

**І.С.Шпонька
В.О.Бондарєва
В.І.Шпонька**

Дніпропетровська державна медична академія

Ключові слова: молочна залоза, злоякісні пухлини епітеліального походження, імуногістохімічні маркери, прогноз.

Надійшла: 23.06.2009

Прийнята: 03.08.2009

УДК 618.19-006.66:57.086.12:57.086.14

ІМУНОГІСТОХІМІЧНИЙ ПРОФІЛЬ В ОЦІНЦІ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ТА ПРОГНОЗУ ПЕРЕБІГУ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Дослідження проведено у рамках науково-дослідної роботи „Індивідуалізація лікування злоякісних пухлин з урахуванням біологічних показників активності пухлинного процесу та маркерів хіміогормонорезистентності” (№ державної реєстрації 0101U001002).

Резюме. Прогностичне значення маркерів біологічних властивостей раку молочної залози, їх вікові та взаємні кореляції є остаточно не визначеними. Метою нашого дослідження було встановлення залежності експресії прогностичних маркерів (ER, PgR, HER-2/neu, pS2, p53, VEGF, Ki-67, bcl-2) від віку та наявності метастазів при раку молочної залози у жінок, встановлення кореляційних зв'язків у групах з метастазами та без метастазів. За даними статистичного аналізу (критерій χ^2), всі використані маркери можуть бути застосовані з високим ступенем вірогідності як прогностичні щодо ризику розвитку метастазів у хворих різного віку. Виняток склали маркери ER та PgR в віковій групі до 35 років, ER – у віковій групі 35-50 років. Лише для маркерів ER та PgR характерним було збільшення рівня експресії з віком: для експресії ER різниця була достовірною у групах 35-50 та старше 50 років, у групах до 35 років та після 50 років; для PgR – між групами 35-50 років та старше 50 років. Маркери p53 та Ki67 виявилися такими, експресія яких достовірно відрізняється у групах з наявністю метастазів незалежно від віку. Вони є найбільш надійними як прогностичні для групи до 35 років. Були виявлені кореляційні зв'язки між експресією маркерів, що є залежними від віку та/або метастазування.

Морфологія. – 2009. – Т. III, № 3. – С. 154-162.

© І.С.Шпонька, В.О.Бондарєва, В.І.Шпонька, 2009

Shponka I.S., Bondareva V.A., Shponka V.I. Immunohistochemical profile in estimation of biological properties and prognosis of breast cancer.

Summary. The prognostic value of markers of biological properties of breast cancer (BC), their age-dependent and mutual correlations are finally not determined. The purpose of our study was to determine the dependence of expression of prognostic markers (ER, PgR, HER-2/neu, pS2, p53, VEGF, Ki-67, bcl-2) on age and presence of metastases at BC in women, to find the cross-correlations in groups with and without metastases. From data of statistical analysis (criterion of χ^2), all of markers are thought to be used as prognostic of metastasis risk with the high level of reliability at patients of different age. The exceptions were ER and PgR in group before 35 years, ER - in group 35-50 years. Only for the ER and PgR an increase of expression with age was observed: for expression of ER a difference was reliable in groups 35-50 and above 50 years, in groups before 35 years and after 50 years; for PgR - between groups 35-50 years and above 50 years. The expression of markers of p53 and Ki-67 showed the reliable difference in groups with the presence of metastases, regardless of age. The last are most reliable as prognostic for the group before 35 years. Cross-correlations between expression of markers which depended on age and/or metastasis were determined.

Key words: mammary gland, malignant tumors of epithelial origin, immunohistochemical markers, prognosis.

Вступ

Рак молочної залози (PMЗ) посідає провідне місце в структурі онкологічної захворюваності жінок (його поширеність серед пухлинних захворювань становить у середньому 26%), а частота його неухильно зростає та має тенденцію до омолодження. В останні роки значна увага приділяється молекулярним та клітинним маркерам, що характеризують фундаментальні біологічні властивості пухлини. Крім виявлення рецепторів до естрогену й прогестерону (El Saghier N.S. et al.

2006; Bal W. et al., 2008), що визначає прогноз та чутливість пухлин МЗ до антигормональної терапії (Offersen B.V. et al., 2008), гормон-залежного протеїну pS2 (Ioakim-Liossi A. et al., 1997), важливим є встановлення інших властивостей пухлини: визначення факторів пухлинного росту й прогресії – епідермального фактору росту (Offersen B.V. et al., 2008), фактору росту ендотелію судин (VEGF), факторів, що регулюють запрограмовану загибель клітин: апоптотичного маркеру p53 (Bartley A. N., Ross D. W., 2002) та

антиапоптоичного протеїну bcl-2 (Ioachim E.E. et al., 2000); маркеру проліферативного потенціалу пухлини Ki-67 (Gerson R. et al., 2005). Дискутабельним залишається питання про вікові кореляції між експресією маркерів та взаємодії між маркерами росту та генетичної нестабільності пухлини, ростовими факторами та ангіогенним або інвазивним потенціалом пухлини (Jang J.E. et al., 1999; Eppenberger-Castori S. et al., 2002; Al-Harris E.S., 2008).

