

Е. Н. Левик, А. И. Шевченко, В. А. Туманский, А. В. Евсеев

Влияние экспрессии иммуногистохимического маркера Ki-67 на продолжительность жизни больных раком желудка 0–III стадий

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: рак желудка, иммуногистохимический маркер Ki-67, выживаемость.

В Украине 60,9% больных раком желудка умирают в течение года после установления диагноза. С целью изучения влияния гиперэкспрессии иммуногистохимического маркера Ki-67 на продолжительность жизни проведено исследование с участием 129 больных раком желудка 0–III стадий, получивших лечение в ЗОКОД с июня 2006 по октябрь 2013 года. Всем пациентам, вошедшим в исследование, проведено радикальное хирургическое лечение. Адъювантную полихимиотерапию получили 62 больных раком желудка (48%). Иммуногистохимическое исследование проведено с использованием моноклональных антител Мо а-Hu Ki-67 Antigen, Clone MIB-1. Гиперэкспрессия Ki-67 отмечена в опухолевой ткани 65,9% больных раком желудка, что свидетельствует об агрессивности процесса. Назначение адъювантной химиотерапии больным раком желудка II стадии при наличии высокой пролиферативной активности Ki-67 достоверно улучшает продолжительность жизни ($p < 0,05$).

Вплив експресії імуногістохімічного маркера Ki-67 на тривалість життя хворих на рак шлунка 0–III стадій

О. М. Левик, А. І. Шевченко, В. О. Туманський, А. В. Євсєєв

В Україні 60,9% хворих на рак шлунка помирають протягом року після встановлення діагнозу. З метою вивчення впливу гіперекспресії імуногістохімічного маркера Ki-67 на тривалість життя здійснили дослідження за участю 129 хворих на рак шлунка 0–III стадій, які отримали лікування в ЗОКОД з червня 2006 до жовтня 2013 року. Всім пацієнтам, які взяли участь у дослідженні, виконали радикальне хірургічне лікування. Ад'ювантну поліхіміотерапію отримали 62 хворих на рак шлунка (48%). Імуногістохімічне дослідження виконали, використовуючи моноклональні антитіла Мо а-Hu Ki-67 Antigen, Clone MIB-1. Гіперекспресія Ki-67 визначена в пухлинній тканині у 65,9% хворих на рак шлунка, що свідчить про агресивність процесу. Призначення ад'ювантної хіміотерапії хворим на рак шлунка II стадії за наявності високої проліферативної активності Ki-67 вірогідно поліпшує тривалість життя ($p < 0,05$).

Ключові слова: рак шлунка, імуногістохімічний маркер Ki-67, виживаність.**Патологія.** – 2015. – №2 (34). – С. 59–63

Effect of expression of immunohistochemical marker Ki-67 on the life expectancy of patients with gastric cancer 0–III stages

O. M. Levyk, A. I. Shevchenko, V. A. Tumanskiy, A. V. Evseyev

In Ukraine 60,9% of patients with gastric cancer die within 1 year after ascertainment of diagnosis.

Aim: In order to investigate the effect of Ki-67 overexpression on life expectancy, study was conducted among 129 patients with gastric cancer of 0 - III stages, who received treatment in Zaporizhzhia Regional Clinical Oncology Center from June 2006 till October 2013.

Methods and results. All patients included in the study underwent radical surgical treatment. 62 patients with gastric cancer (48%) received adjuvant chemotherapy. Immunohistochemical study was performed using monoclonal antibodies Mo a-Hu Ki-67 Antigen, Clone MIB-1. It has been found that the Ki-67 overexpression is observed in 65,9% of the tumor tissue of gastric cancer patients and indicates aggressive process.

Conclusion. Using adjuvant chemotherapy among patients with gastric cancer II stage significantly improves the life expectancy ($p < 0.05$) in cases when patients have the presence of high Ki-67 proliferative activity.

Key words: Cancer of Stomach, Ki-67 Antigen, Survival Rate.**Pathologia.** 2015; №2 (34): 59–63

Повышенная заболеваемость и высокая смертность от рака желудка во всем мире способствуют поиску новых факторов прогноза течения заболевания. Несмотря на проводимое противоопухолевое лечение, в Украине 60,9% больных раком желудка умирают в течение года после установления диагноза [8].

