

Л.А. Налескіна

Л.Б. Забарко

Л.З. Поліщук

Є.Є. Новак

М.П. Клеветенко

Л.М. Захарцева

А.М. Романенко

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

Інститут урології і нефрології АМН України

Київська міська онкологічна лікарня, Київ, Україна

Ключові слова: серозні новоутворення яєчника, проліферативна активність пухлинних клітин, антиген ядер проліферуючих клітин (PCNA).

КОМПЛЕКСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОЛІФЕРАТИВНОГО ПОТЕНЦІАЛУ СЕРОЗНИХ НОВОУТВОРЕНЬ ЯЄЧНИКА З УРАХУВАННЯМ РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ PCNA

Резюме. Дано комплексну оцінку проліферативного потенціалу пухлинних клітин 46 серозних новоутворень яєчника на підставі імуногістохімічного визначення в них експресії антигену ядер проліферуючих клітин (PCNA) та мітотичного режиму. За рівнем експресії PCNA, особливостями її прояву у пухлинних клітинах, частотою і спектром патології мітозів виділені дві форми пограничних серозних пухлин: проліферуючі цистаденоми та проліферуючі цистаденоми з атипією епітелію. За цими ж показниками встановлено три рівні градації проліферативної активності у злоякісних серозних новоутвореннях яєчника, які відображають різний ступінь їх злоякісності. Отримані дані є інформативними показниками проліферативного потенціалу різних за морфологією серозних пухлин яєчника, які можуть бути використані як при диференціальній діагностиці новоутворень, так і при призначенні адекватного лікування хворим, особливо у разі проведення хіміотерапії.

ВСТУП

Останнім часом, завдяки використанню у морфологічних дослідженнях пухлинних клітин генетичних та імуногістохімічних методик [1–4], виникла можливість більш виваженого визначення характеру процесу під час диференціальної діагностики новоутворень та визначення рівня і особливостей проліферативної активності злоякісних пухлин. Це, безумовно, є важливим для прогнозування клінічного перебігу хвороби та вибору методу лікування, особливо у разі призначення хіміотерапії хворим із злоякісними пухлинами, в тому числі на рак яєчника [5–9].

Мета дослідження полягала у комплексному вивченні якісних та кількісних особливостей прояву проліферативної активності в епітеліальних злоякісних новоутвореннях яєчника, включаючи імуногістохімічне визначення рівня експресії антигену ядер проліферуючих клітин (PCNA) та мітотичного режиму пухлин.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження виконували на післяопераційному матеріалі 46 пухлин яєчника, які були видалені у жінок віком від 28 до 71 року. На гістологічних препаратах, отриманих в результаті заливки новоутворень у целоїдин-парафін і фарбування гематоксиліном та еозином, встановлено морфологічний діагноз, вивчені цитоморфологічні особливості новоутворень та проведена оцінка мітотичного режиму пухлин (загальна кількість мітозів — мітотичний

індекс (МІ), який виражено у промілі, співвідношення фаз мітозу, кількість та спектр патології мітозу). На паралельних парафінових зрізах ставили імуногістохімічну реакцію для визначення рівня експресії PCNA в ядрах епітеліальних клітин.

Для цього використовували моноклональні антитіла проти антигену ядер проліферуючих клітин PC-10 фірми «Dako» (Данія) та ABC-кіт фірми «Vectro» (США). Кожного разу проводили контрольні дослідження. Дані щодо зв'язування первинних та вторинних антитіл отримували за допомогою кольорової реакції з ДАБ. Результати імуногістохімічної реакції у спостереженнях оцінювали як відсоток позитивних клітин серед 2000 підрахованих.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При морфологічній верифікації новоутворень яєчника встановлено, що за гістологічним типом 33 з них є серозними епітеліальними пухлинами, 3 — муцинозними. За цитоморфологічними характеристиками серед серозних епітеліальних пухлин 10 були визначені як пограничні — цистаденоми, 23 — як злоякісні новоутворення. За гістологічною структурою 26 серозних злоякісних пухлин були цистаденокарциномами, 9 — папілярними аденокарциномами. Три муцинозні пухлини розцінені як цистаденокарциноми. Аналіз даних визначення рівня експресії PCNA в ядрах епітеліальних клітин усіх досліджених серозних новоутворень яєчника свідчить про широкий діапазон коливань цього показника у спостереженнях — від 11,3 до 89,7%. При

детальній оцінці отриманих результатів залежно від гістологічної структури пухлин в 10 пограничних цистаденомах межі коливань кількості проліферуючих клітин становили 11,3–35,3%.

