

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ p53 И c-erbB-2 ОНКОПРОТЕИНОВ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

ШУЛЬГА А.В., БАСИНСКИЙ В.А., САВИЦКИЙ С.Э.

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

УОЗ «Гродненская областная клиническая больница»

Резюме. В 69 случаях первичного рака яичников с помощью иммуногистохимического метода изучена экспрессия p53 и c-erbB-2 онкопротеинов. При серозном гистологическом типе выявлена зависимость экспрессии p53 от клинической стадии, наличия метастазов и общей пятилетней выживаемости больных. Гиперэкспрессия c-erbB-2 была связана со снижением пятилетней общей и безрецидивной выживаемости. При эндометриоидном и светлоклеточном гистологических типах новообразования данные маркеры не имели прогностической ценности.

Ключевые слова: рак яичников, иммуногистохимия, p53, c-erbB-2, прогноз

Abstract. Expression of p53, c-erbB-2 oncoproteins was investigated with immunohistochemical method in 69 cases of primary ovarian carcinoma. In serous histological type p53 expression dependence on clinical stage, presence of metastases and general five-year survival period of patients was revealed. Overexpression of c-erbB-2 was associated with decreased general five-year and disease-free survival periods. In endometrioid and clear cell histological types of cancer these markers were of no prognostic value.

Key words: ovarian cancer, immunohistochemistry, p53, c-erbB-2, prognosis

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 230015, Гродно, ул. Горького, 80, УО «Гродненский государственный медицинский университет» кафедры патологической анатомии, тел. 8(0152) 43-34-57 - Шульга А. В.

Введение. Рост заболеваемости и высокая частота смертельных случаев предопределяет необходимость поиска дополнительных прогностических маркеров рака яичников (РЯ) и внедрения их в практическое здравоохранение для оптимизации и индивидуализации лечения больных.

Ген p53 – наиболее известный супрессор опухолей, играющий ключевую роль в клеточном цикле и развитии апоптоза, получивший символическое название «хранитель генома». При мутации p53 клетки вынуждены входить в клеточный цикл с поврежденной и нерепарированной ДНК, поэтому их деление становится неуправляемым процессом [1]. В норме белок p53, кодируемый одноименным геном, живет приблизительно 20 минут, так как быстро деградирует в протеосомах и поэтому в клетках большинства тканей находится на пороге детекции. Мутантный тип p53 (mt p53) существует от нескольких часов до дней и накапливается в ядрах опухолевых клеток [2]. Считается, что иммуногистохимическая (ИГХ) положительная реакция практически полностью зависит от наличия именно mt p53. Высокая частота поломок гена p53 при онкологических заболеваниях предопределяет повышенный интерес к данной проблеме и в настоящее время. Известно, что приблизительно в 50% первичных новообразований человека отмечаются мутации p53, а в злокачественных опухолях яичников мутации данного гена могут достигать 75-80% [1, 3].

Her-2/neu (c-erbB-2) входит в семейство тирозинкиназных рецепторов, состоящее из 4 функционально взаимосвязанных рецепторных молекул, играющих важную роль в пролиферации, апоптозе и дифференцировке клеток, а также влияющих на работу ряда сигнальных каскадов [2].

В настоящее время определение HER2-статуса широко используется при раке молочной железы, где гиперэкспрессию указанного маркера определяют с помощью ИГХ метода и при ее наличии для лечения с успехом используется моноклональное антитело – трастузамаб. При неопределенном ИГХ HER2-статусе требуются исследования, выявляющие наличие амплификации гена:

хромогенная *in situ* гибридизация гена (CISH) или дорогостоящий, но более чувствительный метод флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) [4].

Публикации, посвященные изучению p53 и c-erbB-2 в РЯ, часто носят противоречивый характер. Большинство исследователей отмечают гиперэкспрессию указанных маркеров в РЯ по сравнению с доброкачественными, пограничными опухолями [5]. Некоторые авторы отмечают связь экспрессии p53 со степенью дифференцировки [3], клинической стадией [6], гистологическим типом [7], выживаемостью [6], а также чувствительностью к химиотерапии [8]. В других работах отрицается связь с данными клинико-морфологическими параметрами [9, 10, 11].

