

Е.С. Клименко¹
В.С. Свінцицький²

¹ДУ «Луганський державний
медичний університет»,
Луганськ

²Національний інститут раку,
Київ, Україна

Ключові слова: граничні пухлини
яєчника, серозний рак яєчника,
HER-2/neu, VEGF

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ БІЛКІВ HER-2/neu ТА VEGF У ГРАНИЧНИХ ПУХЛИНАХ ЯЄЧНИКА

Мета: провести імуногістохімічний аналіз експресії HER-2/neu та VEGF у клітинах граничних пухлин яєчника (ГПЯ), порівняти одержані результати з експресією цих маркерів у клітинах раку яєчника (РЯ) та оцінити їх клінічне значення. **Об'єкт:** операційний матеріал хворих на ГПЯ та РЯ (32 і 56 пацієнтів відповідно), яким до хірургічного лікування поліхіміотерапію не проводили. **Методи дослідження:** клінічні, морфологічні, імуногістохімічні, статистичні. **Результати:** встановлено гетерогенність фенотипу пухлинних клітин (ПК) у хворих на ГПЯ та РЯ за цитоморфологічними особливостями і експресією маркерів проліферації (HER-2/neu) та ангиогенезу (VEGF), які визначають індивідуальні біологічні особливості пухлинного процесу в яєчнику. У 3 (9,4%) пацієнтів із ГПЯ виявлено пухлинні імплантати без цитологічних ознак малігнізації по поверхні чіпця (сальника). Позитивна експресія HER-2/neu і VEGF частіше визначалася у хворих на РЯ, ніж у пацієнтів із ГПЯ. Загальна 3- і 5-річна виживаність хворих на ГПЯ становила 100% незалежно від фенотипу ПК, виживаність хворих на РЯ була нижчою за умови сильної позитивної експресії маркерів. **Висновки:** експресія HER-2/neu і VEGF у ПК є індивідуальним показником біологічної активності ГПЯ. Одержані результати стосовно гетерогенної експресії HER-2/neu та VEGF у ПК вказують на існування двох субтипів серозних ГПЯ з різними потенціями до проліферації та ангиогенезу.

ВСТУП

Граничні пухлини яєчника (ГПЯ) вперше були описані ще на початку минулого століття як напівзлаякісні (semimalignant) пухлини, які мають спільний з раком яєчника (РЯ) епітеліальний генез та однакові клінічні симптоми. Для останніх притаманні невиразність і неспецифічність — біль у черевній порожнині, збільшення розмірів яєчника, диспептичні та дизуричні явища, наявність кіст, а у 23% хворих немає жодних скарг. У зв'язку з цим ГПЯ, як і РЯ, часто не діагностують на ранніх стадіях [1–4]. Етіопатогенез ГПЯ остаточно не встановлено через відсутність великих рандомізованих досліджень, хоча з виникненням цих пухлин пов'язують низку факторів. До них віднесено вік першої вагітності та перших пологів, особливості менструальної функції, гормональний статус, прийом контрацептивів, паління, сімейний анамнез РЯ [1, 4].

Гістологічна структура ГПЯ варіабельна: виділяють серозні, муцинозні чи інтестинальні варіанти, які характерні також і для злаякісних епітеліальних пухлин яєчника. Для ГПЯ притаманні певні цитологічні та морфологічні зміни, а саме: гіперплазія епітелію, формування папілярних структур, атипія ядер, підвищена мітотична активність. Такі ознаки характерні й для малігнізованих тканин, що стало підставою для розгляду ГПЯ як пухлин, які за рівнем цитоморфологічних змін займають проміжне становище між доброякісними цистаденомами та злаякісними пухлинами яєчника [5]. У класифікації

пухлин яєчника ВООЗ 1973 р. ГПЯ називають пухлинами граничної злаякісності із синонімом «карцинома низького злаякісного потенціалу» (carcinoma of low malignant potential — LMP). У класифікації ВООЗ 2003 р. [6] ці пухлини позначають терміном «граничні пухлини», який є найбільш популярним серед патологів і гінекологів.

Основною рисою, яка відрізняє ГПЯ від РЯ, є відсутність стромальної інвазії, хоча в літературі існують вказівки на інвазію у строму чи у лімфатичні судини пухлин із низьким злаякісним потенціалом, а також на імплантацію пухлинних клітин (ПК) по черевній порожнині [7–9]. Це вказує на таку надзвичайно важливу біологічну характеристику клітин ГПЯ, як інвазійність, яка в онкоморфології вважається ознакою злаякісного росту. Тому пошуки критеріїв для диференційної діагностики між ГПЯ з/без малігнізації та РЯ є актуальними і важливими з погляду діагностики початкових форм раку.

Одним із маркерів, який уже тривалий час широко використовують у клінічній онкології, є СА125. Підвищення його концентрації у сироватці крові є ознакою злаякісного росту в яєчнику. Проте його діагностичне значення не має специфічності, крім випадків розповсюдженого РЯ, тому що підвищений рівень СА125 виявляють при вагітності, перитонітах та інших патологічних станах. В останні роки з метою диференційної діагностики у сироватці крові визначають також концентрацію глікопротеїну HE4 (Human Epididymis protein 4), який експресується

серозними та ендометріюїдними карциномами яєчника [10]. Але більш детальні дослідження показали, що його експресія наявна не тільки у жінок із патологією яєчника, але і у здорових осіб, причому цей показник залежить від фази менструального циклу [11].

