

выявлено достоверное статистическое различие между характером морфологических изменений в многослойном плоском эпителии в подгруппах CIN1, CIN2 и CIN3 и вызывающими их типами ВПЧ. Наличие «собственной» этиологии и типичной морфологической картины для каждой из этих подгрупп, позволяет рассматривать их не как стадии единого процесса, а как самостоятельные клинико-морфологические формы. При таком подходе получают своё логическое объяснение случаи развития РШМ в молодом возрасте. Как видно из полученных данных, в прогностическом плане имеет значение не само выявление определённого типа ВПЧ, а его онкогенная нагрузка.

Выводы:

1. Цервикальная интраэпителиальная неоплазия лёгкой, средней и тяжёлой степени, рассматриваемая в настоящее время как стадии единого процесса, на самом деле представляет собой самостоятельные клинико-морфологические формы вирусного поражения эпителия экзоцервикса.

2. Характер морфологических изменений экзоцервикса определяется типом вируса и его вирусной нагрузкой.

3. В прогностическом плане время от инфицирования вирусом папилломы человека до развития рака также зависит от типа вируса и его вирусной нагрузки и определяется тяжестью (формой) цервикальной интраэпителиальной неоплазии.

Литература

1. Наврузова В.С. Анализ результатов хирургического лечения рака шейки матки пациенток фертильного возраста/В.С. Наврузова// Опухоли женской репродуктивной системы, 2015. №3.-С.87-96

2. Нарвская О.В. Вирус папилломы человека. Эпидемиология, лабораторная диагностика и профилактика папилломавирусной инфекции/ О.В. Нарвская// Инфекция и иммунитет, 2011, Т. 1, № 1, с. 15–22)

3. Рахматулина М. Р. Сравнительный анализ методов диагностики и терапии клинических проявлений папилломавирусной инфекции/М. Р. Рахматулина, А. В. Семенов // Вестник дерматологии и венерологии, 2015. т.№ 1.-С.46-53.

4. Роговская С.И., Липова Е.В. Шейка матки, влагалище, вульва. Физиология, патология, кольпоскопия, эстетическая коррекция: руководство для практикующих врачей / под ред. С.И. Роговской, Е.В. Липовой. - М.: Издательство журнала Status Praesens, 2014. - 832 с.

УДК 61:57.086

А.Н. Козинцев, Е.А. Новикова, В.Я. Крохалев
ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ЯДЕРНЫХ ФЕРМЕНТОВ
ТОПОИЗОМЕРАЗЫ- IIА И KI-67 В ГРУППАХ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ

**МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С РАЗНЫМ СТАТУСОМ ЭКСПРЕССИИ
ЭСТРОГЕНОВЫХ И ПРОГЕСТЕРОНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ**

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии
Уральский Государственный Медицинский Университет
Екатеринбург, Российская Федерация

A.N Kodintsev, E.A Novikova, V.Y Krokhaev

**EXPRESSION PECULIARITIES OF NUCLEAR ENZYMES
TOPOISOMERASE-IIA AND KI-67 IN GROUPS OF BREAST CARCINOMA
CELLS WITH DIFFERENT EXPRESSION STATUS OF ESTROGEN AND
PROGESTERONE RECEPTORS**

Department of histology, cytology and embryology USMU
Ural State Medical University
Yekaterinburg, Russian Federation

Контактный e-mail: antonkodintsev@mail.ru

Аннотация. Исследованы 367 случаев инфильтративной карциномы молочной железы на экспрессию топоизомеразы II-α (TOP-IIα), Ki-67 из них 359 образцов опухолей на экспрессию рецепторов прогестерона и эстрогена иммуногистохимическим (ИГХ) методом. Пороговый уровень экспрессии TOP2A - 10%. Уровень экспрессии Ki-67 оценивали согласно рекомендациям Breastcancer.org. Оценку уровня экспрессии рецепторов эстрогена (ER) и прогестерона (PR) оценивали по шкале Allred DC. Все случаи были разделены на три группы в зависимости от значения Ki-67, в которых оценивался уровень экспрессии TOP-IIα. При исследовании экспрессии стероидных рецепторов все случаи были разделены на 3 группы, в которых оценивалась корреляция ядерных антигенов и рецепторов. Установлено, что уровень экспрессии TOP-IIα увеличивается одновременно с уровнем экспрессии Ki-67 и не зависит от уровня экспрессии ER и PR.

