

*М.Р. Кайрбаев, Ж.К. Чингисова, Е.К. Кукубасов, Р.Ш. Шалбаева, Ж. Досаханов*  
*Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии,*  
*г. Алматы, Казахстан*

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ РАКА ШЕЙКИ И ТЕЛА МАТКИ КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

### ТҰЖЫРЫМДАМА

Адьюванты емес полихимиотерапиялы, хирургиялық және операциядан кейінгі сәуле терапиясы көлемінде комплексті ем жүргізілген жатыр денесі және жатыр мойнының қатерлі ісігімен ауырған науқастардың өмір сүру ұзақтығына талдау жүргізілді. Онкогинекологиялық сырқаттың негізгі клиникалық белгілерімен қатар болжаудың шешуші көрсеткіші болып: жатыр денесінің қатерлі ісігі кезінде - рецепторлық статустың жағдайын гормональдық рецепторлар бойынша эстрогендер мен прогестерондар, эпидермальды өсу факторы HER2/neu, пролиферация

факторлары Ki67 және апоптоз p53, CA-125 ісік маркерінің денгейі; жатыр мойны қатерлі ісігі кезінде - иммуногистохимиялық маркерлерді анықтау – апоптойдты протейн p53 және bcl-2. CA-125 және РЭА ісік маркерлерінің сезімталдығы мен ерекшелігі жергілікті таралған жатыр мойны қатерлі ісігі кезінде төмен болады.

**Маңызды сөздер:** онкогинекологиялық қатерлі ісік, жатыр денесі және жатыр мойны қатерлі ісігі, қатерлі ісікпен ауырған науқастардың өмір сүру ұзақтығы, болжау факторлары, молекулярлы маркерлер.

### ABSTRACT

The survival of patients with uterine and cervical cancer, who had had the treatment in the volume of neoadjuvant chemotherapy, surgery and postoperative radiation therapy was analyzed.

It was revealed, that along with the main clinical signs of gynecological cancer disease forecasting key metrics are: in case of uterine cancer- state of receptor status of hormonal estrogen and progesterone,

epidermal growth factor HER2/neu, factors of Ki67 proliferation and apoptosis in p53, levels of tumor markers-apoptotic proteins p53 and BCL-2. The tumor markers CA-125 and СЭА have low sensitivity and specificity in case of locally advanced cervical cancer.

**Keywords:** oncogynecological cancer, with uterine and cervical cancer, the survival rate of patients with cancer, prognostic factors, molecular markers.

### ВВЕДЕНИЕ

В течение последних 10 лет активно изучаются различные молекулярные маркеры при раке тела и шейки матки [1]. Многие из них являются достаточно значимыми независимыми прогностическими и предсказательными факторами, а некоторые имеют значение при выборе схем противоопухолевой терапии этого заболевания. В исследованиях российских ученых изучались циклооксигеназы

(COX-2, COX-1), муцины (MUC-1, MUC-2), рецепторы эстрогенов (ER) и прогестерона (PR), антиген Ki-67, онкобелок HER2/neu при самой распространенной разновидности рака тела матки — эндометриальной аденокарциноме [2]. Для оценки эффективности лучевой терапии при раке шейки матки проводили иммуногистохимическое изучение пролиферативной активности и репаративной способ-

ности ДНК клеток опухоли по экспрессии маркеров Ki-67, Ku-70, Ku-86, онкобелков p53, HER2, c-myc [3,4]. Gaffney et al. выполняли иммуногистохимическое определение рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR), эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF), топоизомераза- $\alpha$  альфа (ТОРО- $\alpha$ ), и циклооксигеназу-2 (COX-2) в тканях опухоли больных карциномой шейки матки, оценивали потенциальные связи между их экспрессией и прогнозом заболевания [5]. Многофакторный анализ выявил влияние повышенной экспрессии VEGF и COX-2 на отрицательный прогноз заболевания, который заключался в повышении относительного риска смерти. В литературе наиболее часто упоминается об изучении следующих маркеров: антигена плоскоклеточного рака (SCC), раково-эмбриональ-

ного антигена (РЭА), CA-125 и CYFRA21-1. Molina et al. оценили содержание SCC, CEA, CYFRA 21-1 у больных инвазивным раком шейки матки. Они выявили их повышенные уровни в 43%, 25% и 26% случаев, соответственно. При этом авторы отмечают, что последние два маркера не добавляют к диагностической ценности антигена SCC [6]. Другие авторы [7] обнаружили повышенное содержание CA-125 у 21% больных, при этом они предполагают о невысокой чувствительности и специфичности данного маркера.

