

© Коллектив авторов, 2013
УДК 616.316-006-076.5-076.4

ЗНАЧЕНИЕ МАРКЕРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА ДЛЯ ПОГРАНИЧНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКА

*И.И. Виноградов¹, Л.Э. Завалишина^{1,2}, Ю.Ю. Андреева^{1,2}, Е.В. Ахидова³, О.М. Вольпина³,
Т.Д. Волкова³, Д.О. Короев³*

ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт
им. П.А. Герцена» Минздрава России (1);
ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования (2);
Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (3), г. Москва

На сегодняшний день одной из актуальных проблем в гинекологии являются пограничные опухоли яичника, в структуре заболеваемости которых высокий удельный вес составляют женщины репродуктивного возраста. В этой связи часто встает вопрос об органосохраняющих методах лечения, что в свою очередь диктует необходимость оценки риска развития рецидива.

В настоящей статье предпринята попытка определить прогностическое значение маркеров пролиферативной активности (Ki67, циклин D1, p21), а так же про- и антиапоптотических маркеров (p53, bax, bcl-2, сурвивин) для определения потенциально агрессивного поведения этих новообразований.

Ключевые слова: пограничная опухоль яичника, ki67, циклин D1, p21, p53, bax, bcl-2, сурвивин.

Пограничные опухоли яичников (ПОЯ) или опухоли с низким злокачественным потенциалом представляют собой гетерогенную группу новообразований, для которых характерна пролиферация эпителия, клеточная и ядерная атипия, выраженная в большей степени, чем в их доброкачественных аналогах. Однако отсутствует деструктивная инвазия стромы или солидный рост, что в свою очередь связано с более благоприятным прогнозом пограничных опухолей по сравнению с раком яичников [10]. Диагноз пограничной опухоли яичников является одной из самых спорных проблем в гинекологической патологии. Это связано с отсутствием четких гистологических критериев пограничных опухолей, за исключением отсутствия явной инвазии. Кроме того, риск развития рецидива и метастазов в каждом конкретном случае не определен. Это увеличивает потребности в

разработке дополнительных методов диагностики, в том числе панелей антител для иммуногистохимического (ИГХ) исследования с использованием маркеров, позволяющих определить индивидуальные факторы прогноза [6].

В этом отношении перспективным является изучение процессов апоптоза и пролиферативной активности этих опухолей, поскольку пролиферация эпителия – одна из характерных черт ПОЯ.

Наиболее часто для изучения пролиферативной активности опухоли исследуют белок **Ki-67** – ядерный протеин, маркер пролиферативной активности, определяющийся во всех фазах клеточного цикла кроме G0 [2]. Имеются сообщения об увеличении степени пролиферативной активности от пограничной опухоли яичников к low-grade карциноме и, затем к high-grade карциноме [11].

Для изучения процессов апоптоза используют иммуногистохимические реакции с антителами к онкосупрессору p53, а так же протеинам bcl-2 и Вах. Помимо этого, в последние годы изучаются свойства ингибитора апоптоза сурвивина, высокая активность которого в различных опухолях, по данным ряда авторов была связана с плохим прогнозом [1].

Ген-супрессор опухоли **P53** расположен на коротком плече 17 хромосомы, его продукт – ядерный фосфопротеин, вовлеченный в регулирование транскрипции и роста клетки. Мутации гена **P53** являются наиболее часто обнаруживаемой генетической аномалией в опухолях человека [5]. В литературе имеются данные о более выраженной экспрессии p53 в пограничных и злокачественных опухолях яичника по сравнению с доброкачественными [6,9]. По мнению некоторых авторов, более интенсивная ИГХ-реакция в пограничных опухолях может быть интерпретирована как озлокачествление опухоли [9]. Несмотря на это, прогностическая роль p53 остается неоднозначной для опухолей яичников.

Одним из основных маркеров апоптоза является белок bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2 gene) – митохондриальный мембранный протеин, который блокирует апоптоз. Для многих типов карцином показана его различная прогностическая ценность. Обнаружено, что экспрессия bcl-2 в пограничных опухолях интенсивнее, чем в доброкачественных и злокачественных опухолях, однако данные о прогностической значимости этого маркера для ПОЯ крайне скудны [6].

Белок Вах – проапоптотический протеин, локализующийся в цитоплазме и выступающий как ингибитор роста опухоли [6]. Данные об экспрессии этого маркера в опухолях яичника противоречивы. Имеются сообщения как об отсутствии статистически значимых различий экспрессии Вах в доброкачественных, пограничных, и злокачественных опухолях яичника, так и о корреляции слабой экспрессии с плохим прогнозом [3].