При аналізі комплексу кількісних параметрів мітотичного режиму в цих новоутвореннях виявлено аналогічну неоднорідність кожного показника. Індивідуальні коливання МІ у цистаденомах становили 1,1–9,4‰ із середнім значенням $5,9 \pm 0,7\%$. Кількість патологічних мітозів варіювала від 2,7 до 10,8% ($5,7 \pm 0,5\%$).

В результаті аналізу якісної і кількісної характеристики експресії PCNA у кожній із проліферуючих цистаденом встановлено, що у новоутвореннях із меншою кількістю PCNA-позитивних клітин антиген у значній частині клітин спостерігався у вигляді дифузно поширених у ядрі гранул світло-коричневого кольору, що характерно для доброякісної проліферації. При цьому у новоутвореннях із більш значною кількістю PCNA-позитивних клітин визначався інший прояв експресії — гомогенне забарвлення темно-коричневого кольору, яке, за даними літератури [5], притаманне активній клітинній проліферації (рис. 1, 2).

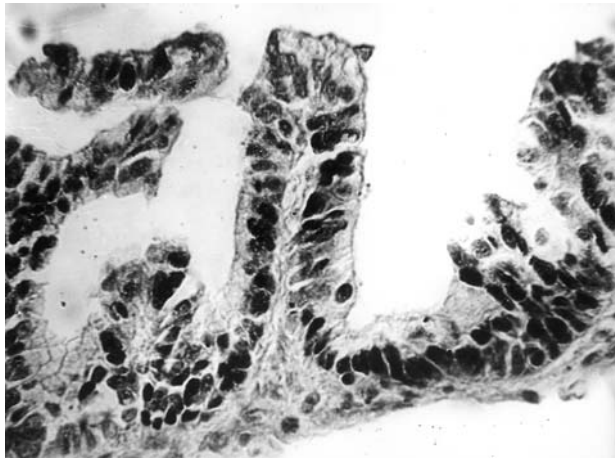


Рис. 1. Проліферуюча папілярна цистаденома. Ділянка пухлини із високим рівнем експресії PCNA у епітеліальних клітинах. Імунопероксидазний АВС-метод, х 300

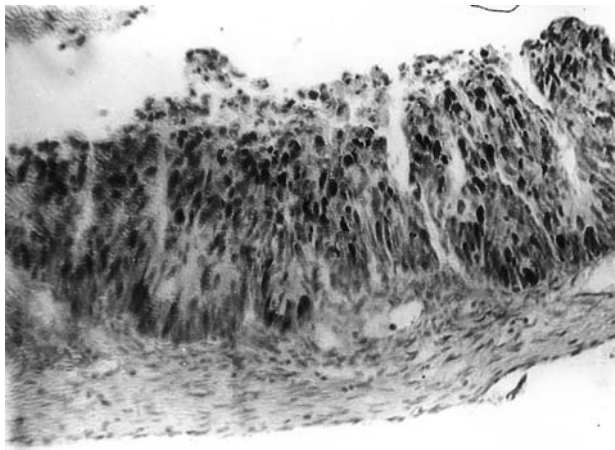


Рис. 2. Проліферуюча папілярна цистаденома з атипією епітелію. Висока частота PCNA-позитивних клітин у новоутворенні. Імунопероксидазний АВС-метод, х 320

Не менш інформативним виявився індивідуальний аналіз спектра патології мітозу у співставленні з показниками експресії PCNA у цих новоутвореннях. Відзначено, що у проліферуючих цистаденомах із більш значною кількістю проліферуючих клітин спостерігався значно більший і різноманітніший спектр патології поділу клітин та поява моноцентричних мітозів, що є однією із ланок збільшення кількості поліплоїдних клітин.

Таким чином, комплекс об'єктивних якісних та кількісних показників проліферативної активності епітеліальних клітин пограничних пухлин яєчника виявився підставою для поділу всіх цистаденом на дві підгрупи: проліферуючі цистаденоми та проліферуючі цистаденоми з атипією епітелію (рис. 3). Показники проліферативної активності у проліферуючих цистаденомах становлять: рівень експресії PCNA — $15,3 \pm 1,7\%$ (11,3–18,2); кількість патологічних мітозів — $4,1 \pm 0,7\%$ (2,7–4,9); МІ — $3,4 \pm 0,9\%$ (1,1–4,9). У проліферуючих цистаденомах з атипією епітелію вони вірогідно вищі ($p < 0,05$) і дорівнюють: PCNA — $24,5 \pm 2,7\%$ (21,2–26,1); патологічні мітози — $6,8 \pm 0,9\%$ (6,1–10,8); МІ — $7,2 \pm 1,3\%$ (5,6–9,4).

