

**Романюк А. М. Особливості експресії маркера проліферації Ki-67 у тканині первинного раку маткових труб / А. М. Романюк, Н. І. Гирявенко, М. С. Ліндін, В. В. Сікора, А. В. Золотарьова // Вісник проблем біології і медицини. - 2016. - Вип. 1(1). - С. 324-327.**

УДК 616–06.6/618.12–006

*Романюк А.М., Гирявенко Н.І., Ліндін М.С., Сікора В.В., Золотарьова А.В.*

## **ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ МАРКЕРА ПРОЛІФЕРАЦІЇ KI-67 У ТКАНИНІ ПЕРВИННОГО РАКУ МАТКОВИХ ТРУБ**

**Сумський державний університет, медичний інститут, кафедра  
патологічної анатомії (м.Суми)**

Дана робота виконана в межах науково-дослідницької теми «Морфогенез загальнопатологічних процесів», № держ. реєстрації 013U003315.

**Вступ.** Захворюваність на первинний рак маткових труб (ПРМТ), за даними різних авторів, коливається в межах від 0,3% до 2% серед всіх злоякісних новоутворень жіночих статевих органів [3,4,7,11]. Вперше достовірно гістологічно підтвержену первинну карциному маткової труби описав К.Orthmann в 1888 році. Як правило, етіологічні чинники захворювання на ПРМТ залишаються мало вивченими. Вважається, що розвиток неоплазії пов'язаний зі специфічним та неспецифічним хронічним запаленням, ендометріозом маткових труб та іншими факторами [4,9,12]. Не можна повністю виключити і вплив генетичної схильності – деякі з пацієнток являються носіями патологічної мутації BRCA-1 и BRCA-2 [4,5,10]. Встановлено, що BRCA-мутації мають близько 15 % хворих з ПРМТ. М. S. Brose і соавт. (2002) з ціллю вивчення росту злоякісних новоутворень у носіїв BRCA-1 мутації обстежили 381 жінку із 147 сімей. Виявилось, що в порівнянні з загальною популяцією, у носіїв патологічної мутації захворюваність на рак товстого кишківника вище в 2 рази, підшлункової залози – в 3, шлунку – в 4, а маткової труб – в 120 раз [6]. Захворювання до операції діагностується дуже рідко (0-21%) [3]. Частіше у пухлинний процес

залучається ампулярна частина маткових труб, дистальний (фімбріальний) кінець труб при цьому, як правило, запаяний. Це супроводжується накопиченням рідини та крові в порожнині труб, їх набряком та подібністю до гідро- або гематосальпінксу. ПРМТ має клінічну та гістологічну схожість з раком яєчників [8]. Частота встановлення правильного діагнозу здебільшого залежить від типу лікувального закладу, до якого звернулась хвора. Так, в онкологічних закладах частота встановлення діагнозу до операції та гістологічне дослідження видаленої пухлини значно вища, ніж в інших лікувальних установах. Враховуючи тісну анатомічну та функціональну спільність яєчника і маткової труби, їх гормональний взаємозв'язок, при „злюкисних тубооваріальних пухлинах” дуже часто важко встановити топічність початкового пухлинного процесу. В пухлинному конгломераті первинність ураження (маткова труба чи яєчник) і шляхи поширення неопластичного процесу визначити важко навіть при морфологічному дослідженні операційного матеріалу. Тому вважається, що розвиток пухлинного процесу у матковій трубі в клінічній практиці реально зустрічається значно частіше [2].

На сьогоднішній день вже чітко доведено, що у хворих з пухлинами однієї локалізації з однаковим розповсюдженням неопластичного процесу, гістологічною будовою та ступенем диференціювання ракових клітин результати лікування можуть значно відрізнятись. Саме тому важливе місце посідає ідентифікація пухлинних маркерів, які пов'язані з прогнозом перебігу захворювання. Проліферативний індекс у пухлинах багатьох локалізацій є незалежним прогностичним показником, який корелює з вірогідністю виникнення рецидиву та з загальною і безрецидивною виживаністю [1]. Одним із методів, що використовується для оцінки проліферативної активності є виявлення експресії білка Ki-67. Антиген Ki-67 є найбільш надійним і чітким маркером проліферації, який відносять до регуляторних білків, оскільки його поява співпадає з моментом вступу клітини в мітотичний цикл [5]. Експресія Ki-67 дозволяє виділити пухлинні клітини,

що знаходяться в активній фазі клітинного циклу на всьому його протязі (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> та M фази), крім G<sub>0</sub>-періода. Він дозволяє визначити "прихований" проліферативний потенціал пухлини [1,5].

