

Бучинська Л.Г.,  
Грінкевич В.М.,  
Свінціцький В.С.,  
Романенко О.В.

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

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України  
Національний медичний університет імені О.О.Богомольця

**Резюме.** В результаті проведеного імуногістохімічного дослідження визначено експресію білків Ki-67, p53, рецепторів естрогенів, рецепторів прогестерону у пухлинних клітинах, а також щільність мікросудин у межах одного гістологічного типу пухлини – серозного раку яєчника. Зіставлення експресії вищезгаданих біомолекулярних маркерів з 5-річною виживаністю хворих свідчить, що вони є суттєвими факторами, які детермінують виживаність хворих на цю патологію. На основі отриманих результатів запропоновано спосіб визначення ймовірного індивідуального прогнозу 5-річної виживаності хворих на серозний рак яєчника. **Ключові слова:** рак яєчника, імуногістохімічне дослідження, молекулярно-біологічні маркери, індивідуальний прогноз.

Виявлення та лікування раку яєчника (РЯ) є актуальною проблемою онкології, що зумовлено 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 відносяться вік хворих, стадія пухлинного процесу, гістологічна структура пухлини та особливості її молекулярного профілю. Незважаючи на багатопланові дослідження пухлинного росту в яєчнику, у тому числі молекулярного фенотипу пухлинних клітин, до цього часу 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 пухлинного процесу – проліферацію, апоптоз, метастазування та інші, зміна функціонування яких пов'язана з агресивністю пухлини. До таких маркерів відносяться білки-регулятори клітинного циклу, рецептори стероїдних гормонів та показники неопластичності

**Мета роботи:** дослідити експресію біомолекулярних маркерів – регуляторів клітинного циклу, рецепторів стероїдних гормонів у пухлинних

клітинах та показника неопластичності у хворих на серозний РЯ і визначити можливості їх використання для оцінки індивідуальної виживаності хворих.

**Матеріали і методи дослідження.** Дослідження проведено на зразках видалених пухлин яєчника у 82 хворих на серозний РЯ I–IV стадії, що лікувалися у відділенні онкогінекології Національного інституту раку МОЗ України. Хворим не призначалась неoad'ювантна хіміотерапія. Вік хворих був від 18 до 79 років, середній вік склав  $50,9 \pm 5,5$  років. Операційний матеріал піддавався класичній гістологічній обробці [9]. Верифікація клінічного діагнозу здійснювалася на гістологічних зрізах, забарвлених гематоксиліном та еозином. На паралельних зрізах проводилось імуногістохімічне дослідження білків з використанням наступних моноклональних антитіл: маркер проліферації Ki-67 (клон МІВ-1), білок p53 (клон DO-7), рецептори естрогенів (клон 1D5) та прогестерону (клон PgR636), маркер ендотелію судин CD34 (клон QVEnd10). Для візуалізації білків використовували систему En Vision ("Dako Cytomation", Данія), ядра пухлинних клітин дофарбовували гематоксиліном Майєра. У кожному препараті аналізували по 800–1000 пухлинних клітин і визначали кількість клітин з позитивною імуногістохімічною реакцією (індекс мітки – ІМ, %). Проліферативну активність пухлинних клітин

**Таблиця 1**

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

Біомолекулярний маркер	Медіана показника	Градації експресії маркера	Визначена при певних значеннях МЕ конкретного біомолекулярного маркера ймовірність 5-річної виживаності хворих, %	p (F-критерій Кокса)
Ki-67, %	16,0	< ME ≥ ME	70,0 20,0	0,02
p53, %	35,5	< ME ≥ ME	72,7 57,8	0,05
PE, %	29,0	< ME ≥ ME	26,0 75,0	0,01
РП, %	37,0	< ME ≥ ME	39,0 65,0	0,04
ЩМС, кількість судин на 1 мм <sup>2</sup> пухлини	59,0	< ME ≥ ME	63,0 51,0	0,05