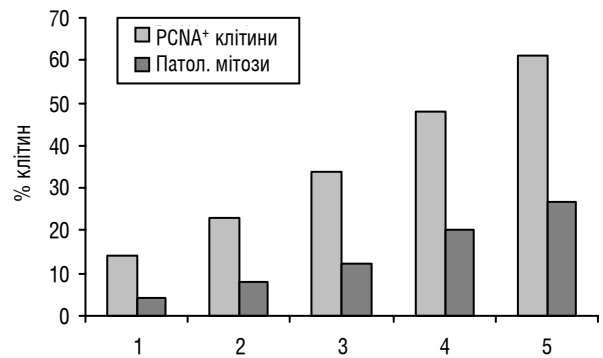


Рис. 3. Рівень проліферативної активності пухлинних клітин у пограничних та злоякісних серозних новоутвореннях яєчника:

1 — проліферуюча папілярна цистаденома; 2 — проліферуюча папілярна цистаденома з атипією епітелію; 3, 4, 5 — відповідно I, II, III ступінь морфологічної злоякісності серозного раку яєчника

Усі злоякісні серозні пухлини характеризуються високим ступенем гетерогенності за дослідженими показниками проліферативної активності. Оцінюючи рівень експресії маркера проліферації клітин PCNA у 33 видалених пухлинах хворих на серозний рак яєчника визначено значну варіабельність цього показника як у різних новоутвореннях, так і у межах однієї пухлини, діапазон коливань — від 27,3 до 89,7% (рис. 4, 5). Середня кількість проліферуючих клітин у новоутвореннях становить $56,2 \pm 3,1\%$ і є суттєво більшою ($p < 0,05$) за таку у проліферуючих цистаденомах.

Слід зазначити, що в усіх спостереженнях позитивна PCNA-реакція у 80–100% клітин виявлялась у вигляді гомогенного темно-коричневого забарвлення.

Аналіз кількісних та якісних характеристик мітотичного режиму у серозних злоякісних пухлинах яєчника свідчив про варіабельність і наявність ви-

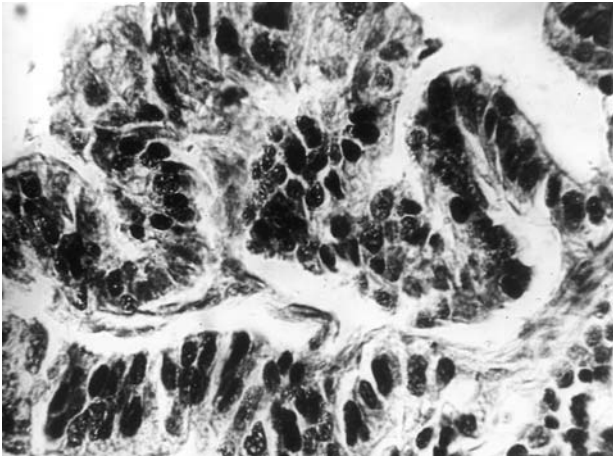


Рис. 4. Папілярна аденокарцинома. Рівень експресії PCNA у залозистих та папілярних структурах — 89,7%. Імунопероксидазний АВС-метод, х 400

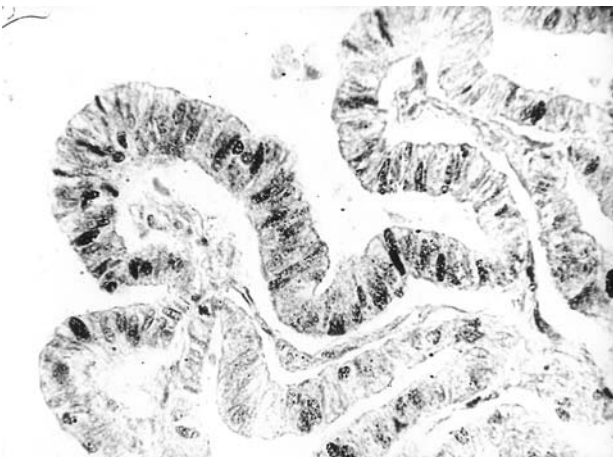


Рис. 5. Папілярна цистаденокарцинома. Нерівномірний розподіл PCNA-позитивних пухлинних клітин у структурах новоутворення. Імунопероксидазний АВС-метод, х 330

