

І.П. Несіна  
 О.В. Романенко  
 В.М. Грінкевич  
 Н.П. Юрченко  
 В.С. Свінцицький  
 Л.Г. Бучинська

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

**Ключові слова:** рак яєчника,  
 ступінь диференціювання,  
 Ki-67, p53, CD34, рецептори  
 естрогенів, щільність  
 мікросудин.

## ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ЩІЛЬНОСТІ МІКРОСУДИН У СЕРОЗНИХ АДЕНОКАРЦИНОМАХ ЯЄЧНИКА

**Резюме.** Проведене дослідження показало значну гетерогенність щільності мікросудин (ЩМС) в серозних аденокарциномах яєчника, яка була найбільш виражена в низькодиференційованих пухлинах. Встановлено, що у хворих, термін життя яких складав менше 5 років, ЩМС у пухлинах та експресія білка p53 були достовірно вищими, а експресія рецепторів естрогенів (PE) — достовірно нижчою, порівняно з такими у хворих, що були живі після операції 5 років і більше. Визначено, що утворення віддалених метастазів у аденокарциномах яєчника відбувається на фоні низького рівня експресії PE. Отримані дані свідчать, що для оцінки перебігу серозного раку яєчника перспективним є визначення ЩМС, експресії p53 та PE в якості прогностичних маркерів пухлинного процесу.

### ВСТУП

Загальновідомо, що ангіогенез, який відбувається завдяки здатності ендотеліальних клітин до самовідтворення та міграції, є одним з процесів, що визначають потенцію пухлини до прогресії та метастазування [1]. Проте судиноутворення у пухлинах має патологічні ознаки: судини набувають підвищеного розгалуження і проникності. Так, було показано, що для злоякісних серозних пухлин яєчника характерним є рясне, хаотичне розташування кровоносних судин, відзначають капілярноподібні судини та судини, що нагадують посткапілярні венули. Стінка таких судин потоншена, базальна мембрана переривчаста, більша частина мікросудин синусоїдного типу з різко вираженим повнокров'ям [2].

Активаторами ангіогенезу є різноманітні цитокіни, у тому числі ростові фактори-мітогени, які продукуються або індуються пухлинними клітинами. Фактор росту ендотеліальних клітин (VEGF) є глікопротеїном, який посідає особливе місце у ангіогенезі. Він стимулює проліферацію ендотеліальних клітин, значно посилює проникність утворених судин, що сприяє дисемінації пухлинних клітин. Зокрема, з проникністю судин пов'язують локальну екстравазацію, яка спостерігається при деяких пухлинах, у тому числі при раку яєчника (РЯ) [3].

До негативних регуляторів ангіогенезу належать такі фактори, як ангіостатин, гепариназа, інтерферони ( $\alpha$  і  $\beta$ ), тромбоспондини (1 і 2), інгібітор металопротеїнази та ін. [4]. Слід зазначити, що процеси судиноутворення контролюються рядом білків, які є продуктами деяких протоонкогенів і генів-супресорів. Серед останніх значну роль відіграє ген TP53. Білок p53 «дикого» типу інгібує експресію VEGF і одночасно активує інгібітори ангіогенезу — тромбоспондини. Неактивовані форми білка p53, які виникають у результаті мутаційних змін гена TP53 або інгібуючого впливу білків-модуляторів його активності, втрачають здатність контролювати ангіоге-

нез. Додатковими чинниками, що впливають на цей процес, є активація онкогенів родини MYC (інгібітори тромбоспондинів) та родини RAS (активатори транскрипційного комплексу AP-1, ряду металопротеїнази і транскрипційного фактору Ets1) [5]. Суттєве значення в регуляції активності білка VEGF відіграє ген BRCA1, білок якого є інгібітором експресії гена VEGF. Причому посередниками між білком BRCA1 і геном VEGF виступають рецептори естрогену альфа (PE- $\alpha$ ), з якими з'єднується BRCA1. Тобто регуляція транскрипції і експресії VEGF залежить як від активності білка BRCA1, так і білка PE- $\alpha$  [6].