– індекс проліферації (ІП) яєчника оцінювали за кількістю Ki-67 – позитивних клітин, Ki-67(+) – (у відсотках). Підрахунок кількості CD34-позитивних новоутворених мікросудин проводили за Weidner N. et al. (1991) [10], перераховуючи кількість судин на 1 мм<sup>2</sup>, що відповідало показнику щільності мікросудин (ЩМС). Відповідно до значень медіани (МЕ) експресія маркерів та ЩМС поділялась на високу (значення вищі за МЕ) і низьку (значення нижчі за МЕ). Виживаність хворих аналізували за методом Каплана–Майєра, достовірність відмінностей між кривими виживаності визначали за F-критерієм Кокса. Прогностичне значення показників оцінювали за допомогою багатофакторного аналізу (пропорційних моделей ризику Кокса) з використанням  $\chi^2$  тесту. Для перевірки достовірностей розрахункових даних ймовірності індивідуальної 5-річної виживаності хворих на серозний РЯ був використаний критерій Пірсона [11].

**Результати дослідження.** В результаті проведеного імуногістохімічного дослідження виявлено значну варіабельність експресії білків Ki-67, p53, рецепторів естрогенів (РЕ), рецепторів прогестерону (РП) та ЩМС у межах пухлини одного гістологічного типу – серозного РЯ, про що свідчать індивідуальні коливання досліджуваних показників. Зокрема, ІП був від 1,1 до 76,0%, ЩМС – від 10 до 126 судин на 1 мм<sup>2</sup> пухлини. Експресія білка p53 була у межах 1,5–79,0% клітин, РЕ - 2,0 – 70,0% клітин, РП - 2,0 – 84,0% клітин. На підставі одержаних індивідуальних значень цих показників були розраховані їх відповідні МЕ (табл.1). МЕ ЩМС становила 59,0 на 1 мм<sup>2</sup> площі пухлини, МЕ експресії Ki-67 –

16,0%, p53 – 35,5%, РЕ – 29,0%, РП – 37,0%. Вказані значення МЕ досліджених показників були використані для їх зіставлення з 5-річною виживаністю хворих і за допомогою методу багатофакторного аналізу була встановлена можливість їх використання для оцінки прогнозу хвороби ( $\chi^2 = 15,2$ ;  $p = 0,009$ ).

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

У якості прикладів наводимо результати розрахунку ймовірного індивідуального прогнозу 5-річної виживаності хворих на серозний РЯ III

**Таблиця 2**

Показники вірогідності та коефіцієнти інформативності досліджених молекулярно-біологічних маркерів

Біомолекулярні маркери	p	KI
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

Рис. 1. Індивідуальний прогноз 5-річної виживаності хворих на серозний РЯ (менопаузальний період)

**Хвора А., 60 років, прожила 9 років після операції**

Молекулярний маркер	Значення	Ймовірність 5-річної виживаності
Ki-67	10 %	88%
p53	19 %	
ЩМС	60 судин	
PE	6 %	
РП	43 %	

**Хвора К. 60 років, прожила 1 рік після операції**

Молекулярний маркер	Значення	Ймовірність 5-річної виживаності
Ki-67	10 %	12%
p53	19 %	
ЩМС	60 судин	
PE	6 %	
РП	43 %	

Рис. 2. Індивідуальний прогноз 5-річної виживаності хворих на серозний РЯ (репродуктивний період)

**Хвора Н., 36 років, прожила 6 років після операції**

Молекулярний маркер	Значення	Ймовірність 5-річної виживаності
Ki-67	10 %	84%
p53	19 %	
ЩМС	60 судин	
PE	6 %	
РП	43 %	

**Хвора М., 40 років, прожила 1 рік після операції**

Молекулярний маркер	Значення	Ймовірність 5-річної виживаності
Ki-67	10 %	7%
p53	19 %	
ЩМС	60 судин	
PE	6 %	
РП	43 %	

стадії (хворі різного віку) залежно від експресії досліджених маркерів в пухлинах, які в цілому узгоджуються з реальними термінами виживаності цих пацієнтів, задокументованими в історіях хвороби (рис.1,2).

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

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

де PS (probability of survival) – ймовірність виживаності хворих, що дорівнює або більше 5 років (%);

KI – коефіцієнт інформативності;

F(xi) – предикативна логічна функція, що

приймає значення 0 або 1 в залежності від того, чи є значення кожного молекулярного показника  $x_i$  таким, що переходить порогові величини ME відповідного фактора.

Перевірка розрахунків ймовірності індивідуального прогнозу 5-річної виживаності хворих на серозний РЯ з реальною виживаністю за даними медичної документації виявила їх співпадіння у 64% випадків.

