

**И.И. Антонеева**  
**С.Б. Петров**

Ульяновский государственный  
университет, Ульяновск

Казанский государственный  
медицинский университет,  
Казань, Россия

## МАРКЕРЫ АПОПТОЗА И ПРОЛИФЕРАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ДИНАМИКЕ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ РАКА ЯИЧНИКА

**Ключевые слова:** рак яичника,  
опухолевая прогрессия,  
пролиферация, апоптоз.

**Резюме.** У 83 больных раком яичника (РЯ) в первичном опухолевом узле проведено иммуногистохимическое определение маркеров пролиферации Ki-67 и PCNA и апоптоза p53 и bcl-2. Установлено, что на I стадии заболевания индекс Ki-67 в среднем составил 5,4%; на II — 27,0%, на III — 69,6% и на IV стадии заболевания — 82,8%. Показано, что при прогрессировании опухоли статистически значимо увеличивается количество клеток, экспрессирующих p53 или bcl-2. Делается вывод, что при прогрессировании РЯ в первичном опухолевом узле, возможно, имеет место отбор p53+ неопластических клеток с высокой пролиферативной активностью и гиперэкспрессией онкопротеина bcl-2.

Одной из основных причин смертности в промышленно развитых странах являются злокачественные новообразования. При этом, согласно данным Международного агентства по изучению рака, к 2020 г. прогнозируется повышение заболеваемости злокачественными опухолями до 15 млн и возрастание смертности до 9 млн человек в год [16]. Анализ статистических данных о злокачественных новообразованиях в России за период с 1999 по 2004 г. показывает, что заболеваемость злокачественными опухолями яичника за этот период имела прирост 14,9% и переместилась по уровню смертности с 6–7-го места в 1999 г. на 5-е в 2004 г., заняв 3-е место по величине прироста [11].

К основным свойствам всех злокачественных опухолей относят повышенную способность к пролиферации, утрату способности к полной дифференцировке и апоптотической гибели, а также инвазивный рост и метастазирование [5]. Благодаря им неоплазма имеет преимущество перед нормальными клетками во время роста и выживания.

Если в здоровой ткани существует баланс между процессами пролиферации и гибели клетки, то в ткани опухоли имеет место автономная и неограниченная пролиферация клеток. При этом в трансформированных клетках возникает устойчивость к индукции апоптоза [9]. В результате генетических мутаций снижается способность трансформированных клеток активировать программу апоптоза, что, с одной стороны, способствует прогрессированию опухолевого процесса, а с другой — может стать причиной множественной лекарственной устойчивости [1]. В связи с этим в последнее время уделяется большое внимание изучению молекулярных маркеров, характеризующих апоптоз и пролиферацию при различных злокачественных новообразованиях [7, 8].

Ведущую роль в развитии апоптоза и регуляции клеточной пролиферации играет природный (Wt)

тип гена-онкосупрессора p53 и кодируемый им ядерный белок p53 [3]. Последний модулирует экспрессию генов, которые отвечают за репарацию ДНК, деление клеток и апоптоз [1, 19]. В значительной части злокачественных опухолей выявляют мутации в хромосоме 17 в области локализации гена-супрессора p53 [4, 21].

Bcl-2 является одним из основных компонентов системы защиты клетки против факторов, вызывающих апоптоз. Известно, что Bcl-2 ингибирует p53-зависимый и независимый апоптозные метаболические пути. При этом способствует образованию в митохондриях ионных каналов, стабилизируя этим митохондриальную цитохром-оксидазу С и связывает белки, участвующие в апоптозе. Цитохром-оксидаза С способна инициировать активацию каскада каспаз и, как следствие, деградиацию ДНК и апоптоз.

С состоянием основных регуляторных систем программированной клеточной гибели связаны неопластические, репаративные и пролиферативные процессы в тканях. Показано, что нарушение механизмов пролиферации — одна из главных особенностей опухолевых клеток. А уровень пролиферативной активности определяет агрессивность и злокачественность опухолевого процесса [7].