Сурвивин – член семейства белков-ингибиторов апоптоза (IAP), избирательно экспрессирующийся в большинстве опухолей, и локализующийся в ядре и цитоплазме. Имеются данные о том, что экспрессия сурвивина более выражена в доброкачественных и пограничных серозных опухолях, и что наиболее часто в этих опухолях сурвивин локализуется в ядре [7].

Предположение о том, что рак яичника, как и большинство других опухолей, возникает в результате нарушений в регулировании клеточного цикла, было сделано давно [13]. Ответственной за смену фаз клеточного цикла является группа белков, называемых циклин-зависимыми киназами (CDKs), которые активируются при взаимодействии с различными циклинами. Так, для перевода клетки из G1 в S-фазу необходим активатор CDK – cyclin D1 – протоонкоген, положительный регулятор клеточного цикла [4]. По данным ряда авторов в 13-56 % случаев рака яичников выявляется амплификация или гиперэкспрессия циклина D1, либо их сочетание [12]. Данные об экспрессии этого маркера в ПОЯ крайне скудны.

Антагонистом циклина D1 является ингибитор CDK – **P21** – p53-индуцируемый ген, белковый продукт которого являясь ингибитором CDK, способен остановить клеточный цикл в фазе G1. Некоторые авторы считают, что слабая экспрессия p21 в серозных опухолях связана с повышенной биологической агрессивностью [8].

Целью исследования являлось изучение про- и антиапоптотических маркеров (p53, Вах, bcl-2, сурвивин), а так же маркеров пролиферативной активности (Ki67, циклин D1, p21) для определения потенциально агрессивного поведения ПОЯ.

Материалы и методы

Исследование проводилось на операционном материале пациенток проходивших лечение или консультированных в МНИОИ им. П.А. Герцена с диагнозом «пограничная опухоль яичника». Были исследованы образцы опухолей 40 женщин в возрасте от 18 до 63 лет (средний возраст 30,8 лет). Пациентки были разделены на две группы: 1 группа – больные с

отсутствием рецидивов ПОЯ (23 человека); 2 группа – больные с наличием рецидива ПОЯ (17 человек).

Для исследования были использованы коммерческие моноклональные антитела производства «Dako» (Denmark) к маркерам пролиферативной активности (Ki67 в разведении 1:40; циклин D1 в разведении 1:50), апоптоза (Bcl2 в разведении 1:40; Вах в разведении 1:70), супрессорам опухолевого роста (p53 и p21 в разведении 1:70). Антитела к сурвивину (в разведении 1:150) были предоставлены разработчиками (ИБХ РАН).

Для иммуногистохимического исследования были изготовлены срезы толщиной 4 мкм, которые наносили на высокоадгезивные стекла. Восстановление антигенной активности проводили в модуле предобработки для автостейнера при температуре 97°C в течение 25 мин. и последующим остывании до 65 °C в течение 20 мин в цитратном буфере pH 6,0 или в трис-ЭДТА буфере pH 9,0. В качестве детекционной системы применяли систему «EnVision Flex» («Dako»), в качестве хромогена – диаминобензидин. Для получения результатов пригодных для количественной обработки реакции проводили с помощью автоматического иммуногисто-стейнера «Avtosteiner Dako Link 48». Препараты исследовали с помощью световой микроскопии. Оценку экспрессии маркеров производили путем подсчета количества окрашенных клеток на 100 клеток препарата в 3 полях зрения (увеличение x40) и выражали полученные результаты в процентах. Анализ результатов проводили при помощи пакета программ Statistica 6.0, используя метод процентилей описательной статистики, U-тест Манна-Уитни. Уровень значимости (p) принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Уровень экспрессии Ki-67 в обеих группах варьировал в пределах от 1% до 70%, при этом экспрессия маркера значительно различалась в опухолях 1 и 2 группы ($p < 0,05$). В 1 группе уровень экспрессии Ki 67 10% соответствовал 25-му проценти-

лю, а 30% – 75-му. Во 2 группе 25-й процентиль был равен 10%, а 75-й – 20%. Таким образом, отмечается тенденция к увеличению уровня экспрессии Ki-67 более 20% в опухолях 1 группы, и снижению уровня менее 10% в опухолях 2 группы, однако статистически значимых различий достигнуто не было ($p > 0,05$), что, возможно связано с малым количеством наблюдений.

Уровень экспрессии Bcl2 варьировал в пределах от 0 до 90%, однако значимых различий в экспрессии маркера между группами не было обнаружено ($p > 0,05$).