Таким образом, современные данные иммуногистохимического изучения гинекологического рака указывают на целый ряд факторов, влияющих на поведение опухоли, ее чувствительность к лечебным воздействиям и исход заболевания.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клинический материал исследования составили 35 больных раком тела (РТМ) и 27 раком шейки матки (РШМ). Всем больным проводилось комплексное лечение в объеме неoadъювантной полихимиотерапии, хирургического лечения и послеоперационной дистанционной лучевой терапии.

У больных раком эндометрия определялись рецепторы эстрогенов, прогестерона и HER-2/neu, BCL, Ki67, p53. У пациентов раком шейки матки определены рецепторы С-erbB-2, маркеры пролиферативной активности Ki67, белков апоптоза bcl-2 и p53. Использовались моноклональные антитела производства DAKO Cytomation (Дания): Her2/neu (Hercept Test), Estrogen Receptor (Clone 1D5), Progesterone Receptor (Clone PgR 636), BCL2 (Clone 124), P53 (Clone Do7), Ki67 (Clone MIB1).

В венозной крови больных радиоиммунологи-

ческим методом определялись опухолевые маркеры CA125 и РЭА коммерческими наборами для радиоиммунного и радиометрического анализа фирм «Immunotech» (Чехия), «DSL» (США) и «Orion» (Финляндия). Статистическая обработка материала проводилась методом общей и корреляционной статистики с использованием компьютерного статистического пакета программы SPSS for Windows (версия 15.0).

Корреляционный анализ проведен с вычислением парных коэффициентов Пирсона и Спирмана (для малых выборок). Анализ выживаемости проведен с помощью актуального метода (Life tables) и метода Kaplan-Meier, а влияние изучаемых параметров на показатели выживаемости [8,9] изучено с помощью регрессионной модели пропорционального риска Кокса (Cox regression).

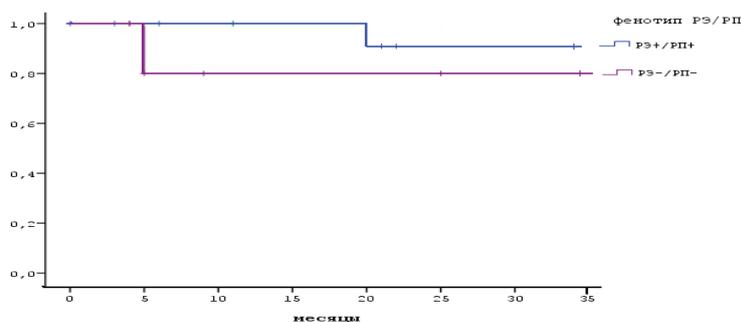
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Прослежены результаты лечения больных раком тела матки в зависимости от различных факторов заболевания. Общеизвестно, что подавляющее большинство случаев прогрессирования заболевания и смертности от рака эндометрия приходится на первые три года жизни после лечения. Результаты лечения при наблюдении больных РТМ в течение 3 и 5 лет не показали существенных различий в показателях, поэтому трехлетний период считается основным в отдаленных результатах лечения больных РТМ.

Показатель безрецидивной выживаемости в группе комплексного лечения больных раком тела матки составил  $70,2 \pm 1,3\%$ . Рассмотрены результаты выживаемости в зависимости от рецепторного статуса опухоли. Анализ выживаемости в зависимости от содержания гормональных рецепторов (РЭ/РП) в опухоли эндометрия показал, что при позитивных опухолях на наличие рецепторов эстрогенов (РЭ) выживаемость достигала 98,6%,

при положительных рецепторах прогестерона (РП)  $91,2 \pm 3,5\%$ . Отрицательное содержание РЭ снижало пятилетнюю выживаемость на 23%. Тогда как негативное содержание РП уменьшало результаты до  $78,3 \pm 4,8\%$ . При чисто эндокринном фенотипе РЭ+/РП+ пятилетняя выживаемость достаточно высока ( $96,2 \pm 3,3\%$ ) по сравнению с отрицательным фенотипом РЭ-/РП- ( $76,8 \pm 3,9\%$ ) ( $p < 0,05$ ) (рисунки 1).