Згідно з даними літератури у процесах метастазування та виникнення рецидивів РЯ ангіогенез відіграє суттєву роль. Проте не існує однозначної думки щодо прогностичного значення неоваскуляризації при цій патології. Так, у дослідженнях Hallingsworth et al. [7] було визначено, що щільність мікросудин (ЩМС) при серозних аденокарциномах яєчника є вагомим прогностичним показником як загальної виживаності, так і безрецидивного перебігу хвороби. Іншими авторами не було виявлено зазначених закономірностей при цій патології [8].

Сьогодні одним із підходів до аналізу активності ангіогенезу в тканинах є визначення рівня експресії генів родини VEGF або їх рецепторів та оцінка ЩМС.

Враховуючи сказане вище, мета дослідження полягала у зіставленні ЩМС, експресії молекулярно-біологічних маркерів проліферації Ki-67, p53 і рецепторів естрогенів (PE) у злоякісних новоутвореннях з клініко-морфологічними характеристиками перебігу пухлинного процесу у хворих на РЯ.

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Робота виконана на операційному матеріалі 81 хворої на РЯ віком від 39 до 79 років (середній вік —  $46,6 \pm 2,4$  року), які не отримували передопераційної терапії. Усі пацієнтки знаходилися на лі-

куванні у відділенні онкогінекології Інституту онкології АМН України (зав. відділенням — д.м.н., проф. Л.І. Воробйова) у період із 1988 по 2007 р. У 16 хворих на РЯ були виявлені віддалені метастази, у 47 хворих — поодинокі метастази у регіонарних лімфовузлах, а у 18 хворих метастазів не виявлено. Термін життя 18 хворих на РЯ не перевищував 5 років, 22 хворі були живі протягом 5 років і більше (до 17 років).

Заключний морфологічний діагноз встановлювали на гістологічних препаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином. Імуногістохімічне виявлення експресії біомаркерів в пухлинах яєчника здійснювали на депарафінованих зрізах, згідно з рекомендаціями Елініді та співавторів [9], з використанням первинних моноклональних антитіл (МкАТ): Ki-67, клон MIB-1; p53, клон DO-7, PE, клон 1D5; CD34, клон QVEnd10 та системи візуалізації EnVision. Забарвлення білка здійснювали за допомогою хромогена — 3-діамінобензидину тетрахлориду (ДАБ). У роботі використані МкАТ, системи візуалізації і ДАБ («DakoCytomation», Данія). Ядра клітин дофарбовували гематоксиліном Майєра.

Результати імуногістохімічної реакції оцінювали напівкількісним методом, шляхом підрахунку кількості позитивно забарвлених клітин — індекс мітки (ІМ) для білків p53 і PE та індекс проліферації (ІП) для білка Ki-67. Експресію маркерів визначали у 600–1000 пухлинних клітинах. Для з'ясування щільності судин у пухлинах яєчника підраховували кількість судин у 10 полях зору мікроскопу (розмір одного поля зору обмежувався вимірною квадратною сіткою із стороною 0,79 мм) з наступним визначенням їх числа на 1 мм<sup>2</sup> за формулою: ЩМС =  $n \cdot 1 \text{ мм}^2 : 0,625 \text{ мм}^2$ , де  $n$  — середня кількість судин на одне поле зору;  $0,625 \text{ мм}^2$  — площа одного поля зору. При виконанні роботи враховували наступні клініко-морфологічні характеристики: стадія захворювання за класифікацією FIGO (I–IV), термін виживаності хворих після операції, особливості терапії (схеми і кількість курсів поліхіміотерапії — ПХТ) та патогістологічний діагноз. Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою пакету програм Microsoft Excel. Для перевірки гіпотези рівності середніх значень двох вибірок використовували непараметричний критерій Вілкоксона — Манна — Уїтні (критерій U). Достовірними вважали відмінності при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При морфологічному аналізі новоутворень яєчника встановлено, що усі пухлини були серозними аденокарциномами різного ступеня диференціювання: 10 — високо-, 34 — помірно- та 37 — низько-диференційовані (відповідно ВДА, ПДА та НДА).