соких значень показників МІ — 11,2–37,3% (21,3 ± 2,5), суттєве порушення фаз мітозу у бік збільшення кількості метафаз і підвищення метафазно-профазного індексу, а також збільшення кількості патологічних форм поділу клітин та розширення спектра патології мітозу за рахунок появи багатополосних мітозів, трьохгрупових та порожнистих метафаз, розсіювання хромосом та фрагментів у метафазі, які у пограничних пухлинах були поодинокі або взагалі відсутні. Слід зазначити, що кількісні співвідношення патологічних форм поділу у різних новоутвореннях були нерівноцінними.

Загальна кількість патологічних мітозів у спостереженнях також була неоднотипною, варіювала від 12,3 до 30,1% (23,9 ± 3,7) і була більшою в тих пухлинах, де виявляли високі показники експресії PCNA.

Індивідуалізований аналіз показників мітотичного режиму та експресії PCNA у новоутвореннях хворих свідчить про те, що найбільш інформативними критеріями злоякісності пухлин є кількість патологічних мітозів та частота PCNA-позитивних пухлинних клітин.

Враховуючи різний прояв проліферації та високий рівень вірогідності зазначеної різниці у спосте-

реженнях раку яєчника, у межах цієї групи новоутворень за показниками експресії PCNA та кількості патологічних мітозів були виділені три рівня градації проліферативної активності цих пухлин, які є відображенням різного ступеня їх злоякісності (див. рис. 3). Доцільність такого розподілу підтвердилась при співставленні отриманих даних із цитоморфологічними характеристиками пухлин.

Крім того, було проведене співставлення рівня експресії PCNA та кількості патологічних мітозів у двох різних за гістологічним типом групах злоякісних пухлин: муцинозних і серозних цистаденокарциномах та папілярних аденокарциномах. Встановлено, що ці новоутворення вірогідно ($p < 0,05$) відрізняються між собою за ступенем проліферативного потенціалу. Найменш агресивними є муцинозні цистаденокарциноми, найвищий рівень проліферативної активності відзначено у папілярних аденокарциномах. Серозні цистаденокарциноми за цим показником займають проміжне положення (таблиця).

Слід відзначити, що результати власних досліджень рівня експресії PCNA і визначення мітотичного режиму у серозних злоякісних пухлинах яєчника співпадають із існуючою думкою про те, що величина метафазно-профазного індексу, частота та спектр патології мітозу корелюють із ступенем злоякісності пухлини, а також про те, що рівень експресії PCNA є маркером проліферативної активності пухлин [10–14], на підставі чого ці показники слід вважати найбільш інформативними критеріями для оцінки проліферативного потенціалу пухлин.

Таким чином, на підставі комплексної оцінки рівня проліферативної активності серозних злоякісних пухлин яєчника доведено, що досліджені новоутворення характеризуються значним ступенем гетерогенності за цими критеріями, яка визначається як у межах популяції пухлинних клітин одного новоутворення, так і всієї групи спостережень в цілому. Встановлено, що серед вивчених показників проліферативної активності найбільш інформативними є рівень експресії PCNA та кількість патологічних форм поділу пухлинних клітин. За якісними та кількісними показниками проліферативної активності серед усіх пограничних серозних пухлин виділені дві форми новоутворень: проліферуючі цистаденоми та проліферуючі цистаденоми з атипією епітелію. За показниками експресії PCNA та кількістю патологічних мітозів у злоякісних клітинах хворих на рак яєчника встановлено три рівня градації проліфе-

Таблиця
Показники проліферативної активності різних за гістологічною структурою злоякісних пухлин яєчника

Гістологічна структура пухлини	Кількість спостережень	Рівень експресії PCNA, %	Кількість патологічних мітозів, %
Муцинозні цистаденокарциноми	3	32,2 ± 3,5 29,1–36,3	12,6 ± 2,3 10,1–14,2
Серозні цистаденокарциноми	23	41,5 ± 2,9 37,6–45,2	15,3 ± 2,7 12,2–18,7
Папілярні аденокарциноми	10	59,3 ± 3,7 48,1–89,7	23,1 ± 3,3 19,4–30,1

ративної активності цих пухлин, які відображають різний ступінь морфологічної злоякісності. При співставленні рівня експресії PCNA та кількості патологічних мітозів у різних за гістоструктурою злоякісних пухлинах яєчника встановлено, що найбільш високий проліферативний потенціал мають папілярні аденокарциноми, а найбільш низький — муцинозні цистаденокарциноми, серозні цистаденокарциноми займають проміжне положення.

