

УДК 618.11-006.6-091.8

**ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ
ЦИКЛИНОВ B1 И D1 ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ**А. В. Шульга¹, В. А. Басинский², С. Э. Савицкий²¹Гродненский государственный медицинский университет²Гродненская областная клиническая больница

Циклины — семейство регуляторных белков, контролирующих клеточный цикл. Наличие функциональных и структурных нарушений регуляторов клеточного цикла (циклинов и циклинзависимых киназ) доказано для новообразований различных локализаций. В 69 случаях первичного рака яичников с помощью иммуногистохимического метода изучена экспрессия циклинов B1 и D1. Выявлена зависимость пятилетней выживаемости и степени дифференцировки опухоли от уровня экспрессии циклинов D1, B1.

Ключевые слова: рак яичников, иммуногистохимия, циклин B1, циклин D1, прогноз

**PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF EXPRESSION
OF CYCLINES B1 AND D1 IN CASE OF OVARIAN CARCINOMA**A. V. Shulga¹, V. A. Basinski², S. E. Savicki²¹Grodno State Medical University²Grodno Regional Clinical Hospital

Cyclins are a family of regulatory proteins that play a key role in controlling the cell cycle. Abnormalities of cell cycle regulators, including cyclins and cyclin dependent kinases, have been reported in various malignant tumors. Expression of cyclin B1, D1 was investigated with immunohistochemical method in 69 cases of primary ovarian carcinoma. Five-year survival and degree of differentiation have been found to depend on cyclins D1, B1.

Key words: ovarian cancer, immunohistochemistry, cyclin B1, cyclin D1, prognosis.

Введение

Регуляция клеточного цикла необходима для контроля пролиферации и дифференцировки клеток, а также сохранения целостности генома. Нарушение этой регуляции — отличительный признак опухолевой клетки. Координация прогрессии клеточного цикла через фазы роста и синтеза управляются событиями фосфорилирования/дефосфорилирования, которые промотируются регуляторными белками, называемыми циклинами, в соединении с каталитическими субъединицами, известными как циклинзависимые киназы (Cdk). Циклинзависимые киназы, активированные фосфорилированием Cdk-активирующей киназой (CAK), интегрируют митогенные и рост-ингибиторные сигналы и координируют клеточный цикл. В настоящее время принята классификация циклинов в соответствии с фазами клеточного цикла: циклины фазы G1 — D1, D2 и D3, циклины S-фазы — A и E, фазы G2/M — B1 и B2. Уровень циклинов направленно меняется в ходе клеточного цикла таким образом, что в каждой стадии цикла активен обычно только один определенный комплекс циклин-циклинзависимой киназы (Cdk). Прогрессию фаз G1→S регулируют циклин D-, E- и A-зависимые киназы, а фаз G2→M — циклин-B-зависимые [1].

Представляет несомненный интерес изучение роли циклинов D1 и B1 в прогнозе злокачественных новообразований, так как пер-

вый контролирует вход в синтетическую фазу клеточного цикла, а второй — непосредственно переход к митозу. Считается, что образование комплекса циклин B-Cdk1 является «точной безвозвратности митоза».

Прогностическая ценность выявления циклинов B1 и D1 доказана для новообразований различных локализаций. При исследовании циклина B1 в раке молочной железы и пищевода он оказался независимым прогностическим фактором метастазирования в лимфатические узлы [2, 3]. В раке шейки матки, молочной железы экспрессия данного маркера была связана с безрецидивной выживаемостью [4, 5]. Повышенная экспрессия циклина D1 также оказалась неблагоприятным прогностическим фактором при злокачественных новообразованиях толстой кишки, молочной железы, плоскоклеточном раке полости рта и языка [6].