Экспрессия Вах колебалась в пределах 0-95%, при этом степень выраженности маркера значимо различалась в опухолях 1 и 2 группы ($p < 0,05$). В 1 группе 25-м процентилем являлся уровень экспрессии 20%, а 75-м процентилем – 70%. Во 2 группе 25-му процентилю соответствовал уровень экспрессии 40%, а 75-му – 90%. Можно отметить, что в этой группе границы значений оказались значительно выше, чем в группе без рецидивов. Таким образом, значимым в опухолях без рецидивов является уровень экспрессии Вах менее 40% (рис. А), тогда как в группе с рецидивами – выше 70% (рис. Б) ($p < 0,05$).

Уровень экспрессии p53 варьировал в пределах от 0 до 90%, однако значимых различий в экспрессии этого маркера между 1 и 2 группами не было обнаружено ($p > 0,05$).

Реакция с p21 находилась в пределах 0-80%, при этом экспрессия маркера значимо различалась в опухолях 1 и 2 группы ($p < 0,05$). В 1 группе 25-му процентилю соответствовал уровень экспрессии 20%, а 75-му – 40%. Во 2 группе уровень 25-й процентиль был равен 10%, 75-й – 30%. Таким образом, значимой в опухолях без рецидивов является экспрессия p21 более 30% (рис. В), тогда как во 2 группе – менее 20% (рис. Г) ($p < 0,05$).

Выраженность экспрессии циклина D1 также сильно варьировала (0-90%), однако значимых различий в экспрессии этого маркера между группами не было обнаружено ($p > 0,05$).

Во всех исследованных случаях наблюдалась цитоплазматическая экспрес-

сия сурвивина, уровень которой колебался в пределах 0-90%, однако значимых различий в его экспрессии между 1 и 2 груп-

пами не было выявлено ($p>0,05$). Значения всех описанных выше маркеров отражены в таблице 1.

Таблица 1

Экспрессии исследованных маркеров в ПОЯ

		Ki-67	Bcl2	Vax	P53	P21	Cyclin D1	Сурвивин	
ПОЯ	Без рецидива	Валидные	23	23	23	23	23	23	
		Медиана	20%	0	30%	10%	30%	30%	10%
		25-й процентиль*	10%	0	20%	10%	20%	0	0
		75-й процентиль**	30%	30%	70%	40%	40%	60%	50%
		Среднее	20%	20%	40%	30%	30%	30%	30%
		Стандартное отклонение	20%	30%	30%	30%	20%	30%	30%
		Стандартная ошибка среднего	0	0	0	0	0	0	0
	Рецидивы	Валидные	17	16	15	17	17	15	15
		Медиана	10%	10%	80%	10%	20%	30%	0
		25-й процентиль*	10%	0	40%	10%	10%	20%	0
		75-й процентиль**	20%	40%	90%	40%	30%	60%	30%
		Среднее	10%	20%	70%	20%	20%	40%	20%
		Стандартное отклонение	10%	30%	30%	30%	10%	30%	30%
		Стандартная ошибка среднего	0	0	0	0	0	0	0

* 25-й процентиль – значение, ниже которого расположено 25% наблюдений.

** 75-й процентиль – значение, выше которого расположено 25% наблюдений. Используются для сравнения и определения пороговых значений данных.

В результате нашего исследования установлено снижение уровня экспрессии p21 ниже 20% в рецидивных ПОЯ, что согласуется с данными литературы [8], демонстрирующими, корреляцию снижения экспрессии p21 с повышением биологической агрессивности опухоли и, обусловленной, вероятнее всего, отсутствием ингибирующей роли p21 на клеточный цикл.

Исследование показало усиление экспрессии Vax в группе с рецидивами (выше 70%). По данным ряда авторов выраженная экспрессия Vax в карциномах яичника связана с благоприятным клиническим прогнозом [3], однако исследования, посвященные изучению связи экспрессии Vax с биологическим поведением именно ПОЯ в настоящее время отсутствуют.

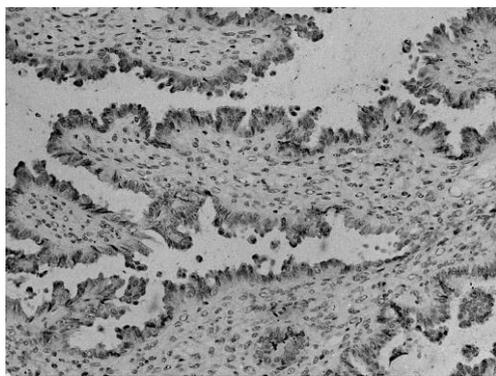
Хотя в литературе имеются сообщения о выраженной экспрессии циклина D1, bcl-2 и сурвивина в ПОЯ, исследования по изучению их прогностического значения для данной патологии практически отсутствуют [6, 7].