Найбільш інформативним методом для встановлення доброякісного чи злоякісного процесу в яєчнику є гістологічне дослідження операційного матеріалу. Як зазначено вище, ГПЯ займають проміжне місце між доброякісними кістами і РЯ із різними морфологічними характеристиками, але за наявності у граничних пухлинах папілярних структур зі значною проліферацією епітелію диференційна морфологічна діагностика між доброякісним і злоякісним процесом досить складна. Тому актуальним є питання комплексу ознак, які можуть вказувати на малігнізацію клітин чи злоякісний характер процесу, адже від морфологічного діагнозу залежить хірургічна тактика: видалення тільки яєчника з пухлиною чи операція більшого обсягу — видалення матки з придатками і резекція чіпця (сальника).

Диференційний підхід до лікування пацієнтів із ГПЯ та початковими формами РЯ зумовлений нині світовою тенденцією до проведення органозберігаючого лікування при початкових стадіях раку. Схема терапії ґрунтується не тільки на клініко-морфологічних особливостях пухлинного процесу, але й на його молекулярно-біологічному профілі, за допомогою якого визначають молекулярно-генетичні порушення, з якими пов'язана агресивність пухлинного росту. Визначення молекулярно-біологічного профілю та його порівняння з морфологічними особливостями пухлин є основою для оцінки індивідуальних біологічних характеристик пухлинного процесу, встановлення молекулярних підтипів раку, які відрізняються за прогнозом [12]. Для їх детекції застосовують імуногістохімічний (ІГХ) метод дослідження пухлин, при якому визначають не тільки наявність біомолекулярного маркера, але і його локалізацію у певних клітинах або зонах утворення [13, 14].

До відмітних особливостей пухлин різного генезу, у тому числі й РЯ, належать проліферація ПК та ангіогенез. Проліферація ПК є однією з важливих характеристик утворення, з якою пов'язані його злоякісність, особливості клінічного перебігу, тривалість безрецидивного періоду, 3- та 5-річну виживаність хворих. У процесах проліферації задіяно сімейство рецепторів епідермального фактора росту, одним з представників якого є HER-2/neu (Human Epidermal growth factor Receptor 2, ErbB2) — мембранний білок із тирозинкіназою активністю, який кодується геном *ERBB2* і частіше експресується у злоякісних пухлинах, ніж у доброякісних. В одному з останніх оглядів [15] наголошено, що цей протеїн задіяний у ErbB-сигнальних шляхах і впливає не тільки на проліферацію, але й на дедиференціацію, адгезію, міграцію, інвазію клітин, а також на ангіогенез. Можливо, через такий широкий спектр

біологічної дії для нього характерна значна варіабельність експресії, навіть у пухлинах спільного генезу [16, 17]. За даними літератури, у багатьох пухлинах експресія HER-2/neu асоціюється зі ступенем їх диференціювання [18], а у хворих на карциному уротелію визнана незалежним предиктивним маркером рецидиву [18, 19]. Гіперекспресія цього протеїну у хворих на рак молочної залози пов'язана з експресією естрогенів і свідчить про гірший прогноз, ніж за відсутності експресії маркера у пухлинах [20]. Дослідження біомолекулярного маркера проліферації HER-2/neu у ГПЯ нечисленні та не розкривають повною мірою його значення як маркера для оцінки біологічної агресивності ГПЯ та їх прогнозу, що диктує необхідність проведення подальших морфологічних та ІГХ досліджень у цьому напрямі.

Як свідчать результати експериментальних досліджень *in vitro* та *in vivo*, проліферація ПК, зокрема клітин раку молочної залози лінії MCF-7, перебуває під частковим аутокринним контролем фактора росту ендотелію судин VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) [21]. VEGF — це мультифункціональний цитокін і сильний мітоген для ендотеліальних клітин, який характеризується широким спектром дії як при фізіологічних станах (заживлення поверхні яєчника при овуляції, заживлення ран на шкірі та внутрішніх органах), так і за патологічних умов, зокрема при рості злоякісних пухлин. Враховуючи, що ангіогенез є невід'ємною ланкою бластогенезу, а судини — обов'язковим компонентом гістологічної структури новоутворень [22], ріст пухлин постійно супроводжується компенсаторно-адаптаційними реакціями, спрямованими на оптимізацію кровопостачання тканин шляхом утворення нових судин. Тому ангіогенезу належить роль біомаркера васкуляризації пухлин яєчника, а набуття пухлиною ангіогенного фенотипу є ключовою подією, пов'язаною з ростом і метастазуванням пухлин [20, 23].

У хворих на РЯ експресія VEGF має особливе значення, оскільки для нього притаманна ще одна біологічна риса — підвищення проникності судин, тому разом з іншими цитокінами VEGF може сприяти розвитку асцити. Продемонстровано також підвищену експресію VEGF під впливом гормонів не тільки в гормонозалежних тканинах (яєчник), але й в гормононезалежних [24]. У пацієнтів із РЯ високий ступінь ангіогенезу та висока експресія VEGF у ПК є маркерами несприятливого прогнозу [25]. Висока концентрація VEGF у сироватці крові, як і сильна експресія у ПК, є показником його активності, що вказує на формування нових судин і в свою чергу спричиняє більшу проліферацію клітин і швидкий ріст пухлини. Тому VEGF розглядають як маркер для проведення таргетної анти-VEGF-терапії [26–28]. Найбільшу діагностичну цінність VEGF набуває при його дослідженні у комбінації з іншими цитокінами або ростовими факторами.

