

**В.А.Бондарева  
И.С.Шпонька**

Днепропетровская государственная медицинская академия

**Ключевые слова:** пролиферативный потенциал, прогностические маркеры, иммуногистохимические методы, биологические свойства опухоли, онкопротеин.

*Надійшла: 28.10.2006*

*Прийнята: 17.11.2006*

## **ЗНАЧЕНИЕ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕС- СИИ Ki-67 И P53 В ОПУХОЛЯХ МО- ЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

**Резюме.** Рост заболеваемости и частота инвалидизации больных на рак молочной железы предопределяет необходимость поиска новых диагностических мероприятий и прогностических маркеров, направленных на раннее установление заболевания, оптимизацию и индивидуализацию лечения пациенток с целью дальнейшего повышения качества жизни больных и их физической и социальной реабилитации. Целью нашего исследования была оценка экспрессии дополнительных важных маркеров биологического поведения опухоли p53-онкопротеина и Ki-67 (маркер пролиферации) у женщин разных возрастных групп, больных на рак молочной железы, с помощью иммуногистохимического метода. Было исследовано 300 женщин с комплексом с 5 маркеров (рецепторы к эстрогенам и прогестеронам - ER, Pg; эпидермальный фактор роста HER-2/neu; p53-онкопротеин, пресенилин p2), и 150 комплексов из 7 маркеров (дополнительно Ki-67, bcl-2). По нашим результатам пролиферативная активность клеток рака молочной железы с метастазами выше в сравнении с группой без метастазов. Кроме того, мы установили корреляцию положительного статуса по p53-онкопротеина с молодым возрастом. Таким образом, это разрешает использовать их как независимые прогностические маркеры, которые свидетельствуют о высоком метастатическом и инвазивном потенциале опухоли.

**Bondareva V.A., Shponka I.S. The importance of prognostic markers of tumor progression Ki-67 and p53 in the breast cancer**

**Summary.** The increase of morbidity and invalidization frequency of patients with the breast cancer stipulates a necessity to find of the new diagnostic ways and prognostic markers with the aim for early diagnostic, optimization and individual way of therapy that will allow to improve the quality of life, patients' physical and social rehabilitation. The purpose of our investigation was to estimate an expression of important biological markers of tumor's behavior – p53 and Ki-67 (proliferative markers) at women suffering from breast cancer of different age by immunohistochemical method. We have examined 300 women with 5 markers (estrogen and progesteron receptors - ER, PgR; human epidermal growth factor receptor HER-2/neu; p53-oncoprotein, presenolin pS2), and 150 women with 7 markers (additionally Ki-67, bcl-2). Our data suggests that the proliferative activity of breast cancer cells is higher at patients with metastasis. Besides, we have estimated correlation between young age of women and p53-positive status. Thus, it allows their using as independent prognostic markers which are evidence of high metastatic and invasive tumor potential.

**Key words:** proliferative potential, prognostic markers, immunohistochemical methods, biological properties of tumor, oncoproteins.

### **Введение**

Одним из механизмов опухолевой трансформации и прогрессии является нарушение регуляции клеточного цикла с ингибированием апоптоза и активацией пролиферации (Ермилова В.Д., 2002; Esteva F., Hortobagyi G., 2004; Goradini D., Diadone M., 2004). В связи с этим особенное значение имеет изучение протеинов, регулирующих клеточный цикл и иницирующих пролиферацию, таких как маркер пролиферации Ki-67, циклин E, циклин-зависимые киназы и др, а также протеинов-блокаторов – p53, bcl-2 (Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е., 2002; Allred D.C. et al., 1993; Thor A. et al., 1992; Elledge R. et al., 1997).