**Мета дослідження** – визначити особливості експресії маркера проліферації Ki-67 у тканині первинного раку маткових труб.

**Матеріали та методи.** З метою визначення проліферативної активності клітин у тканині ПРМТ нами проаналізований операційний матеріал від 30 жінок, прооперованих з приводу раку маткових труб за період 2005-2015 рр. Післяопераційний матеріал був розділений на декілька груп у залежності від ступеню диференціювання неоплазій відповідно до класифікацій ВОЗ та клінічних стадій захворювання за FIGO. При I стадії пухлина обмежена матковою трубою (трубами), при II – пухлина залучає одну або обидві труби і поширюється на тазові органи, при III стадії – пухлина вражає одну або обидві маткові труби з імплантацією по очеревині поза тазу та / або метастазами в регіонарних лімфатичних вузлах.

Для гістологічної верифікації діагнозу використовували парафінові блоки та виготовлені з них гістологічні серійно-ступінчаті зрізи, забарвлені гематоксиліном та еозином. Характер морфологічних змін маткових труб вивчали при збільшенні мікроскопа ×100-400. Імуногістохімічне (ІГХ) дослідження проводили на парафінових зрізах із використанням кролячих моноклональних антитіл до білка Ki-67 (клон SP6). Для цього виготовляли зрізи завтовшки 3-4 мкм, які підлягали стандартній депарафінізації та зневодненню у ксилолі та спиртах у зростаючих концентраціях. Демаскування антигенів проводили у водяній бані «ВБ-4» при температурі 97<sup>0</sup>С. Реакція антиген-антитіло була візуалізована з використанням системи детекції «Ultra Vision Quanto Detection System HRP DAB Chromogen» («Thermo scientific», США), яка включала блокування ендогенної активності пероксидази перекисем водню, блокування неспецифічного фонового фарбування з використанням «Ultra V block», посилення реакції «Primary Antibody Amplifier Quanto» та кінцева візуалізація діамінобензидином з

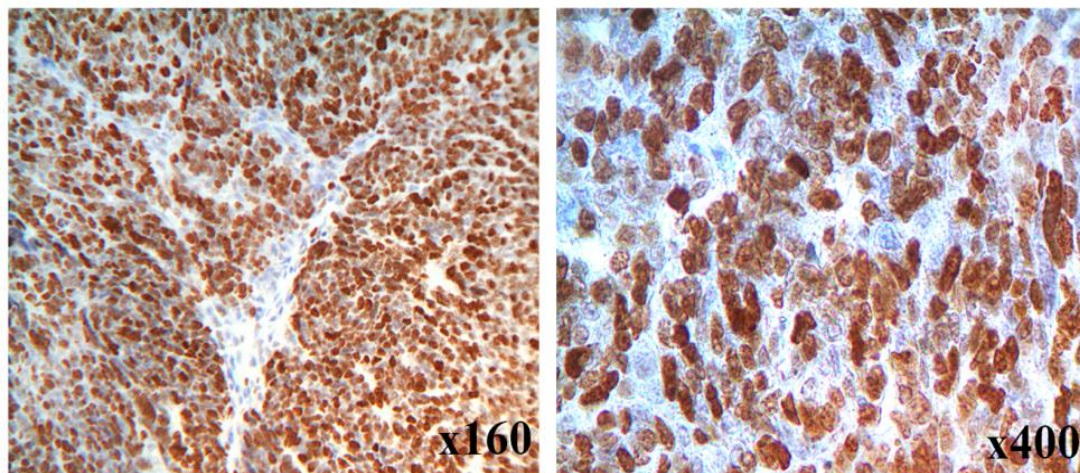
дофарбовуванням ядер гематоксилином Маса. Позитивним результатом імуногістохімічної реакції вважалася наявність специфічного забарвлення ядер пухлинних клітин. Підрахунки індексу проліферації проводили за допомогою світлового мікроскопа «MICROmed», аналізуючи наявність позитивної реакції у 1000 клітинах. Рівень експресії білка Ki-67 оцінювали напівкількісним методом: 0 балів – негативна реакція, 1 – слабо-позитивна реакція (кількість позитивно пофарбованих клітин (n) =0-30%), 2 бали – помірно-позитивна реакція (30<n>60%), 3 бали – сильно-позитивна реакція (n>60%). Отримані показники співставляли з клініко-анатомічними параметрами (клінічна стадія, ступінь диференціювання пухлини, наявність регіональних метастазів). Статистичну обробку проводили за допомогою програми Microsoft Excel 2010 з додатком AtteStat 12.0.5. Результати вважалися статистично достовірними при ступеню вірогідності більше 95% ( $p \leq 0,05$ ).