Отже, підбиваючи підсумок, необхідно ще раз підкреслити, що морфологічна діагностика епітелі-

альних пухлин яєчника є традиційно однією з найбільш складних, тому що через значний гістогенетичний поліморфізм і варіабельність цитоморфологічних структур новоутворень яєчника не завжди можна чітко виділити проміжні варіанти між ГПЯ з низьким потенціалом проліферації та злоякісності, з одного боку, та істинними злоякісними процесами, з іншого. За умови відсутності макроскопічних ознак малігнізації певного новоутворення яєчника основне завдання точної верифікації неопластичного процесу в яєчнику полягає у визначенні проліферативного потенціалу пухлини та біологічних ознак злоякісності, що стало можливим із впровадженням у морфологічну діагностику молекулярно-біологічних методів дослідження пухлин.

Мета дослідження — провести ІГХ аналіз експресії HER-2/neu та VEGF у ПК ГПЯ, порівняти одержані результати з експресією цих маркерів у клітинах РЯ та оцінити їх клінічне значення.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проведено ретроспективний аналіз клінічних даних, морфологічне та ІГХ дослідження операційного матеріалу 32 хворих на ГПЯ та 56 пацієнтів із РЯ у II–III стадії (група порівняння). Хворі перебували на стаціонарному лікуванні у Луганському обласному онкологічному диспансері протягом 2008–2013 рр. і дали згоду на використання клінічних даних і операційного матеріалу з дослідницькою метою.

Комплексне обстеження, крім клінічного огляду, обов'язково включало сонографію органів малого таза з використанням піхового та абдомінального датчиків, кольорове доплерівське картування, дослідження у динаміці концентрації пухлинного маркера СА 125 у сироватці крові, а за необхідності — додаткові методи дослідження (рентгенографія органів грудної клітки, комп'ютерна томографія).

Стадію пухлинного процесу в яєчнику визначали за клінічною класифікацією FIGO. Усім хворим проведено хірургічне лікування згідно зі Стандартами діагностики і лікування онкологічних хворих, затвердженими наказами МОЗ України від 27.07.1998 р. № 140 і від 17.09.2007 р. № 554.

Хірургічне лікування при ГПЯ складалося з кількох етапів. Після розтину черевної порожнини шляхом середньої лапаротомії проводили ретельний огляд її органів і тканин. Далі виконували процедуру хірургічного стадіювання. Якщо не виявлено розповсюдження пухлинного процесу на парієтальній і вісцеральній очеревині та були відсутні ПК у змивах черевної порожнини (що встановлювали шляхом проведення термінового цитологічного дослідження змивів), вважали, що стадія захворювання відповідає градації T1aN0M0, при ураженні обох яєчників — T1bN0M0, при ураженні одного чи обох яєчників і наявності асцитів — стадії T1cN0M0. За умови ураження одного яєчника проводили одностороннє видалення придатків матки на боці уражен-

ня та біопсію контралатерального яєчника, резекцію чіпця з терміновим інтраопераційним морфологічним дослідженням.

Операційний матеріал фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну, піддавали подальшому класичному проведенню і морфологічному дослідженню парафінових гістологічних зрізів, забарвлених гематоксиліном та еозином. На паралельних зрізах (4–5 мікронів) проводили ІГХ реакцію з використанням MkAT проти c-erbB-2/HER-2/neu (Clone SP3, Thermo Fisher Scientific, США) та проти VEGF (RB-9031-P0, Thermo Fisher Scientific, США). Гістологічні зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра. Для візуалізації результатів ІГХ реакції використовували набір реактивів EnVision system (Dako LSAB2 system, Данія) відповідно до рекомендацій виробника. Для оцінки ІГХ експресії VEGF і HER-2/neu застосовували напівкількісний аналіз (у балах). Експресія VEGF: відсутність забарвлення — 0 балів; незначне забарвлення 1–25% ПК — 1 бал (VEGF+); помірне забарвлення 26–50% ПК — 2 бали (VEGF++); значне забарвлення > 50% ПК — 3 бали (VEGF+++). Позитивною експресією VEGF вважали кількість ПК > 25% з помірним і значним забарвленням, тобто з VEGF++ і VEGF+++ . Оцінка експресії HER-2/neu: відсутність продукту ІГХ реакції — 0 балів; незначна експресія маркера не по всій мембрані клітин менше ніж у 10% клітин — 1 бал (HER-2/neu+); помірна експресія маркера по всій мембрані клітин більше ніж у 10% клітин — 2 бали (HER-2/neu++); сильна експресія маркера по всій мембрані клітин більше ніж у 10% клітин — 3 бали (HER-2/neu+++) [29]. Як позитивний контроль застосовували MkAT проти панцитокератинів, як негативний — фізіологічний розчин, який наносили на гістологічні зрізи замість MkAT. Гістологічні препарати аналізували з використанням мікроскопа «PrimoStar» (Zeiss, Німеччина) при збільшенні 200–400. Статистичний аналіз одержаних даних включав використання непараметричних і параметричних статистик, зокрема і t-критерій Стьюдента. Кореляцію міжгрупових даних аналізували за допомогою критерію χ^2 і коефіцієнта кореляції Пірсона (r). Вживаність хворих оцінювали за Капланом — Мейєром, для парних порівнянь використовували log-rank критерій. Статистично достовірними вважали значення $p < 0,05$. Обробку результатів дослідження проводили з використанням пакета програми STATISTICA 6.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз клінічних даних показав (табл. 1), що середній вік 32 хворих на ГПЯ I (Ia–Ic) стадії становив $42,9 \pm 3,1$ року при індивідуальних коливаннях від 30 до 66 років. Кількість пацієнтів репродуктивного віку (від 30 до 45 років) сягала 24 (75,0%). Порівняно з хворими на ГПЯ, у 56 пацієнтів із РЯ (II–III стадія) середній вік був достовірно вищим і становив $59,4 \pm 2,7$ року ($p < 0,05$) при індивідуальному діапа-

зоні від 41 до 72 років, а кількість хворих репродуктивного віку була достовірно меншою — 12 (21,4%) осіб ($p < 0,05$).