Целью работы была оценка маркеров апоптоза и пролиферации опухолевой ткани при раке яичника (РЯ) в динамике прогрессирования опухоли.

### ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования послужили гистологические препараты операционно-биопсийного материала первичной опухоли 83 первичных больных РЯ. По стадиям (ст.) заболевания (FIGO, 1976) больных распределили следующим образом: I ст. была у 4 (4,8%), II — у 6 (7,2%), III — у 40 (48,2%), IV — у 33 (39,8%). В зависимости от гистологической структуры опухоли в исследуемой группе 29 (35%) были отне-

сены к серозному гистотипу, 23 (28%) — муцинозному, 16 (19%) — эндометриоидному, 13 (16%) — мезонефроидному и 2 (2%) — неклассифицируемому.

Образцы опухолевой ткани фиксировали в нейтральном забуференном формалине с обычной стандартной проводкой и заливкой в парафин. Гистологические препараты окрашивали обычными способами и проводили иммуногистохимические исследования.

При оценке пролиферативной активности использовали моноклональные антитела (МкАТ, «Novocastra» и «Дак») к антигену ядер пролиферирующих клеток PCNA и к негистонному белку Ki-67, который определяется в ядрах клеток во время поздней G-фазы, S, G<sub>2</sub> и M, но не в G<sub>0</sub> — фазе клеточного цикла. Проллиферативную активность опухоли оценивали как процент Ki-67+-клеток от общего числа опухолевых клеток. Для оценки индекса пролиферации по PCNA высчитывали процент клеток, в ядрах которых выявляли экспрессию PCNA.

В иммуногистохимической оценке экспрессии mtp53 использовали мышиные МкАТ к p53, клон DO-7, IgG2b (M7001 «DakoCytomation») в разведении 1 : 100 при времени экспозиции 60 мин. Критерием положительной реакции считалась окраска 10% и более ядер опухолевых клеток. Bcl-2 выявляли с помощью МкАТ к Bcl-2, клон Bcl-2/100/D<sub>3</sub>, IgGi (NCL-bcl-2 «Novocastra») в разведении 1 : 80 при инкубации 60 мин. Положительной считалась реакция при цитоплазматической и мембранной окраске более 10% опухолевых клеток.

Полученные в ходе исследования результаты подвергнуты обработке с использованием непараметрических статистических методов. Значимость различий между группами определяли с использованием Н-критерия Крускала — Уоллиса. Силу связи между признаками устанавливали ранговой корреляцией Спирмена.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что на I клинической стадии заболевания количество Ki-67+-клеток невелико и составляет порядка  $5,4 \pm 0,63\%$  (таблица). Расположение этих клеток не имеет выраженных закономерностей. Ki-67+-клетки располагаются разрозненно и, как правило, единичны. Однако имеется устойчивая тенденция к увеличению таких клеток в мелких железах. В группе РЯ II ст. указанные тенденции сохранялись. При прогрессировании неоплазмы (РЯ III ст.) выявляли тенденцию к усилению экспрессии Ki-67 (см. таблицу).

Таблица

Средние значения индексов пролиферации у больных РЯ на различных клинических стадиях заболевания (M ± m)

Стадия заболевания (по FIGO)	Индекс пролиферации	
	Ki-67	PCNA
I (n = 4)	$5,4 \pm 0,63$	$22,8 \pm 4,03$
II (n = 6)	$10,2 \pm 0,66^*$	$27,0 \pm 5,76^*$
III (n = 40)	$47,0 \pm 4,12^*$	$69,9 \pm 12,99^*$
IV (n = 33)	$45,5 \pm 4,12$	$82,8 \pm 11,48$

\*Различие с данными на предыдущей клинической стадии статистически значимо (p = 0,0001).

Исследование РЯ IV ст. показало сохранение высокой пролиферативной активности: экспрессия Ki-67 в ряде случаев достигала 58% (рис. 1).