Степень злокачественности и дифференцировки РМЖ во многом определяется пролиферативной активностью опухолевых клеток, однако, традиционный подсчет митотической активности не отражает пролиферативный потенциал опухоли, так как собственно митоз занимает несколько часов (что может визуализироваться при рутинном исследовании), а подготовка к нему – около

24 часов, в связи с чем изучение негистонового протеина Ki-67 (маркера пролиферации), экспрессирующегося во всех клетках, вышедших из G0-фазы, представляется актуальным и позволяет определить именно "скрытый" пролиферативный потенциал данной опухоли и судить о степени злокачественности, а также разделить пациентов на группы с относительно благоприятным и неблагоприятным прогнозом (Keshgegian A., Snaap A., 1995; Molino A. et al., 1997).

Существует много способов визуализации и оценки пролиферативной активности клеток – подсчет митотического показателя при обычном гистологическом исследовании, анализ включения радионуклидов, иммуногистохимическое выявление пула пролиферирующих клеток и другие. Иммуногистохимическое определение пролиферативного индекса является на сегодняшний день наиболее оптимальным способом, удачно сочетающим высокую информативность и минимальные экономические затраты, поскольку маркеры выявляют не только клетки собственно в митозе,

но и клетки, находящиеся в процессе подготовки к делению и таким образом свидетельствуют о пролиферативном потенциале опухоли (Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., 2001; Петров С.В., Райхлин Н.Т., 2004; Dabbs D., 2002).

Пролиферативная активность в опухолях молочной железы в соответствии с рекомендациями Fitzgibbons et al. (2000) оценивается по градациям ( $\geq 1\%$ ,  $\geq 10\%$ ,  $\geq 20\%$  опухолевых клеток), в связи с чем экспрессия Ki-67 более чем в 20% опухолевых клеток рассматривается как крайне неблагоприятный фактор.

Накопление мутантного (mt) p53 свидетельствует об агрессивном поведении этой формы РМЖ, более коротком безметастазном и безрецидивным периоде, худшем прогнозе и более «жесткой» терапии (Семиглазов В.Ф., 2000; Surowiak P. et al., 2001; Ruibal A. et al., 2000). P53 также может использоваться в комплексном исследовании РМЖ в качестве независимого прогностического маркера, особенно у пациентов с интактными лимфоузлами и способствует отбору больных, потенциально чувствительных к химио- или лучевой терапии (Thor A. et al., 1992; O'Malley F. et al., 1994).

**Целью** нашего исследования явилась оценка регуляторных процессов пролиферации и апоптоза с изменением их соотношений в опухолях молочной железы пациенток, находившихся на лечении в городском, областном онкологических диспансерах г.Днепропетровска и в территориальном многопрофильном объединении №4. Нами был исследован биопсийный и операционный материал 300 комплексов из 5 маркеров (рецепторы к эстрогенам и прогестеронам - ER, PgR; эпидермальный фактор роста HER-2/neu; p53-онкопротеин, пресенилин pS2), и 150 комплексов из 7 маркеров (рецепторы к эстрогенам и прогес-

теронам - ER, PgR; эпидермальный фактор роста HER-2/neu; p53-онкопротеин, пресенилин pS2, Ki-67, bcl-2 (блок апоптоза), полученный в период с марта 2006 года до настоящего момента.

#### **Материалы и методы**

В нашей работе мы проанализировали уровень экспрессии Ki-67 и p53-онкопротеина в опухолях молочной железы у пациенток различных возрастных групп. Важное значение для всех дальнейших процедур имела правильная фиксация материала с использованием нейтрального 10% забуференного формалина непосредственно после забора материала (Петров С.В., Райхлин Н.Т., 2004; Dabbs D., 2002; Ikeda K., Inoue S., 2004). Срезы толщиной 4-5 мкм наносили на стекла, обработанные адгезивной жидкостью. Демаскировку антигенов производили путем нагревания срезов в цитратном буфере с pH=6,0 путем автоклавирования в течение 10 мин при достижении в буфере температуры 121°C при давлении 1 атм. Дальнейшая процедура осуществлялась согласно технологии и требованиям в спецификации, прилагающейся к каждому маркеру (Ki-67, клон MIB-1, DAKO; p53, клон DO-7, DAKO). После удаления первичных антител, мы применяли систему визуализации LSAB2 (биотинилированные антитела и пероксидазный комплекс), а в качестве хромогена использовали DAB (диаминобензидин). После иммуногистохимических реакций срезы дополнительно окрашивались гематоксилином Майера. Антигенные детерминанты к Ki-67 и p-53 располагались интрануклеарно, поэтому позитивными считали только те результаты, в которых были получены интенсивные ядерные реакции (рис.1.).