Метою дослідження було встановлення залежності експресії прогностичних маркерів від віку та наявності метастазів при РМЗ у жінок, встановлення кореляційних зв'язків у групах з метастазами та без метастазів.

Матеріали та методи

У дослідженні було проведено аналіз клініко-анатомічного матеріалу 1305 випадків РМЗ у жінок різного віку. Хворі знаходилися на лікуванні в онкодиспансерах Дніпропетровської області. Для проведення морфологічного дослідження використовували парафінові блоки операційного та біопсійного матеріалу. Після проведення ретельного рутинного патогістологічного дослідження зрізи товщиною 4-6 мкм наносили на спеціальні адгезивні предметні стекла SuperFrost Plus, потім депарафінізували відповідно до прийнятих стандартів. Після депарафінізації для відновлення антигенних властивостей тканини проводили теплову індукцію епітопного (антигенного) звороту (HIER – heat induction of epitope retrieval) шляхом нагрівання в цитратному буфері з рН=6,0 в автоклаві (8 хвилин при температурі +121°C).

З метою встановлення експресії прогностичних імуногістохімічних (ІГХ) маркерів ми використовували спектр антитіл, який включав маркери p53 (клон DO-7 (DAKO), клон SP5 (LabVision)), маркеру проліферації Ki-67 (клон MIB-1 (DAKO), клон SP6 (LabVision)), bcl-2 (клон 124 (DAKO), клон 100/D5 (LabVision)), c-erbB-2/HER-2/neu (DAKO, клон SP3 (LabVision)),

рецепторів стероїдних гормонів: ER (клон 1D5 (DAKO), клон SP1 (LabVision)) та PgR (клон PgR 636 (DAKO), клон SP2 (LabVision)), VEGF – фактор росту ендотелію судин (клон VG1 (DAKO)), pS2-протеїн (клон BC04 (DAKO)). Інкубацію зрізів з первинними антитілами проводили у вологих камерах при температурі 23-25°C на протязі 30 хвилин. Титр антитіл підбирався індивідуально для кожного маркера. Наступний етап імуногістохімічного дослідження проводили з використанням систем візуалізації LSAB2, EnVision (DAKO) та UltraVision LP (LabVision), ідентифікація реакцій проводилась за допомогою хромогену DAB під контролем мікроскопа протягом від 20 секунд до 3 хвилин. Для диференціювання структур тканин зрізи додатково забарвлювали гематоксилином Майєра.

Для оцінки різниці в експресії маркерів між підгрупами з метастазами та без метастазів у кожній віковій групі та різниці між віковими групами був використаний непараметричний критерій χ^2 (хі-квадрат), що є опцією програми Excel. Для виявлення залежності від віку порівнювали між собою загальний розподіл за інтенсивністю експресії певного маркера (без урахування наявності метастазів) між групою менше 35 років та групою 35-50 років, групою менше 35 років та старше 50 років, а також між групами 35-50 років та старше 50 років. Для розрахунку сили та напрямку корелятивного зв'язку між експресією маркерів використали тетрагоричний показник зв'язку (Плохинський М.О., 1970), який рекомендований для оцінки альтернативної різноманітності.

Результати та їх обговорення

В групі пацієнток віком до 35 років ми спостерігали наявність метастазів у 47,0% випадків. В групі хворих середнього віку при РМЗ виявлялася менша відносна доля випадків з метастазуванням (33,4%). Частота виявлення метастазів в старшій віковій групі складала 40,5% (табл. 1).

Таблиця 1
Розподіл хворих на РМЗ за віком та наявністю метастазів у залежності від ступеня експресії ER

Вікові групи, років	Метастази відсутні				Метастази наявні			
	Інтенсивність ІГХ реакції				Інтенсивність ІГХ реакції			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
< 35 (n=51)	11	5	4	5	14	2	5	5
	11	14			14	12		
	25				26			
35-50 (n=410)	112	36	59	66	52	28	35	22
	112	161			52	85		
	273				137			
> 50 (n=844)	126	71	84	221	86	60	89	107
	126	376			86	256		
	502				342			

Серед усіх досліджених зразків РМЗ ми виявили ER+ пухлини (рис.1) у 69,3% випадків. В групі пацієнок віком до 35 років ER+ пухлини зустрічалися у 51,0% випадків. Статистичний аналіз показав, що ER+ пухлини у молодшій віковій групі виявлялися незалежно від наявності метастазів. В групі жінок середнього віку ми спостерігали більш високий відсоток (60,0%) ER+ пухлин, порівняно до молодшої групи. ER негативні пухлини (рис. 2) склали 41% у групі з відсутніми метастазами (Mts-) та 37,9% – у групі з їх наявністю (Mts+). Це вказувало на незалежність метастазування від наявності або відсутності експресії рецепторів до естрогенів в цій віковій групі, що підтвердилось статистичним аналізом. У віковій групі старше 50 років ми визначили максимальну долю пухлин з ER позитивним статусом (74,8%). Лише в цій віковій групі відмінності у рівні експресії рецептора до естрогену між випадками метастатичного та безметастатичного перебігу РМЗ були статистично достовірними ($p < 0,001$). Взагалі, з'ясувалося, що в групах середнього та старшого віку при наявності ER+ пухлин існує закономірність щодо більш високого рівня експресії ER незалежно від наявності метастазів. За рівнем експресії ER+ пухлин не було статистично достовірної різниці між групами до 35 років та 35-50 років, але при порівнянні груп 35-50 та старше 50 років, до 35 років та після 50 років різниця була достовірною ($p < 0,001$ та $p < 0,01$ відповідно).