Результати імуногістохімічного дослідження показали, що експресію трансмембранного білка міжклітинної адгезії — CD-34 відзначали в усіх пухлинах яєчника. Виявлено значну гетерогенність васкуляризації цих новоутворень як у пухлинах різних

хворих, яка залежала від ступеня диференціювання пухлин і була найбільше виражена у НДА яєчника, так і у межах однієї пухлини. Значення ЩМС коливалися від 10 до 128 судин на 1 мм<sup>2</sup>, що в середньому склало  $63,6 \pm 2,9$ . Позитивну експресію білків Ki-67, p53 та PE відзначено у більшості аденокарцином яєчника (відповідно у 71,5; 88,2 та 73,8%). Середня кількість клітин з експресією білків Ki-67, p53 та PE складала відповідно  $20,4 \pm 0,2\%$ ;  $28,5 \pm 0,2\%$  та  $29,3 \pm 0,2\%$ .

При аналізі прогностичного значення ЩМС у пухлинах хворих на РЯ з'ясувалося, що у групі хворих, термін життя яких складав < 5 років, щільність судин у пухлинах була достовірно ( $p < 0,05$ ) вищою (на 15 судин на 1 мм<sup>2</sup>), порівняно з такою у хворих, що були живі після операції 5 років і більше (табл. 1). При цьому в останніх достовірно вищою (на 7,1%) була експресія PE і нижчою (на 6,6%) експресія білка p53.

Таблиця 1

Експресія білків p53, PE і ЩМС у пухлинах хворих на серозний РЯ в залежності від термінів життя

Перебіг хвороби	Досліджені показники		
	p53, ІМ, %	PE, ІМ, %	ЩМС, кількість судин на 1 мм <sup>2</sup>
Живі 5 років і більше	$24,9 \pm 0,6$	$32,2 \pm 0,4$	$47,6 \pm 3,7$
Померли до 5 років	$31,5 \pm 0,7$	$25,1 \pm 0,5$	$62,6 \pm 5,1$

На думку деяких дослідників, активація ангіогенезу у новоутвореннях яєчника супроводжується підвищеною здатністю пухлини до інвазії [10]. Тому низьку ЩМС у епітеліальних злоякісних пухлинах яєчника автори пов'язують з кращою 5-річною виживаністю хворих з I та II і навіть III та IV стадіями і вважають, що ступінь неоваскуляризації пухлин може мати прогностичне значення для хворих на РЯ [11, 12].

Крім цього, нами було проаналізовано ЩМС і експресію білків p53 та PE у серозних пухлинах яєчника в залежності від наявності у хворих на рак метастазів. Проведений аналіз показав відсутність достовірної різниці ЩМС у хворих без метастазів, порівняно з відповідними показниками у пацієнток з віддаленими метастазами, з вираженою тенденцією до збільшення цього показника у хворих з метастазами. Натомість, рівень експресії білків p53 та PE в пухлинах хворих з метастазами був достовірно нижчий ( $p < 0,05$ ) за рівень експресії цих білків у пухлинах хворих без метастазів. При цьому звертають на себе увагу значні відмінності у рівні експресії саме PE в залежності від наявності у хворих віддалених метастазів (табл. 2).

Таблиця 2

ЩМС та експресія білків p53 та PE у пухлинах хворих на РЯ без метастазів та з віддаленими метастазами

Наявність метастазів	Досліджені показники		
	ЩМС, кількість судин на 1 мм <sup>2</sup>	p53, ІМ, %	PE, ІМ, %
Метастази відсутні	$55,5 \pm 5,7$	$30,5 \pm 0,6$	$32,2 \pm 0,4$
Віддалені метастази	$62,8 \pm 6,4$	$27,9 \pm 0,7$	$25,1 \pm 0,5$

Як видно з представлених даних, наявність віддалених метастазів у хворих на серозний РЯ асоцію-

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ється з підвищенням ЩМС та зниженням експресії РЕ. Про наявність такої залежності говорять і інші автори [6], які вважають, що активація ангиогенезу у пухлинах молочної залози виникає завдяки підвищенню експресії гена *VEGF*, який у свою чергу знаходиться під контролем білка *BRCA1*, і відбувається за участю РЕ- $\alpha$ . Оскільки мутації гена *BRCA1* є частою подією при РЯ, логічно припустити, що активація ангиогенезу у досліджених пухлинах яєчника може бути наслідком інактивації білка *BRCA1* і зниженням рівня експресії РЕ.