Публикации, посвященные изучению циклинов в раке яичников (РЯ), часто носят противоречивый характер. Большинство исследователей отмечают гиперэкспрессию указанных маркеров в РЯ по сравнению с доброкачественными, пограничными опухолями [7, 8] и неизменной тканью яичника [9]. Однако в других работах гиперэкспрессию циклина D1 связывают с благоприятным прогнозом [10], высокой степенью дифференцировки новообразования [11]. Противоречивые данные получены при сравнительном анализе влияния цик-

линов на выживаемость больных. Гиперэкспрессия циклина D1 рассматривается как независимый неблагоприятный фактор прогноза безрецидивной выживаемости [12, 13], тогда как в других исследованиях не находят связь данных маркеров с продолжительностью жизни у больных РЯ [14]. Только в единичных публикациях проведена сравнительная характеристика экспрессии циклинов B1 и D1 в РЯ разных гистологических типов [9, 13], где данные носят разрозненный характер.

Цель исследования

Провести сравнительный анализ экспрессии циклинов B1 и D1 опухолевыми клетками в РЯ разных гистологических типов, степени дифференцировки и клинической стадии.

Материал и метод

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

Наиболее частым гистологическим типом РЯ был серозный (49), в 8 наблюдениях выявлена эндометриоидная аденокарцинома, 5 случаев муцинозного и 7 светлоклеточного вариантов новообразования. При этом в 14 случаях 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 безрецидивная выживаемость в исследуемой группе составила 24,6 % (при ранних стадиях — 51,9 %, при поздних — 7,2 %).

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование материала проводили на парафиновых срезах по стандартной методике с использованием мышиных моноклональных антител к циклину B1 (клон v152, разведение 1:50, «Dako»)

и циклину D1 (клон DCS-6, разведение 1:40, «Dako»). Демаскировку антигенов осуществляли при 98 °C в водяной бане в течение 40 мин, применяя цитратный буфер. В качестве детекционной системы использовали EnVision с ДАБ-хромогеном. Негативный контроль во всех случаях проводили с использованием вместо первичных антител 1 % раствора бычьего сывороточного альбумина.

Оценка цитоплазматической и ядерной экспрессии циклинов B1 и D1 проводилась полуколичественно в 6 случайных полях зрения, исходя из процента и интенсивности положительно окрашенных опухолевых клеток (позитивной считалась реакция при окраске более 10 % опухолевых клеток). Для оценки ИГХ реакции использовали 6-балльную шкалу и программы WCIF ImageJ и Aperio Image Score. Статистическая обработка проводилась с использованием программы «Statistica» 6.0 (Stat Soft, 2001 г.) с определением Н-критерия Крускала-Уоллиса и метода Каплана-Мейера (различия считались достоверными при $p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Анализ данных ИГХ исследований показал, что положительная реакция с антителами к циклину B1 выявлена в 59 (85,5 %) случаях РЯ. При этом в 36 наблюдениях отмечалась только цитоплазматическая экспрессия циклина B1, в 23 новообразованиях обнаружено сочетание цитоплазматического и ядерного окрашивания. Наличие положительной реакции с антителами к циклину D1 выявлено в 47 (68,1 %) случаях РЯ, чаще наблюдалось сочетание цитоплазматического и ядерного окрашивания (49 %). Следует отметить, что во всех муцинозных аденокарциномах отмечалась гиперэкспрессия изучаемых маркеров с преобладанием ядерно-цитоплазматической локализации, а наибольший процент случаев с отсутствием реакции с данными антителами был в группе серозных раков ранних клинических стадий (таблица 1).

Таблица 1 — Характер экспрессии циклинов B1 и D1 в зависимости от гистологического типа и клинической стадии рака яичников (n = 69)