Морфологічний аналіз видалених пухлин яєчника засвідчив, що у 32 хворих пухлини мали гістологічну будову граничних серозних папілярних цистаденом, у 51 (91,1%) — серозного РЯ з наявністю папілярних і залозистих структур, у 5 (8,9%) — муцинозного РЯ. Серед пацієнок із ГПЯ переважали хворі з ураженням одного яєчника (Ia стадія — 50,0%) і високим ступенем диференціювання пухлин (18 (56,2%) осіб).

Таблиця 1
Клініко-патологічна характеристика хворих на ГПЯ та РЯ

Характеристика	Кількість хворих, n (%)
ГПЯ, n = 32 (100%)	
Вік	
Середній	42,9 ± 3,1 року
Діапазон коливань віку	30–66 років
Кількість хворих репродуктивного віку	24 (75,0)
Стадія за FIGO	
T1aNOMO	16 (50,0)
T1bNOMO	10 (31,3)
T1cNOMO	6 (18,7)
Гістологічна структура	
Серозна гранична цистаденома	32 (100)
Ступінь диференціювання	
G1	18 (56,2)
G2	14 (43,8)
РЯ, n = 56 (100%)	
Вік	
Середній	59,4 ± 2,7 року
Діапазони коливань віку	41–72 роки
Кількість хворих репродуктивного віку	12 (21,4)
Стадія за FIGO	
II	39 (69,4)
III	17 (30,6)
Гістологічна структура	
Серозний рак	51 (91,1)
Муцинозний рак	5 (8,9)
Ступінь диференціювання	
G1	35 (62,5)
G2	21 (37,5)

Хоча у цій роботі проводили дослідження ГПЯ і РЯ, детальну клінічну та морфологічну характеристику РЯ в II–III стадії ми не наводимо, оскільки її досить ґрунтовно представлено у багатьох монографіях з онкогінекології та підручниках з онкології.

Макроскопічний аналіз операційного матеріалу показав, що ГПЯ мали різний вигляд залежно від їх локалізації — на поверхні яєчника чи в його товщі. Пухлини на поверхні яєчника мали вигляд папіл різного об'єму, які іноді зливалися або випиналися, їх кількість варіювала. Інтраоваріальні пухлини частіше виглядали як кісти різного розміру — одно- чи багатокамерні — з наявністю папілярних структур у різній кількості та неодноманітної будови або без них. Вміст кістозних новоутворень також був різним — у вигляді жовтуватої рідини (іноді з геморагічним відтінком) у серозних кістах або желеподібної маси у муцинозних кістах. Розміри пухлин теж коливалися в діапазоні від 5–10 до 20 см. У 17 (53,1%) хворих на ГПЯ в яєчниках відзначали також доброя-

кісні кісти — серозні, муцинозні, кісти жовтого тіла. Тобто за макроскопічними ознаками можна було оцінити лише розміри новоутворень в яєчнику та характер їх вмісту, але не було можливості встановити характер патологічного процесу за умови відсутності метастатичного ураження очеревини. Тому особливе значення надавали подальшому морфологічному дослідженню новоутворень яєчника з акцентом на цитологічних особливостях клітин у папілах. У кістозних новоутвореннях без папілярних структур епітелій був сплюсним, лише іноді з ознаками незначної гіперплазії в окремих ділянках. ПК ГПЯ та серозного РЯ мали папілярну структуру зі значною варіабельністю за розмірами папіл. При мікроскопічному дослідженні встановлено, що ГПЯ і РЯ відзначалися G1–G2 ступенем гістологічного диференціювання з переважанням G1 (див. табл. 1).

Найбільші труднощі у морфологічному дослідженні виникали при характеристиці епітеліального компонента папілярних структур пухлин. При злосудних процесах в яєчнику епітелій мав більші розміри, характеризувався значною атипією за формою та розмірами, а також мав ознаки не тільки гіперплазії, але й проліферації у вигляді залозистих, трабекулярних, мікропапілярних структур порівняно з ГПЯ.

Відомо, що характерними ознаками розповсюджених форм РЯ є пухлинні імпланти по поверхні чіпця та очеревині, а також псамомні тільця. Подібні структури ми виявили у 3 (9,3%) хворих на ГПЯ, проте за цитологічною характеристикою імплантати не мали ознак малігнізації. Натомість у пацієнтів із РЯ в II–III стадії діагностували пухлинні імпланти з вираженими ознаками атипії та поліморфізму ПК по черевній порожнині, у малому тазу та по поверхні чіпця.

Найважливішою ознакою для диференційної діагностики між ГПЯ та початковими формами РЯ є наявність інвазії ПК у строму яєчника. За даними літератури [8], інвазія може мати деструктивний або недеструктивний характер. У нашому дослідженні всі ГПЯ не мали значної деструкції строми, але відзначено мікроінвазію кластерів ПК у строму. Відсутність описаних ознак стало підставою для віднесення досліджених ГПЯ до пухлин із низьким інвазійним потенціалом, натомість у хворих на РЯ в II стадії виявлено значну деструкцію строми.

ІГХ аналіз експресії досліджених маркерів HER-2/neu та VEGF виявив суттєву гетерогенність ГПЯ і РЯ за ступенем експресії маркерів. Відзначено індивідуальні коливання кількості HER-2/neu-позитивних клітин від 0 до 58%, VEGF-позитивних клітин — від 0 до 73%. Кількість HER-2/neu-позитивних клітин у хворих на ГПЯ у середньому становила 16,1 ± 2,3%, у пацієнок із РЯ вона була достовірно більшою — 46,4 ± 3,6% ($p < 0,05$). Кількість VEGF-позитивних клітин у хворих на ГПЯ у середньому сягала 33,1 ± 3,3%, в осіб із РЯ вона була також достовірно більшою — 61,5 ± 2,9% ($p < 0,05$) (рис. 1).

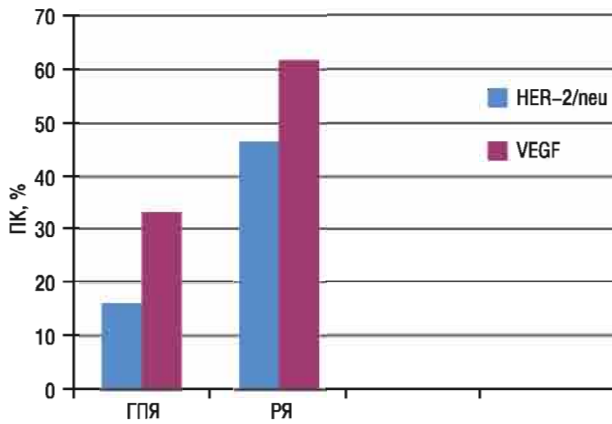


Рис. 1. Кількість ПК (%), які експресують HER-2/neu і VEGF, у хворих на серозні ГПЯ в I стадії та серозний РЯ в II–III стадії

Користуючись критеріями оцінки експресії маркерів у клітинах ГПЯ і РЯ, усі досліджені пухлини ми поділили на імунопозитивні та імунонегативні (табл. 2). Виявилось, що кількість хворих на HER-2/neu-позитивні ГПЯ становила 18,8%, що в 1,9 раза менше, ніж кількість пацієнтів із HER-2/neu-позитивним РЯ (35,7%; $p < 0,05$). Подібну тенденцію відзначено і щодо експресії VEGF: кількість VEGF-позитивних ГПЯ становила 25,0% проти 48,2% імунопозитивних РЯ, що також менше в 1,9 раза ($p < 0,05$). Статистична обробка одержаних результатів виявила позитивну кореляцію між показниками експресії HER-2/neu та VEGF у граничних і злоякісних пухлинах яєчника: у ГПЯ кореляція була незначною ($r = 0,27$), в РЯ вона підвищувалася до помірної ($r = 0,37$).

Таблиця 2

Розподіл хворих на ГПЯ і РЯ за експресією HER-2/neu і VEGF у ПК

Біомолекулярний маркер та особливості експресії у клітинах пухлин	Хворі на ГПЯ, n (%)	Хворі на РЯ, n (%)
HER-2/neu-позитивна експресія HER-2/neu++; HER-2/neu+++	6 (18,8)	20 (35,7)*
HER-2/neu-негативна експресія 0–HER-2/neu+	26 (81,2)	36 (64,3)
Усього	32 (100,0)	56 (100,0)
VEGF-позитивна експресія VEGF++; VEGF+++	8 (25,0)	27 (48,2)**
VEGF-негативна експресія 0–VEGF+	24 (75)	29 (51,8)
Усього	32 (100,0)	56 (100,0)

* $p < 0,05$ між експресією HER-2/neu у ГПЯ та РЯ; ** $p < 0,05$ між експресією VEGF у ГПЯ та РЯ.

Одним з етапів роботи стало порівняння експресії VEGF і HER-2/neu у клітинах ГПЯ в Ia стадії та клітинах доброякісних кіст контралатерального яєчника в одних і тих самих хворих. Такі зіставлення показали, що у гістологічних препаратах доброякісних кіст експресія обох білків була відсутня або наявна у незначній кількості клітин (до 10% HER-2/neu- і VEGF-позитивних клітин). Натомість у кістах з папілами, гіперплазією та проліферацією епітелію в ГПЯ експресія HER-2/neu і VEGF була визначена у більшій кількості клітин — у 40 і 45% відповідно.

На цьому прикладі чітко простежується асоціація морфологічних змін у ГПЯ з експресією біомолекулярних маркерів проліферації та ангіогенезу, тобто маркерів, задіяних у пухлинному рості. Ці дані збігаються з результатами інших досліджень, в яких показано, що для HER-2/neu характерна диференційна експресія залежно від гістологічної структури пухлин яєчника: у ГПЯ вона становить 22,2%, але у злоякісних пухлинах підвищується у 2 рази (46,4%) [30]. Крім того, навіть у межах РЯ однієї гістологічної структури розрізняють пухлини з різним ступенем експресії цього маркера (від 1+ до 3+). Експресію HER-2/neu відзначали у 52,5% РЯ, при цьому її ступінь був різним: 39,2% карцином були слабо позитивними (1+), 13,3% — помірно позитивними (2+) та 47,5% — сильно позитивними (3+). Підвищена експресія HER-2/neu корелювала зі зниженням виживаності хворих, а сильна експресія була незалежним прогностичним маркером у хворих на РЯ у III стадії [31]. Експресія VEGF+++ у ПК також є свідченням високої агресивності серозного РЯ і предиктором розвитку рецидиву та метастазування по черевній порожнині [32–34]. Отже, значна експресія HER-2/neu і VEGF у ПК хворих на РЯ є предиктивним показником несприятливого прогнозу серозного РЯ.

Враховуючи це, важливим, на наш погляд, є порівняння виживаності хворих на ГПЯ і РЯ залежно від фенотипу ПК, при цьому з урахуванням кількості імунонегативних та імунопозитивних ПК із сильною експресією маркерів (HER-2/neu+++ VEGF+++). У цьому дослідженні кількість ГПЯ з таким фенотипом становила 50% (7 із 14 пухлин з позитивною експресією HER-2/neu і VEGF). У хворих на РЯ кількість пухлин із фенотипом HER-2/neu+++ VEGF+++ була достовірно більшою і становила 68,1% (32 з 47 імунопозитивних пухлин) ($p < 0,05$). Слід наголосити на незалежності кількості клітин із фенотипом HER-2/neu+++ VEGF+++ від віку хворих на ГПЯ та РЯ, а також стадії РЯ.

Статистична обробка виживаності хворих за Капланом — Мейером встановила, що цей показник залежав від характеру патологічного процесу в яєчнику: загальна 3- і 5-річна виживаність хворих на РЯ була нижчою, особливо за умов високої експресії маркерів ($p < 0,05$) (рис. 2). Виживаність хворих на ГПЯ (3- і 5-річна) становила 100% і не залежала від кількості імунопозитивних клітин. Таким чином, відсутність експресії VEGF та HER-2/neu у ПК РЯ можна вважати сприятливим фактором прогнозу при РЯ і, навпаки, висока експресія цих маркерів є предиктивною ознакою несприятливого прогнозу РЯ.

Слід вказати, що у хворих на ГПЯ високою виживаність може бути навіть за умов інтраперитонеальних «відсівів» ПК, що було виявлено нами тільки при мікроскопічному дослідженні зразків чіпця у 3 (9,4%) пацієнтів. Причини розповсюдженості ПК по мезотелію чи чіпцю у хворих на ГПЯ залишаються

невідомими, незважаючи на намагання розробити класифікацію таких імплантатів (десмопластичний субтип, мікропапілярні структури, стромальна інвазія) та визначити їх роль як потенційних критеріїв розвитку рецидивів [36]. Неприятливим прогностичним фактором у пацієнтів із ГПЯ може бути інвазія строми яєчника пухлинними мікропапілами. Але, за даними літератури, цей фактор також не відіграє суттєву роль в усіх випадках ГПЯ. Так, у літературі описано високу виживаність 137 хворих на ГПЯ, незважаючи на те, що у 18 з них була інвазія пухлинних мікропапіл, у 20 — мікроінвазія окремих ПК у строми яєчника [37].

Поряд із цим залишається невирішеним питання, чому сильна експресія досліджених маркерів у хворих на РЯ пов'язана з несприятливим прогнозом, а у пацієнтів із ГПЯ такої залежності не виявлено попри те, що HER-2/neu як представник родини епідермального фактора росту відіграє домінуючу роль у стимуляції пухлинного росту. Поясненням, можливо, може слугувати теза, що механізми прогресування ГПЯ і РЯ характеризуються як загальними рисами, так і низкою індивідуальних молекулярних особливостей та сигнальних шляхів, зміни яких або стримують, або підвищують злоякісний потенціал новоутворення, що й може спричинити рецидиви.

Якщо брати до уваги індивідуальні біологічні особливості, то згідно з одержаними результатами виживаності хворих на ГПЯ ми можемо зазначити, що цей показник залежить як від структурних властивостей пухлин з урахуванням ступеня атипії ПК та характеру інвазії, так і від біомолекулярних показників, у тому числі й від експресії HER-2/neu і VEGF. Останні можна вважати індивідуальними показниками біологічної активності ГПЯ, а їхня негативна функція стосовно потенції ГПЯ до подальшого біологічного прогресування (імплантація ПК в органи малого таза, черевну порожнину і чепець), очевидно, залежить від скооперованої дії низки інших біомолекулярних маркерів пухлинного процесу. На користь цього свідчать положення мультимодальної молекулярної моделі прогресування раку (MultiModal Molecula Network — MMMN): у пухлинному прогресуванні може мати значення комплексність змін, а дизрегуляція більше як одного молекулярного фактора або мішені може викликати каскад молекулярних змін, що у свою чергу сприятиме створенню іншої молекулярної основи, від якої буде залежати генетична та епігенетична гетерогенність раку [35]. Тому як предиктивні фактори клінічного прогнозу ГПЯ необхідно залучати інші молекулярні маркери, які будуть характеризувати як первинну пухлину, так і особливості її мікрооточення та гормональний профіль організму. Для з'ясування всіх цих питань потрібні подальші порівняльні дослідження молекулярних змін у ГПЯ та розповсюджених формах РЯ для визначення різних варіантів біологічного і клінічного прогресування, пов'язаних із комплексом молекулярно-генетичних змін (мутації, амплі-

фікація, гетеропloidія, гіперекспресія рецепторів, лігандзалежна і ліганднезалежна активація рецепторів, модуляція впливу факторів організму).

Таким чином, проведене дослідження засвідчило гетерогенність цитоморфологічних змін у видалених пухлинах яєчника і варіабельність експресії біомолекулярних маркерів HER-2/neu і VEGF у хворих на серозні ГПЯ. Різний ступінь експресії цих маркерів вказує на можливість поділу ГПЯ на 2 групи (імунонегативні та імунопозитивні пухлини за експресією HER-2/neu і VEGF у ПК).