Наше исследование не выявило значимых различий экспрессии этих маркеров в исследуемых группах. При исследо-

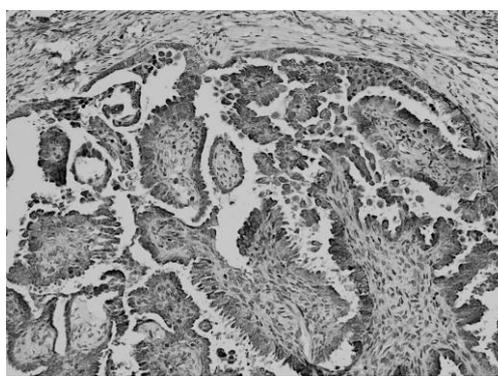
вании p53 так же не было обнаружено значимых различий экспрессии в безрецидивных и рецидивных опухолях, хотя, по мнению некоторых авторов, более интенсивная реакция в пограничных опухолях может быть признаком озлокачествления опухоли [9]. Однако исследования по этому вопросу так же скудны.

Выводы

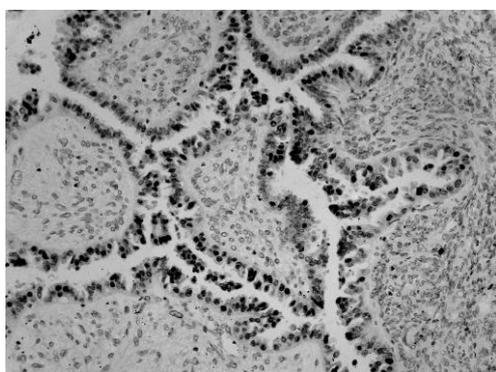
1. В пограничных опухолях яичника, склонных к рецидивам отмечается экспрессия p21 ниже 20% и экспрессия Vax выше 70%;
2. Для пограничных опухолей яичника, не склонных к рецидивам характерна экспрессия p21 выше 30% и экспрессия Vax ниже 40%;
3. Прогностическое значение уровня экспрессии Ki 67 требует дальнейшего изучения, так как согласно исследованиям ряда авторов отмечено увеличение степени пролиферативной активности в карциномах яичника, по сравнению с ПОЯ. [11].
4. Циклин D1, bcl-2, p53 и сурвивин пока не имеют прогностической ценности для оценки биологического поведения ПОЯ.



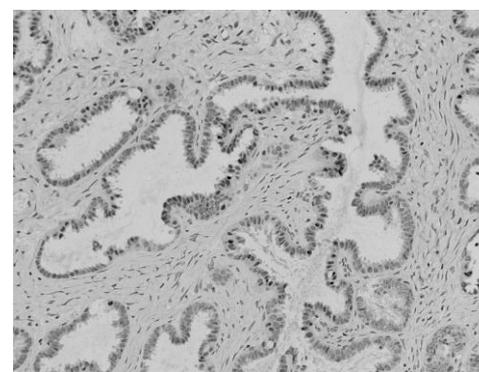
А – экспрессия Вах в 20% клеток ПОЯ без рецидива, х200



Б – экспрессия Вах в 90% клеток при рецидиве ПОЯ, х200



В – экспрессия p21 в 60% клеток ПОЯ без рецидива, х200



Г – экспрессия p21 в 10% клеток при рецидиве ПОЯ, х200

Литература

1. Вольпина О.М. Ингибитор апоптоза сурвивин при переходо-клеточном раке мочевого пузыря / О.М. Вольпина // Архив патологии. – 2011. – №2. – С. 8-10.
2. Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10 / Schonk-D.M., Schonk- [et al.] // Hum. Genet. – 1989. – Vol. 83. №(3). – P. 297-299.
3. Bax protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer / Y.T. Tai Y.T. [et al.] // J. Clin. Oncol. – 1998. – Vol. 16. – P. 2583-2590.
4. Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein / H. Müller H. [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1994. – Vol. 91. – P. 2945-2949.
5. Expression and prognostic significance of cox-2 and p-53 in hodgkin lymphomas: a retrospective study- / N.O. Barisik NO [et al.] // Diagn. Pathol. – 2010. – Vol. 5. – P. 19.
6. Expression of Pro-Apoptotic (p53, p21, bax, bak and fas) and Anti-Apoptotic (bcl-2 and bcl-x) Proteins in Serous Versus Mucinous Borderline Ovarian Tumours / R. Fauvet R [et al.] // J. Surg. Oncol. – 2005. – Vol. 92. – P. 337-343.