Гистологический тип, стадия	Гиперэкспрессия *	Цитоплазматическая	Ядерная	Смешанная	Отсутствие
Серозный I–II стадия (n = 12)	Циклин D1	1 (8,3 %)	1 (8,3 %)	3 (25 %)	7 (58,4 %)
	Циклин B1	7 (58,4 %)	0	1 (8,3 %)	4 (33,3 %)
Серозный III–IV стадия (n = 37)	Циклин D1	12 (32,4 %)	0	13 (35,2 %)	12 (32,4 %)
	Циклин B1	19 (51,4 %)	0	14 (37,8 %)	4 (10,8 %)
Эндометриоидный (n = 8)	Циклин D1	3 (37,5 %)	1 (12,5 %)	2 (25 %)	2 (25 %)
	Циклин B1	5 (62,5 %)	0	2 (25 %)	1 (12,5 %)
Муцинозный (n = 5)	Циклин D1	2 (40 %)	0	3 (60 %)	0
	Циклин B1	2 (40 %)	0	3 (60 %)	0
Светлоклеточный (n = 7)	Циклин D1	4 (57,2 %)	0	2 (28,6 %)	1 (14,2 %)
	Циклин B1	3 (42,9 %)	0	3 (42,9 %)	1 (14,2 %)

* При наличии > 10 % позитивных клеток

Экспрессия изучаемых маркеров в большем количестве случаев характеризовалась диффузным или очаговым умеренно выраженным окрашиванием цитоплазмы, ядер опухолевых клеток, а также незначительного количества стромальных и эндотелиальных клеток (таблица 2). Ядерная локализация продуктов реакции с данными антителами чаще выявлялась в 10–30 % опухолевых клеток.

Наиболее выраженная цитоплазматическая реакция с антителами к обоим циклинам наблюдалась в муцинозном и серозном раке III–IV клинических стадий, а к циклину В1 — в светлоклеточном варианте аденокарциномы, в котором мы также видели больший процент

клеток с ядерной локализацией продуктов реакции к изучаемым маркерам. Обращала на себя внимание очаговость выраженной экспрессии циклинов, что может говорить о наличии участков в опухоли с повышенной пролиферативной активностью.

При анализе вариантов соотношения уровня экспрессии данных биомолекулярных маркеров в цитоплазме раковых клеток оказалось, что независимо от гистологического типа значительно чаще (59,4 % случаев) отмечалось превалирование экспрессии циклина В1 по сравнению с D1. В 29 % наблюдений РЯ она была одинаковой и только в 11,6 % случаев — преобладание экспрессии циклина D1.

Таблица 2 — Содержание циклинов В1 и D1 в цитоплазме (ц) и ядре (я) клеток РЯ различных гистологических типов

Гистотип	Серозный, I–II стадия, n = 12		Серозный, III–IV стадия, n = 37		Эндометриоидный, n = 8		Муцинозный, n = 5		Светлоклеточный, n=7	
	ц	я	ц	я	ц	я	ц	я	ц	я
Маркер										
Циклин D1 (баллы)	1,9± 0,3*	0,4± 0,2	3,0± 0,2	0,4± 0,1	3,0± 0,6	0,7± 0,4	3,6± 0,4	1,0± 0,5	2,8± 0,4	0,8± 0,5
Циклин В1 (баллы)	3,0± 0,4	0,3± 0,3	3,7± 0,2	0,4± 0,1	3,7± 0,6	0,5± 0,4	4,2± 0,4	0,8± 0,4	4,0± 0,5	1,0± 0,5

* Здесь и далее в таблице: первая цифра — средняя, вторая — ошибка средней

Не было выявлено корреляционной зависимости между большинством клинико-морфологических характеристик и экспрессией циклинов в клетках РЯ, за исключением степени дифференцировки опухоли. Результаты теста Крускала-Уоллиса (рисунок 1) свидетельствовали о наличии статистически значимой связи между экспрессией циклина В1 и степенью дифференцировки генерализованных форм РЯ ($N = 5,9$, $p = 0,05$).

Из рисунка 1 видно, что все высокодифференцированные серозные аденокарциномы III–IV стадии характеризовались величиной цитоплазматической экспрессии циклина В1 в 4 и более баллов, а в группе умеренно- и низкодифференцированных аденокарцином наблюдались различные варианты выраженности реакции с данными антителами. Это может свидетельствовать о значительной пролиферативной активности серозного рака яичников высокой степени дифференцировки при поздних клинических стадиях.