#### **Результати та їх обговорення.**

Аналізуючи дані пацієнток, встановлено що їх вік коливався у межах 35-89 років (середній вік  $61,2 \pm 2,28$  роки). Згідно системи класифікації пухлин гінекологічних органів за FIGO у 16 випадках виявлений PMT I стадії, у 6 – II стадії та у 8 випадках – III стадії. Ступінь місцевого поширення неоплазій не залежав від віку хворих ( $p > 0,05$ ). Метастази в регіональних лімфатичних вузлах діагностовано в 7 випадках.

В усіх спостереженнях морфологічний варіант пухлин відповідав серозній аденокарциномі маткової труби, ступінь диференціювання варіював від низької до високої. У 4 випадках мала місце високодиференційована аденокарцинома та по 13 випадків аденокарциноми помірної та низької диференціації. ІГХ аналіз експресії білка Ki-67 у клітинах пухлини маткових труб показав, що проліферуючі клітини виявлялися в усіх випадках. При цьому експресія білка Ki-67 в епітелії раку маткових труб асоціювалася з морфологічними ознаками проліферації. Значення Ki-67 варіювали від 15,0-95,0% ( $62,5 \pm 4,49\%$ ). Індекс проліферативної активності для

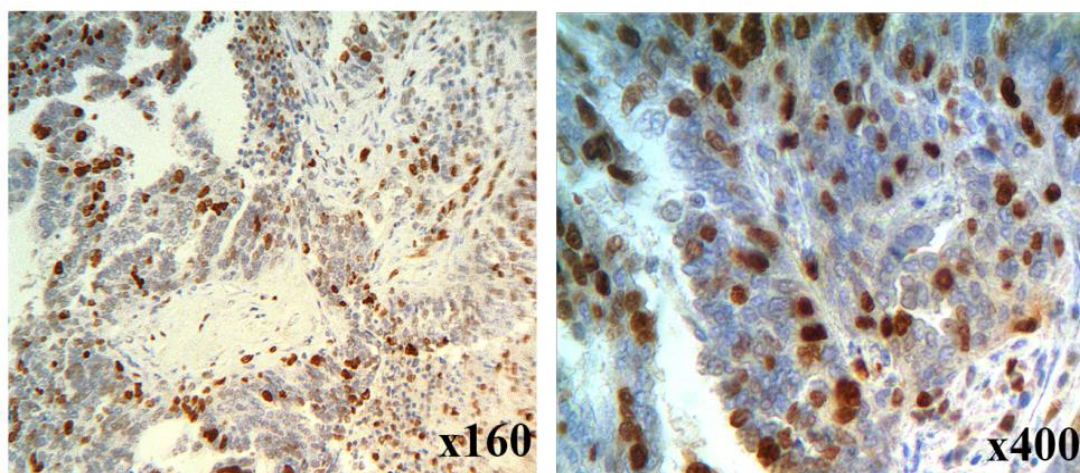
високодиференційованої аденокарциноми знаходився в діапазоні від 15,0% до 28,0%, складаючи в середньому  $22,0 \pm 3,24\%$ . Для аденокарциноми помірного ступеню диференціювання мінімальне значення Кі-67 було 35%, а максимальне – 82%, при цьому середнє значення складало  $52,9 \pm 3,7\%$  (Рис.1).



