

Л.Г. Бучинська¹
В.М. Грінкевич²
В.С. Свінцицький³
О.В. Романенко²

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

²Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

³Національний інститут раку, Київ, Україна

Ключові слова: рак яєчника, імуногістохімічне дослідження, молекулярно-біологічні маркери, індивідуальний прогноз.

ВИКОРИСТАННЯ БІОМОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ ПРЕДИКАТИВНОЇ ОЦІНКИ ІНДИВІДУАЛЬНОГО ПРОГНОЗУ ВИЖИВАНOSTІ ХВОРИХ НА СЕРОЗНИЙ РАК ЯЄЧНИКА

Обґрунтування і мета: незважаючи на багатопланові дослідження раку яєчника (РЯ), у тому числі молекулярного фенотипу пухлинних клітин (ПК), досі відсутні чіткі критерії, за якими можна було б прогнозувати індивідуальну виживаність хворих на РЯ. **Мета дослідження** — вивчити експресію Ki-67, p53, рецепторів стероїдних гормонів у ПК та показника неоангіогенезу у хворих на серозний РЯ і визначити можливості їх використання для оцінки індивідуальної виживаності хворих. **Об'єкт і методи дослідження:** у дослідження залучено 82 хворих на серозний РЯ I–IV стадії. В операційному матеріалі імуногістохімічним методом з використанням відповідних моноклональних антитіл визначали експресію Ki-67, p53, рецепторів естрогенів та прогестерону, CD34. На основі останнього показника розраховували щільність мікросудин (ЩМС) на 1 мм² пухлини. Виживаність хворих аналізували за методом Каплана — Мейєра; прогностичне значення кожного з показників оцінювали за допомогою багатфакторного аналізу (пропорційні моделі ризику Кокса, χ^2 -тест). **Результати:** визначено високу індивідуальну варіабельність експресії Ki-67, p53, рецепторів естрогенів і прогестерону у ПК, а також ЩМС у пухлинах одного гістологічного типу — серозного РЯ. Зіставлення експресії досліджених маркерів з 5-річною загальною виживаністю хворих свідчить, що вони є суттєвими чинниками останньої. **Висновок:** досліджені маркери мають прогностичне значення; на основі отриманих результатів запропоновано спосіб визначення ймовірного індивідуального прогнозу 5-річної виживаності хворих на серозний РЯ.

ВСТУП

Виявлення та лікування раку яєчника (РЯ) є актуальною проблемою онкології, зумовленою високою захворюваністю та смертністю хворих через пізню діагностику та агресивний перебіг хвороби, їх низькою 5-річною виживаністю (30–35%). Відомо, що клінічний перебіг пухлинного процесу залежить від багатьох факторів, до яких належать вік хворих, стадія пухлинного процесу, гістологічна структура пухлини та особливості її молекулярного профілю. Незважаючи на багатопланові дослідження РЯ, у тому числі й молекулярного фенотипу пухлинних клітин (ПК), досі відсутні чіткі критерії, за якими можна було б прогнозувати індивідуальну виживаність хворих на РЯ [1–3]. Результати багатьох сучасних досліджень вказують, що у якості прогностичних факторів клінічного перебігу РЯ доцільно використовувати біомолекулярні маркери, що відображають ключові характеристики ПК, — проліферативну активність, чутливість до чинників апоптозу, метастатичний потенціал та інші, зміна яких пов'язана з агресивністю пухлини. До таких маркерів відносять білки-регуля-

тори клітинного циклу, рецептори стероїдних гормонів, показники неоангіогенезу [4–8].