Исследование общей пятилетней выживаемости больных РЯ с помощью метода Каплана-Мейера (рисунок 2) показало, что в группе пациентов с ядерной гиперэкспрессией циклина D1 отмечалось менее благоприятное течение заболевания, чем в группе с отсутствием реакции с данными антителами. Достоверные значения наблюдались только в группе

серозных раков III–IV клинических стадий ($p = 0,023$), где двухлетняя общая выживаемость у больных с наличием ядерной гиперэкспрессии циклина D1 в раковых клетках составила меньше 30 %, а при ее отсутствии — 54,2 %, к тому же общая выживаемость женщин из первой группы была не более 38 мес.

На следующем этапе все анализируемые случаи были распределены на группы в зависимости от наличия либо отсутствия соответствующего циклина в ядре или в цитоплазме. Оказалось, что в группе больных, которые характеризовались низкой продолжительностью жизни (до 1 года после постановки диагноза) в 65 % случаев определялась гиперэкспрессия циклина D1 в ядре раковых клеток, а выраженность цитоплазматической реакции с данными антителами была более 3 баллов в 80 %. При этом наблюдалась гиперэкспрессия циклина В1 в цитоплазме, а ее выраженность была более 4 баллов, к тому же в 57,1 % определялась ядерная локализация продуктов реакции. В группе больных, которые прожили более 3 лет, наблюдалось снижение экспрессии обоих циклинов в ядре (гиперэкспрессия в менее 35 % случаев) и в цитоплазме раковых клеток (особенно для циклина D1). Схожая тенденция прослеживалась в группе больных, проживших более 5 лет, где ядерная гиперэкспрессия циклина D1 была только в 26% наблюдений.

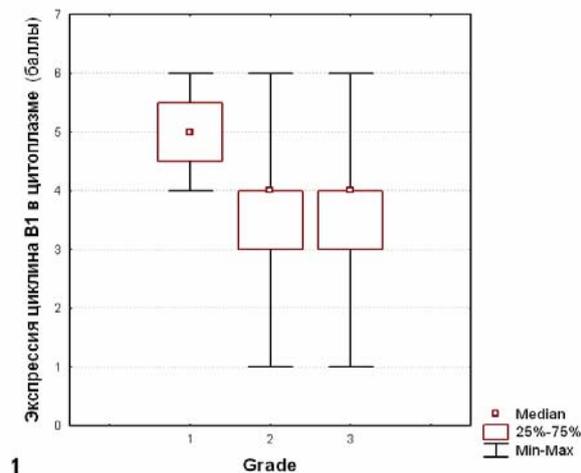


Рисунок 1 — Взаимосвязь уровня экспрессии циклина В1 в клетках серозного РЯ с дифференцировкой новообразования

Связь различных вариантов сочетаний наличия гиперэкспрессии, а также выраженности реакций с антителами к изучаемым маркерам с продолжительностью жизни больных РЯ, очевидно, объясняется тем, что скорость продукции и величина накопления этих циклинов отражает пролиферативную активность и антионкогенный потенциал опухолевой клетки.

Высокая экспрессия циклина В1 и D1 в цитоплазме и ядре (1 группа), очевидно, свидетельствует о высокой пролиферативной, недостаточной антионкогенной активности и определяется в опухолевых клетках, обладающих высокой злокачественностью, поэтому данное сочетание является плохим прогностическим признаком в плане продолжительности жизни. Одновременно средняя и высокая цитоплазматическая экспрессия циклина В1 на фоне отсутствия ядерной гиперэкспрессии и низкой экспрессии циклина D1 (2 группа) с большей вероятностью является свидетельством остановки клеточного цикла в контрольной точке G2.

Анализ полученных данных свидетельствует об ИГХ гетерогенности злокачественных новообразований яичников как в пределах разных гистологических вариантов, так и групп с одной гистологической структурой и клинической стадией. Вместе с тем уровень и характер экспрессии таких регуляторов клеточного цикла, как циклины В1 и D1 в ряде случаев имеют самостоятельное прогностическое значение и могут служить дополнительными критериями злокачественности при оценке прогноза заболевания после хирургического лечения, а также при решении вопроса о необходимости коррекции и назначения дополнительной адъювантной терапии больным РЯ.