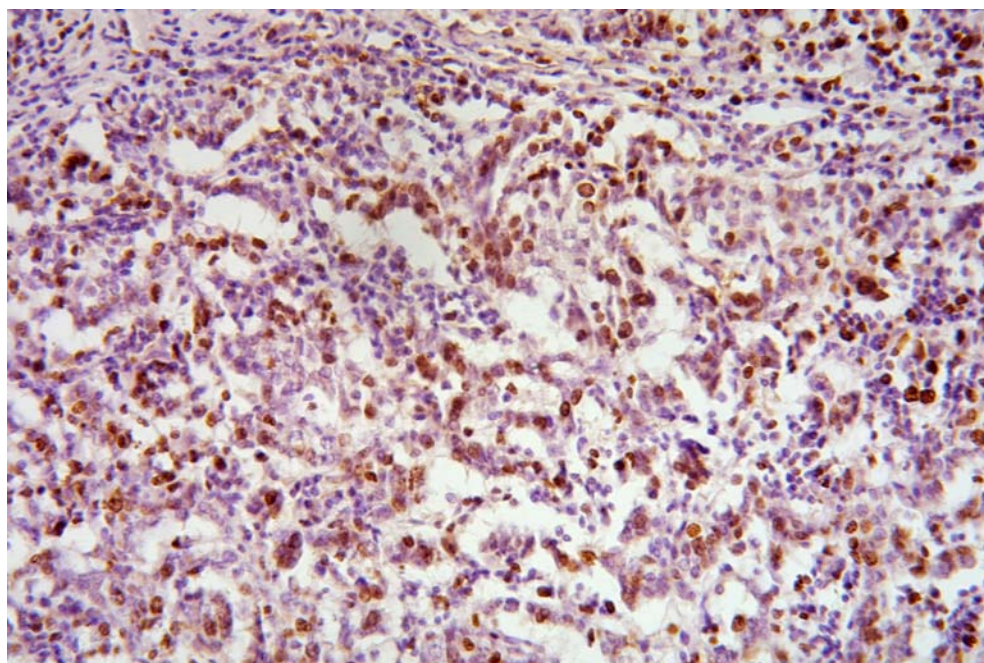


Рис.1. Яркая позитивная интрануклеарная реакция с Ki-67. Иммуногистохимический метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера.  $\times 400$ .

Стандарт оценки экспрессии p53 более сложен по сравнению со стероидными рецепторами и требует осторожной интерпретации, поскольку позитивный статус существенно влияет на терапевтические подходы. Мы пользуемся рекомендациями американской научно-исследовательской лабораторией, централизованной и контролирующей деятельность более чем 60 лабораторий мира (ARUP), в соответствии с которыми оценивается

интенсивность окрашивания ядер (аналогично стероидным рецепторам по 3 степеням). При окрашивании менее 5% ядер, вне зависимости от интенсивности, опухоль считается p53-негативной. P53-позитивным статус будет при: 1) окрашивании более 50% ядер вне зависимости от интенсивности; 2) интенсивном (3+) окрашивании более 5% ядер; 3) умеренном окрашивании от 10% до 50% ядер (рис.2).