Мета роботи: дослідити експресію маркера проліферації Ki-67, p53, рецепторів стероїдних гормонів у ПК та показника неоангіогенезу у хворих на серозний РЯ і визначити можливості використання досліджених маркерів для оцінки індивідуальної виживаності хворих.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на зразках видалених пухлин 82 хворих на серозний РЯ I–IV стадії, що перебували на лікуванні у відділенні онкогінекології Національного інституту раку МОЗ України. Пацієнткам не призначали неoad'ювантної хіміотерапії. У післяопераційний період (починаючи з 7–8-ї доби) проводили ад'ювантну внутрішньовенну поліхіміотерапію за платиновмісними схемами CAP і CEP. Вік хворих становив від 18 до 79 років, середній — 50,9±5,5 року. Операційний матеріал піддавали класичній гістологічній обробці [9]. Верифікацію клінічного діагнозу здійснювали на гістологічних зрізах, забарвлених гематоксиліном та еозином. На паралельних зрізах проводили

імунгістохімічне (ІГХ) дослідження з використанням моноклональних антитіл («Dako Cytomation», Данія) до маркера проліферації Ki-67 (клон МІВ-1), білка p53 (клон DO-7), рецепторів естрогенів (РЕ) (клон 1D5) та прогестерону (РП) (клон PgR636), маркера ендотелію судин CD34 (клон QVEnd10). Для візуалізації реакції використовували систему En Vision («Dako Cytomation», Данія), ядра ПК дофарбовували гематоксиліном Мейєра. У кожному препараті аналізували по 800–1000 ПК і визначали кількість клітин із позитивною ІГХ реакцією (індекс мітки, %). Проліферативну активність ПК — індекс проліферації (%) — оцінювали за кількістю Ki-67-позитивних клітин, (Ki-67(+)). Підрахунок кількості CD34-позитивних (CD34(+)) новоутворених мікросудин проводили за N. Weidner та співавторами (1991) [10], перелічуючи кількість судин на 1 мм², що відповідало показнику щільності мікросудин (ЩМС). Відповідно до значень медіани (МЕ) кожного з показників експресію маркерів та ЩМС поділяли на високу (значення ≥ МЕ) і низьку (значення ≤ МЕ). Вживаність хворих аналізували за методом Каплана — Мейєра, достовірність відмінностей між кривими виживаності визначали за F-критерієм Кокса. Прогностичне значення показників оцінювали за допомогою багатофакторного аналізу (пропорційних моделей ризику Кокса) з використанням χ^2 -тесту. Для перевірки достовірності розрахункових даних ймовірності індивідуальної 5-річної виживаності хворих на серозний РЯ використано критерій Пірсона [11].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведеного ІГХ дослідження виявлено значну варіабельність експресії білків Ki-67, p53, РЕ, РП та ЩМС у межах одного гістологічного типу пухлин — серозного РЯ, про що свідчать індивідуальні коливання досліджуваних показників. Зокрема, індекс проліферації становив від 1,1 до 76,0%, ЩМС — від 10 до 126 судин на 1 мм² пухлини. Експресія білка p53 була у межах 1,5–79,0% клітин, РЕ — 2,0–70,0%, РП — 2,0–84,0%. На підставі одержаних індивідуальних значень цих показників розраховано їх МЕ: МЕ ЩМС становила 59,0 на 1 мм², МЕ експресії Ki-67 — 16,0%, p53 — 35,5%, РЕ — 29,0%, РП — 37,0%. Вказані значення МЕ досліджених показників використано для зіставлення з 5-річною виживаністю хворих (табл. 1) і за допомогою методу багатофакторного аналізу встановлено можливість їх використання для оцінки прогнозу захворювання ($\chi^2 = 15,2$; $p = 0,009$).

На основі отриманих даних нами запропоновано спосіб визначення ймовірного індивідуального прогнозу 5-річної виживаності хворих на серозний РЯ. Отримавши показники вірогідності p , тобто внесок кожного маркера у виживаність пацієнок, розраховували коефіцієнти інформативності (КІ) — ваговий коефіцієнт відповідного молекулярного показника. У сукупності усі коефіцієнти були нормовані таким чином, що $\sum KИ = 1$ (табл. 2).