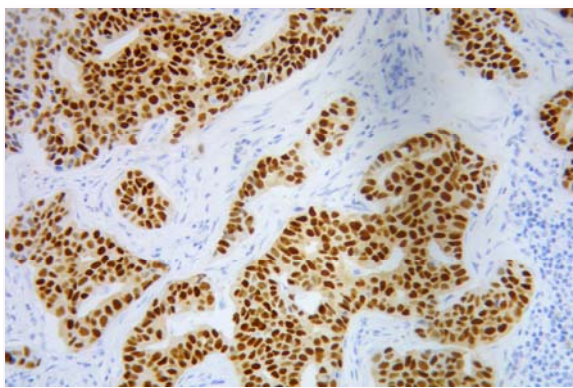


Рис. 1. Інтенсивна інтрануклеарна ІГХ реакція з ER в операційному матеріалі РМЗ жінки 57 років. $\times 400$.

У дослідженій групі хворих на РМЗ загальна частка PgR+ пухлин (рис. 3) склала 57,2% (табл. 2). При аналізі інтенсивності експресії рецепторів до прогестерону у молодшій групі ми виявили, що PgR+ пухлини були у 43,1% хворих. В групі з метастазами частка PgR+ пухлин склала 34,6% випадків, у хворих без метастазів – 52,0%. В групі пацієнок середнього віку ми виявили 51,5% PgR+ пухлин. Такі пухлини склали 55,8% випадків у групі хворих без метастазів, та 43,1% у групі з метастазами. При порівнянні ро-

зподілу пухлин за ступенем експресії PgR у групах за ознакою наявності або відсутності метастазів, виявлялася істотно більша частка PgR+ пухлин у групах без метастазів ($p < 0,05$). Збільшення долі PgR+ пухлин до 60,3% виявилось в групі пацієнок старшого віку. Розподіл таких пухлин серед груп з метастазами та без них склав 56,1% та 63,1% відповідно. Різниця у розподілі пухлин з різним рівнем експресії PgR між віковими групами була статистично достовірною лише між групами 35-50 та старше 50 років ($p < 0,05$).

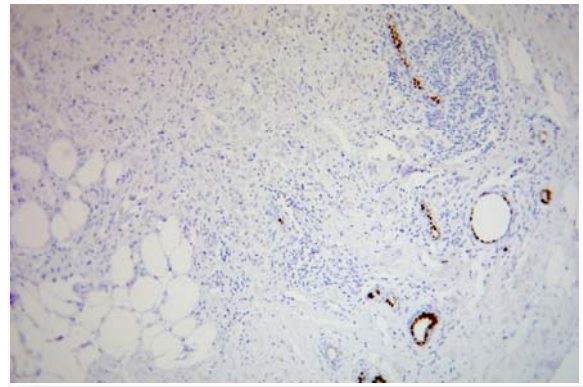


Рис. 2. Відсутність ІГХ реакції з ER в операційному матеріалі РМЗ жінки 40 років, внутрішній позитивний контроль – інтактні часточки МЗ. $\times 200$.

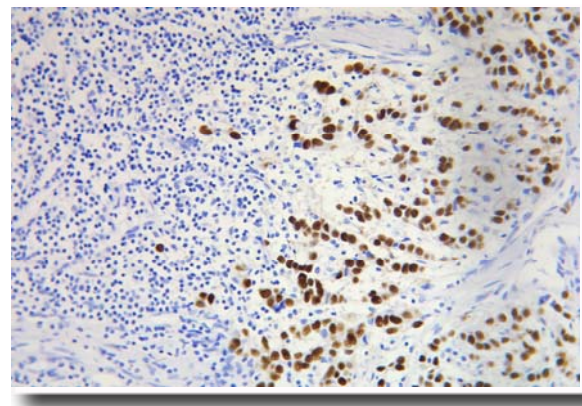


Рис. 3. Позитивна інтрануклеарна ІГХ реакція з PgR в метастазі РМЗ в лімфатичний вузол у жінки 52 років. $\times 400$.

Серед усіх досліджених зразків РМЗ частка HER-2/neu позитивних пухлин склала 24,4% (табл. 3). Ми спостерігали пухлини з максимальним рівнем (+++) експресії у 18,1% випадків.

В групі хворих до 35 років частка HER-2/neu позитивних пухлин (рис. 4) склала 31,4%. Частота випадків HER-2/neu позитивних пухлин у групі з метастазами була 42,3%, у групі без метастазів – 20,0% ($p > 0,05$). В групі хворих середнього віку пухлини, позитивні на цей маркер, склали 24,4%. В групі з метастазами HER-2/neu+ пухли-

ни склали 39,4%, у групі без метастазів – 16,8% (p<0,001). В групі хворих віком старше 50 років HER-2/neu позитивні пухлини склали 23,9%. Ми спостерігали у цій віковій групі пухлини з мак-

симальним рівнем експресії у 17,1% випадків. В групі з метастазами позитивні пухлини зустрічалися у 31,3% випадків, у групі хворих без метастазів – у 18,9% (p<0,001).

Таблиця 2
Розподіл хворих на РМЗ за віком та наявністю метастазів у залежності від ступеня експресії PgR

Вікові групи, років	Метастази відсутні				Метастази наявні			
	Інтенсивність ІГХ реакції				Інтенсивність ІГХ реакції			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
< 35 (n=51)	12	2	5	6	17	3	4	2
	12	13			17	9		
	25				26			
35-50 (n=410)	121	34	68	50	78	21	26	12
	121	152			78	59		
	273				137			
> 50 (n=844)	185	73	138	106	150	69	83	40
	185	317			150	192		
	502				342			

Таблиця 3
Розподіл хворих на РМЗ за віком та наявністю метастазів у залежності від ступеня експресії HER-2/neu

Вікові групи, років	Метастази відсутні				Метастази наявні			
	Інтенсивність ІГХ реакції				Інтенсивність ІГХ реакції			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
< 35 (n=51)	11	9	2	3	7	8	4	7
	11	10			7	11		
	25				26			
35-50 (n=410)	142	85	10	36	50	33	11	43
	142	46			50	54		
	273				137			
> 50 (n=844)	297	110	39	56	117	118	19	88
	297	95			117	107		
	502				342			

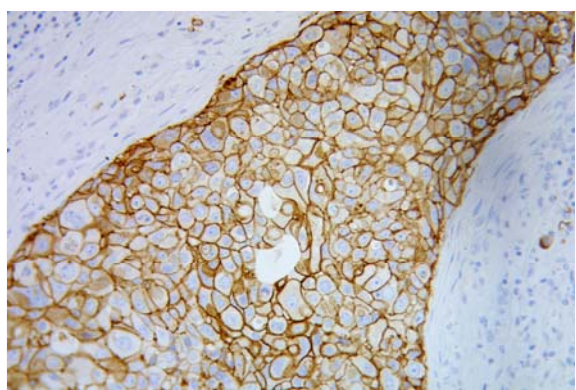


Рис. 4. Інтенсивна мембранна ІГХ реакція (3+) з erbB-2/HER-2/neu в матеріалі товстоголовкової біопсії РМЗ жінки 34 років (x400).

У наших дослідженнях VEGF-позитивними були 55,8% пухлин (табл. 4). У молодшій віковій

групі їх частка була найбільшою та складала 58,8%. У середній віковій групі такі пухлини спостерігалися у 55,1% випадків, у старшій – у 55,9%. У жінок віком до 35 років, VEGF+ пухлини склали 65,4% у групі з метастазами та 52,0% – у групі без метастазів (p>0,05).

В середній віковій групі VEGF+ пухлини зустрічалися у 59,9% випадків у групі з метастазами, та 52,7% – у групі без метастазів (p<0,01). У пацієнток віком понад 50 років пухлини, позитивні на фактор росту судинного ендотелію, виявлялися у 58,8% випадків з метастазами та у 54,0% випадків без метастазів (p<0,001).

Загальна частка p53+ пухлин (рис. 5) складала 26,3% (табл. 5). У молодшій віковій групі їх частка складала 33,3%, у середній – 28,0%, у старшій – 25,0%, що виявило тенденцію (статистично недостовірну) до більш агресивного перебігу РМЗ у молодому віці.

Таблиця 4

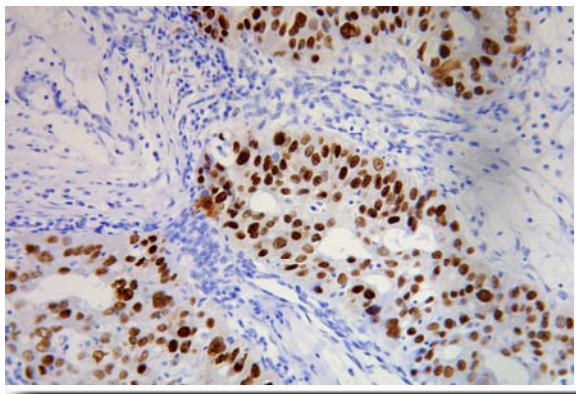
Розподіл хворих на РМЗ за віком та наявністю метастазів у залежності від ступеня експресії VEGF

Вікові групи, років	Метастази відсутні				Метастази наявні			
	Інтенсивність ІГХ реакції				Інтенсивність ІГХ реакції			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
< 35 (n=51)	6	6	9	4	3	6	9	8
	12		13		9		17	
	25				26			
35-50 (n=410)	73	56	95	49	16	39	46	36
	129		144		55		82	
	273				137			
> 50 (n=844)	155	76	175	96	54	87	125	76
	231		271		141		201	
	502				342			

Таблиця 5

Розподіл хворих на РМЗ за віком та наявністю метастазів у залежності від ступеня експресії p53

Вікові групи, років	Метастази відсутні		Метастази наявні	
	Інтенсивність ІГХ реакції		Інтенсивність ІГХ реакції	
	-	+	-	+
< 35 (n=51)	20	5	14	12
	25		26	
35-50 (n=410)	221	52	74	63
	273		137	
> 50 (n=844)	425	77	208	134
	502		342	

Рис. 5. Позитивна інтрануклеарна ІГХ реакція з p53 в операційному матеріалі РМЗ жінки 45 років. $\times 400$.

