами для прогнозу перебігу пухлинного процесу у хворих на розповсюджений РЯ.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Christie M, Oehler MK. Molecular pathology of epithelial ovarian cancer. J Br Menopause Soc 2006; **12**: 57–63.
2. Подушкина ИИ, Степанова ЕВ, Дбар ЖИ. Молекулярно-биологические маркеры, характеризующие апоптоз, пролиферацию и ангиогенез при раке яичников. Вест рос онкол науч центра им. Н.Н.Блохина РАМН 2003; **11**: 60–3.
3. Карселадзе АИ. Некоторые аспекты онкоморфологии опухолей яичников. Практик онкология 2000; **12**: 12–8.
4. Karseladze AI. The role of the pathologist in the assessment of the effect of chemotherapy in patients with epithelial ovarian carcinoma. Evr J Gynecol Oncol 2002; **4**: 1115–21.
5. Имянитов ЕИ. Молекулярная генетика рака яичников. Практик онкол 2000; **12**: 3–9.
6. Lyall MS, Dundas SR, Curran S, Murray GI. Profiling markers of prognosis in colorectal cancer. Clin Cancer Res 2006; **12**: 1184–91.
7. Горбачева ЛБ., Блюменберг АГ. О некоторых современных факторах лекарственной устойчивости к химиотерапии у больных раком яичников. Современные экспериментальные и клинические подходы к диагностике и рациональному лечению рака яичников. Сб. статей приуроченный к Европейской школе по онкологии, посвященной раку яичников / Под ред ВА Горбуновой/ Москва, 2001: 139–46.
8. Yokoyama Y, Sato S, Fukushi Y, *et al.* Significance of multi-drug-resistant proteins in predicting chemotherapy response and prognosis in epithelial ovarian cancer. J Obstet Gynaecol Res 1999; **25**: 387–94.
9. Sagarra RA, Andrade LA, Martinez EZ, *et al.* P53 and Bcl-2 as prognostic predictors in epithelial ovarian cancer. Int J Gynecol Cancer 2002; **12**: 720–7.
10. Nezhat F, Cohen C, Rahaman J, *et al.* Comparative immunohistochemical studies of bcl-2 and p53 proteins in benign and malignant ovarian endometriotic cysts. Cancer 2002; **94**: 2935–40
11. Lukyanova NYu, Kulik GI, Yurchenko OV, *et al.* Expression of p53 and bcl-2 proteins in epithelial ovarian carcinoma with different grade of differentiation. Experim oncol 2000; **49**: 91–5.
12. Huang J, Tan PH, Thiyagarajan J, Bay BH. Prognostic significance of glutathione S-transferase-pi in invasive breast cancer. Mod Pathol 2003; **16**: 558–65.
13. Shain KH, Dalton WS. Cell Adhesion Is a Key Determinant in de Novo Multidrug Resistance (MDR): New Targets for the Prevention of Acquired MDR. Mol Cancer Therap 2001; **1** (11): 69–78.
14. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. Nat Rev Cancer. 2004; **8**: 592–603.

15. Vousden KH. Activation of the p53 tumor suppressor protein. Biochim Biophys Acta 2002; **16**: 47–59.

16. Murata T, Haisa M, Uetsuka H, *et al.* Molecular mechanism of chemoresistance to cisplatin in ovarian cancer cell lines. Int J Mol Med 2004; **13**: 865–8.

17. Borner MM, Brousset P, Pfanner-Meyer B, *et al.* Expression of apoptosis regulatory proteins of the Bcl-2 family and p53 in primary resected non-small -cell lung cancer. Br J Cancer 1999; **79**: 952–8.

18. Лук'янова НЮ, Юрченко ОВ, Шпильова СІ та ін. Чутливість до протипухлинних препаратів та експресія молекулярних маркерів апоптозу і лікарської резистентності у хворих на рак яєчників. Здоров'я жінки 2005; (2): 52–4.

19. Gadducci A, Di Cristofano C, *et al.* P53 gene status in patients with advanced serous epithelial ovarian cancer in relation to response to paclitaxel- plus platinum-based chemotherapy and long-term clinical outcome. Anticancer Res 2006; **26**: 687–93.

## PROGNOSTIC MOLECULAR MARKERS IN PATIENTS WITH OVARIAN CANCER

N.Y. Lukyanova, O.V. Yurchenko,  
V.S. Svintsytsky, V.F. Chekhun

**Summary:** *Immunohistochemical study of marker proteins was performed in tumors of patients with disseminated ovarian cancer (OC). It was established that the expression of drug resistance proteins (P-gp and GST) and apoptosis regulating proteins (p53 and Bcl-2) markedly correlates with the patients' survival. Based on the immunohistochemical study of the expression of molecular markers of apoptosis and drug resistance proteins, prognostic factors of the course of disease were defined which will help to plan adequately the adjuvant treatment in patients with disseminated OC.*

**Key Words:** ovarian cancer, prognosis, molecular markers, drug resistance, apoptosis.

### Адреса для листування:

Лук'янова Н.Ю.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, відділ механізмів протипухлинної терапії