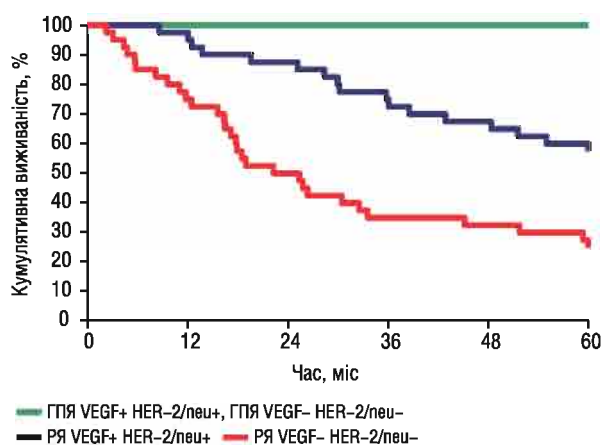


Рис. 2. Аналіз кривих виживаності за Капланом — Мейєром, log rank test, $p < 0,05$

ВИСНОВКИ

1. Позитивну експресію HER-2/neu встановлено у 18,8% серозних ГПЯ і 35,7% серозних РЯ, VEGF — у 25% ГПЯ і 48,2% РЯ.
2. Між експресією HER-2/neu та VEGF виявлено помірну кореляцію у хворих на РЯ ($r = 0,37$), незначну — у пацієнтів із ГПЯ ($r = 0,27$).
3. У хворих на ГПЯ і РЯ кількість ПК з фенотипом HER-2/neu+++ VEGF+++ становила відповідно 50 і 68,1% ($p < 0,05$).
4. Експресія HER-2/neu і VEGF у ПК є індивідуальним показником біологічної активності ГПЯ.
5. Одержані результати стосовно гетерогенної експресії HER-2/neu та VEGF у ПК вказують на існування двох субтипів серозних ГПЯ з різною потенцією до проліферації та ангиогенезу.

СПИСОК ВИКОРАСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Cormio G, Loizzi V, Falagario M, *et al.* Borderline epithelial tumors of the ovary (<http://dx.doi.org/10.5772/54828>).
2. Новикова ЕГ, Батгалова ГЮ. Пограничные опухоли яичников. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. 152 с.
3. Picke IH, Tamussino K. History of gynecological pathology. XIV. Hermann Joannes Pfannenstiel. Int J Gynecol Pathol 2003; 22: 310—314.
4. Hart WR. Borderline epithelial tumors of the ovary. Modern Pathol 2005; 18: 33—50.
5. Deavers MT, Gershenson DM, Tortolero-Luna G, *et al.* Micropapillary and cribriform patterns in ovarian serous tumors of low malignant potential: a study of 99 advanced stage cases. Am J Surg Pathol 2002; 26:1129—41.