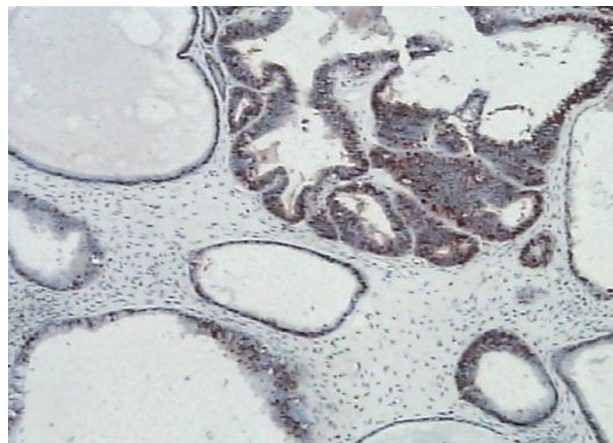


Рис. 1. Высокое содержание Ki-67+-клеток. Ув. x 150

Данные литературы относительно уровня экспрессии Ki-67 при РЯ достаточно разноречивы [18]. При этом установлено, что индекс Ki-67 неодинаков при разных гистологических формах РЯ и коррелирует со степенью дифференцировки опухоли при серозном РЯ [8].

С.В. Петров и соавторы [10] указывают, что при иммуногистохимической оценке пролиферативной активности неоплазмы при РЯ реакция на антиген ядер пролиферирующих клеток PCNA выявляется в виде диффузной и/или зернистой окраски ядер раковых клеток. В тканевых образцах PCNA наиболее часто отмечают в папиллярных новообразованиях, в мелких железах и участках инвазивного роста (рис. 2).

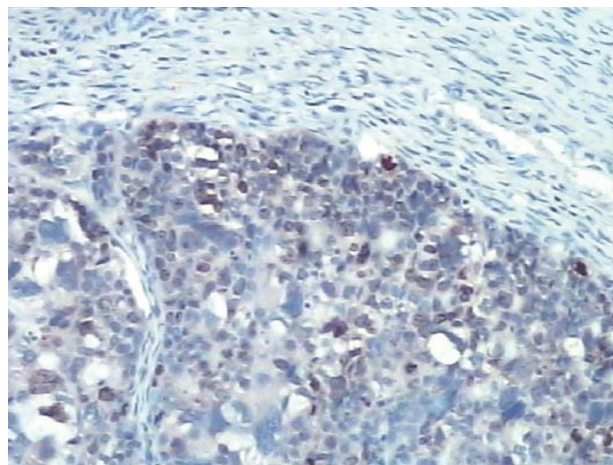


Рис. 2. Высокое содержание PCNA+-клеток в железах эндометриоидного РЯ. Ув. x 100

На I и II клинических стадиях заболевания уровень PCNA демонстрирует значительные колебания от 18 до 32%.

В отдельных случаях вообще не выявляли PCNA-положительных клеток. При прогрессировании новообразования (III–IV ст.) количество PCNA-положительных клеток значительно возрастает (см. таблицу), достигая в ряде случаев 100% (рис. 3).