Отмечено влияние экспрессии эпидермального фактора роста HER-2/neu на пятилетние результаты больных РТМ. Показано значительное ее уменьшение при увеличении экспрессии онкопротеина. При отрицательном результате выявления HER-2-рецепторов (0 и 1+) выживаемость составляет  $81,6 \pm 3,5\%$ . При положительной экспрессии HER2/neu (2+) выживаемость снижается до  $71,3 \pm 4,2\%$ . В случае выявления гиперэкспрессии онкобелка HER-2/neu выживаемость снижается до  $50,0 \pm 5,4\%$ .



**Рисунок 1 – Общая выживаемость при раке тела матки в зависимости от уровня гормонального рецепторного фенотипа опухоли (Kaplan&Meier)**

Оценка безрецидивной выживаемости больных РТМ в зависимости от экспрессии фактора пролиферации Ki67 показала, что высокая пролиферативная активность (34% и более) оказала неблагоприятное влияние на результаты. Показатель трехлетней выживаемости у больных с низкой пролиферативной активностью (0-33%) составил  $80,8 \pm 3,3\%$  против  $57,9 \pm 5,4\%$  при пролиферативной активности 34% и более ( $p < 0,05$ ). Не выявлено достоверного влияния экспрессии p53 и BCL2 на отдаленные результаты лечения больных РТМ. Изучены пятилетние показатели выживаемости в зависимости от исходного уровня опухолевых маркеров СА125 и РЭА. Выявлено, что большей прогностической значимостью в отношении выживаемости больных раком тела матки имеет опухолевый маркер СА125. При повышенном исходном уровне его выше нормальных значений (30 МЕ/мл и более) показатель общей пятилетней выживаемости снижался до  $76,2 \pm 3,5\%$ .

Установление экспрессии эпидермального фактора роста HER-2/neu, а также фактора пролиферации Ki имеет прогностическое значение при раке тела матки. Обнаружение положительной и особенно сверхэкспрессии онкопротеина HER-2/neu приводит к раннему проявлению прогрессирования заболевания и снижает показатели пятилетней выживаемости до 50%. Выявление высокой экспрессии фактора пролиферации Ki67 снижает выживаемость больных до 57,9%. В отношении влияния факторов апоптоза при раке эндометрия в исследованиях не выявили прогностического значения BCL2-фактора на отдаленные результаты. Влияние экспрессии p53 в качестве независимого прогностического фактора требует дальнейшего изучения.

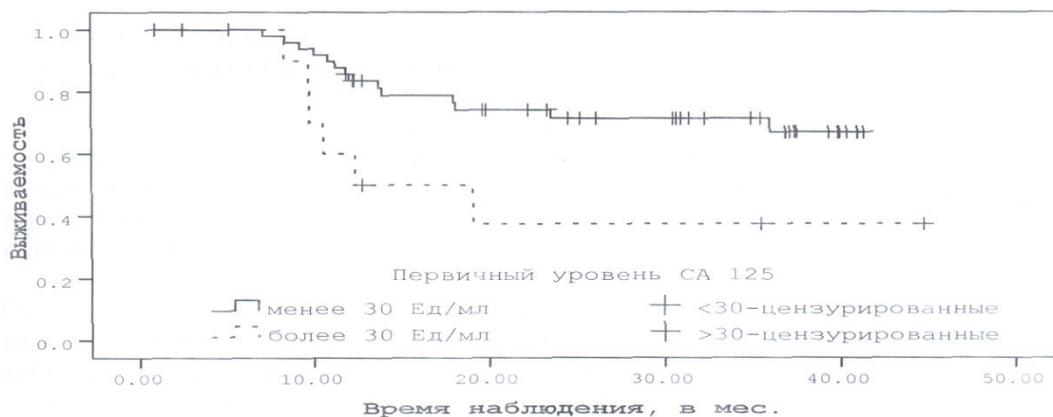
У больных РШМ было повышение уровня РЭА в 65,1% случаев по сравнению с уровнем РЭА у здоровых лиц ( $0,5 \pm 0,1$  нг/мл), а уровень СА 125 был повышен у 46,0% по сравнению с сывороточным содержанием СА 125 в контрольной группе ( $12,4 \pm 1,2$  Ед/мл).