Таблиця 1

Порівняння особливостей експресії молекулярно-біологічних маркерів у ПК і 5-річної виживаності хворих на серозний РЯ

Маркер	МЕ	Градації експресії маркера	Визначена залежно від градації маркера щодо МЕ ймовірність 5-річної тривалості життя хворих, %	p (F-критерій Кокса)
Ki-67, %	16,0	< МЕ ≥ МЕ	70,0 20,0	0,02
p53, %	35,5	< МЕ ≥ МЕ	72,7 57,8	0,05
РЕ, %	29,0	< МЕ ≥ МЕ	26,0 75,0	0,01
РП, %	37,0	< МЕ ≥ МЕ	39,0 65,0	0,04
ЩМС, кількість судин на 1 мм ² пухлини	59,0	< МЕ ≥ МЕ	63,0 51,0	0,05

Таблиця 2

Показники вірогідності та КІ досліджених молекулярно-біологічних маркерів

Маркери	p	КІ
Ki-67	0,106	0,19
p53	0,232	0,09
ЩМС	0,273	0,07
РЕ	0,417	0,05
РП	0,034	0,6

Ймовірність 5-річної виживаності хворих з урахуванням показників комплексу біомолекулярних маркерів визначали за формулою:

$$PS = \sum KI \cdot F(x_i) \cdot 100 (\%),$$

де PS (probability of survival) — ймовірність виживаності хворих, що дорівнює 5 або більше років (%); $KИ$ — коефіцієнт інформативності; $F(x_i)$ — предикативна логічна функція, що набуває значення 0 або 1 залежно від того, чи є значення кожного молекулярного показника x_i таким, що переходить порогової величини МЕ відповідного фактора.

У якості прикладів наводимо результати розрахунку ймовірного індивідуального прогнозу 5-річної виживаності хворих на серозний РЯ III стадії (хворі різного віку) залежно від експресії досліджених маркерів у пухлинах, які в цілому узгоджуються з реальними термінами виживаності цих пацієнтів, задокументованими в історіях хвороби (табл. 3, 4). Усі хворі після циторедуктивної операції отримали по 5 курсів поліхіміотерапії.

Таблиця 3

Індивідуальний прогноз 5-річної виживаності хворих на серозний РЯ (менопаузальний період)

Маркер	Пацієнтка А, 60 років, прожила 9 років після операції		Пацієнтка К, 60 років, прожила 1 рік після операції	
	Індивідуальне значення	Ймовірність 5-річної виживаності	Індивідуальне значення	Ймовірність 5-річної виживаності
Ki-67, %	10,0	88,0%	40,0	12,0%
p53, %	19,0		37,0	
ЩМС на 1 мм ² пухлини	60,0		47,0	
РЕ	6,0		42,0	
РП	43,0		35,0	

Таблиця 4

Індивідуальний прогноз 5-річної виживаності хворих на серозний РЯ (репродуктивний період)

Маркер	Пацієнтка Н, 36 років, прожила 6 років після операції		Пацієнтка М, 40 років, прожила 1 рік після операції	
	Індивідуальне значення	Ймовірність 5-річної виживаності	Індивідуальне значення	Ймовірність 5-річної виживаності
Ki-67, %	8,0	84,0%	44,0	7,0%
p53, %	39,0		37,0	
ЩМС на 1 мм ² пухлини	84,0		39,0	
PE	35,0		5,0	
РП	67,0		5,0	

При перевірці розрахунків ймовірності індивідуального прогнозу 5-річної виживаності хворих на серозний РЯ з реальною виживаністю за даними медичної документації виявлено їх збіг у 69%. На основі отриманих результатів запропоновано спосіб визначення ймовірного індивідуального прогнозу 5-річної виживаності пацієнток із серозним РЯ.