Наличие положительной реакции с антителами к c-erbB-2 в новообразованиях яичников по данным различных авторов регистрируется до 70% случаев [10]. Большинство исследователей связывают гиперэкспрессию c-erbB-2 с более агрессивным поведением опухоли, наличием метастазов, низкой степенью дифференцировки, снижением общей и безрецидивной выживаемости [8, 11, 12], тогда как в других работах не находят связь данного маркера с продолжительностью жизни у больных РЯ, а также основными клиническими и морфологическими признаками [13]. Только в единичных публикациях проведена сравнительная характеристика экспрессии c-erbB-2 в РЯ разных гистологических типов, где данные носят разрозненный характер [9,14].

Цель исследования: провести сравнительный анализ экспрессии p53 и c-erbB-2 опухолевыми клетками в РЯ разных гистологических типов, степени дифференцировки и клинической стадии.

Материал и методы

Исследование выполнено на архивном гистологическом материале 69 больных, оперированных по поводу РЯ в Гродненском областном онкологическом диспансере в период с 1999 по 2002 г. Анализ гистологических срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, проводился согласно классификации ВОЗ (2003). Средний возраст в исследуемой группе составил

56,9±1,2 года. В послеоперационном периоде у большинства женщин (87%) были проведены стандартные режимы комбинированной химиотерапии.

Наиболее частым гистологическим типом РЯ был серозный (49), в 8 наблюдениях выявлена эндометриоидная аденокарцинома, в 7 случаях – светлоклеточный рак, а в 5 – муцинозный вариант новообразования. При этом в 14 наблюдениях степень дифференцировки рака была отнесена к G1, в 35 – к G2, а в 20 – к G3. Первая стадия, согласно классификации FIGO, была установлена у 15 женщин, вторая – у 12, а генерализация процесса наблюдалась в 42 случаях (третья стадия – 37, четвертая – 5). Общая пятилетняя выживаемость в исследуемой группе составила 27,5%.

ИГХ исследование материала проводили на серийных парафиновых срезах по стандартной методике с использованием мышиных моноклональных антител к p53 (клон D0-7, разведение 1:100, "Dako") и поликлональных кроличьих антител к c-erbB-2 (разведение 1:300, "Dako", A0485). Демаскировку антигенов осуществляли при 98°C в водяной бане в течение 40 мин., применяя цитратный буфер (pH 6,0). В качестве детекционной системы использовали EnVision. Проводили положительные и отрицательные контрольные реакции.

Для оценки ядерной экспрессии p53 использовали индекс метки (ИМ), высчитывая процент позитивно окрашенных опухолевых клеток от общего количества в зонах с наибольшим их содержанием (позитивной считали реакцию при коричневой окраске более 10% ядер опухолевых клеток). Подсчет мембранной экспрессии c-erbB-2 проводили согласно общепринятой балльной системе Herceptest™ (0, 1+, 2+, 3+). Для оценки количества и степени окрашивания клеток использовали программы WCIF ImageJ и Aperio Image Scope. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Анализ данных ИГХ исследований показал, что положительная реакция с антителами к c-erbB-2 была выявлена в 24 (34,7%) случаях РЯ и проявлялась мембранным и цитоплазматическим окрашиванием различной степени