Оскільки, згідно з даними літератури, виживаність хворих на рак різного генезу у більшості випадків обумовлена ступенем диференціювання пухлин, нами був зроблений порівняльний аналіз рівня ЩМС у серозних аденокарциномах яєчника різного ступеня диференціювання. Проведене зіставлення показало, що при ВДА та ПДА яєчника щільність судин була майже однаковою, а при НДА спостерігалася виражена тенденція до підвищення ЩМС, яка, однак, завдяки значній варіабельності цього показника була недостовірною (табл. 3).

**Таблиця 3**  
ЩМС і експресії білків Ki-67, p53 та PE у серозних новоутвореннях яєчника різного ступеня диференціювання

Ступінь диференціювання пухлин	Досліджені показники			
	ЩМС, кількість судин на 1 мм <sup>2</sup>	ІП Ki-67, %	ІМ p53, %	ІМ PE, %
ВДА	59,8 ± 5,5	15,1 ± 0,5	24,3 ± 0,6	51,6 ± 0,7
ПДА	58,1 ± 4,1	20,4 ± 0,3	26,7 ± 0,3	31,8 ± 0,3
НДА	69,1 ± 4,4	21,5 ± 0,3	32,5 ± 0,3	21,6 ± 0,3

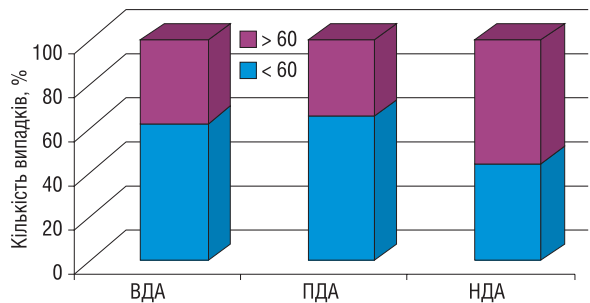
Проліферативний потенціал епітеліальних пухлин яєчника, оцінений за кількістю клітин експресуючих Ki-67, достовірно ( $p < 0,001$ ) збільшувався при ПДА та НДА яєчника, відповідно на 5,3 та 6,4%, порівняно з таким при ВДА. Одночасно з останнім спостерігалось достовірне ( $p < 0,05$ ) збільшення експресії білка p53 у НДА яєчника, порівняно з таким у ВДА та ПДА відповідно на 8,2 та 5,8%. На відміну від цього, спрямованість змін експресії РЕ була протилежною, а саме достовірно ( $p < 0,05$ ) зменшувалася, при зниженні ступеня диференціювання пухлин на 19,8 та 30,0% (відповідно для ПДА та НДА порівняно з показниками у ВДА). Як видно з представлених середніх даних, високу ЩМС у серозних пухлинах яєчника виявляли при високих значеннях експресії білка p53 та низьких РЕ і вона не корелювала з проліферативним потенціалом пухлин.

При аналізі клінічних особливостей у хворих на РЯ було визначено, що у пацієток з віддаленими метастазами переважали НДА яєчника (у 81,2% пухлин), а у жінок без метастазів — ВДА та ПДА (у 60,1% пухлин). У групі хворих, які померли у перші 5 років після операції, високодиференційованих пухлин не виявляли.

Для більш детальної оцінки взаємозв'язку між експресією досліджених біомолекулярних маркерів нами було використано статистичний метод оцінки медіан (Me). Так, було визначено, що для білків p53 та РЕ медіанне значення ІМ дорівнювало

30,0%, а для показника ЩМС медіанне значення кількості судин на 1 мм<sup>2</sup> становило 60. Враховуючи значення медіан, нами були використані наступні критерії оцінки ступеня експресії досліджених біомаркерів: для білків p53 та РЕ ІМ  $< 30,0\%$  вважали низькою експресією, а ІМ  $\geq 30,0\%$  — високою. ЩМС  $< 60$  судин на 1 мм<sup>2</sup> вважали низькою, а ЩМС  $\geq 60$  — високою. Оцінку проліферативного потенціалу проводили за іншими критеріями відповідно до рекомендацій літератури і згідно з результатами наших попередніх досліджень [13]. При значеннях ІП  $< 10,0\%$  експресію білка Ki-67 вважали низькою, а при ІП  $\geq 10,0\%$  — високою.