6. Tavassoli FA, Devilee P (eds). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press: Lyon, 2003.
7. McKenney JK, Balzer BL, Longacre TA. Ovarian serous tumors of low malignant potential with stromal microinvasion: a clinicopathologic study of 36 cases. *Mod Pathol* 2004; **17**: 205A–206A.
8. McKenney JK, Balzer BL, Longacre TA. Patterns of stromal invasion in ovarian serous tumors of low malignant potential (borderline tumors): a reevaluation of the concept of stromal microinvasion. *Am J Surg Pathol* 2006; **30**(10): 1209–21.
9. Sangoi AR, McKenney JK, Dadras SS, Longacre TA. Lymphatic vascular invasion in ovarian serous tumors of low malignant potential with stromal microinvasion: a case control study. *Am J Surg Pathol* 2008; **32** (2): 261–8.
10. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2005; **65**: 2162–9.
11. Anastasi E, Granato T, Marchei GG, et al. Ovarian tumor marker HE4 is differently expressed during the phases of the menstrual cycle in healthy young women. *Tumour Biol* 2010; **31**(5): 411–5.
12. Семглазов ВФ. Новые подходы к лечению рака молочной железы. *Вопр Онкол* 2013; **59** (3): 288–91.
13. Rein BJD, Gupta S, Dada R, et al. Potential Markers for Detection and Monitoring of Ovarian Cancer. *J Oncol* 2011; Article ID 475983, doi:10.1155/2011/475983.
14. Cramer DW, Bast RC Jr, Berg CD, et al. Ovarian Cancer Biomarker Performance in Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial Specimens. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011; **4**(3): 365–74.
15. Hiss D. Optimising molecular — targeted therapies in ovarian cancer: the renewed surge of interest in ovarian cancer biomarkers and cell signaling pathways. *J Oncol* 2012; article ID 737981, 23 pages, doi 10.1155/2012/737981.
16. Dragomir LP, Mărgăriteanu C, Florescu A, et al. The immunorexpression of EGFR and Her2/neu in oral squamous carcinoma. *Rom J Morphol Embryol* 2012; **53**(3): 597–601.
17. Marinaş MC, Mogoş G, Ciurea R, Mogoş DG. EGFR, HER2/neu and Ki67 immunorexpression in serous ovarian tumors. *Rom J Morphol Embryol* 2012; **53** (3): 563–7.
18. Enache M, Simionescu CE, Stepan A. EGFR and Her2/neu immunorexpression in papillary urothelial bladder carcinomas. *Rom J Morphol Embryol* 2013; **54** (1): 137–41.
19. Sasaki Y, Sasaki T, Kawai T, et al. HER2 protein overexpression and gene amplification in upper urinary tract urothelial carcinoma — analysis of 171 patients. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; **7** (2): 699–708.
20. Badowska-Kozakiewicz AM, Sobo IM, Patera J, Kozłowski W. Immunohistochemical evaluation of human epidermal growth factor receptor 2 and estrogen and progesterone receptors in invasive breast cancer in women. *Arch Med Sci* 2013; **9** (3): 466–71.
21. Guo P, Fang Q, Tao HQ, et al. Over expression of vascular endothelial growth factor by MCF-7 breast cancer cells promotes estrogen-independent tumor growth *in vivo*. *Cancer Res* 2003; **63** (15): 46–91.
22. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 2005; **69**(Suppl 3): 4–10.
23. Ławicki S, Będkowska GE, Gacuta-Szumarska E, Szmitkowski M. The plasma concentration of VEGF, HE4 and CA125 as a new biomarkers panel indifferent stages and sub-types of epithelial ovarian tumors. *J Ovarian Res* 2013; **6**: 45–48.
24. Hyder SM, Nawaz Z, Chiappetta C, Stancel GM. Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2000; **60**: 3183–6.
25. Duncan TJ, Al-Attar A, Rolland P, et al. Vascular endothelial growth factor expression in ovarian cancer: A model for targeted use of novel therapies? *Clin Cancer Res* 2008; **14** (10): 3030–5.
26. Lichtenberger VM, Tan PK, Niederleithner H, et al. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell* 2010; **140**: 268–79.
27. Hata K, Watanabe Y, Nakai H, et al. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene in epithelial ovarian cancer: an approach to anti-VEGF therapy. *Anticancer Res* 2011; **31** (2): 31–7.
28. Winiarski BK, Wolanska KI, Rai S, et al. Epithelial ovarian cancer-induced angiogenic phenotype of human omental microvascular endothelial cells may occur independently of VEGF signaling. *Transl Oncol* 2013; **6** (6): 3–14.
29. Ménard S, Casalini P, Campiglio M, et al. Role of HER2/neu tumor progression and therapy. *Cell Mol Life Sci* 2005; **61** (23): 2965–78.
30. Hadisubroto YS, Suwiyoga K. HER2/Neu Expression was different between benign, border line and malignant epithelial ovarian tumors. *Indones J Obstet Gynecol* 2014; **2** (1): 46–9.
31. Høgdall EVS, Christensen L, Kjaer SK, et al. Distribution of HER-2 overexpression in ovarian carcinoma tissue and its prognostic value in patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 2003; **98** (1): 66–73.
32. Nishida N, Yano H, Komai K, et al. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 2 are related closely to the prognosis of patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 2004; **101**(6): 1364–74.
33. van der Zee AG, de Vries EG, et al. Multiple VEGF family members are simultaneously expressed in ovarian cancer: a proposed model for bevacizumab resistance. *Curr Pharm Des* 2012; **18** (25): 3784–92.
34. Nakayama K, Kanzaki A, Takebayashi Y, et al. Different features of angiogenesis between ovarian and breast carcinoma. *Cancer letters* 2001; **170** (2): 161–7.
35. Thiagalingam S. A cascade of modules of a network defines cancer progression. *Cancer Res* 2006; **66** (15): 7379–85.
36. Morice P, Uzan C, Fauvet R, et al. Borderline ovarian tumour: pathological diagnostic dilemma and risk factors for invasive or lethal recurrence. *Lancet Oncol* 2012; **13** (3): e103–15.
37. Prat J, deNictolis M. Serous border line tumors of the ovary: along-term follow-up study of 137 cases, including 18 with a micropapillary pattern and 20 with microinvasion. *Am J Surg Pathol* 2002; **26**: 1111–28.

FEATURES OF EXPRESSION OF PROTEINS HER2/neu AND VEGF IN BORDERLINE OVARIAN TUMORS

E.S. Klimenko, V.S. Svintsisky

Summary. Aim: to conduct the immunohistochemical analysis of expression of HER-2/neu and VEGF in the cells of borderline ovary tumors (BOT), to compare the got results to expression of these markers in the cells of ovary cancer (OC) and to estimate they clinical value. **Object:** operating material of patients with BOT and OC (32 and 56 patients, accordingly), to which before surgical treatment polichemotherapy was not conducted. **Methods:** clinical, morphological, immunohistochemical, statistical. **Results:** the phenotype heterogeneity of tumor cells in patients with BOT and OC was carried out according to cytomorphological features and expression of proliferation markers (HER-2/neu) and angiogenesis (VEGF), which determine the individual biological features of tumor process in an ovary. In 3 (9.4%) of patients with BOT implants were diagnosed without the cytological signs of

malignization on the omentum surfaces. Positive expression of HER-2/neu and VEGF was more frequent determined for patients with OC, than for patients with BOT. General 3- and 5-years survivability of patients with BOT was 100% regardless to phenotype of tumor cells, survivability of patients with OC was less on condition of strong positive expression of markers. Conclusions: expression of HER-2/neu and VEGF in tumor cells is the individual indexes of biological activity of BOT. The got results in relation to heterogeneous expression of HER-2/neu and VEGF in tumor cells

specify on existence of two subtypes of serosal BOT with different potencies to proliferation and angiogenesis.

Key Words: borderline ovary tumors, serous cancer of ovary, HER-2/neu, VEGF.

Адреса для листування:

Свінцицький В.С.

03022, Київ, вул. Ломоносова, 33/43

Національний інститут раку

E-mail: SVS1@voliacable.com

Одержано: 01.08.2014