интенсивности, при этом выраженная реакция была более характерна для папиллярных структур, чем для солидного компонента опухоли. Оценивалась только мембранная локализация продуктов реакции: в 10 (14,5%) наблюдениях отмечалась экспрессия 1+, в 11 (15,9%) новообразованиях – 2+, а 3+ регистрировалась только в 3 (4,3%) опухолях. Таким образом, гиперэкспрессия (2/3+) указанного маркера была выявлена в 20,3% случаев. Экспрессия *mt p53* была обнаружена в 62,3% (43 из 69) случаев РЯ. Окрашивание наблюдалось в ядрах опухолевых клеток, при этом реакция с антителами к данному онкопротеину отсутствовала в других клетках (стромальных, эндотелиальных, лимфоцитах). Следует отметить, что гиперэкспрессия *mt p53* чаще всего наблюдалась в серозных опухолях поздних клинических стадий (78,4%, ИМ = $45,2 \pm 5,7\%$), а отсутствие данного маркера – в эндометриоидном и светлоклеточном гистологических типах РЯ (62,5% и 57,1%, соответственно). Гиперэкспрессия *c-erbB-2* в большем проценте случаев по сравнению с общей группой была характерна для светлоклеточного рака (42,9%), а при эндометриоидном варианте – не наблюдалась (табл. 1).

Таблица 1

Экспрессия биомолекулярных маркеров в зависимости от гистологического типа и клинической стадии рака яичников

Гистологический тип, стадия (ст.)	Маркер					
	P53			CerB-2		
	$\leq 10\%$	$> 10\%$	ИМ, % $M \pm m$	0	1+	2/3+
Серозный, 1-2 ст.	7 (58,3)*	5 (41,7)	$25,4 \pm 8,3$	9 (75)	2 (16,7)	1 (8,3)
Серозный, 3-4 ст.	8 (21,6)	29 (78,4)	$45,2 \pm 5,7$	23 (62,2)	5 (13,5)	9 (24,3)
Эндометриоидный	5 (62,5)	3 (37,5)	$13,6 \pm 5,9$	7 (87,5)	1 (12,5)	0
Светлоклеточный	4 (57,1)	3 (42,9)	$24,6 \pm 12,5$	2 (28,6)	2 (28,6)	3 (42,9)
Муцинозный	2 (40)	3 (60)	$19,6 \pm 7,2$	4 (80)	0	1 (20)
Общая группа	26 (37,7)	43 (62,3)	$34,1 \pm 3,9$	45 (65,2)	10 (14,5)	14 (20,3)

Примечание: * – здесь и далее в таблице: первая цифра – абсолютная, вторая – %

Учитывая гетерогенность экспрессии изучаемых биомолекулярных маркеров в РЯ, мы проанализировали их как в общей группе, так и отдельно для каждого гистологического типа. Гиперэкспрессия с-erbB-2 онкопротеина в общей группе не зависела от гистологического типа ($p=0,24$), клинической стадии ($p=0,08$), наличия метастазов ($p=0,21$), но прослеживалась взаимосвязь со степенью дифференцировки: в низкодифференцированных новообразованиях чаще наблюдалась гиперэкспрессия указанного маркера ($N = 6,2$, $p<0,05$). Результаты теста Крускала-Уоллиса свидетельствовали о наличии статистически значимой связи между экспрессией mt p53 и клинической стадией ($N = 10,1$, $p<0,05$), а также наличием метастазов ($N = 6,3$, $p<0,05$). К тому же, ИМ при РЯ ранних клинических стадий составил $19\pm4,3\%$, а при поздних – $43,8\pm5,3\%$.

При серозном гистологическом типе РЯ экспрессия с-erbB-2 онкопротеина не была связана со степенью дифференцировки, клинической стадией, возрастом, развитием метастазов. Mt p53 был связан с клинической стадией (тест Крускала-Уоллиса: $N = 10$, $p=0,02$) и наличием метастазов ($N = 6,3$, $p=0,01$) (рис.1).