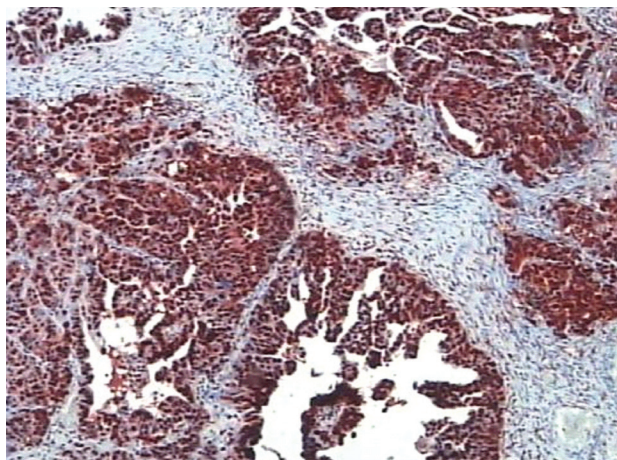


Рис. 3. Экспрессия PCNA в 100% клеток РЯ IV ст. Ув. x 100

Таким образом установлено, что пролиферативная активность клеток овариального рака неодинакова на различных клинических стадиях заболевания. В группе больных РЯ на III клинической стадии показатели экспрессии PCNA и Ki-67 достоверно и существенно ( $p = 0,0001$ ) превышали таковые в группе на I–II клинических стадиях и продолжали возрастать на IV клинической стадии заболевания. Это позволяет утверждать, что при прогрессировании РЯ появляются клоны клеток с высокой пролиферативной активностью.

p53 — полифункциональный белок, основная функция которого реализуется в ядре. Ген *p53* постоянно транскрибируется и транслируется, однако сам белок быстро деградирует в протеосомах и в клетках большинства тканей находится на пороге детекции [13]. Мутантный тип *mt p53* — долгоживущий протеин, его период полураспада — до 24 ч. Считается, что иммуногистохимическая положительная реакция полностью зависит главным образом от наличия мутантного типа *mt 53* [11]. Мутантная форма белка *p53* уже не выполняет своих функций и деление клеток ставится неуправляемым процессом [12]. Полагают, что мутации *p53* могут как инициировать канцерогенез (синдром Ли — Фраумени) или определять его начальные этапы, так и возникать в процессе роста опухоли, обеспечивая ее новые агрессивные свойства [3]. Мутантный *p53* определяется при многих злокачественных образованиях, таких как опухоли легкого (70%), молочной железы (20%), желудка (60%) [21]. В злокачественных эпителиальных опухолях яичника экспрессия *p53* может достигать 80% [17, 22].

Результаты проведенного нами исследования по оценке экспрессии антигена *p53* атипическими эпителиальными клетками при прогрессировании РЯ представлены на рис. 4. Установлено, что при прогрессировании РЯ увеличивается количество атипических эпителиальных клеток опухоли, экспрессирующих *p53*. При этом достоверность различий между группами статистически значимая ( $p = 0,0001$ ) и корреляция со стадией положительная

высокая ( $r = 0,6092$ ). Полученные результаты позволяют предполагать, что в процессе прогрессирования первичной опухоли либо нарастают мутации гена *p53*, либо имеет место отбор *p53+* опухолевых клеток, обеспечивающих более агрессивное течение. Наряду с *p53* наиболее последовательно изучается в апоптозе роль гена *bcl-2*. В свою очередь белок *p53* снижает активность *Bcl-2*, что, возможно, запускает апоптоз в клетках с поврежденной ДНК. Установлено, что *Bcl-2* подавляет Fas-зависимый апоптоз [2]. Изучены механизмы, благодаря которым *Bcl-2* реализует свою антиапоптотическую функцию [15]. Данные относительно уровня экспрессии белка *Bcl-2* и возможностей использования его в качестве прогностического фактора у больных с солидными опухолями достаточно противоречивы [1].

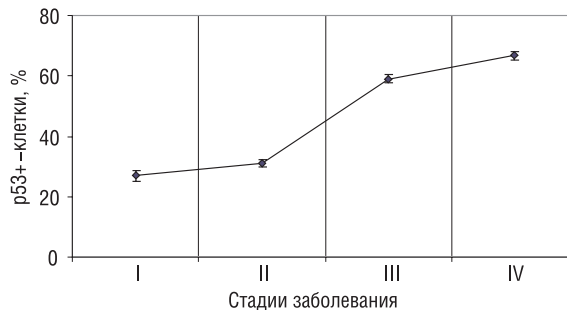


Рис. 4. Содержание атипических эпителиальных клеток яичника, экспрессирующих *p53*, при прогрессировании РЯ

Результаты проведенного нами исследования по оценке экспрессии антигена *Bcl-2* атипическими эпителиальными клетками при прогрессировании РЯ представлены на рис. 5.