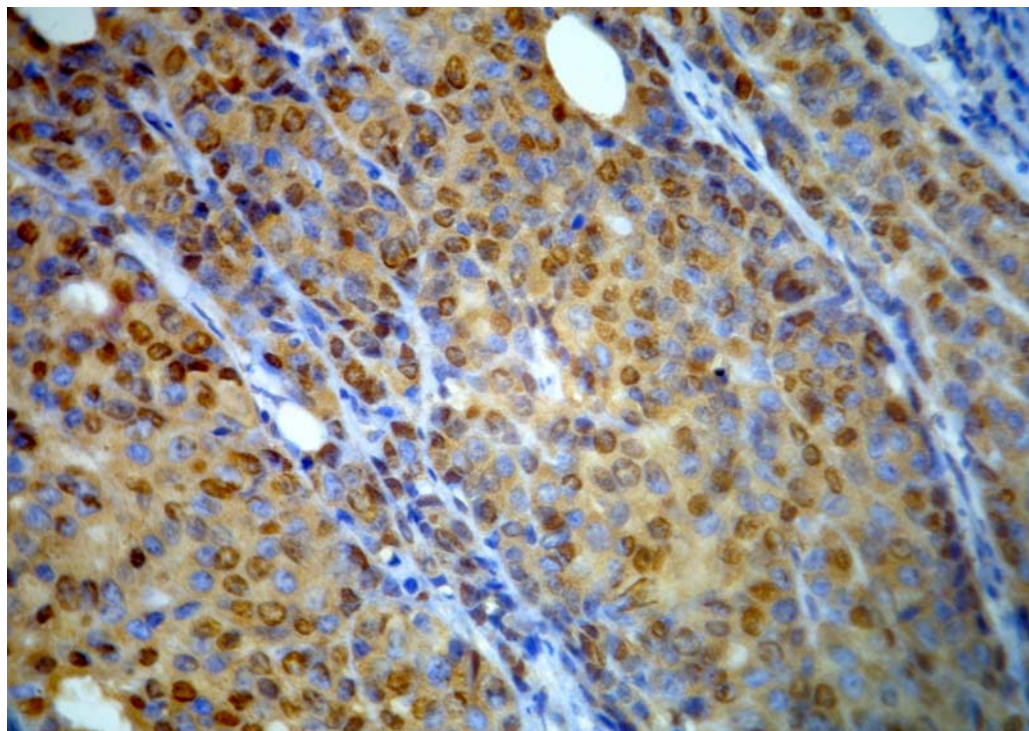


Рис.2. Яркая позитивная реакция с p53-онкопротеином. Иммуногистохимический метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера.  $\times 1000$ .

### Результаты и их обсуждение

При исследовании 300 комплексов из 5 маркеров и 150 из 7 маркеров (450) мы получили, что p53-позитивный статус РМЖ составлял 113 случаев (25,11%) (табл.1.).

Таблица 1.  
Распределение экспрессии p53-онкопротеина по возрастным группам.

Возрастная группа	P53+
до 30 лет	16 (48%)
От 31 до 40 лет	75 (39,2%)
От 41 до 60 лет	20 (9,8%)
старше 60 лет	58 (3%)
Всего	113 (25,11%)

Таким образом, имеет место корреляция позитивного статуса по p53-онкопротеину с молодым возрастом, а сам маркер является мощным независимым прогностическим фактором долгосрочного результата, возможно, вторым после метастазов в лимфоузлы.

Также нами было выявлено, что в опухолевой ткани молочной железы экспрессия Ki-67 отчетливо со склонностью опухоли к инвазии. Однако мы не выявили обратной зависимости между экспрессией Ki-67 и степенью дифференцировки в опухолях молочной железы, что только подтверждает целесообразность включения этого маркера в спектр антител при исследовании рака молочной железы (табл.2.).

Пролиферативная активность (ПА) клеток раков молочной железы с метастазами выше, чем в РМЖ без метастазов, что свидетельствует о том, что Ki-67 является независимым дополнительным прогностическим маркером, способствующим выделению пациенток в группы «риска».