В настоящее время широко изучают иммуногистохимические маркеры различных злокачественных образований [1,3,4,9]. Каждый из маркеров имеет свое ограниченное значение, поскольку опухолевая ткань продуцирует несколько протоонкогенов, супрессоров генов и онко-антигенов. При исследовании новообразований желудка обнаружена экспрессия множества факторов роста и их рецепторов: эпидермальный фактор роста (EGF),

его рецептор (EGFR), трансформирующий фактор роста (TGF-альфа), erbB-2, c-met, K-sam. Экспрессия EGFR и TGF коррелирует с прогрессией и плохим прогнозом аденокарциномы. Сверхэкспрессия EGFR напрямую связана с анеуплоидией, пролиферативным индексом и метастазированием в регионарные лимфатические узлы [6]. Активация c-met и K-sam коррелирует с прогрессией и метастазированием опухоли. Сверхэкспрессию протоонкогена bcl-2, блокирующего апоптоз и отвечающего за иммортализацию клеток, наблюдают на ранних фазах возникновения опухоли [6].

К основным свойствам всех злокачественных опухолей относят повышенную способность к пролиферации, утрату способности к полной дифференцировке

и апоптотической гибели, а также инвазивный рост и метастазирование [5]. Нарушение механизмов пролиферации – одна из главных особенностей опухолевых клеток. Уровень пролиферативной активности определяет агрессивность и злокачественность опухолевого процесса [7]. Пролиферативную активность клеток можно исследовать по экспрессии белка Ki-67.

Антитела к Ki-67 выявляют пролиферирующие клетки, находящиеся в разных фазах цикла. Это наиболее надежный и четкий маркер пролиферации. Антиген Ki-67, который определяют с помощью соответствующих моноклональных антител, представляет собой короткоживущий протеин и разрушается в течение 1,5–2 часа. Поэтому антитела к Ki-67 выявляют только делящиеся клетки, так как Ki-67 не успевает накапливаться и не остается в покоящихся клетках. Белок Ki-67 в основном связан с хромосомами, определяется в области теломер, центромер, в ядрышках. Он очень лабилен при наличии протеаз, что затрудняет его изучение, поэтому связь с белками, регулирующими клеточный цикл, мало изучена и четко не определена. Тем не менее показано, что микроинъекции антител к Ki-67 приводят к снижению пролиферативной активности клеток. В точке G0 клеточного цикла белок не отмечен, также как и в начале G1-фазы первого клеточного цикла. Появление Ki-67 происходит в конце фазы G1, его уровень постепенно нарастает на протяжении S-фазы и достигает максимума к митозу. Ki-67 – надежный индикатор пролиферации практически во всех опухолевых образованиях человека [2].

Цель работы

Изучить влияние гиперэкспрессии иммуногистохимического маркера Ki-67 на продолжительность жизни больных раком желудка 0–III стадий.

Пациенты и методы исследования

Исследовали 129 больных резектабельным раком желудка 0–III стадий ($T_{is-3}N_{0-2}M_0G_{1-4}$), получивших лечение в Запорожском областном клиническом онкологическом диспансере с июня 2006 по октябрь 2013 года. Среди больных – 76 мужчин (58,9%) и 53 женщины (70,1%). Возраст пациентов – от 28 до 80 лет. Окончательное стадирование проведено после морфологического исследования операционного препарата: с 0 стадией – 2 (1,6%) больных, I – 18 (14%), II – 44 (34%), с III стадией заболевания – 65 (50,4%) пациентов.

Всем больным, вошедшим в исследование, произведено радикальное хирургическое вмешательство: гастрэктомия – 39 (30,2%) пациентам с раком желудка, субтотальная дистальная резекция – 76 (58,9%), проксимальная субтотальная резекция – 14 (10,9%) пациентам (рис. 1).

Адьювантную полихимиотерапию получили 62 (48%) больных раком желудка, 67 (52%) пациентов не получали химиотерапевтического лечения. При проведении химиотерапии использовали стандартные схемы лечения согласно приказу МЗ Украины от 29 апреля 2011 г. № 247. Химиотерапию начинали не позднее 1,5 месяца после оперативного вмешательства.

Имуногистохимическое исследование проведено



Рис. 1. Распределение пациентов в зависимости от вида проведенного оперативного вмешательства.