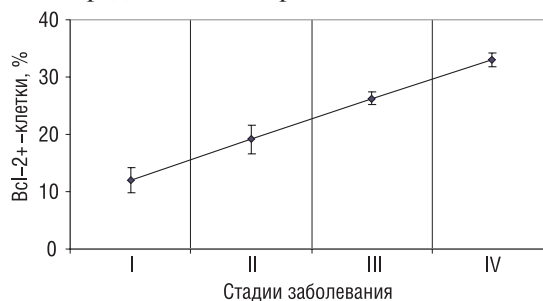


Рис. 5. Содержание атипических эпителиальных клеток яичника, экспрессирующих *Bcl-2*, при прогрессировании РЯ

Показано, что при прогрессировании РЯ количество клеток опухоли, экспрессирующих *Bcl-2*, увеличивается. Достоверность различий между стадиями статистически значимая ( $p = 0,0001$ ), и корреляция со стадией положительная высокая ( $r = 0,6255$ ).

Для опухолевых клеток характерны генетические изменения, ведущие к ослаблению различных путей апоптоза, в частности ингибирование проницаемости митохондриальной мембраны для цитохрома С и АИФ вследствие изменения экспрессии белков семейств *Bcl-2*. Для клеток РЯ показано подавление аутофагии — другого способа программированной гибели клеток, связанного с лизосомальной деградацией белков [5]. Считается, что гиперэкспрессия

Bcl-2 приводит к неопластическому процессу. В то же время показано, что низкий уровень этого белка коррелирует с плохим прогнозом при раке молочной железы [23] и его гиперэкспрессия является благоприятным прогностическим признаком при РЯ [6]. Существует также мнение, что экспрессия Bcl-2 не всегда блокирует апоптоз [14]. Вероятно, в разных типах опухолей проявляется разная роль Bcl-2.

Таким образом, на основании выше изложенного можно предполагать, что в процессе прогрессирования РЯ в первичном опухолевом узле, возможно, имеет место отбор p53+ неопластических клеток, характеризующихся высокой пролиферативной активностью и гиперэкспрессией онкопротеина Bcl-2.

Поскольку изученные маркеры пролиферации и апоптоза имеют непосредственное отношение к радио- и химиочувствительности неоплазмы [2], полученные результаты могут быть использованы при выборе оптимальных схем лечения и оценке прогноза РЯ на различных клинических стадиях заболевания.

## ЛИТЕРАТУРА

1. **Абраменко ИВ, Фильченков АА.** Оценка параметров апоптоза в диагностике онкологических заболеваний, их прогнозе и оптимизации схем терапии. *Вопр онкол* 2003; **49**: 21–30.
2. **Акимов АА, Иванов СД, Хансон КП.** Апоптоз и лучевая терапия злокачественных новообразований. *Вопр онкол* 2003; **49**: 261–9.
3. **Копнин БП.** Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. *Биохимия* 2000; **65**: 5–33.
4. **Копнин БП.** Опухолевые супрессоры и мутаторные гены. В кн: *Канцерогенез*. / Под ред ДГ Заридзе / Москва: Медицина, 2004: 125–56.
5. **Копнин БП.** Современные представления о механизмах злокачественного роста. В: *Материалы X Российского онкологического конгресса*. Москва, 2006: 99–102.
6. **Мильчаков ДЕ.** Клинико-морфологическая характеристика серозного рака яичников у женщин (на примере Кировской обл). [Автореф дис ... канд мед наук]. Санкт-Петербург, 2007. 19 с.
7. **Пожариский КМ, Леенман ЕН.** Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний *Арх патол* 2000; (5): 3–11.
8. **Полушкина ИН.** Биомолекулярные маркеры как факторы прогноза при серозном раке яичников III–IV стадии. [Автореф дис ... канд мед наук]. Москва, 2002. 39 с.
9. **Райхлин НТ, Райхлин АН.** Регуляция и проявление апоптоза в физиологических условиях и в опухолях. *Вопр онкол* 2002; **48**: 159–71.
10. **Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека.** / Под ред СВ Петрова, НТ Райхлиной / Казань: Титул, 2004. 451 с.
11. **Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2004 г.** Под ред МИ Давыдова, ЕМ Аксель. *Вестник РОНЦ им ИН Блохина*, 2006; **17**: 97.
12. **Cloven NG, Kyshtoobayeva A, Burger RA, et al.** In vitro chemoresistance and biomarker profiles are unique for histologic subtypes of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004; **92**: 160–6.

13. **Ichihara A, Tanaka K.** Roles of proteasomes in cell growth. *Mol Biol Rep* 1995; **21**: 49–52.

14. **Kuwashima Y, Kobayashi Y, Kawarai A, et al.** Expression of bcl-2 and apoptotic DNA fragmentation in human endometrial adenocarcinoma cells. *Anticancer Res* 1996; **16**: 3221–4.

15. **Mitselou A, Ioachim E, Kitsou E, et al.** Immunohistochemical study of apoptosis — related bcl-2 protein and its correlation with proliferation indices (Ki-67, PCNA), tumor suppression genes (p53, pRb), the oncogene c-erb-B2, sex steroid hormone receptors and other clinico-pathological features, in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *In vivo* 2003; **17**: 469–78.

16. **Parkin DM, Pisani P, Ferlay J.** Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999; **49**: 33–64.

17. **Pieretti M, Hopenhayn-Rich C, Khattar NH, et al.** Heterogeneity of ovarian cancer: relationships among histological group, stage of disease, tumor markers, patient characteristics, and survival. *Cancer Invest* 2002; **20**: 11–23.

18. **Reitmaier M, Rudlowski C, Biesterfeld S, et al.** Comparative studies on the biological significance of the marker for proliferation Ki-67-Antigen and PSNA in primary ovarian carcinoma. *Zentralbl Gynecol* 2000; **122**: 361–7.

19. **Schmitt CA, Love SW.** Apoptosis and therapy. *G Path* 1999; **187**: 127–37.

20. **Soussi T.** p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res* 2000; **60**: 1777–88.

21. **Soussi T, Dehouche K, Bérout C.** p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum Mutat* 2000; **15**: 105–13.

22. **Terada K, Mattson D, Goo D, Shimizu D.** DNA aneuploidy is associated with increased mortality for stage I endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2004; **95**: 483–7.

23. **Zhang GJ, Kimijima I, Abe R, et al.** Apoptotic index correlates to bcl-2 and p53 protein expression, histological grade and prognosis in invasive breast cancers. *Anticancer Res* 1998; **18**: 1989–98.

## MARKERS OF APOPTOSIS AND PROLIFERATION OF TUMOR CELLS IN THE DYNAMICS OF OVARIAN CANCER PROGRESSION

*I.I. Antoneeva, S.B. Petrov*

**Summary.** 83 ovarian cancer (OC) patients were immunohistochemically examined to determine the proliferation markers Ki-67 and PCNA as well as apoptosis markers p53 and bcl-2 in the primary tumor nodes. It was found that Ki-67 index was in average 5.4% on the I<sup>st</sup> stage; 10.2% on the II<sup>nd</sup> stage; 47.0% on the III<sup>rd</sup> stage and 45.5% on the IV<sup>th</sup> stage of the disease. It was shown that in tumor progression the number of cells that express p53 or bcl-2 significantly increases. The conclusion is in the tumor progression in the primary tumor nodes there is a possible selection of p53+ neoplastic cells with high proliferative activity and hyperexpression of bcl-2 oncoprotein.

**Key Words:** ovarian cancer, tumor progression, proliferation, apoptosis.

### Адрес для переписки:

Антонеева И.И.  
Россия, 432001, Ульяновск,  
ул. Крымова, 63, корп. 2, кв. 403  
E-mail: Naum-53@yandex.ru