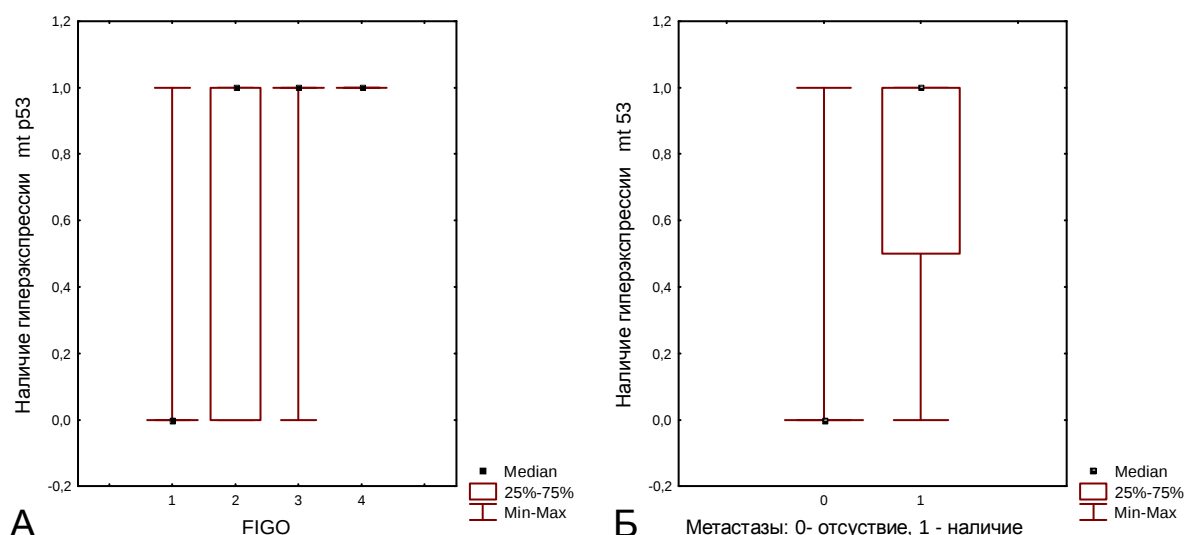


Рис. 1 – Взаимосвязь гиперэкспрессии mt p53 в раковых клетках с клинической стадией новообразования (А) и наличием метастазов (Б)

На рис. 1А видно, что все серозные аденокарциномы IV клинической стадии имели гиперэкспрессию mt p53, а при III стадии такая же картина

наблюдалась в 75% случаев. Несмотря на то, что при эндометриоидном и светлоклеточном гистологических вариантах, чаще наблюдалось отсутствие экспрессии mt p53, не было найдено статистической зависимости от гистологического типа ($p=0,09$), а также от степени дифференцировки ($p=0,14$).

К тому же, ИМ при серозном РЯ ранних клинических стадий составил $25,4 \pm 8,3\%$, а при поздних – $45,2 \pm 5,7\%$. При отсутствии метастазов РЯ в клетках первичной опухоли в 75% случаев не наблюдалась гиперэкспрессия изучаемого маркера (рис. 1Б).

Все это, в совокупности, говорит об агрессивном фенотипе новообразований с наличием гиперэкспрессии изучаемого маркера.

В муцинозном раке положительная реакция с антителами к mt p53 отмечалась в 60% наблюдений, а ИМ был относительно низким и составил $19,6 \pm 7,2$.