на парафиновых срезах опухоли желудка, полученных при плановом послеоперационном гистологическом исследовании. После депарафинизации и регидратации срезов проводили высокотемпературную (pH=9,0) демаскировку антигенов путем нагревания на водяной бане в Трис-ЭДТА буфере и ингибировании эндогенной пероксидазы путем инкубации в течение 10 минут в 3% растворе перекиси водорода. Иммуногистохимическое исследование выполнено с использованием моноклональных антител Mo a-Hu Ki-67 Antigen, Clone MIB-1 против маркера антигена клеточной пролиферации Ki-67. После 30-минутной инкубации с первичными антителами, их визуализировали с помощью системы детекции EnVision FLEX с хромогеном DAB+ (DAKO, США). После проявления результатов иммуногистохимической реакции срезы докрашивали гематоксилином Майера и заключали в бальзам. Результаты иммуногистохимической реакции оценивали полуколичественным методом с помощью микроскопа Axioptan 2 (Carl Zeiss, ФРГ). Индекс клеточной пролиферации вычисляли по ядерной экспрессии антигена Ki-67: 0–5% иммуноокрашенных ядер опухолевых клеток составляли 0 баллов, 6–25% – 1 балл, 26–50% – 2 балла, 51–75% – 3 балла, 76–100% – 4 балла.

Все опухоли в зависимости от количества Ki-67-положительных клеток разделены на опухоли с высокой пролиферативной активностью (количество Ki-67-положительных клеток в опухоли не менее 25%) и низкой пролиферативной активностью (количество Ki-67-положительных клеток в опухоли меньше 25%).

При исследовании выживаемости пациентов статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Excel (MS Office 2007) и STATISTICA 6,0 (StatSoft Inc., США). Для оценки выживаемости использовали метод Каплана – Майера, с

определением достоверности разницы между группами с помощью Соx F-критерия. Статистически значимым считали уровень $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Проведенный анализ показал преобладание пациентов с опухолями с высокой пролиферативной активностью ($Ki-67 > 25\%$) – 65,9% (85 больных). Наибольшее количество пациентов с гиперэкспрессией Ki-67 отмечено среди больных раком желудка III стадии – 52 (40,3%) пациента, больные со II стадией – 30 (23,3%); с 0–I стадиями преобладали пациенты с низкой пролиферативной активностью Ki-67 – 13 (10%) больных (с гиперэкспрессией – 7 (5,4%)). При II и III стадиях процент пациентов с низкой экспрессией Ki-67 составил почти одинаковое количество (14 (10,9%) больных против 13 (10%) соответственно).

При изучении экспрессии Ki-67 в группах пациентов с различными стадиями рака вне зависимости от проведенного лечения отмечено достоверное улучшение выживаемости среди больных с 0–I стадиями при наличии низкой пролиферативной активности Ki-67 по сравнению с высокой: в группе с низкой активностью Ki-67 медиана выживаемости не достигнута, за период наблюдения в течение 4,2 года умер 1 больной из 13 (7,7%), в группе с высокой пролиферативной активностью Ki-67 умерли 3 пациента из 7 (42,9%) ($p = 0,026$) (рис. 2).

В группах больных раком желудка II и III стадий от-

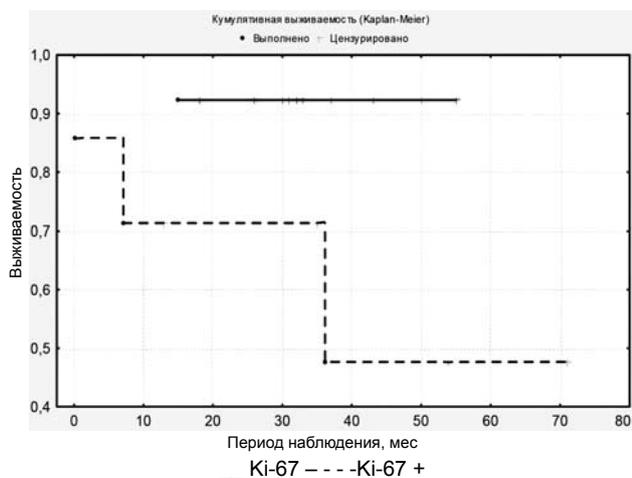


Рис. 2. Выживаемость больных раком желудка 0–I стадий в зависимости от экспрессии Ki-67.

мечено улучшение выживаемости при наличии высокой экспрессии Ki-67 (рис. 3).