Изучение выживаемости больных местнораспространенным РШМ в зависимости от исходного содержания опухолевого маркера СА125 в сыворотке крови (рисунок 2) выявило, что при исходных нормальных показателях СА125 (менее 30 Ед/мл) 4-летняя выживаемость составила  $66,8 \pm 7,3\%$ , а при уровнях СА125 выше 30 Ед/мл этот показатель равен  $37,5 \pm 6,1\%$  ( $t=3,08$ ;  $p < 0,01$ ). Установлено, что

исходные уровни опухолевых маркеров повышены лишь у незначительного количества больных местнораспространенным РШМ - 21,2% для СА125 и 17,2% для РЭА относительно стандартного норматива. Однако, эти данные повышены у значительно большего количества пациенток относительно показателей здоровых лиц - 46,0% для СА125 и 65,1% для РЭА. Кроме того, выявлено достоверное снижение показателей СА125 и РЭА в процессе терапии. Отмечена прямая корреляционная связь средней силы между уровнями РЭА и СА125 при местнораспространенном РШМ до лечения (коэффициент корреляции  $r=0,4$  при  $p=0,002$ ). Несмотря на то, что исходный уровень СА125 был повышен у относительно небольшого количества пациенток, выявлено неблагоприятное прогностическое значение его исходных, превышающих 30 Ед/мл, заключающееся в низкой 4-летней выживаемости по сравнению с больными, у которых исходные показатели СА125 были меньше 30 Ед/мл. Для изучения клинической значимости иммуногистохимического выявления экспрессии некоторых апоптотических белков (p53, bcl-2), белков пролиферации (Ki67) и фактора роста (c-erbB-2) проведено их определение в тканях опухоли больных местнораспространенным РШМ. Сроки наблюдения варьировали от 9,5 до 53 месяцев, медиана наблюдения 5 лет в целом не достигнута, поэтому выживаемость рассчитана на фактическое время наблюдения. Показатель 4-летней выживаемости в данной группе пациентов составил 65,7%.

Оценка отдаленных результатов терапии в зависимости от содержания рецепторов bcl-2 и p53 позволила вывить новые значимые результаты. Используя порог значения в 10% положительно окрашенных ядер, белок p53 показал свою достоверную отрицательную прогностическую значимость на течение заболевания. Таким образом, установлена тенденция достоверности p53 как важного прогностического фактора именно при данном пороговом значении, поскольку при пороговых показателях в 5% достоверного влияния на прогноз болезни иммуногистохимического маркера p53 не выявлено.

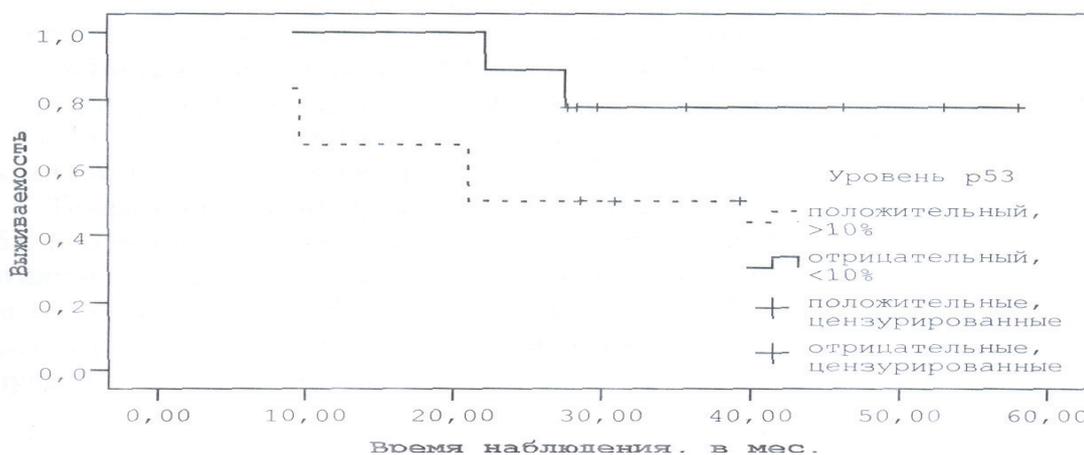
Из рисунка 3 видно, что кривые выживаемости значительно отличаются друг от друга при наличии более 10% и менее 10% положительных рецепторов p53 в цитозоле опухоли. 4-летняя выживаемость при отрицательном статусе опухолевой ткани на p53 составила  $77,8 \pm 9,6\%$  и  $50,0 \pm 9,4\%$  при окрашивании более 10% ядер ( $p < 0,05$ ).