Annotation. Investigation of 367 cases of infiltrating breast carcinoma for TOP-IIα, Ki-67 expression and 359 samples of breast tumors the expression of progesterone and estrogen receptors has been studied by immunohistochemistry. Cat off point of TOP-IIα - 10%. Expression level of Ki-67 was evaluated in accordance with Breastcancer.org. Appreciation of receptor expression level was performed according to the scale used by Allred DC et al. All cases were divided into three groups depending on Ki-67. Grouping TOP-IIα expression values was carried out inside the three formed groups. All cases of steroid receptor were divided into 3 groups. Correlation evaluation of nuclear antigens and receptors was fulfilled inside the four formed groups. It was found out that the number of cases with TOP-IIα overexpression increased simultaneously with the increase of Ki-67 expression level. The frequency of Ki-67 and Top- IIα overexpression does not depend on from expression of receptors ER/PR.

Ключевые слова: топоизомераза IIα, Ki-67, рецепторы.

Keywords: topoisomerase II α , Ki-67, receptors.

Статистические данные последних лет свидетельствуют о нарастающем темпе роста заболеваемости раком молочной железы (РМЖ) и характеризуется большим разнообразием клинического течения. Более того, инвазивный РМЖ является гетерогенной группой опухолей с широкой вариацией в отношении клинических проявлений и прогноза. Определение таких молекулярно-биологических маркеров как, Her-2/neu, ER, PR, TOP II α и Ki-67, может дать дополнительную информацию о скорости роста опухоли, способности к метастазированию, устойчивости к химиопрепаратам [3]. Биологические особенности каждой конкретной опухоли могут помочь в прогнозировании исхода заболевания и в индивидуализации лечения [4].

Ki-67 – это ядерный белок, связанный с клеточной пролиферацией, который участвует в синтезе рибосомальной РНК и экспрессируется в фазах клеточного цикла S, G1, G2, и M. В образцах нормальной ткани молочной железы он экспрессируется на низком уровне (менее 3% клеток в ER-негативных опухолях, но не в ER-позитивных) [5,6]. Мета-анализ с участием 12155 пациенток с РМЖ показал, что повышенная экспрессия Ki-67 увеличивает риск рецидива и ухудшает прогноз выживаемости пациенток с ранними стадиями данного заболевания [6, 11]. В настоящее время Ki-67 используется как дополнительный предиктивный фактор при выборе адъювантной химиотерапии [10]. Ядерный фермент TOP- II α играет ключевую роль в репликации, пролиферации, репарации ДНК и является мишенью для антрациклинов [9]. Tokiniwa H, et. al. обнаружили достоверную корреляцию между повышением уровня экспрессии TOP- II α и Ki-67 в клетках РМЖ [10]. Существует все больше доказательств, что TOP-II α может выступать независимым прогностическим фактором, а амплификация гена TOP- II α может быть использована как предиктивный маркер к антрациклинам (Koren R, Rath-Wolfson L, Ram E с соавт., 2004) [1,7]. Однако в настоящее время не существует единых рекомендаций для оценки порогового значения уровня гиперэкспрессии TOP-II α .

Цель исследования – изучить экспрессию TOP II α и Ki-67 в группах клеток РМЖ с разным статусом экспрессии эстрогеновых и прогестероновых рецепторов.

Материалы и методы исследования

Было исследовано 367 образцов инфильтративной карциномы молочной железы гистологическим, иммуногистохимическим (ИГХ), и статистическими методами на базе лаборатории патоморфологии ГБУЗСО «Институт медицинских клеточных технологий» на депарафинизированных срезах с использованием автоматической системы ИГХ окрашивания Universal Staining System Autostainer Dako. Демаскировка антигенных детерминант проводилась в миниавтоклаве Pascal (DakoCytomation) 10 мин. при 15 psi (121°C) в Target Retrieval Solution (Dako, S1699). Визуализация с помощью EnVision+ Dual Link

System – HRP (Dako, K4061). Для оценки уровня экспрессии Ki-67 использовали моноклональные антитела MIB1. Экспрессию Ki-67 оценивали в соответствии с рекомендациями Breastcancer. org. ($>10\%$ - **низкая**; **10% – 20% – пограничная**; **$<20\%$ гиперэкспрессия**). Пороговое значение экспрессии TOPII- α $>10\%$ [1, 2].