*Рис. 1. Високодиференційований ПРМТ. Наявність рецепторів Кі-67 у пухлинній тканині (слабопозитивна реакція – Кі-67 < 30,0%).*

*ІГХ дослідження експресії Кі-67.*

У пухлинах низької диференціації інтервал значень Кі-67 був від 70,0% до 95,0%, а середній показник проліферативної активності складав  $84,8\% \pm 2,5\%$  (Рис.2).



*Рис. 2. Низькодиференційований ПРМТ. Наявність рецепторів Кі-67 у пухлинній тканині (сильнопозитивна реакція – Кі-67 > 60,0%).*

*ІГХ дослідження експресії Кі-67.*

Тобто, у пухлинах зі ступенем анаплазії G1-G2 частіше відмічали низьку, а в пухлинах зі ступенем анаплазії G3 – високу експресію Ki-67 ( $p < 0,05$ ). Встановлено, що зі зростанням ступеню анаплазії ПРМТ (зниження ступеня диференціювання) спостерігалось одночасне збільшення індексу проліферації, рівень експресії білка також залежав від клінічної стадії захворювання за FIGO ( $p < 0,05$ ). Так, при I стадії ПРМТ середнє значення Ki-67 становило  $51,93 \pm 5,61\%$ , для II-III стадії  $74,57 \pm 5,82\%$  (Таблиця 1). Не було отримано достовірних відмінностей рівня проліферативної активності від віку хворих ( $p > 0,05$ ).

*Таблиця 1. Аналіз рівня експресії Ki-67 в залежності від клінічної стадії захворювання та ступеня диференціювання.*

	Кількість випадків	Середнє значення Ki-67
Клінічна стадія (FIGO):		
I	16	$51,93 \pm 5,61\%$ ,
II-III	14	$74,57 \pm 5,82\%$
Ступінь диференціювання:		
Висока	4	$22,0 \pm 3,24\%$ .
Середня	13	$52,9 \pm 3,7\%$ .
Низька	13	$84,8\% \pm 2,5\%$ .

Проліферативна активність клітин раку маткових труб з метастазами була вищою ( $p < 0,05$ ), у порівнянні з ПРМТ без метастазів (Таблиця 2).

*Таблиця 2. Розподіл експресії Ki-67 в залежності від інтенсивності забарвлення ядер у жінок з наявністю метастазів на момент операції і без метастазів.*

Інтенсивність реакції	Рак маткових труб з метастазами	Рак маткових труб без метастазів	Разом
n=0-30%	0	4	13,33%

30<n>60%	0	11	36,67%
n>60%	7	8	50%
Разом	7	23	30 (100%)

### **Висновки.**

1. Визначення експресії маркера проліферації Ki-67 значно доповнює традиційні морфологічні методи дослідження і дозволяє ідентифікувати діагноз раку маткових труб з високою точністю.

2. Для первинного раку маткових труб характерні високі показники проліферативної активності, про що свідчить надзвичайно агресивний перебіг захворювання.

3. Враховуючи більш високу проліферативну активність клітин раку маткових труб з наявністю метастазів та тенденцію до наростання проліферативної активності по мірі зниження диференціювання неоплазії ступінь експресії Ki-67 є незалежним прогностичним маркером для N-статуса, тобто сприяє виділенню пацієток у групи «ризик».

**Перспективи подальших досліджень.** Вивчення імуногістохімічних маркерів апоптозу, адгезивної спроможності, інвазивного потенціалу пухлинних клітин та епігенетичних змін ДНК у тканині ПРМТ.

### **Список використаної літератури.**

1. Бабиченко И. И. Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста: Учеб. пособие / И. И. Бабиченко, В. А. Ковязин. – М.: РУДН, 2008. – 109 с.