У хворих віком до 35 років p53+ пухлини склали 46,2% випадків у групі з метастазами та 20,0% – у групі без метастазів ($p < 0,05$). У пацієнток середнього віку з РМЗ p53+ пухлини зустрічалися у 46,0% випадків у групі з метастазами та 19,0% – у групі без метастазів ($p < 0,001$). У пацієнток віком понад 50 років p53+ пухлини спостерігалися у 39,2% випадків при метастатичному ускладненні РМЗ та 15,4% – у групі без метастазів ($p < 0,001$).

Загальна частка bcl-2+ пухлин складала 50,3% (табл. 6). У молодшій віковій групі вони склали 51,0% випадків, у середній – 51,2%, у старшій –

49,9%, що вказує на статистично підтверджену незалежність експресії цього маркера при РМЗ від віку.

У пацієнток віком до 35 років bcl-2+ пухлини (рис. 6) склали 46,2% випадків у групі з метастазами та 56,0% – у групі без метастазів ($p > 0,05$). У хворих середнього віку з РМЗ bcl-2+ пухлини зустрічалися у 42,3% випадків у групі з метастазами, в 55,7% – у групі без метастазів ($p < 0,05$). У пацієнток, віком понад 50 років, bcl-2+ пухлини спостерігалися у 44,2% випадків при метастазах, у групі без метастазів – у 53,8% ($p < 0,01$).

Загальна частка пухлин, де кількість Ki-67 позитивних клітин (рис. 7) була менша, ніж 10%, складала 20,4%, пухлин з 10-20% позитивних клітин – 31,0%, пухлин з кількістю Ki-67 позитивних клітин більшою, ніж 20% – 48,6% (табл. 7). У молодшій групі частка пухлин з максимальною кількістю Ki-67 позитивних клітин складала 36,0% у групі без метастазів та 73% – у групі з метастазами. Різниця в рівні експресії Ki-67 між групою з метастазами та без них була статистично достовірною ($p < 0,05$).

У хворих середнього віку спостерігалось 68,5% пухлин, що мали найвищий рівень проліферативної активності, в групі з метастазами. В групі без метастазів такі пухлини склали лише 38,0%. Різниця в рівні експресії цього маркера

між групою з метастазами та без них була статистично достовірною ($p < 0,001$). У старшій віковій групі пухлини з максимальним рівнем експресії Ki-67 склали 33,9% випадків у групі без метастазів та 69,9% – у групі з метастазами ($p < 0,001$).

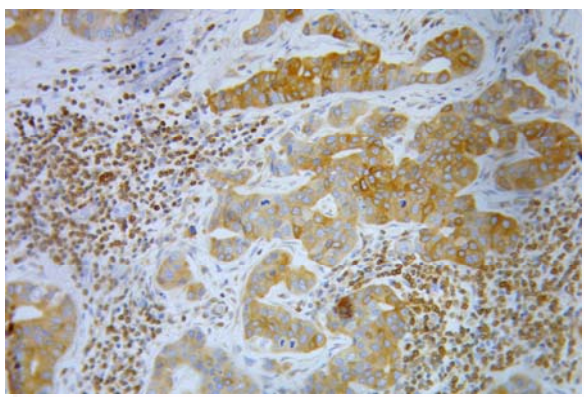


Рис. 6. Позитивна цитоплазматична ІГХ реакція з bcl-2 в операційному матеріалі РМЗ жінки 63 років. $\times 400$.

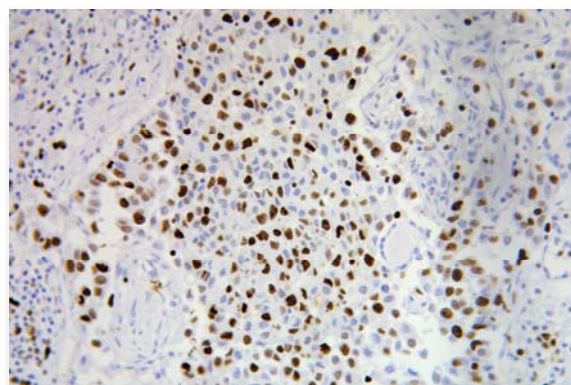


Рис. 7. Позитивна інтрануклеарна ІГХ реакція з Ki-67 в біопсійному матеріалі РМЗ жінки 39 років ($\times 400$). Частка позитивних клітин 47%.

У наших дослідженнях pS₂ позитивними (рис. 8) були 52,9% пухлин (табл. 8). У молодшій віковій групі їх частка складала 47,0%, у середній – 55,9%, у старшій – 51,8%, що вказує на незалежність експресії цього маркера у РМЗ від віку.