В 359 образцах РМЖ была исследована экспрессия рецепторов стероидных гормонов. Полуколичественная оценка ИГХ проводилась согласно критериям D.C. Allred, et al. (от 0 до 8 баллов); ER+/PR+ позитивными опухолями считаются при сумме баллов 3 и более. Все случаи были разделены на 3 группы: ER+/PR-(n=55); ER+/PR+ (n=138); ER-/PR-(n=165). Статистический анализ проводился с помощью программного пакета Microsoft Office Excel 2013 и программы STATISTICA 10 (En. Version; StatSoft, Inc.).

Результаты исследования и их обсуждение

В соответствии с пороговым значением экспрессии TOP II- α ($\geq 10\%$) все случаи (n=368) были разделены на две группы. В группу 1 вошли случаи экспрессии TOP II- α $> 10\%$ (гиперэкспрессия) (n = 117; 32%), где значение экспрессии Ki-67 составляет 70%. В группу 2 вошли случаи с нормальным уровнем экспрессии TOP II- α $\leq 10\%$ (n=250; 68%), где максимальное значение Ki-67 составляет 80%. Среднее значение уровня экспрессии Ki-67 в первой группе опухолей (TOP II- α $> 10\%$) = 35%, что свидетельствует о преобладании карцином с гиперэкспрессией Ki-67. Во второй группе образцов (TOP II- α $\leq 10\%$) составляет 14,7%, т.е. Ki-67 имеет пограничный уровень экспрессии (Таблица 1).

Таблица 1. Группы клеток с разным уровнем экспрессии TOP II- α и Ki-67

Ядерные антигены	Ki- 67 (0% - 10%)	Ki-67 (10% - 20%)	Ki-67 ($>20\%$)
Топоизомераза II-α ($\leq 10\%$)	95 (97,9%)	85 (80,2%)	70 (43,1%)
Топоизомераза II-α ($>10\%$)	2 (2,1%)	21 (19,8%)	94 (56,9%)

Гипотеза о нормальном распределении Пирсона ($r=0,6972$; $p < 0,05$) отвергалась как для Ki-67 и TOP II- α , так и для ER и PR, поэтому корреляция определялась с помощью непараметрического критерия Спирмена. Удалось обнаружить среднюю значимую корреляцию между изначальными не сгруппированными значениями Ki-67 и TOP II- α ($R_s=0,607575$; $p<0,05$).

В группе, где Ki-67 ($<10\%$) преобладают случаи, с нормальным уровнем экспрессией TOP II- α (97,9%). При статистическом анализе обнаружена средняя, значимая корреляция ($R_s=0,475686$; $p < 0,05$). В группе, где Ki-67 (10%-20%) наблюдался рост случаев с гиперэкспрессией TOP II- α (19,8%) по сравнению с клетками, где нормальное значение TOP II- α (80,2%). При статистическом анализе второй группы определяется слабая незначимая корреляция ($R_s=0,159658$; $p<0,05$). В группе, с гиперэкспрессией Ki-67 ($>20\%$),

наблюдается значительное преобладание образцов РМЖ с гиперэкспрессией TOP II-α (>10%) (56,9%) в отличие от клеток с нормальным уровнем экспрессии TOPII-α (43,1%), между Ki-67 и TOP II-α выявлена средняя, значимая корреляция ($R_{(s)}=0,442732$; $p<0,05$). Наиболее сильная статистически значимая корреляция отмечается в группе клеток с нормальным значением экспрессии TOP II-α и Ki-67 ($R_{(s)}=0,475686$; $p<0,05$). Между TOP II-α и PR обнаружена слабая обратная значимая корреляция ($R_{(s)}=-0,206206$; $p<0,05$), TOP II-α и ER ($R_{(s)} = -0,107469$; $p<0,05$). Слабая значимая корреляция выявлена между Ki-67 и PR ($R_{(s)} = -0,259825$; $p<0,05$), Ki-67 и ER ($R_{(s)}=-0,173846$; $p<0,05$).