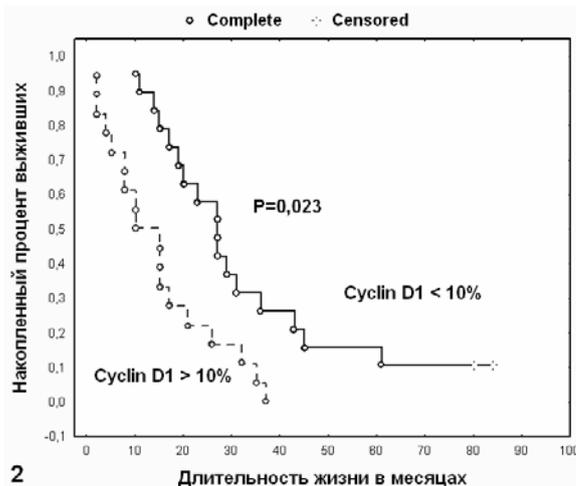


Рисунок 2 — Общая выживаемость больных генерализованными формами серозного РЯ в зависимости от наличия ядерной гиперэкспрессии циклина D1

Выводы

1. Анализ различных вариантов сочетания гиперэкспрессии циклинов В1 и D1, а также выраженности реакций с антителами к изучаемым маркерам позволяет оценить как пролиферативную активность, так и антионкогенный потенциал опухолевых клеток РЯ.

2. К особенностям высокодифференцированного серозного РЯ III–IV клинических стадий следует отнести выраженную цитоплазматическую реакцию с антителами к циклину В1, отражающую высокую пролиферативную активность опухоли.

2. Наличие ядерной гиперэкспрессии циклина D1 ассоциировано со снижением общей выживаемости больных генерализованными формами серозного рака.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Копнин, Б. П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза / Б. П. Копнин // Биохимия. — 2000. — С. 5–33.
2. Expression of cyclins in ductal hyperplasia, atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ of the breast / Hee-Jung Kim [et al.] // Yonsei Medical Journal. — 2000. — Vol. 41. — P. 345–353.
3. Determination of the prognostic significance of cyclin B1 overexpression in patients with esophageal squamous cell carcinoma / M. Hiroshi [et al.] // Virchows Arch. — 1999. — Vol. 434. — P. 153–158.
4. Expression profiling of cyclin B1 and D1 in cervical carcinoma / M. Zhao [et al.] // Exp. Oncol. — 2006. — Vol. 28, № 1. — P. 44–48.
5. Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor / T. Suzuki [et al.] // Cancer Science. — 2007. — Vol. 98, № 5. — P. 644–651.
6. Clinical significance of cyclin D1 expression in patients with node-positive breast carcinoma treated with adjuvant therapy / P. Pelosio [et al.] // Annals of Oncology. — 1996. — Vol. 7. — P. 695–703.
7. Brustmann, H. Epidermal growth factor receptor expression in serous ovarian carcinoma: an immunohistochemical study with galactin-3 and cyclin D1 and outcome / H. Brustmann // Int. J. Gynecol. Pathol. — 2008. — Vol. 27, № 3. — P. 380–389.