Медиана выживаемости у пациентов со II стадией при низкой экспрессии Ki-67 составила 39,3 месяца, а у больных с высокой пролиферативной активностью Ki-67 – не достигнута ($p = 0,035$). Данные при III стадии аналогичны: медиана выживаемости пациентов с низкой экспрессией Ki-67 составила 19,4 месяца против 25,5 месяца у больных с низкой пролиферативной активностью Ki-67 ($p = 0,23$).

Исходя из полученных результатов пациентов со II

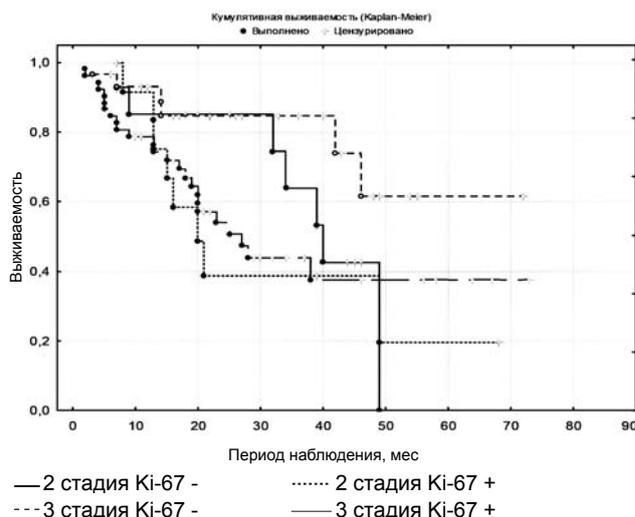


Рис. 3. Выживаемость больных раком желудка II–III стадий в зависимости от экспрессии Ki-67.

и III стадиями рака, проведен анализ выживаемости внутри групп. Сравнили больных с разным уровнем экспрессии в группе пациентов, которые получили только хирургическое вмешательство, и в группе больных, которым выполнена операция и назначено адъювантное химиотерапевтическое лечение.

Среди больных раком желудка II стадии, получивших только хирургическое лечение, достоверного улучшения выживаемости в зависимости от уровня пролиферативной активности Ki-67 не отмечено (медианы выживаемости в группах с низкой и высокой экспрессией не достигнуты, $p = 0,23$) (рис. 4).

В ходе анализа выживаемости в группе пациентов со II стадией рака, которым проведено комбинированное лечение (операция и адъювантная химиотерапия), отмечено улучшение выживаемости у больных с высокой пролиферативной активностью Ki-67: медиана выживаемости не достигнута, а у больных с низкой экспрессией

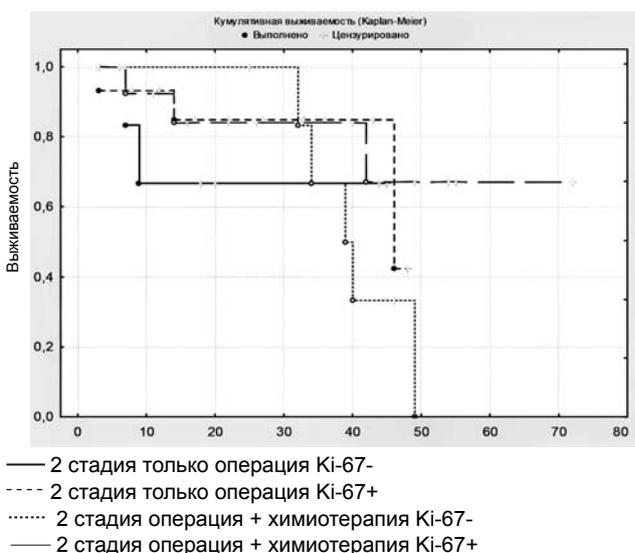


Рис. 4. Выживаемость больных раком желудка II стадии в группах только оперативного и комбинированного лечения в зависимости от экспрессии Ki-67.

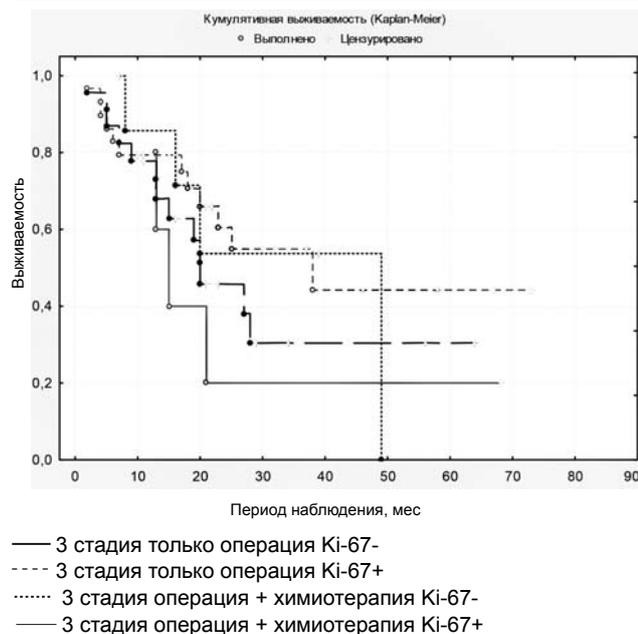


Рис. 5. Выживаемость больных раком желудка III стадии в группах только оперативного и комбинированного лечения в зависимости от экспрессии Ki-67.

Ki-67 она составила 39 месяцев ($p=0,05$) (рис. 4).

Изучение выживаемости больных раком III стадии в группе хирургического лечения показало улучшение выживаемости у пациентов с высокой пролиферативной активностью Ki-67 по сравнению с больными с низкой экспрессией Ki-67 (медианы выживаемости – 31 и 14 месяцев соответственно; $p=0,03$) (рис. 5).

Анализ выживаемости, проведенный среди больных раком III стадии, которые получили комбинированное лечение, не показал существенных различий в зависимости от уровня экспрессии Ki-67, медианы выживаемости у пациентов с низкой и высокой экспрессией составили 21,9 и 20 месяцев соответственно ($p=0,27$) (рис. 5).

Выводы

1. Гиперэкспрессия Ki-67 отмечена в опухолевой ткани у 65,9% больных раком желудка и свидетельствует об агрессивности процесса.

2. Назначение адъювантной химиотерапии больным раком желудка II стадии при наличии высокой пролиферативной активности Ki-67 достоверно улучшает продолжительность жизни ($p<0,05$).

Список литературы

1. Антонеева И.И. Маркеры апоптоза и пролиферации в динамике прогрессирования рака яичника / И.И. Антонеева, С.Б. Петров // Онкология. – 2008. – Т. 10. – №2. – С. 234–237.
2. Бабиченко И.И. Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста / И.И. Бабиченко, В.А. Ковязин. – М.: РУДН, 2008. – 109 с.
3. Делекторская В.В. Молекулярно-биологические маркеры метастазирования и прогноза при раке толстой кишки : дис. на соискание ученой степени д.мед.н.: 14.00.14 / В.В. Делекторская. – М., 2007. – 247 с.
4. Иммуногистохимический профиль эндометриоидной аденокарциномы тела матки: ER, PR, HER-2, Ki-67 и их прогностическое значение / К.М. Пожарисский, В.П. Тен, Н.А. Максимова и др. // Архив патологии. – 2005. – Т. 68. – №2. – С. 13–17.
5. Копнин В.Р. Современные представления о механизмах злокачественного роста / В.Р. Копнин // Материалы X Российского онкологического конгресса (г. Москва, 21–23 ноября 2006 г.). – М., 2006. – С. 99–102.
6. Петров С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / С.В. Петров, Н.Т. Райхлин. – 3-е изд. – Казань: Титул, 2004. – 456 с.
7. Пожарисский К.М. Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний / К.М. Пожарисский, Е.Н. Леенман // Архив патологии. – 2000. – №5. – С. 3–11.
8. Рак в Украине, 2009–2010 / З.П. Федоренко, А.В. Гайсеренко, Л.О. Гулак и др. // Бюллетень национального канцер-реестра Украины. – 2010. – №12. – С. 37.
9. Сабиров А.Х. Гистологические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические маркеры рака молочной железы, их прогностическая значимость : автореф. дис. на соискание ученой степени д.мед.н.: спец. 03.03.04 «Клеточная биология, цитология, гистология» / А.Х. Сабиров. – Тюмень, 2010. – 20 с.

References

1. Antoneeva, I. I., & Petrov, S. B. (2008). Markery apoptoza i proliferacii v dinamike progressirovaniya raka yaichnika [Markers of apoptosis and proliferation in the dynamics of the progression of ovarian cancer]. *Oncology*, 10(2), 234–237. [in Ukrainian].
2. Babichenko, I. I., & Kovyazin, V. A. (2008). *Novye metody immunogistokhimicheskoy diagnostiki opukholevogo rosta* [New methods of immunohistochemical diagnosis of tumor growth]. Moscow. [in Russian].
3. Delektorskaya, V. V. (2007). *Molekulyarno-biologicheskie markery metastazirovaniya i prognoza pri rake tolstoj kishki* (Dis... dokt. med. nauk). [Molecular biological markers of metastasis and prognosis in colorectal cancer. Dr. med. sci. diss.]. Moscow. [in Russian].
4. Pozharisskij, K. M., Ten, V. P., Maksimova, N. A., Samsonova, E. A., & Umancheeva, A. F. (2005). Immunogistokhimicheskij profil' e'ndometrioidnoj adenokarcinomy tela matki: ER, PR, HER-2, Ki-67 i ikh prognosticheskoe znachenie [Immunohistochemical profile endometrioid uterine adenocarcinoma: ER, PR, HER-2, Ki-67 and their prognostic value]. *Arhiv patologii*, 68(2), 13–17. [in Russian].
5. Koptin, V. R. (2006) *Sovremennye predstavleniya o mekhanizmax zlokachestvennogo rosta* [Modern understanding of the mechanisms of malignant growth]. *Proceedings of the 10th Congress of the Russian Cancer*, (pp. 99–102). Moscow. [in Russian].
6. Petrov, S. V., & Rajkhlina, N. T. (2004). *Rukovodstvo po immunogistokhimicheskoy diagnostike opukholej cheloveka* [Guide immunohistochemical diagnosis of human tumors]. Kazan' : Titul. [in Russian].
7. Pozharisskij, K. M., & Leenman, E. N. (2000). *Znachenie immunogistokhimicheskikh metodik dlya opredeleniya kharaktera lecheniya i prognoza opukholevykh zabolovanij* [The value of immunohistochemical techniques to determine the nature of the treatment and prognosis of neoplastic diseases]. *Arhiv patologii*, 5, 3–11. [in Russian].

8. Fedorenko, Z. P., Gajserenko, A. V., Gulak, L. O., Gorokh, E. L., Ryzhov, A. U., Sumkina, O. V., & Kutsenko, L. B. (2010). Rak v Ukraine, 2009–2010 [Cancer in Ukraine, 2009–2010]. *Byulleten' nacional' nogo kancer-reestra Ukrainy*, 12, 37. [in Ukrainian].
9. Sabirov, A. Kh. (2010). *Gistologicheskie, immunogistokhimicheskie i molekulyarno-geneticheskie markery raka molochnoj zhelezy, ikh prognosticheskaya znachimost'* (Dis... dokt. med. nauk). [Histological, immunohistochemical and molecular genetic markers of breast cancer and their prognostic significance. Dr. med. sci. diss.] Tyumen'. [in Russian].

Сведения об авторах:

Левик Е.Н., заочный аспирант, ассистент каф. онкологии и онкохирургии, Запорожский государственный медицинский университет, E-mail: drakosha81@mail.ru.

Шевченко А.И., д. мед. н., профессор, зав. каф. онкологии и онкохирургии, Запорожский государственный медицинский университет.

Туманский В.А., д. мед. н., профессор, зав. каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, директор Института клинической патологии человека.

Евсеев А.В., к. мед. н., ассистент каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет.

Відомості про авторів:

Левик О.М., заочний аспірант, асистент каф. онкології і онкохірургії, Запорізький державний медичний університет, E-mail: drakosha81@mail.ru.

Шевченко А.І., д. мед. н., професор, зав. каф. онкології і онкохірургії, Запорізький державний медичний університет.

Туманський В.О., д. мед. н., професор, зав. каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медичний університет, директор Інституту клінічної патології людини.

Євсєєв А.В., к. мед. н., асистент каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медичний університет.

Information about authors:

Levyk O.M., Assistant of Department of Oncology, Zaporizhzhia State Medical University, E-mail: drakosha81@mail.ru.

Shevchenko A.I., MD, PhD, DSci, Professor, Head of the Department of Oncology, Zaporizhzhia State Medical University.

Tumanskiy V.A., MD, PhD, DSci, Professor, Head of the Department of Pathologic Anatomy and Forensic Medicine,

Zaporizhzhia State Medical University, E-mail: tumanskiy@zsmu.zp.ua.

Evseyev A.V., M.D., Ph.D., Zaporizhzhia State Medical University, associate professor of the Department of Pathologic Anatomy and Forensic Medicine, E-mail: evseevanton@ukr.net.

Надійшла в редакцію 19.12.2014 р.