ВИСНОВОК

Підсумовуючи вищенаведене, можна стверджувати, що досліджені біомолекулярні маркери (Ki-67, p53, рецептори стероїдних гормонів та ЩМС) мають прогностичне значення і можуть бути використані для оцінки ймовірного індивідуального прогнозу 5-річної виживаності хворих на серозний РЯ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Pectasides D, Fountzilias G, Aravantinos G, et al. Epithelial ovarian carcinoma in younger vs older women: is age an independent prognostic factor. *Int J Gynecol Cancer* 2007; **17**: 1003–10.
2. Cancer Incidence in Five Continents. IARC Sci Publ Lyon, 2008; **9**. 896 p.
3. Свінціцький ВС. Комплексне лікування хворих на злоякісні пухлини яєчника [Автореф дис... д-ра мед наук: спец 14.01.07]. Київ: 2010; 40 с.
4. Антонова ИИ, Петров СБ. Экспрессия маркеров апоптоза и пролиферации в динамике прогрессирования рака яичников. *Патол физиол и эксп терапия* 2008; (4): 6–7.
5. Blok R, Blok K, Jelen M, Grybos H. Analysis of prognostic factors for the extent of vascularity of serous ovarian cancer on the basis of CD34 antigen expression. *Ginecol Pol* 2004; **75** (2): 91–8.
6. Eliassen A, Hankinson S. Endogenous hormone levels and risk of breast, endometrial and ovarian cancers: prospective studies. *Adv Exp Med Biol* 2008; **630**: 148–65.
7. Cho EY, Choi YL, Chae SW, et al. Relationship between p53-associated proteins and estrogen receptor status in ovarian serous neoplasms. *Int J Gynecol Cancer* 2006; **16**: 1000–6.
8. Новичков Е, Новичков ЕВ, Вотинцев АА. Зависимость прогноза рака яичников от экспрессии рецепторов к половым гормонам и пролиферативной активности опухолевых клеток. *Арх Патол* 2006; **2**: 10–13.

9. Эллиниди ВН, Аникеева НВ, Максимова НА. Практическая иммуноцитохимия (методические рекомендации). Санкт-Петербург: ВЦЭРМ МЧС Росзип, 2002. 36 с.

10. Weidner N, Semple JP, Welch WR. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; **324**: 1–8.

11. Лапач СН, Губенко АВ, Бабич ПН. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. Киев: МОРИОН, 2001. 320 с.

USAGE OF BIOMOLECULAR MARKERS FOR THE PREDICTIVE ESTIMATION OF INDIVIDUAL SURVIVAL PROGNOSIS OF PATIENTS WITH OVARIAN CARCINOMA

L.G. Buchynska, V.M. Grinkevych, V.S. Svintsisky, O.V. Romanenko

Summary. Background and aim: despite the multifaceted research of ovarian carcinoma (OC), including molecular phenotype of tumor cells (TC), so far there are no clear criteria by which to predict individual survival of patients with OC. **Objective** — examine the expression of Ki-67, p53, steroid hormone receptors in TC and neoangiogenesis characteristics in patients with serous OC and identify opportunities to use them to evaluate the survival of individual patients. **Object and methods:** the study involved 82 patients with serous OC I–IV stage. In operating material according to immunohistochemical method monoclonal antibodies the expression of Ki-67, p53, estrogen and progesterone receptor, CD34 were determined. The microvessels density (per 1 mm² tumor) was calculated. Survival of patients were analyzed by Kaplan — Mayer; predictive value of each of the indicators evaluated using multivariate analysis (Cox proportional risk model, χ^2 -test). **Results:** identified high individual variability in expression of Ki-67, p53, estrogen and progesterone receptors in TC and microvessel density in tumors of one histological type — serous OC. Comparison of expression of the studied markers with 5-year overall survival rate of patients indicates that they are significant factors in the last. **Conclusion:** the investigated markers are of prognostic significance, based on these results the method of determining of individual forecasts 5-year survival of patients with serous OC is proposed.

Key words: ovarian carcinoma, immunohistochemical analyses, biomolecular markers, individual survival prognosis.

Адреса для листування:

Бучинська Л.Г.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології НАН України
E-mail: laboncogen@yandex.ua