**Висновки.** Підсумовуючи наведене вище, 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.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ПРЕДИКАТИВНОЙ ОЦЕНКИ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ПРОГНОЗА ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ СЕРОЗНЫМ РАКОМ ЯИЧНИКА

Бучинская Л.Г., Гринкевич В.И., Свинцицкий В.С., Романенко А.В.  
Национальный медицинский университет имени А.А.Богомольца

**Резюме.** В результате иммуногистохимического исследования определено экспрессию белков Ki-67, p53, рецепторов эстрогенов, рецепторов прогестерона в опухолевых клетках, а также плотность микрососудов в пределах одного гистологического типа опухоли – серозного рака яичника. Сопоставление экспрессии вышеупомянутых биомолекулярных маркеров с 5-летней выживаемостью больных свидетельствует о том, что они являются существенными факторами, которые детерминируют выживаемость больных этим заболеванием. Опираясь на результаты исследования предложен способ определения вероятного индивидуального прогноза 5-летней выживаемости больных серозным раком яичника.

**Ключевые слова:** рак яичника, иммуногистохимическое исследование, молекулярно-биологические маркеры, индивидуальный прогноз.

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

Buchynska L.G., Grinkevych V.M., Svintsisky V.S., Romanenko O.V.  
O.O. Bohomolets National Medical University

**Abstract.** As a result of conducted immunohistochemical research the expression of Ki-67, p53 proteins, estrogenes receptors, progesterone receptors as well as microvessel density was determined under scope of one of the histological cancer type – ovarian carcinoma. Comparison of above biomolecular markers with 5 years patients' survival shows them to be significant factors determining survival of patients with this pathology. Based on obtained results it was proposed the methodology of deriving of probable individual 5 years survival prognosis for patients with ovarian carcinoma.

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

### ЛІТЕРАТУРА

1. Epithelial ovarian carcinoma in younger vs older women: is age an independent prognostic factor? / D. Pectasides, G. Fountzilas, G. Aravantinos [et al.] // Int. J. Gynecol. Cancer. - 2007. - V. 17. - P. 1003-1010.
2. Cancer Incidence in Five Continents / IARC Sci. Publ. - Lyon. - 2008. - V. 9. - 896 p.
3. Свинцицкий В.С. Комплексне лікування хворих на злоякісні пухлини яєчника: автореф. дис. д-ра мед. наук: спец. 14.01.07 / Свинцицкий Валентин Станіславович. - К., 2010. - 40 с.
4. Антонеева И.И. Экспрессия маркеров апоптоза и пролиферации в динамике прогрессирования рака яичников / И.И. Антонеева, С.Б. Петров // Патол. Физиол. и эксп. терапия. - 2008, №4. - С.6-7.
5. Analysis of prognostic factors for the extent of vascularity of serous ovarian cancer on the basis of CD34 antigen expression. / R. Blok, K. Blok, M. Jelen, H. Grybos // Gynecol Pol. - 2004. - V.75.- №2. - P.91-98.
6. Elliassen A. Endogenous hormone levels and risk of breast, endometrial and ovarian cancers: prospective studies / A. Elliassen, S. Hankinson // Adv. Exp. Med. Biol. - 2008. - V. 630. - P.148 - 165.
7. Relationship between p53-associated proteins and estrogen receptor status in ovarian serous neoplasms / E.Y. Cho, Y.L. Choi, S.W. Chae [et al.] // Int. J. Gynecol. Cancer. - 2006. - V. 16. - P. 1000-1006.
8. Новичков Е.В. Зависимость прогноза рака яичников от экспрессии рецепторов к половым гормонам и пролиферативной активности опухолевых клеток / Е.В. Новичков, А.А. Вотинцев // Арх. Патол. - 2006. - № 2. - С. 10-13.
9. Эллиниди В.Н. Практическая иммуноцитохимия (методические рекомендации) / В.Н. Эллиниди, Н.В. Аникеева, Н.А. Максимова // С. Петербург: ВЦЭРМ МЧС Россия. - 2002. - 36с.
10. Weidner N. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma / N. Weidner, J.P. Semple, W.R. Welch // N. Engl. J. Med. -1991.- V.324.- P.1-8.
11. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Губенко, П.Н. Бабич // К.: МОРИОН. - 2001. -320 с.