Згідно з розробленими критеріями кількість пухлин з високою і низькою ЩМС змінювалася в залежності від ступеня їх диференціювання. Так, у групі хворих на ВДА яєчника тільки 37,5% пухлин мали високу ЩМС, а у хворих з НДА яєчника кількість випадків з високою ЩМС збільшувалася до 55,9% (рисунок).



**Рисунок.** Кількість пухлин з високою і низькою ЩМС у хворих на серозний РЯ різного ступеня диференціювання

У той же час у хворих з патогістологічним діагнозом ВДА яєчника переважна кількість пухлин мала низький індекс проліферації та високий рівень експресії РЕ. При цьому кількість пухлин з низькою і високою експресією білка p53 була майже однаковою. У хворих з НДА яєчника переважали високопроліферуючі пухлини з високою експресією білка p53 і низькою або відсутньою експресією РЕ (табл. 4).

**Таблиця 4**  
Кількість пухлин з високою і низькою експресією білків Ki-67, p53 та PE у хворих на серозний РЯ різного ступеня диференціювання

Досліджені молекулярно-біологічні маркери	Ступінь експресії маркера	Кількість пухлин, %		
		ВДА	ПДА	НДА
Ki-67	ІП = 0	20,0	36,7	24,3
	ІП $< 10,0\%$	40,0	6,6	16,2
	ІП $\geq 10,0\%$	40,0	56,7	59,5
p53	ІМ = 0	—	20,0	8,3
	ІМ $< 30\%$	50,0	43,3	38,9
	ІМ $\geq 30\%$	50,0	36,7	52,8
PE	ІМ = 0	—	17,6	40,6
	ІМ $< 30\%$	11,1	26,5	21,6
	ІМ $\geq 30\%$	88,9	55,9	37,8

Судячи з отриманих даних, можна говорити, що у більшості вивчених пухлин яєчника білок p53 не впливав на процеси проліферації і ангиогенезу, що може бути пов'язано з підвищенням зміненої форми білка p53 у пухлинах яєчника, яка знижує його інгібуючий вплив на вищезгадані процеси. Більше того, згідно з результатами інших дослідників [14],

стимуляція неоваскуляризації у пухлинах яєчника може підвищуватись в умовах гіпоксії, незалежно від стану гена *TP53*, а за рахунок активації фактора *HIF-1 $\alpha$* . На відміну від цього, наявність оберненої залежності між ЩМС та експресією *PE* у НДА яєчника, напевно, свідчить про залежність судиноутворення в цих пухлинах від експресії *PE*.

Виходячи з результатів дослідження, можна говорити про існування зв'язку між ступенем неоваскуляризації серозних аденокарцином яєчника та ступенем їх диференціювання, оскільки кількість пухлин з високим рівнем ЩМС у групі хворих з НДА була майже у 1,5 раза вище ніж у хворих з ВДА та ПДА яєчника, і у НДА виявлено тенденцію до підвищення кількості судин на 1 мм<sup>2</sup>. Ці дані дещо суперечать результатам інших дослідників, які показали, що високо- та помірnodиференційовані сосочкові цистаденокарциноми яєчника більш васкуляризовані, ніж низькодиференційовані пухлини [2].