При проведении сравнительного анализа операционного материала первичной опухоли и рецидива, выяснилось, что в этих случаях уровень Ki-67 превышал 10% в первичной опухоли и существенно повышался по сравнению с исходным значением в рецидиве.

Таблица 2.

Распределение экспрессии Ki-67 в зависимости от интенсивности окрашивания у лиц с наличием метастазов на момент обследования и без метастазов.

Интенсивность реакции	РМЖ с метастазами	РМЖ без метастазов	Σ
до 10%	2 (4,4%)	7 (6,8%)	9 (6%)
От 10% до 20%	6 (12,7%)	18 (17,4%)	24 (16%)
Свыше 20%	39 (82,9%)	78 (75,8%)	117 (78%)
Всего	47 (100%)	103 (100%)	15 (100%)

Высокие показатели различных маркеров опухолевой пролиферации (высокий пролиферативный индекс, III степень гистологической злокачественности, уровень экспрессии Ki-67 более 20%) ассоциируются с большей вероятностью полного регресса опухоли в ответ на химиотерапию. Тем не менее отмечалось, что в случаях, когда высокий митотический индекс и показатель Ki-67 ассоциированы с мутацией гена p53, вероятность значительного эффекта неoadъювантной химиотерапии крайне низка, а отдаленные результаты лечения значительно ухудшаются.

#### Заключение

В целом, суммируя вышеизложенные данные, можно предположить, что степень агрессивности клинического течения РМЖ и ПА первичного опухолевого узла взаимосвязаны: чем больше ПА, тем короче интервал от первичного лечения до прогрессирования, и от начала прогрессирования до смерти больной. Следовательно, ПА претендует на роль важного показателя времени безрецидивного периода и общей продолжительности жизни больных РМЖ в качестве дополнительного предсказательного фактора в отношении клинического течения заболевания.

Таким образом, гиперэкспрессия p53 и Ki-67 в опухолях молочной железы сопровождалась выраженным инвазивным ростом, низкой степенью дифференцировки и ранним метастазированием. В силу того, что корреляции между экспрессией p53 и Ki-67 не выявлено, это позволяет расценивать их как независимые прогностические маркеры при раке молочной железы, свидетельствующих о высоком метастатическом и инвазивном потенциалах.

#### Перспективы дальнейших разработок

Приведенные выше взгляды на оценку дополнительных маркеров биологических свойств опухоли для оптимизации и индивидуализации медикаментозной терапии рака молочной железы активно используются при определении тактики лечения в онкологических клиниках г. Днепропетровска. На сегодняшний день нельзя говорить о реальной эффективности такого подхода, поскольку иммуногистохимическое исследование опухоли лишь недавно приобрело статус стандарта обследования, что предполагает постоянное динамическое отслеживание.

#### Литературные источники

Ермилова В.Д. Роль современной патоморфологии в характеристике рака молочной железы // *Практ. онкол.*- 2002.- Т.3, №1.- С.15-20.

Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Тканевые маркеры как факторы прогноза при раке молочной железы // *Практ. онкол.*- 2002.- Т.3, №1.- С.38-44.

Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С. Современные возможности молекулярно-биохимических методов оценки биологического «поведения» рака молочной железы // *Вестн. РАМН.*- 2001.- №9.- С.65-70.

Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека.- Казань, 2004.- 452 с.

Семиглазов В.Ф. Значение прогностических и предсказывающих факторов при выборе лечения у больных метастатическим раком молочной железы // *Практ. онкол.*- 2000.- №2.- С.26-30.

Accumulation of mutant p53 is associated with increased proliferation and poor clinical outcome in node negative breast cancer / Allred D. et al. // *J. Natl. Cancer Inst.*- 1993.- Vol.85.- P.200-206.