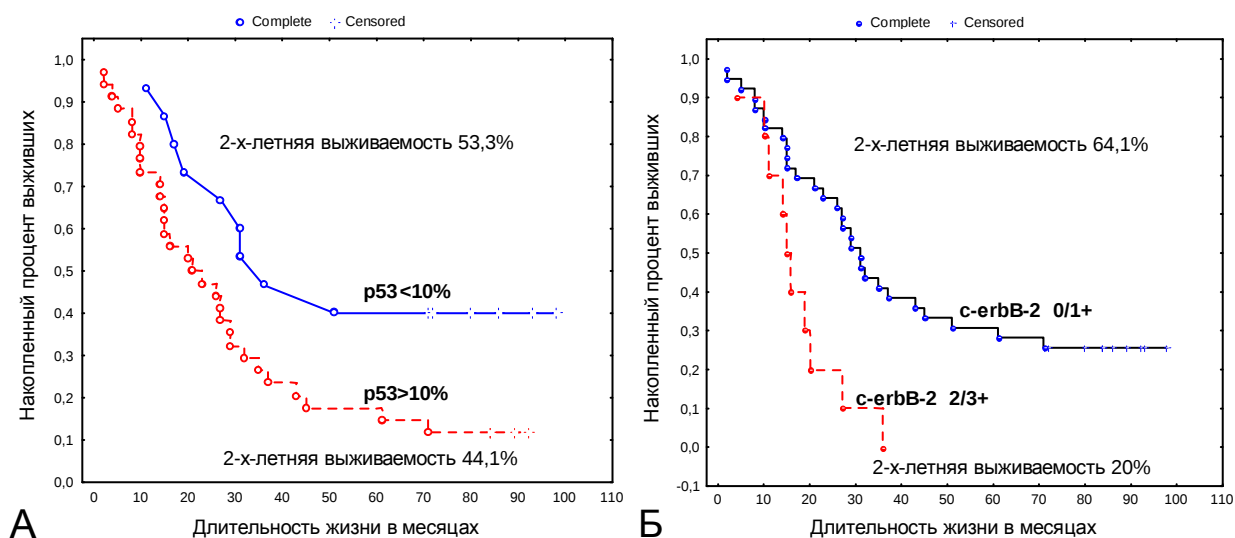
Подобные результаты получены авторами ряда работ [15], но в нашем исследовании гиперэкспрессия данного онкопротеина наблюдалась только в группе с наличием метастазов ($N = 4$, $p=0,05$). Полученные данные, прежде всего в связи с малым количеством наблюдений, требуют подтверждения на большем количестве случаев.

При эндометриоидном и светлоклеточном РЯ статистически значимой связи экспрессии изучаемых маркеров с клинико-морфологическими параметрами в нашей работе не наблюдалось.

Подобные результаты получены рядом исследователей, которые изучали p53 и c-erbB-2 при данных гистологических типах [15], но публикации, посвященные изучению этой проблемы, носят противоречивый характер.

В одних работах указывается на повышение уровня экспрессии c-erbB-2 онкопротеина при светлоклеточном РЯ [9], в других – на незначительное количество таких случаев [14]. В нашем исследовании гиперэкспрессия этого маркера была выявлена в 42,9% случаев, что может свидетельствовать о худшем прогнозе при данном гистологическом типе.

Некоторые исследователи подчеркивают, что при эндометриоидном раке в сочетании с эндометриозом, характерен сравнительно больший уровень экспрессии изучаемых онкопротеинов [16], но в нашей работе оценить эти данные не представлялось возможным.



Исследование общей и безрецидивной пятилетней выживаемости больных РЯ с помощью метода Каплана-Мейера (рис. 2) показало, что в группе пациентов с гиперэкспрессией $c-erbB-2$ и $mt \ p53$ отмечалось менее благоприятное течение заболевания, чем в группе с отсутствием реакции с данными антителами. Достоверные значения наблюдались при серозном РЯ, причем $c-erbB-2$ онкопротеин был связан как с общей пятилетней ($p=0,023$), так и с безрецидивной выживаемостью ($p=0,03$), а $mt \ p53$ имел прогностическое значение только для общей выживаемости больных ($p=0,02$).

Результаты проведенного исследования подчеркивают связь изученных маркеров с некоторыми клинико-морфологическими параметрами РЯ и прогнозом. Такое отличие в оценке прогностического значения $p53$ и $c-erbB-2$ при опухолях яичников в различных работах, по нашему мнению, можно объяснить различием контингентов больных, использованием разных систем оценки степени дифференцировки РЯ, определением критериев позитивности антител (в доступной нам литературе мы нашли 5 способов оценки

гиперэкспрессии антител к mt p53), а также применяемых методов статистической обработки полученных данных.

Заключение

Таким образом, определение уровня экспрессии таких биомолекулярных маркеров как p53 и c-erbB-2 в РЯ имеет несомненное практическое значение. Однако полученные данные свидетельствуют о необходимости оценки характера экспрессии данных онкопротеинов с обязательным учетом гистологического варианта новообразования, а не в общей группе, что приводит многих исследователей к противоречивым данным. В частности, если для серозного РЯ уровень экспрессии изучаемых маркеров связан с агрессивным фенотипом и снижением выживаемости, то при эндометриоидном и светлоклеточном гистологических типах это не имело прогностического значения.