Таблиця 6

Розподіл хворих на РМЗ за віком та наявністю метастазів у залежності від ступеня експресії bcl-2

Вікові групи, років	Метастази відсутні		Метастази наявні	
	Інтенсивність ІГХ реакції		Інтенсивність ІГХ реакції	
	-	+	-	+
< 35 (n=51)	11	14	14	12
	25		26	
35-50 (n=410)	121	152	79	58
	273		137	
> 50 (n=844)	232	270	191	151
	502		342	

Таблиця 7

Розподіл хворих на РМЗ за віком та наявністю метастазів у залежності від ступеня експресії Ki-67

Вікові групи, років	Метастази відсутні			Метастази наявні		
	Позитивних клітин (%)			Позитивних клітин (%)		
	<10	10-20	>20	<10	10-20	>20
< 35 (n=51)	8	8	9	3	4	19
	25			26		
35-50 (n=410)	80	89	104	12	31	94
	273			137		
> 50 (n=844)	137	195	170	26	77	239
	502			342		

Таблиця 8

Розподіл хворих на РМЗ за віком та наявністю метастазів у залежності від ступеня експресії pS₂

Вікові групи, років	Метастази відсутні		Метастази наявні	
	Інтенсивність ІГХ реакції		Інтенсивність ІГХ реакції	
	-	+	-	+
< 35 (n=51)	11	14	16	10
	25		26	
35-50 (n=410)	104	169	77	60
	273		137	
> 50 (n=844)	221	281	186	156
	502		342	

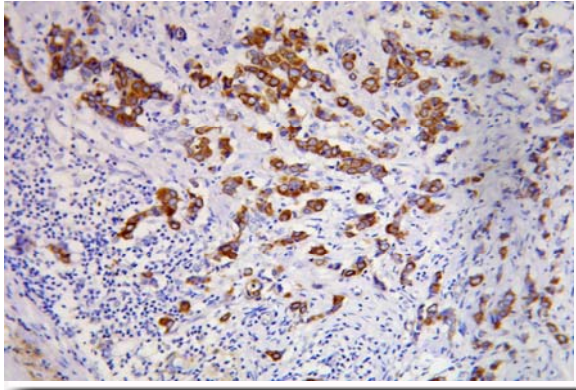


Рис. 8. Позитивна цитоплазматична ІГХ реакція з pS2 в операційному матеріалі РМЗ жінки 48 років. $\times 400$.

При аналізі розподілу випадків pS₂⁺ пухлин у групах з метастазами та без них була виявлена статистично достовірна тенденція щодо відносної більшості пухлин, позитивних на цей маркер, у групах без метастазів. Так, у хворих віком до 35 років, pS₂⁺ пухлини склали 56% випадків у групі без метастазів та 38,5% – у групі з метастазами (p<0,05). У жінок середнього віку з РМЗ pS₂⁺ пухлини зустрічалися у 43,8% випадків у групі з метастазами, та у 61,9% – у групі без метастазів (p<0,001). У пацієнток, віком понад 50 років, pS₂⁺ пухлини ми виявили у 45,6% випадків, у групі без метастазів – 55,9% (p<0,001).

Не було статистично достовірних відмінностей за рівнем експресії HER-2/neu, VEGF, HER-2/neu, pS2, p53, Ki67, bcl-2 між віковими групами.

У злоякісних пухлинах МЗ епітеліального походження встановлено сильний позитивний кореляційний зв'язок між експресією PgR та Bcl-2 (0,72, p<0,001), PgR та pS2 (0,80, p<0,001), позитивний кореляційний зв'язок середньої сили між експресією ER та PgR (0,60, p<0,001), ER та pS2 (0,62, p<0,001), ER та Bcl-2 (0,41, p<0,001), слабкий позитивний кореляційний зв'язок між експресією Ki-67 та p53, Ki-67 та VEGF, VEGF та p53, Bcl-2 та pS2. Негативний кореляційний зв'язок середньої сили спостерігався між експресією ER та Ki-67 (-0,40, p<0,001), PgR та Ki-67 (-0,54, p<0,001), PgR та VEGF (-0,48, p<0,001), Ki-67 та Bcl-2 (-0,45, p<0,001), Ki-67 та pS2 (-0,51 p<0,001), p53 та pS2 (-0,44, p<0,001), слабкий негативний зв'язок між експресією ER та HER-2/neu, PgR та HER-2/neu, ER та p53, PgR та p53, HER-2/neu та pS2, VEGF та pS2, VEGF та Bcl-2. Кореляційні зв'язки були відсутні між експресією p53 та HER-2/neu, Ki67 та HER-2/neu, HER-2/neu та bcl-2, HER-2/neu та VEGF.