**Рисунок 2 - Кривые выживаемости больных местнораспространенным раком шейки матки в зависимости от содержания сывороточного CA125 (по Kaplan-Meier)**

Анализ уровня содержания иммуногистохимического маркера bcl-2 выявил его достоверное влияние на показатели общей выживаемости (рисунок 4). Так, при уровне экспрессии рецеп-

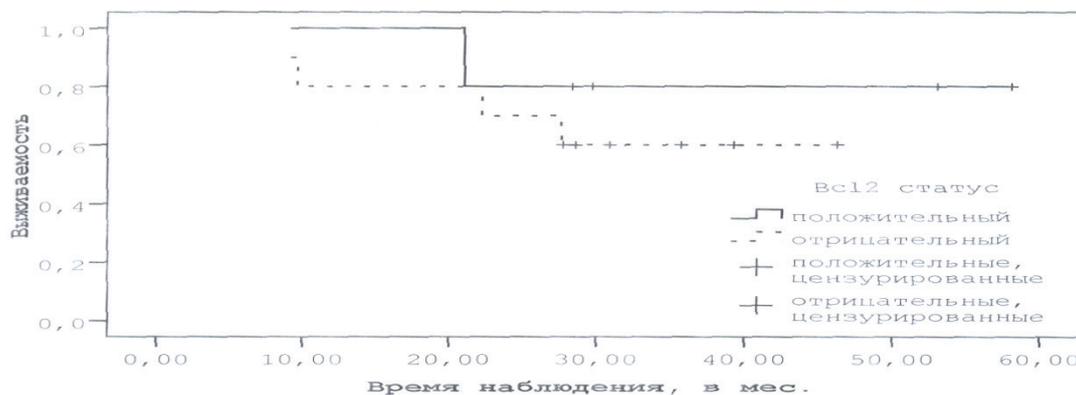
торов bcl-2 более 10% выживаемость больных РШМ оказалась достоверно лучше -  $80,0 \pm 7,9\%$  против  $60,0 \pm 5,5\%$  при окрашивании менее 10% ядер.



**Рисунок 3 - Кривая выживаемости больных раком шейки матки в зависимости от экспрессии рецепторов p53 в опухолевой ткани (по Kaplan-Meier)**

Таким образом, иммуногистохимическое определение маркеров bcl-2 и p53 в опухолевой ткани при местнораспространенном раке шейки матки позволило выявить новые значимые факторы прогноза. Прогноз вы-

живаемости при bcl-2-положительных и p53-отрицательных опухолях достоверно лучше. Причем значимым порогом для оценки прогноза в данном случае является окрашивание более 10% ядер.



**Рисунок 4 - Кривая выживаемости больных местнораспространенным раком шейки матки в зависимости от экспрессии рецепторов bcl-2 в опухолевой ткани (по Kaplan-Meier)**

**ЛИТЕРАТУРА:**

1. К.М. Пожарисский. Иммуногистохимический профиль эндометриоидной аденокарциномы тела матки // *Арх. патол.* - 2005. – № 2. – С. 13-17.
2. Т.С.Разоренова, Е.А.Самсонова, К.М.Пожарисский и др. Математический анализ прогностической значимости клинико-морфологических и иммуногистохимических факторов при эндометриоидной аденокарциномы тела матки // *Вопр. онкологии.*- 2007.- Т. 53, № 6. – С. 682-689.
3. Н.А.Гаспарян, К.М.Пожарисский, Г.М.Жаринов и др. Иммуногистохимическое изучение предсказательного значения онкобелков p53, HER2, c-тус при лучевой терапии плоскоклеточного рака шейки матки // *Вопр. онкол.* – 2007. - Т. 53. - С. 439-444.
4. Н.А.Болдарян, К.М.Пожарисский, В.Л.Винокуров и др. Прогностическое значение уровня экспрессии циклооксигеназ (COX-1, COX-2) при раке эндометрия (клинико-иммуногистохимическое исследование) // *Вопр. онкол.* - 2008. - Т. 54. - С. 40-46.
5. Gaffney D.K., Haslam D., Tsodikov A. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*- 2003-Vol.56.-P.922-928
6. Molina R., Filella X., Auge J.M. et al. CYFRA 21.1 in patients with cervical cancer: comparison with SCC and CEA // *Anticancer Res.*-2005.- Vol.25.-P.1765-1771
7. Takeda M., Sakuragi N., Okamoto K. et al. Preoperative serum SCC, CA125, and CA9-9 levels and lymph node status in squamous cell carcinoma of the uterine cervix // *Acta Obstet Gynecol. Scand.* – 2002.- Vol.81.-P.451-457
8. Kaplan E.L., Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations // *J. Amer. Stat. Assoc.* - 1958. – Vol. 53. – P. 457-481.
9. В.М.Мерабишвили. Выживаемость онкологических больных. - СПб, 2006. – 437 с.