Гетерогенность характера экспрессии p53 и c-erbB-2, а также противоречивость имеющихся литературных данных об их роли в оценке прогноза новообразования, свидетельствует о необходимости стандартизации проведения иммуногистохимических исследований и оценки их результатов.

Литература

1. Копнин, Б. П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза / Б. П. Копнин // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – № 1. – С. 5-33.
2. Введение в молекулярную биологию канцерогенеза: учеб. пособие / А. А. Новик [и др.]; под ред. Ю. Л. Шевченко. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 224 с.
3. Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: a gynecologic oncology group study / L. Havrilesky [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2003. – Vol. 21, N 20. – P. 3814-3825.
4. Сравнительное иммуногистохимическое исследование HER-2 – статуса рака молочной железы с помощью стандартного набора "Herceptest" и

антител к c-erbB-2 / Л. Э. Завалишина [и др.] // Архив патологии. – 2008. – № 2. – С. 25-28.

5. Clinical and molecular comparison between borderline serous ovarian tumors and advanced serous papillary ovarian carcinomas / R. Halperin [et al.] // Eur. J. Gynaecol. Oncol. – 2001. – Vol. 22, N 4. – P. 292-296.

6. Distribution of p53 expression in tissue from 774 Danish ovarian tumour patients and its prognostic significance in ovarian carcinomas / E. V. Hogdall [et al.] // APMIS. – 2008 – Vol. 116, N 5. – P. 400-409.

7. Mutation and expression of the TP53 gene in early stage epithelial ovarian carcinoma / M. M. Leitao [et al.] // Gynecol. Oncol. – 2004. – Vol. 93, N 2. – P. 301-306.

8. TP53 status determines clinical significance of ERBB2 expression in ovarian cancer / J. Kupryjanczyk [et al.] // British Journal of Cancer – 2004. – Vol. 91. – P. 1916-1923.

9. In vitro chemoresistance and biomarker profiles are unique for histologic subtypes of epithelial ovarian cancer / N. G. Cloven [et al.] // Gynecol. Oncol. – 2004. – Vol. 92, N 1. – P. 160-166.

10. Relationship between expressions of p53, c-erbB2 genes, proliferating cell nuclear antigen and prognosis of patients with ovarian epithelial carcinoma / J. D. Li [et al.] // Chinese J. of Cancer. – 2002. – Vol. 21, N 3. – P. 292-296.

11. C-erbB-2, p53, and nm23 proteins as prognostic factors in patients with epithelial ovarian carcinoma / S. Tomić [et al.] // Croat Med. J. – 2003. – Vol. 44 – P. 429-434.

12. HER2/neu oncoprotein overexpression in epithelial ovarian cancer: evaluation of its prevalence and prognostic significance. Clinical study / E. Verri [et al.] // Oncology. – 2005. – Vol. 68. – P. 154-161.

13. Topoisomerase 1A, HER/2neu and Ki67 expression in paired primary and relapse ovarian cancer tissue samples / P. Surowiak [et al.] // Histol. Histopathol. – 2006. – Vol. 21. – P. 713-720.

14. HER-2/neu expression in ovarian clear cell carcinomas / H. Iwamoto [et al.] // Int. J. Gynecol. Cancer. – 2003. – Vol. 13, N 1. – P. 28-31.

15. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies / M. Kóbel [et al.] // PLoS Med. – 2008. – Vol. 5, N 12. – P. 1749-1760.

16. Prefumo, F. Analysis of p53 and c-erbB-2 expression in ovarian endometrioid carcinomas arising in endometriosis / F. Prefumo, P. L. Venturini, E. Fulcheri // Int. J. Gynecol. Pathol. – 2003. – Vol. 22, N 1. – P. 83-88.