Ми виявили кореляційні зв'язки, що мають вікові особливості, а також зв'язки, що обумовлюють пухлинне прогресування. Направленість зв'язків збігаються з даними, отриманими більшістю інших дослідників (Joachim E.E. et al.,

2000; Bartley A. N., Ross D. W., 2002; Li B.J. et al., 2004; Gerson R. et al., 2009). У дослідженнях, присвячених вивченню експресії фактору росту судинного ендотелію та інших маркерів, де групи пацієнтів були невеликі, були деякі розходження з нашими даними у долі позитивних випадків та силі кореляційних зв'язків (Jang J.E. et al., 1999; Al-Harris E.S. et al., 2008).

Після проведенні кореляційного аналізу виявилось, що зв'язки можна розбити на наступні групи:

1. Кореляційні зв'язки, що суттєво змінюються при наявності метастазів та незалежно від віку впливають на пухлинне прогресування: між експресією VEGF та p53 (0,25, p<0,001, у групі Mts-; 0,46, p<0,001, у групі Mts+), Ki-67 та p53 (0,07, p<0,05, у групі Mts-; 0,33, p<0,001, у групі Mts+); bcl-2 та pS2 (0,36, p<0,001, у групі Mts-; 0,21, p<0,001, у групі Mts+); ER та VEGF (-0,30, p<0,001, у групі Mts-; -0,44, p<0,001, у групі Mts+), PgR та VEGF (0,68, p<0,001, у групі Mts-; 0,47, p<0,001, у групі Mts+), p53 та pS2 (-0,34, p<0,001, у групі Mts-; -0,55, p<0,001, у групі Mts+). Отримані дані вказують на взаємостимулювання проліферативних, ангіогенних та апоптотичних властивостей пухлин. Меншої залежності один від одного набувають проліферативні та антиапоптотичні процеси та експресія рецепторів до стероїдних гормонів; а також антиапоптотичні процеси, з одного боку, та ангіогенні та проліферативні, з іншого.

2. Кореляційні зв'язки, що не суттєво або неозначно для різних вікових груп впливають на пухлинне прогресування (метастазування): ER та p53, PgR та p53, p53 та bcl-2 (значне посилення негативного зв'язку при формуванні метастазів лише у старшій групі); ER та bcl-2, PgR та bcl-2 (незначне ослаблення позитивного зв'язку при формуванні метастазів); Ki-67 та VEGF (незначне посилення позитивного зв'язку при формуванні метастазів); pS2 та HER-2/neu, pS2 та VEGF (незначне посилення негативного зв'язку при формуванні метастазів); pS2 та Ki-67 (незначне ослаблення негативного зв'язку при формуванні метастазів).

3. Кореляційні зв'язки, що змінюються з віком, на які не впливає наявність метастазів: PgR та pS2 (незначне ослаблення позитивного зв'язку).

4. Зв'язки, що істотно змінюються як в залежності від віку, так при наявності метастазів: ER та PgR, ER та pS2 (суттєве ослаблення позитивного зв'язку з віком та при формуванні метастазів, остання тенденція максимально проявляється у старшій групі); ER та HER-2/neu, PgR та HER-2/neu (суттєве посилення негативного зв'язку з віком та при формуванні метастазів, остання тенденція максимально проявляється у пременопаузальний період).

5. Кореляційні зв'язки відсутні: p53 та HER-2/neu, Ki67 та HER-2/neu, HER-2/neu та bcl-2, HER-2/neu та VEGF. Таким чином, експресія HER-2/neu виявилася найменш залежною від інших маркерів.

Підсумок

Всі використані маркери можуть бути застосовані з високим ступенем вірогідності як прогностичні (показники ризику метастазування) при РМЗ. Різниця між групами з метастазами та без них була достовірною з $p < 0,001$ для експресії ER, PgR, HER-2/neu, pS2, p53, VEGF, Ki67, $p < 0,01$ – для експресії bcl-2. Як прогностичні по відношенню до ризику виникнення метастазів, маркери ER та PgR повинні бути застосовані обережно в віковій групі до 35 років, ER – у віковій групі 35-50 років. Лише для маркерів ER та PgR характерним було збільшення рівня експресії з віком: для експресії ER різниця була достовірною у групах 35-50 та старше 50 років ($p < 0,001$), у групах до 35 років та після 50 років ($p < 0,01$); для PgR – між групами 35-50 років та старше 50 років ($p < 0,05$). Маркери p53 та Ki67 виявилися такими, експресія яких достовірно відрізняється у групах з наявністю метастазів, незалежно від віку. Вони є найбільш надійними як прогностичні для групи до 35 років.

Кореляційні зв'язки між експресією маркерів, що суттєво змінюються при пухлинному прогресуванні, незалежно від віку – VEGF та

p53, Ki-67 та p53; bcl-2 та pS2; ER та VEGF, PgR та VEGF, p53 та pS2. В залежності від віку та від наявності метастазів суттєво змінюється зв'язок між експресією ER та HER-2/neu, PgR та HER-2/neu (посилення негативного зв'язку з віком та при формуванні метастазів, остання тенденція максимально проявляється у пременопаузальний період); ER та Ki67, PgR та Ki67, (посилення негативного зв'язку з віком та ослаблення при формуванні метастазів), ER та PgR, ER та pS2 (ослаблення позитивного зв'язку з віком та при формуванні метастазів, остання тенденція максимально проявляється у постменопаузі). У постменопаузальний період спостерігається посилення зв'язку при формуванні метастазів між ER та p53, PgR та p53, p53 та VEGF. Таким чином, експресія рецепторів до жіночих статевих гормонів зменшує проліферативний, апоптотичний та метастатичний потенціал злоякісних пухлин МЗ, що з віком набуває більшого значення. Вікові особливості РМЗ пов'язані із посиленням негативної залежності експресії рецепторів до гормонів та синтезу HER-2/neu. Посилення цього зв'язку при метастазуванні максимально проявляється у групі 35-50 років.

Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження в напрямку виявлення прогностичної цінності імуногістохімічних маркерів повинні враховувати виживання хворих та низку інших критеріїв перебігу РМЗ.

Літературні джерела

Плохинский Н. А. Биометрия : 2-е изд. / Н. А. Плохинский. – М. : Из-во Московского университета, 1970. – 367 с.

A comparison among HER2, TP53, PAI-1, angiogenesis, and proliferation activity as prognostic variables in tumours from 408 patients diagnosed with early breast cancer / Birgitte Vrou Offeren, Jan Alsner, Karen Ege Olsen [et al.] // *Acta Onc.* – 2008. - Vol. 47. – P. 618-632.

Age-associated biomarker profiles of human breast cancer / Serenella Eppenberger-Castori, Dan H. Moore, Ann D. Thor [et al.] // *Int. J. Bioch. & Cell Biol.* – 2002. - Vol. 34, № 11. – P. 127-132.

Bartley A. N. Validation of p53 immunohistochemistry as a prognostic factor in breast cancer in clinical practice / Angela N. Bartley, Dennis W. Ross, // *Arch. Path. Lab. Med.* – 2002. - Vol. 126, № 4. - P. 456-458.

Breast cancer in young women (<35 years) : the impact of age on the prognosis / W. Bal, M. Jarzab, E. Nowara [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 26. – P. 619.

Correlation between VEGF expression and prognostic factors in breast cancer / J. E. Jang, S.-Y. Choi, C. H. Park [et al.] // *J. Korean Cancer Assos.* - 1999. - Vol. 31, № 3. - P. 483-491.

Effects of young age at presentation on survival in breast cancer / Nagi S. El Saghir, Muhieddine Seoud, Mazen K. Khalil [et al.] // *BMC Cancer.* - 2006. - Vol. 6. – P. 194.

Expression correlation of Ki67 to P53, VEGF, and C-erbB-2 genes in breast cancer and their clinical significances / B. J. Li, Z. H. Zhu, J. Y. Wang [et al.] // *Ai Zheng.* – 2004. - Vol. 23, № 10. – P. 1176-1179.

Expression of pS2 protein and estrogen and progesterone receptor status in breast cancer / Anna Ioakim-Liossi, Petros Karakitsos, Christos Markopoulos [et al.] // *Acta Cytol.* – 1997. - Vol. 41. – P. 713-716.

Immunohistochemical expression of Bcl-2 protein in breast lesions: correlation with Bax, p53, Rb, C-erbB-2, EGFR and proliferation indices / Ioachim Elli E., Malamou-Mitsi Vasiliki, Kamina Sebastia A. [et al.] // *Anticancer Res.* – 2000. - Vol. 20, № 6. – P. 4221-4225.

Ki67 in breast cancer: correlation between proliferation cellular and other prognostic factors / R. Gerson, L. Alban, A. Martinez [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2009. - Vol. 27. – P. 86-92.

Over expression of vascular endothelial growth factor in correlation to Ki-67, grade, and stage of

Шпонька И.С., Бондарева В.А., Шпонька В.И. Иммуногистохимический профиль в оценке биологических свойств и прогноза течения рака молочной железы.

Резюме. Прогностическое значение маркеров биологических свойств рака молочной железы, их возрастные и взаимные корреляции являются окончательно не установленными. Целью нашего исследования было определение зависимости экспрессии прогностических маркеров (ER, PgR, HER-2/neu, pS2, p53, VEGF, Ki-67, bcl-2) от возраста и наличия метастазов при раке молочной железы у женщин, определение корреляционных связей в группах с метастазами и без метастазов. По данным статистического анализа (критерий χ^2), все маркеры могут быть использованы с высоким уровнем достоверности как прогностические в отношении риска развития метастазов у больных разного возраста. Исключение составили маркеры ER и PgR в возрастной группе до 35 лет, ER – в возрастной группе 35-50 лет. Только для маркеров ER та PgR характерным было увеличение уровня экспрессии с возрастом: для экспрессии ER разница была достоверной в группах 35-50 и старше 50 лет, в группах до 35 лет и после 50 лет; для PgR – между группами 35-50 лет и старше 50 лет. Выявилось, что экспрессия маркеров p53 и Ki-67 достоверно отличается в группах с наличием метастазов независимо от возраста. Последние являются наиболее надежными в качестве прогностических для группы до 35 лет. Были выявлены корреляционные связи между экспрессией маркеров, которые зависели от возраста и/или метастазирования.

Ключевые слова: молочная железа, злокачественные опухоли эпителиального происхождения, иммуногистохимические маркеры, прогноз.