2. Красиленко Д. М. Особливості клінічного перебігу первинного раку фаллопієвих труб. Збірник наукових праць Асоціації акушерів-гінекологів України / Д. М. Красиленко, Л. І. Воробйова, Ю. С. Доценко. – Київ, 2001. – 346 с.

3. Папуниди М. Д. Рак маточной трубы. особенности диагностики и лечения (обзор литературы) / М. Д. Папуниди, Е. А. Ульрих. // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – №4(40). – С. 67-70.
4. Сумцов Г. А. Первичный рак маточных труб. Монография / Г. А. Сумцов, Д. Г. Сумцов. – Сумы, Сумский государственный университет, 2015.
5. Шацева Т. А. Антиген Ki-67 в оценке опухолевой пролиферации. Его структура и функции / Т. А. Шацева, М. С. Мухина. // Вопросы онкологии. – 2004. – №50(2). – С. 157—64.
6. Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program / [M. S. Brose, T. R. Rebbeck, K. A. Calzone at all.]. // Journal of the National Cancer Institute. – 2002. – 94. – P. 1365-1372.
7. Neoplasms of the fallopian tube cancer medicine. 5th edition / [C. J. Cohen, G. M. Thoas, G. S. Hagopian at all.]. // Canada. – B.C:Decker Inc, 2000. – 1683 p.
8. Hariprasad P. Primary bilateral fallopian tube carcinoma the report of a single case with review of the literature / P. Hariprasad, T. Srinivas, K. J. Shetty. // J Clin Diagn Res. – 2013. – №7(5). – P. 930-2.
9. Mladenović-Segedi L. Primary fallopian tube carcinoma / L. Mladenović-Segedi // Med. Pregl. – 2009. – Vol. 62, № 1–2. – P. 31–36.
10. Small fallopian tube carcinoma with extensive upper abdominal dissemination: a case report / [C. Oliveira, H. Duarte, C. Bartosch, D. Fernandes.]. // J Med Case Rep. – 2013. – №7(1). – P. 252.
11. Tavassoli F.A., Devilee P. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon: IARC Press, 2003. – 206 p.
12. Primary serous papillary adenocarcinoma of the fallopian tube: a case report / [Z. Topolovec, M. Mrcela, S. Sijanović at all.]. // Acta Clin Croat. – 2014. – №53. – P. 242-245.



## **ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ МАРКЕРА ПРОЛІФЕРАЦІЇ КІ-67 У ТКАНИНІ ПЕРВИННОГО РАКУ МАТКОВИХ ТРУБ**

**Романюк А.М., Гирявенко Н.І., Линдін М.С., Сікора В.В., Золотарьова А.В.**

**Резюме.** Метою дослідження стало визначення особливості експресії маркера проліферації Кі-67 у тканині первинного раку маткових труб за допомогою імуногістохімічного дослідження із використанням кролячих моноклональних антитіл до білка Кі-67 (клон SP6). Отримані показники співставляли з клініко-анатомічними параметрами (клінічна стадія, ступінь диференціювання пухлини, наявність регіональних метастазів). Позитивним результатом імуногістохімічної реакції вважалася наявність специфічного забарвлення ядер пухлинних клітин. Встановлено, що для первинного раку маткових труб характерні високі показники проліферативної активності, про що свідчить надзвичайно агресивний перебіг захворювання. Виявлений взаємозв'язок між індексом проліферації, ступенем анаплазії пухлини та клінічною стадією захворювання.

**Ключові слова:** первинний рак маткових труб, індекс проліферації.

**УДК 616–06.6/618.12–006**

## **ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРА ПРОЛИФЕРАЦИИ КИ-67 В ТКАНИ ПЕРВИЧНОГО РАКА МАТОЧНЫХ ТРУБ**

**Романюк А.Н., Гирявенко Н.И., Линдин Н.С., Сикора В.В., Золотарева А.В.**

**Резюме.** Целью исследования стало определение особенности экспрессии маркера пролиферации Ки-67 в ткани первичного рака маточных труб с помощью иммуногистохимического исследования с использованием кроличьих моноклональных антител к белку Ки-67 (клон SP6). Полученные показатели сопоставляли с клинико-анатомическими параметрами (клиническая стадия, степень дифференцировки опухоли, наличие региональных метастазов). Положительным результатом

иммуногистохимической реакции считалось наличие специфической окраски ядер опухолевых клеток. Установлено, что для первичного рака маточных труб характерны высокие показатели пролиферативной активности, о чем свидетельствует чрезвычайно агрессивное течение заболевания. Выявлена взаимосвязь между индексом пролиферации, степенью анаплазии опухоли и клинической стадией заболевания.