Отримані дані слід враховувати не тільки при диференціальній діагностиці різних за морфологією пухлин яєчників, а й у разі призначення адекватного лікування хворим цієї категорії, особливо при проведенні хіміотерапії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Wolf NG, Abdul-Karim FW, Farver C, *et al.* Analysis of ovarian borderline tumors using comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Genes, Chromosomes, Cancer* 1999; **25** (4): 307–15.
2. Коннин БП. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. *Биохимия* 2000; **65** (1): 5–33.
3. Пожариский КМ, Леенман ЕЕ. Значение иммуногистохимических методик для определения характера течения и прогноза опухолевых заболеваний. *Арх патологии* 2000; **62** (5): 3–11.
4. Упоров АВ, Семиглазов ВФ, Пожариский КМ. Иммуногистохимическое изучение клеток рака молочной железы с использованием разных маркеров пролиферации. *Арх патологии* 2000; **62** (2): 26–30.
5. Lima SC, Frizelle SP. Proliferative activity in benign and neoplastic prostatic epithelium. *J Pathol* 1994; **17** (3): 201–8.
6. Zheng W, Zhan RZ. Quantitative comparison of apoptosis to cell proliferation and p53 protein in breast carcinomas. *Acta Cytol* 1998; **42** (2): 430–2.
7. Kimura H, Konishi K, Inoue T, *et al.* Flow cytometric analysis and immunohistochemical staining for the p53 protein and proliferating cell nuclear antigen. *J Surg Oncol* 1998; **68** (4): 246–9.
8. Daponte A, Guidozi F, Tiltman AJ, *et al.* p53 as a prognostic factor for stage III serous adenocarcinomas of the ovary. *Anticancer Res* 1999; **19** (6): 2387–90.
9. Автандилов ГГ. Индекс клональной пролиферации и его изменения в процессе озлокачествления ткани по данным цитофотометрии ДНК. *Вопр онкол* 2000; **46** (4): 423–6.
10. Казанцева ИА. Патология митоза в опухолях человека. Новосибирск: Наука, 1981. 143 с.
11. Полякова ГА, Казанцева ИА, Калинин АП и др. Адrenокортикальные опухоли: митотический индекс и величина ядер как критерии дифференциальной диагностики. *Арх патологии* 1999; **61** (3): 30–4.

12. Semenjuk WO, Wolod'ko NA, Huley R. The value of several prognostic factors in ovarian granulosa cell tumors. В: Онкология Тезисы II съезда онкологов стран СНГ. Киев 2000. *Exp Oncol*; **22** (Suppl): 992.

13. Dietrich DR. Toxicological and pathological applications of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a novel endogenous marker for cell proliferation. *Critical Rev Toxicol* 1993; **23** (1): 77–109.

14. Noda H, Maehara Y, Irie K, *et al.* Growth patterns and expressions of cell cycle regulator protein p53 and p21 WAF1/CIP1 in early gastric carcinoma. *Cancer* 2001; **92** (7): 1828–35.

COMPLEX INVESTIGATION OF THE PROLIFERATIVE POTENTIAL IN SEROUS OVARIAN NEOPLASMS WITH ACCOUNT FOR THE LEVEL OF PCNA EXPRESSION

L.A. Naleskina, L.B. Zabarko, L.Z. Polishcook, E.E. Novak, M.P. Klevetenko, L.M. Zakhartseva, A.M. Romanenko

Summary. *The proliferative potential of tumor cells from 46 serous ovarian neoplasms was assessed based on immunohistochemical evaluation of the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and mitotic patterns. Two forms of borderline serous tumors were identified based on the PCNA expression, peculiarities of its manifestation in tumor cells, occurrence and range of pathology of mitoses. These two forms are: proliferating cystadenomas and proliferating cystadenomas with atypical epithelium. Based on the same indicators, three gradation levels of the proliferative activity in malignant serous ovarian neoplasms were identified, which reflect the differences in the level of their malignancy. The data obtained presents informative indicators of the proliferative potential of the varying in morphology serous ovarian neoplasms, which may be used both for differential diagnosis of neoplasms and for instituting an adequate treatment, especially chemotherapy.*

Key Words: serous ovarian neoplasms, proliferative activity of tumor cells, proliferating cell nuclear antigen (PCNA).

Адреса для листування:

Налескіна Л.А.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, відділ механізмів лейкозогенезу