Accumulation of p53 tumor suppressor gene pro-

tein: an independent marker of prognosis in breast cancers / Thor A.D. et al. // *J. Natl. Cancer Inst.*- 1992.- №84.- P.845-855.

Analysis of five-year course of the disease / Surowiak P. et al. // *Folia Histochem. Cytobiol.*- 2001.- Vol.39, №2.- P.143-144.

bcl-2, p53, and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group study / Elledge R.M. et al. // *J. Clin. Oncol.*- 1997.- Vol.15.- P.1916-1922.

Clinico-biological impact of pS2 positivity in estrogen receptor negative-infiltrating ductal carcinomas of the breast / Ruibal A. et al. // *Rev. Esp. Med. Nucl.*- 2000.- Vol.19, №6.- P.428-433.

Dabbs D. *Diagnostic immunohistochemistry.*- Churchill Livingstone, 2002.- 676 p.

Esteva F., Hortobagyi G. Prognostic markers in early breast cancer // *Breast Cancer Res.*- 2004.- Vol.6, №3.- P.109-118.

Goradini D., Diadone M. Biomolecular prognostic factors in breast cancer // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*- 2004.- Vol.16., №1.- P.49-55.

Ikedo K., Inoue S. Estrogen receptors and their

downstream targets in cancer // Arch. Histol. Cytol.- 2004.- Vol.67, №5.- P.435-442.

Keshgegian A., Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma: mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1 // Am. J. Clin. Pathol.- 1995.- Vol.104.- P.42-49.

Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: association with clinical and pathological variables and prognosis / Molino A., Micciolo R., Turazza M. et al. // Int. J. Cancer.- 1997.- Vol.74.-

P.433-437.

P53 mutations are confined to the comedo type ductal carcinoma in situ of the breast: immunohistochemical and sequencing data / O'Malley F. et al. // Lab. Invest.- 1994.- №71.- P.67-72.

Prognostic Factors in Breast Cancer / Fitzgibbons M. et al. // Arch. Pathol. Lab. Med.- 2000.- Vol.124.- P.966-978.

Wysocki S., Iacopetta B., Ingram D. Prognostic significance of pS2 mRNA in breast cancer // Eur. J. Cancer.- 1994.- Vol.30A, №12.- P.1882-1884.

### **Бондарєва В.О., Шпонька І.С. Значення прогностичних маркерів пухлинної прогресії Ki-67 и P53 у пухлинах молочної залози.**

**Резюме.** Ріст захворюваності та частота інвалідизації хворих на рак молочної залози зумовлює необхідність пошуку нових діагностичних заходів та прогностичних маркерів, спрямованих на раннє встановлення захворювання, оптимізацію та індивідуалізацію лікування пацієнток з метою подальшого підвищення якості життя хворих та їх фізичною і соціальною реабілітацією. Метою нашого дослідження була оцінка експресії додаткових важливих маркерів біологічної поведінки пухлини p53-онкопротеїну та Ki-67 (маркер проліферації) у жінок різних вікових груп, хворих на рак молочної залози, за допомогою імуногістохімічного методу. Було досліджено 300 жінок із комплексом з 5 маркерів (рецептори до естрогенів та прогестеронів - ER, PgR; епідермальний фактор росту HER-2/neu; p53-онкопротеїн, пресенілін pS2), та 150 комплексів із 7 маркерів (додатково Ki-67, bcl-2). За нашими результатами проліферативна активність клітин раку молочної залози із метастазами вища у порівняннях із групою без метастазів. Крім того, ми встановили кореляцію позитивного статусу по p53-онкопротеїну із молодим віком. Таким чином, це дозволяє використовувати їх як незалежні прогностичні маркери, що свідчать про високий метастатичний та інвазійний потенціал пухлини.

**Ключові слова:** проліферативний потенціал, прогностичні маркери, імуногістохімічні методи, біологічні властивості пухлини, онкопротеїни.