Таким чином, проведене дослідження показало, що у серозних аденокарциномах яєчника спостерігається значна гетерогенність ЩМС, яка найбільш виражена в низькодиференційованих пухлинах. Визначено, що поява віддалених метастазів у аденокарциномах яєчника асоціюється з низьким рівнем експресії *PE* і незначним підвищенням ЩМС. Встановлено, що у хворих, термін життя яких склав < 5 років, ЩМС у пухлинах та експресія білка *p53* були достовірно вищими, а експресія *PE* — достовірно нижчою, порівняно з такими у пухлинах хворих, що були живі після операції 5 років і більше. Отримані дані свідчать, що для оцінки перебігу серозного раку яєчника перспективним є визначення ЩМС, експресії *p53* та *PE* в якості прогностичних маркерів пухлинного процесу.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Амчиславский ЕИ, Соколов ДИ, Сельков СА, Фрейдлин ИС. Пролиферативная активность эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 и ее модуляция. Цитология 2005; 47 (5): 393–402.
2. Михалева ЛМ, Мороз ЕА, Бархина ТГ и др. Морфофункциональная характеристика кровеносных сосудов микроциркуляторного русла в серозных опухолях яичников. Арх патол 2005; (6): 28–31.
3. Ровенский ЮА. Клеточные и молекулярные механизмы опухолевой инвазии. Биохим 1998; 63 (9): 1204–21.
4. Черноглазова ЕВ, Дбар ЖН, Степанова ЕВ. Молекулярные механизмы опухолевого неоваскуляризации. Успехи соврем биол 2004; 124 (5): 480–8.
5. Копнин БП. Опухолевые супрессоры и мутаторные гены. В кн: Канцерогенез. Под ред ДГ Заридзе. Москва: Медицина, 2004. 575 с.
6. Kawai H, Li H, Chun Ph, et al. Direct interaction between BRCA1 and the estrogen receptor regulates vascular endothelial

growth factor (VEGF) transcription and secretion in breast cancer cells. Oncogene 2002; 21: 7730–9.

7. Hallingsworth HC, Kohan EC, Sterinberg SM, et al. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. Am J Pathol 1995; 147: 33–41.

8. Nakayama K, Kanzaki A, Takebayashi Y, et al. Different features of angiogenesis between ovarian and breast carcinoma. Cancer Lett 2001; 170: 161–7.

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

10. Abulafia O, Ruizi JE, Holcomb K, et al. Angiogenesis in early-invasive low-malignant-potential epithelial ovarian carcinoma. Obstet Gynecol 2000; 95: 548–52.

11. Alvarez AA, Krigman HR, Whicker RS, et al. The prognostic significance of angiogenesis in epithelial ovarian cancer. Clin Cancer Res 1999; 5: 587–91.

12. Bamberger ES, Perrett CW. Angiogenesis in epithelial ovarian cancer. J Clin Pathol 2002; 55: 348–59.

13. Buchynska LG, Nesina IP, Yurchenko NP, et al. Expression of p53, p21<sup>waf1/cip1</sup>, p16<sup>ink4a</sup> and Ki-67 proteins in serous ovarian tumours. Exp Oncol 2007; 29 (1): 49–53.

14. Horiuchi A, Imai T, Shimizu M, et al. Hypoxia-induced changes in the expression of VEGF, HIF-1 alpha and cell cycle-related molecules in ovarian cancer cells. Anticancer Res 2002; 22 (5): 2697–702.

## THE PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF MICROVESSEL DENSITY FOR SEROUS OVARIAN CANCER PATIENTS

I.P. Nesina, O.V. Romanenko, V.M. Grinkevych, N.P. Yurchenko, V.S. Svintsitskiy, L.G. Buchynska

**Summary.** Current study has demonstrated that microvessel density (MVD) in ovarian serous carcinomas was very heterogeneous, especially in G3 adenocarcinomas. Patients who lived less than 5 years were shown to have significantly increased MVD and p53 expression and decreased estrogen receptors (ER) expression compared to those who lived longer after the operation. It has also been established that metastases occur on the background of high ER expression. The obtained data prove that the study of MVD, p53 and ER expression in serous ovarian cancer is very perspective and can be used as prognostic markers of this disease course.

**Key Words:** ovarian cancer, tumor grade, Ki-67, p53, CD34, estrogen receptors, microvessel density.

### Адреса для листування:

Несіна І.П.  
03022, Київ, вул. Васильківська, 45  
Інститут експериментальної патології,  
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького  
НАН України