7. Immunohistochemical localization of survivin in serous tumors of the ovary / B. Tringler B. [et al.] // Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. – 2004. – Vol. 12. – P. 40-43.
8. Immunohistochemical profiling of benign, low malignant potential and low grade serous epithelial ovarian tumors / V. Ouellet V. [et al.] // BMC Cancer. – 2008. – Vol. 8. – P. 346-353.
9. Immunohistochemistry with apoptotic-antiapoptotic proteins (p53, p21, bax, bcl-2), c-kit, telomerase, and metallothionein as a diagnostic aid in benign, borderline, and malignant serous and mucinous ovarian tumors / H. Ozer, H. [et al.] // Diagn. Pathol. – 2012. – Vol. 7, №(1). – P. 124.
10. Shin I. Molecular pathogenesis of ovarian borderline tumors: new insights and old challenges / I. Shin, R. Kurman // Clin. Cancer Res. – 2005 – Vol. 11, №(20). – P. 7273-7279.
11. Sylvia M.T. The expression of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, Her-2-neu, p53 and Ki-67 in epithelial ovarian tumors and its correlation with clinicopathologic variables / M.T. Sylvia, S. Kumar, P. Dasari // Indian J. Pathol. Microbiol. – 2012. – Vol. 55. – P. 33-37.
12. The concurrent expression of p27 (kip1) and cyclin D1 in epithelial ovarian tumors / L. Sui L. [et al.] // Gynecol. Oncol. – 1999. – Vol. 73. – P. 202-209.
13. Weinberg R.A. Tumor suppressor genes / R.A. Weinberg // Science – 1991. Vol. 254. – P. 1138- 1146.

IMPORTANCE OF MARKERS OF THE PROLIFERATION AND APOPTOSIS FOR OVARIAN BORDERLINE TUMOURS

I.I. Vinogradov, L.E. Zavalishina, Yu.Yu. Andreeva, E.V. Akhidova, O.M. Volpina, T.D. Volkova, D.O. Koroev

For today, one of actual problems in gynecologic pathology are borderline tumours of the ovary to which frame of a case rate the high specific gravity is compounded by women of reproductive age. Thereupon often there is a question about safety treatment methods, that dictates necessity of an assessment of risk of development of recurrence of disease.

In present article attempt to define prognostic importance of markers of proliferative activity (ki67, cyclin D1, p21), and pro-and antiapoptotic markers (p53, bax, bcl-2, survivin) for definition potentially an aggressive behavior of ovarian borderline tumour.

Keywords: *ovarian borderline tumour, ki67, cyclin D1, p21, p53, bax, bcl-2, survivin.*

Виноградов Илья Игоревич – клин. ординатор патологоанатомического отделения МНИОИ им. П.А. Герцена.

125284, г. Москва, 2-Боткинский пр., д. 3.

E-mail: vinil1707@yandex.ru.

Завалишина Лариса Эдуардовна – д-р биол. наук, вед. науч. сотр. патологоанатомического отделения МНИОИ им. П.А. Герцена, проф. кафедры патологической анатомии РМАПО.

125284, г. Москва, 2-Боткинский пр., д. 3; ул. Поликарпова, д. 10/12.

Андреева Юлия Юрьевна – д-р мед. наук, вед. науч. сотр. патологоанатомического отделения МНИОИ им. П.А. Герцена, проф. кафедры патологической анатомии РМАПО

125284, г. Москва, 2-Боткинский пр., д. 3; ул. Поликарпова д.10/12.

E-mail: julandr@list.ru.

Ахидова Елена Владимировна – ст. лаборант подразделения лаборатории синтетических вакцин института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

117997 ГСП, г. Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

E-mail: akhidova@gmail.com.

Вольпина Ольга Марковна – д-р хим. наук, проф., руководитель подразделения лаборатории синтетических вакцин института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

17997 ГСП, г. Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

E-mail: volpina@ibch.ru.

Волкова Татьяна Даниловна – канд. хим. наук, науч. сотр. подразделения лаборатории синтетических вакцин института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

117997 ГСП, г. Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

E-mail: tdvol@mx.ibch.ru.

Короев Дмитрий Отарович – канд. хим. наук, науч. сотр. подразделения лаборатории синтетических вакцин института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

117997 ГСП, г. Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

E-mail: koroev@mx.ibch.ru.