**Ключевые слова:** первичный рак маточных труб, индекс пролиферации.

**УДК 616–06.6/618.12–006**

**THE EXPRESSION FEATURES OF PROLIFERATION MARKER  
Ki-67 IN THE TISSUE OF PRIMARY FALLOPIAN TUBES CARCINOMA**

*Romaniuk A., Gyryavenko N., Lyndin M., Sikora V., Zolotareva A.*

**Summary.** The incidence of primary fallopian tubes carcinoma (PFTC) are ranged from 0,3 to 2% of all malignant tumors of the female genital organs. The important place is given to the identification of tumor markers which associated with prognosis of the disease. One of the methods of proliferative activity evaluation is identification of protein expression Ki-67, which allows defining the "hidden" proliferative potential of the tumor.

**Materials and methods.** For the determination of cells proliferative activity in a tissue of PFTC we analyzed operating material from 30 women, who was operated concerning for cancer of the fallopian tubes. The protein expression level of Ki-67 was evaluated by semiquantitative method: 0 points - the negative reaction, 1 point – low positive reaction (the number of positively stained cells (n) = 0-30%), 2 points – moderate positive reaction (30<n>60%), 3 points – highly positive reaction (n>60%). We have compared the resulting indicators with clinical and anatomical parameters (clinical stage, stage of tumor differentiation, presence of regional metastases).

**Results and discussion.** According to the classification system of gynecologic tumors by FIGO in 16 cases were detected fallopian tube cancers in I stage, in 6 cases – II stage, in 8 cases – III stage. In all cases morphological variant

of tumors corresponded to serous adenocarcinoma of fallopian tubes, and the differentiation stage varied from low to high. Immunohistochemical analysis of Ki-67 protein expression in the cells of fallopian tubes cancer demonstrated that the proliferating cells were detected in all cases. The values of Ki-67 have varied from 15,0 to 95,0% ( $62,5 \pm 4,49\%$ ). Proliferative activity index for highly differentiated adenocarcinoma was an average of  $22,0 \pm 3,24\%$ , for moderate differentiation stage of adenocarcinoma –  $52,9 \pm 3,7\%$ , and for weakly differentiation –  $84,8\% \pm 2,5\%$ . In the tumors with G1-G2 stage of anaplasia were found low expression of Ki-67, in its turn G3 stage - high Ki-67 expression ( $p < 0,05$ ).

The level of protein expression also depended from clinical stage of the disease (by FIGO) ( $p < 0,05$ ). Thus, in I stage of PFTC average value of the Ki-67 was  $51,93 \pm 5,61\%$ , in II-III stages –  $74,57 \pm 5,82\%$ . Credible differences of the proliferative activity from the age of patients ( $p > 0,05$ ) were not received. Cells proliferative activity of fallopian tubes cancer with metastases was higher ( $p < 0,05$ ), compared with PFTC without metastases.

**Conclusions.** Primary fallopian tube cancer is characterized by high indicators of proliferation activity, as evidenced by the extremely aggressive course of the disease. Considering higher proliferative activity of the cells of fallopian tubes cancer with metastases presence and tendency to increase of proliferative activity with decreasing of differentiation neoplasia the expression stage of Ki-67 promotes to patients affiliation to group of the "risk".

**Perspectives for further research.** The research of immunohistochemical apoptosis markers, adhesion capabilities, invasive potential of tumor cells and epigenetic DNA changes in the tissue of primary fallopian tubes carcinoma.

**Keywords:** Primary fallopian tubes carcinoma, proliferation index.