8. A novel immunohistochemical method for estimating cell cycle phase distribution in ovarian serous neoplasms: implications for the histopathological assessment of paraffin-embedded specimens / I. S. Scott [et al.] // *British Journal of Cancer*. — 2004. — Vol. 90. — P. 1583–1590.
9. Overexpression of cyclin D1 and c-Myc gene products in human primary epithelial ovarian cancer / C.-H. Chen [et al.] // *Int. J. of Gynecol. Cancer*. — 2005. — Vol. 15. — P. 878–883.
10. The concurrent expression of p27^{kip1} and cyclin D1 in epithelial ovarian tumors / Li Sui [et al.] // *Gynecol. Oncology*. — 1999. — Vol. 73, № 2. — P. 202–209.
11. Clinicopathologic analysis and expression of cyclin D1 and p53 of ovarian borderline tumors and carcinomas / H. L. Shao [et al.] // *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. — 2007. — Vol. 42, № 4. — P. 227–232.
12. Cyclin D1, p53, and p21^{Waf1/Cip1} expression is predictive of poor clinical outcome in serous epithelial ovarian cancer / A. Bali [et al.] // *Clinical Cancer Research*. — 2004. — Vol. 10. — P. 5168–5177.
13. Overexpression of cyclin D1 is associated with poor survival in epithelial ovarian cancer / F. Barbieri [et al.] // *Oncology*. — 2004. — Vol. 66, № 4. — P. 310–315.
14. Cyclin B1, D1 overexpression and its correlation with clinical prognostic factors in ovarian carcinoma / J. W. Kim [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. — 2006. — Vol. 24. — P. 150–167.

Поступила 11.05.2009

УДК 616.441-006.5-089.8

ПОДХОДЫ К ОПЕРАТИВНОМУ ЛЕЧЕНИЮ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ЭНДОКРИННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

И. А. Васюхина, Е. Н. Сницаренко, Н. Ф. Чернова, К. К. Зекедова

Республиканский научно-практический центр
радиационной медицины и экологии человека, г. Гомель

Проведено исследование 174 прооперированных пациентов с патологией щитовидной железы. Показано, что наиболее частой причиной рецидива ДТЗ является неадекватный объем оперативного вмешательства. Определены сроки продолжительности лечения препаратами, подавляющими функцию щитовидной железы при диффузном токсическом зобе.

Ключевые слова: хирургическое лечение, диффузный токсический зоб.

APPROACHES TO SURGICAL TREATMENT OF PATIENTS WITH CHRONIC ENDOCRINE THYROID PATHOLOGY

I. A. Vasyuhina, E. N. Snitsarenko, N. F. Chernova, K. K. Zekenova

Republican Research Center for Radiation Medicine
and Human Ecology, Gomel

We studied 174 operated patients with thyroid pathology. We show that the most frequent reason of diffuse toxic goiter relapse is inadequate extent of surgical intervention. We defined the period of treatment duration by preparations suppressing the function of thyroid gland at diffuse toxic goiter.

Key words: surgery, diffuse toxic goiter.

Введение

Среди всех случаев первичного гипотиреоза не менее трети приходится на ятрогенный, развившийся после хирургических операций на щитовидной железе или после терапии радиоактивным I^{131} . В настоящее же время гипотиреоз рассматривается как наиболее благоприятный исход лечения многих заболеваний щитовидной железы [1]. Наиболее частой причиной ятрогенного гипотиреоза в нашей стране являются оперативные вмешательства на щитовидной железе. Хирургическое лечение токсического зоба как болезни Грейвса, так и многоузлового токсического предпринимается все реже, за исключением стран, в которых традиционно доминирует этот метод лечения, в том числе и в Республике Беларусь. Основным же методом лечения токсического зоба на протяжении последних нескольких десятилетий стала терапия I^{131} (РИТ) [1].

Болезнь Грейвса (диффузный токсический зоб) — это системное аутоиммунное заболевание, развивающееся вследствие выработки антител к рецептору тиротропного гормона (АТ-рТТГ), клинически проявляющееся поражением щитовидной железы с развитием синдрома тиротоксикоза в сочетании с экстратиреоидной патологией (эндокринная офтальмопатия, претибиальная микседема и др.) [2]. До того, как был выяснен патогенез болезни Грейвса, идеология хирургического лечения этого заболевания выглядела следующим образом: у пациента с тиротоксикозом чаще всего выявлялось увеличение размера щитовидной железы и для того, чтобы нормализовать уровень тиреоидных гормонов, нужно удалить часть органа. Наиболее распространенной операцией была и остается до сих пор субтотальная тиреоидэктомия (субТТЭ) [1].

В дальнейшем стало очевидно, что болезнь Грейвса — это системное аутоиммунное забо-