При изучении уровня экспрессии TOP II-α внутри 3 групп (Таблица 2), прямая слабая значимая корреляция наблюдается в группе ER+/PR+ между TOP II-α и ER ($R_{(s)} = 0,189958$; $p<0,05$) и в группе ER+/PR-: между TOP II-α и ER ($R_{(s)} = 0,189958$; $p<0,05$). Обратная слабая значимая корреляция наблюдается в группе ER+/PR-: между TOP II-α и PR ($R_{(s)} = -0,290028$; $p<0,05$). В группе ER+/PR- между Ki-67 и ER наблюдается обратная слабая значимая корреляция ($R_{(s)} = -0,272146$; $p<0,05$). В группах ER+/PR+ и ER-/PR- корреляция между Ki-67 и ER/PR отсутствует.

Таблица 2. Группы образцов РМЖ с разным уровнем экспрессии стероидных рецепторов и TOP2A, Ki-67

	ER+/PR-	ER+/PR+	ER-/PR-
TOP II-α (≤ 10%)	39 (70,9%)	102 (73,9%)	103 (62,4%)
TOP II-α (>10%)	16 (29,1%)	36 (26,1%)	62 (37,6%)
Ki-67 (0%-10%)	15 (27,2%)	43 (31,2%)	38 (25,5%)
Ki-67 (10%-20%)	18 (32,7%)	50 (36,2%)	17 (11,4%)
Ki-67 (>20%)	22 (40%)	45 (32,6%)	94 (63,1%)

При оценке уровня экспрессии Ki-67 и TOP II-α внутри 4 групп, не удалось установить закономерную значимую корреляционную связь между уровнем гиперэкспрессии ядерных антигенов и стероидных рецепторов, что согласуется с данными литературы (Nikolenyi A et al., 2012) [8].

Выводы

1. Между TOP II-α и Ki-67 определялась средняя значимая корреляция.
2. Наиболее сильная корреляция TOP II-α и Ki-67 выявляется в группе клеток с нормальным уровнем экспрессии данных ферментов.
3. Число случаев, сопровождающихся гиперэкспрессией TOPII-α увеличивается одновременно с возрастанием уровня экспрессии Ki-67.
4. Частота гиперэкспрессии Ki-67 и TOP II-α не зависит от уровня экспрессии эстрогеновых и прогестероновых рецепторов.

Литература

1. Арутюнян Е.В, Новикова Е.А. Анализ их маркеров клеток карциномы молочной железы с уровнем экспрессии белка топоизомеразы IIα // Health & education millennium. 2014. - Т.16.- № 3.- 3-6.
2. Козинцев А. Н., Новикова Е. А., Сазонов С. В., Крохалев В. Я. Изучение гиперэкспрессии фермента топоизомеразы II-α в группах клеток карциномы молочной железы с разным статусом экспрессии белка HER-2 // Вестник уральской медицинской академической науки. 2014. -№ 5 (51).- 79-83.
3. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Тканевые маркеры как факторы прогноза при раке молочной железы // Практическая онкология. 2002. -Т.3. №1.- 39-40.
4. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В.. Опухолевые маркеры при раке молочной железы // Врач. 2011. - №1.- 2-12.
5. Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, et al. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. J Cell Physiol. 2006 Mar; 206 (3):624-35.
6. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. Breast Cancer Res Treat. 2013 Jun;139(2):539-52.
7. Koren R, Rath-Wolfson L, Ram E, et al. Prognostic value of Topoisomerase II in female breast cancer. Oncol Rep. 2004 Oct;12(4):915-9.
8. Nikolenyi A, Uhercsák G, Csenki M, et al. Tumour topoisomerase II alpha protein expression and outcome after adjuvant dose-dense anthracycline-based chemotherapy. Pathol Oncol Res. 2012 Jan;18(1):61-8.
9. Rody A, Karn T, Ruckhäberle E. Gene expression of topoisomerase II alpha (TOP2A) by microarray analysis is highly prognostic in estrogen receptor (ER) positive breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2009 Feb;113(3):457-66.
10. Tokiniwa H, Horiguchi J, Takata D, et al. Topoisomerase II alpha expression and the Ki-67 labeling index correlate with prognostic factors in estrogen receptor-positive and human epidermal growth factor type-2-negative breast cancer. Breast Cancer. 2012 Oct;19(4):309-14.
11. Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1–98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. J Clin Oncol 26(34):5569-5575

УДК 611.08

**Д.К.Козманишвили, В.С.Леонов, Н.Р.Шабунина–Басок, Е.Ю.Ермишина
О ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АУТОПСИЙНОГО
МАТЕРИАЛА ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО**