

Ядерный антиген Ki-67 как фактор прогноза при почечно-клеточном раке

С.А. Варламов, В.С. Дорошенко, А.Ф. Лазарев

Алтайский филиал ГУ РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, ГУЗ Алтайский краевой онкологический диспансер, Барнаул

Ki-67 NUCLEAR ANTIGEN AS A PROGNOSTIC FACTOR IN RENAL CELL CARCINOMA

S.A. Varlamov, V.S. Doroshenko, A.F. Lazarev

Altai branch of Public institution Russian Oncologic Research Center named after N.N. Blohin, Altai regional oncologic clinic, Barnaul

Great attention paid to renal cell carcinoma (RCC) is due to increase in its prevalence. This paper is devoted to comparison of classic clinical and pathological prognostic factors and expression character of proliferation marker Ki-67 in this cancer. Proliferative activity was analyzed in 101 cases of RCC by immunohistochemical assays using antibodies to the Ki-67. High index Ki-67 was diagnosed more often in an aggressive variants RCC and Fuhrman grade 3–4 tumors. Besides, RCC with high proliferative activity had significantly lower time of appearance of distant metastases and poor survival in coparison with RCC with low proliferative activity.

Введение

В течение последних 10–15 лет отмечают постепенный рост выявленных случаев рака почки (РП). Число заболевших в мире ежегодно увеличивается на 2%, и в 2000 г. смертность превысила 100 000 человек. Начиная с 1990 г. заболеваемость РП имеет наибольшую среди всех форм рака тенденцию к росту — 36% у мужчин, 27% у женщин. Это объясняется ростом средней продолжительности жизни, распространенностью курения, наличия таких заболеваний, как ожирение, сахарный диабет и артериальная гипертензия [1, 2]. Мужчины болеют в 2–3 раза чаще, чем женщины. В 2005 г. в России общая заболеваемость достигла 10,8 на 100 тыс. населения, в Алтайском крае эти цифры составили 12,4 на 100 тыс. населения, что является одним из наиболее высоких показателей в мире. Для сравнения: в Японии на 100 тыс. населения приходится 1,5 случая РП. Преобладающей формой РП является почечно-клеточный рак (ПКР), который встречается в 90–95% всех случаев опухолей почки у взрослых [1, 3]. ПКР характеризуется весьма вариабельным клиническим течением, что обусловлено генетической гетерогенностью и морфологическим разнообразием данной группы опухолей. Важнейшими среди классических прогностических факторов являются степень ядерной атипии по S.A. Fuhrman и TNM-стадия, менее значимыми считают клеточный вариант и характер роста ПКР [4–6]. Такое положение дел побуждает к продолжению поиска тех критериев, которые позволят с большей точностью определить группы больных с неблагоприятным прогнозом. В последнее время в клинической онкологии широко используют иммуногистохимический (ИГХ) метод. Безусловным преимуществом данного метода оценки индивидуальных биологических характеристик опухоли являются прекрасная воспроизводимость, доступность, возможность исследования антигенов на мес-

те их прижизненной локализации [1]. Ki-67 является общепризнанным и широко используемым маркером пролиферации, напрямую связанным с делением клетки. Он представлен двумя различными формами с молекулярной массой 320 и 359 кДа, кодирующий ген локализуется на 10-й хромосоме и состоит из 15 экзонов. В процессе митоза белок в основном связан с хромосомами, в интерфазе выявляется преимущественно в ядрышках. Максимальный уровень белка Ki-67 в клетке регистрируется в митозе. В G1-фазе клеточного цикла происходит падение его уровня, сменяющееся постепенным возрастанием в ходе фазы S и достижением максимума к следующему митозу [7–9]. Уже доказано его значение для прогнозирования клинического течения при ряде злокачественных опухолей. Имеющиеся в литературе данные о прогностической роли Ki-67 при ПКР недостаточны [8, 10]. Все это делает исследование, посвященное клинической оценке ряда ИГХ-параметров при ПКР, актуальным и своевременным.

Целью данной работы явилось сопоставление экспрессии ядерного антигена Ki-67 с рядом клинико-морфологических параметров при ПКР.

Материалы и методы

Настоящее исследование основано на ретроспективном анализе данных 122 больных ПКР, получивших лечение в период с 1997 по 2003 г. в урологическом отделении ГУЗ Алтайский краевой онкологический диспансер (главный врач — докт. мед. наук проф. А.Ф. Лазарев). Средний возраст пациентов — $56,3 \pm 9,7$ года (от 37 лет до 81 года). В возрасте до 40 лет находились 4 (3,3%) больных, 40–49 лет — 29 (23,8%), 50–59 — 44 (36,1%), 60–69 — 31 (25,4%), 70 лет и старше — 13 (10,6%) больных. Мужчин с ПКР отмечено больше, чем женщин: 75 (61,5%) мужчин и 47 (38,5%) женщин, соотношение мужчин и женщин составило 1,6:1. Более половины больных (74 пациента — 60,6%) бы-

ли трудоспособного возраста: 49 мужчин до 60 лет и 25 женщин до 55 лет. При группировке опухолей по клиническим стадиям (I–IV) выявлено: I стадии (T1N0M0) соответствовали 16 (12,4%) наблюдений, II стадии (T2N0M0) – 18 (14,9%) наблюдений, III стадии (T1N1M0, T2N1M0, T3N0M0, T3N1M0) – 70 (57,8%) и IV (T4N0M0, T4N1M0, ТлюбаяN2M1, ТлюбаяNлюбаяM1) – 18 (14,9%).

Из 122 опухолей почек, где в гистологическом диагнозе значился ПКР, нам удалось ознакомиться с гистологическими препаратами первичных опухолей в 105 случаях. При этом к светлоклеточному варианту ПКР нами были отнесены 75 (71,4%) наблюдений, хромофильному – 11 (10,4%), кистозному – 8 (7,6%), гранулярноклеточному – 6 (5,7%), веретенноклеточному – 5 (4,8%). В 2 случаях опухоли были расценены как хромофобный вариант ПКР (с положительной окраской по Hale), но из-за малого количества наблюдений данный вариант ПКР не сочли необходимым рассматривать отдельно, эти случаи анализировали в группе светлоклеточного ПКР. В 101 случае проведено ИГХ-исследование ПКР. ИГХ-реакции проводили на серийных парафиновых срезах. Демаскировка антигенов происходила путем инкубации срезов в течение 20 мин в ретривере при температуре 120°C в растворе 0,01 М цитратного буфера (рН=6,0). Эндogenous пероксидазу блокировали при обработке срезов в течение 10 мин в 3% перекиси водорода. Инкубация с первичными антителами к ядерному антигену Ki-67 (клон MIB-1, «Dako») в разведении 1:400 длилась в течение 20 мин при комнатной температуре. Иммуноокрашивание проводили стрептавидин-биотиновым пероксидазным методом («Dako», LSAB+ Kit HRP), в качестве хромогена использовали раствор 3,3-диаминобензидина («Dako», Liquid DAB+). Для фонового ядерного окрашивания применяли гематоксилин. Негативный контроль осуществляли без первичных антител. В каждом случае исследовали 1000 опухолевых клеток в 6–15 полях зрения в зависимости от плотности опухоли, при увеличении $\times 400$. Определяли индекс пролиферации (ИП) Ki-67 – число положительно окрашенных ядер клеток от общего количества подсчитанных клеток, в процентах.

Полученные данные в большинстве наблюдений подчинялись нормальному распределению, что позволило использовать для статистического анализа параметрический критерий Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ. Вычисление и

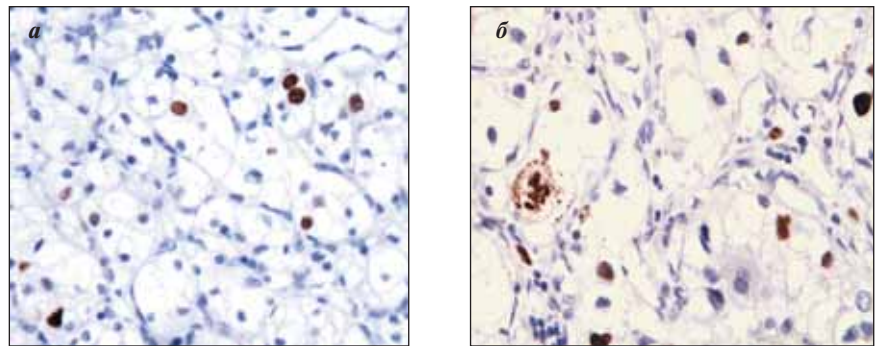


Рис. 1. ПА ПКР по экспрессии Ki-67 (увеличение $\times 400$): а – клетки ПКР разной интенсивности окрашивания; б – патологический митоз клеток ПКР

сравнение достоверности различий средних величин выполняли с использованием пакета программ для компьютерного анализа SAS. Построение гистограмм осуществляли с помощью компьютерной программы Microsoft Excel (2002).

Результаты и обсуждение

Нами были сопоставлены классические клинико-морфологические факторы и ИП Ki-67 в клетках ПКР. Результат ИГХ-выявления антигена Ki-67 представлен в виде очень четко окрашенных в темно-коричневый цвет ядер с более интенсивным окрашиванием ядрышек (рис. 1, а), а также сильно выраженного окрашивания митотических фигур (рис. 1, б). Мы провели исследование пролиферативной активности (ПА) по экспрессии ядерного антигена Ki-67. Среди всех обследованных больных вне зависимости от пола, возраста, варианта ПКР, гистологического строения и т.д. разброс показателей экспрессии антигена Ki-67 был от 1,6 до 13,9 %. Таким образом, ПКР характеризовался низкими значениями ИП Ki-67.

В целом среднее значение индекса пролиферации Ki-67 во всей группе было $5,1 \pm 2,3\%$ (стандартная ошибка среднего – 0,2), медиана – 4,5%. ПА опухоли оценивали как низкую – при ИП Ki-67 менее 5,0%, как высокую – при ИП Ki-67 5,0% и более. В результате установлено, что 62 больных (61,4%) имели опухоли с низкой ПА ПКР по индексу Ki-67, а 39 (38,6%) – с высокой ПА. При высокой ПА средние показатели Ki-67 составили $7,4\% \pm 2,0$ (от 5,1 до 13,9%); медиана – 6,5%. При низкой ПА эти значения были $3,5 \pm 0,9\%$; 3,5 и 1,6–4,9% соответственно.

Сопоставление классических клинико-морфологических факторов прогноза при ПКР и выраженности экспрессии антигена Ki-67 позволило выявить некоторые особенности течения ПКР с высокой и низкой ПА.

В зависимости от пола больных более высокие показатели индекса Ki-67 отмечены у мужчин. Средние значения ИП Ki-67 у мужчин были $5,4 \pm 2,2\%$, у женщин – $4,3 \pm 2,5\%$, при этом медиана

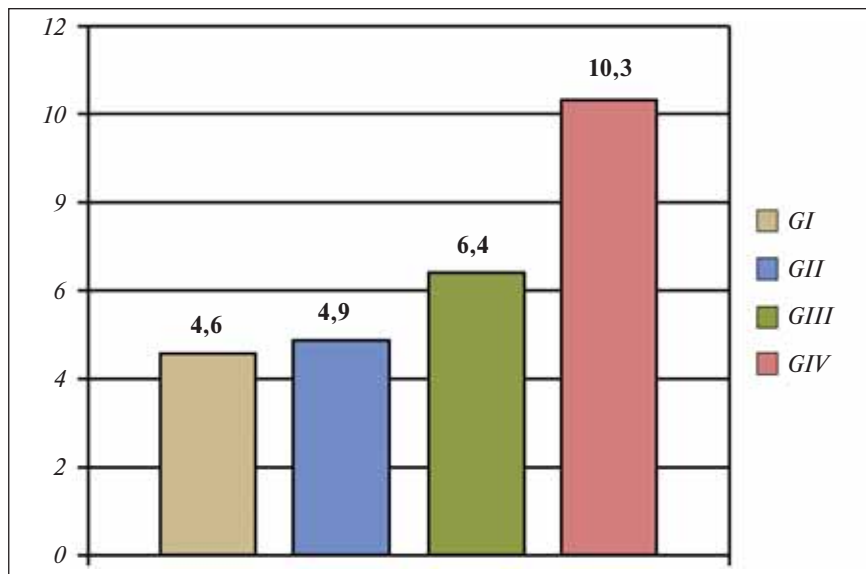


Рис. 2. ПА по индексу Ki-67 в зависимости от степени ядерной атипии ($p < 0,005$) [5]

Таблица 1. ПА по индексу пролиферации Ki-67 в зависимости от дистантного метастазирования

Показатель	ПА по индексу Ki-67				p
	низкая		высокая		
	абс.	%	абс.	%	
Отдаленные метастазы					
нет	44	70,9	21	53,8	>0,05
есть	18	29,1	18	46,2	>0,05
Итого ...	62	100	39	100	—
Срок возникновения, мес	25,8±25,0		7,8±7,8		<0,006

показателя была 4,9 и 3,8% соответственно, различия статистически значимы ($p=0,03$).

Средние показатели и медиана значения индекса пролиферации Ki-67 в возрасте до 40 лет были $3,6 \pm 2,7$ и 2,5%, от 40 до 49 лет — $4,7 \pm 2,2$ и 4,2%, от 50 до 59 лет — $5,3 \pm 2,5$ и 4,6%, 60—69 лет — $4,6 \pm 2,2$ и 4,2%, от 70 до 79 лет — $6,1 \pm 2,3$ и 4,7%. Таким образом, самые низкие показатели индекса пролиферации Ki-67 наблюдали в возрастной группе от 40 до 49 лет, а самые высокие — в старшей возрастной группе от 70 до 79 лет. Полученные различия в средних величинах в разных возрастных группах не были статистически значимы ($p > 0,2$).

По мере увеличения стадии ПКР (за исключением I стадии) отмечен рост средних показателей и медианы значения индекса Ki-67. У 16 (15,8%) пациентов с I клинической стадией процесса средние значения и медиана индекса экспрессии Ki-67 составили $4,4 \pm 2,2$ и 4,2%, у 17 (16,8%) больных со II клинической стадией эти показатели были $4,0 \pm 1,3$ и 4,1%, у 54 (53,5%) пациентов с III стадией процесса — $5,2 \pm 2,6$ и 4,7% и у 14 (13,9%) больных с IV

стадией — $5,9 \pm 2,1$ и 5,9% соответственно. Эти различия не были статистически значимыми ($p=0,087$), что не позволяет расценивать данный антиген как стадиоспецифический. Отсутствие статистически значимых различий объясняется, по-видимому, небольшим числом наблюдений I, II и IV стадий.

Сопоставляя взаимосвязь выраженности ПА и варианта ПКР, получили следующие результаты. Наименьшее среднее значение, медиана и интервал изменения были при кистозном и гранулярноклеточном вариантах ПКР ($3,6 \pm 1,4\%$, 3,8%, 1,9—5,6 и $3,6 \pm 0,7\%$, 3,2%, 3,1—4,7% соответственно). Промежуточное положение по величине этих показателей занимали светлоклеточный ($4,9 \pm 2,1\%$, 4,7 и 1,6—12,8%) и хромфильный ($5,4 \pm 2,3\%$, 4,5 и 1,9—9,3%) варианты ПКР. Наибольшие показатели отмечены при веретенноклеточном варианте ПКР ($7,7 \pm 4,7\%$, 6,2%, интервал изменений — 2,5—13,9%). Следовательно, прогностически неблагоприятные гистологические формы ПКР отличались более высокими значениями ИП Ki-67 ($p=0,032$).

Среди больных, у которых была исследована ПА по ИП Ki-67, были 48 (47,6%) пациентов с ПКР I степени ядерной атипии (GI), 40 (39,6%) — со II степенью (GII), 12 (11,9%) — с III степенью (GIII) и 1 (0,9%) — с IV степенью (GIV). Отмечено повышение средних показателей индекса Ki-67 с увеличением степени ядерной атипии: $4,6 \pm 0,3\%$ при GI, $4,9 \pm 2,2\%$ при GII, $6,4 \pm 2,8\%$ при GIII и единственное наблюдение с GIV со значением индекса пролиферации Ki-67 — 10,3% (рис. 2).

Полученные различия в экспрессии ядерного антигена Ki-67, выявленные исходя из степени ядерной атипии, — статистически значимы ($p=0,008$).

Для того чтобы проанализировать экспрессию ядерного антигена Ki-67 в зависимости от дистантного метастазирования, всех пациентов разделили на 2 группы по величине индекса Ki-67. В первую группу вошли 62 (61,4%) пациента с низкой ПА, у которых значения индекса Ki-67 не превышали 5,0%. Вторую группу составили 39 (38,6%) больных

со значениями индекса Ki-67 5,0% и более. У 18 (29,0%) из 62 больных с низкой ПА по индексу Ki-67 развились отдаленные метастазы (табл. 1). Преобладание больных ПКР с отдаленными метастазами в группе с высокой ПА по индексу Ki-67 не было статистически значимым ($p > 0,05$).

В соответствии со сроками возникновения дистантных метастазов у больных этой группы среднее значение было $25,8 \pm 25,0$ мес, медиана возникновения отдаленных метастазов равнялась 18 мес (интервал изменения – от 0 до 89 мес). В группе больных с высокой ПА по индексу Ki-67 также у 18 (46,2%) пациентов были диагностированы отдаленные метастазы. Сроки возникновения отдаленных метастазов в этой группе больных были значительно меньше и составили: среднее значение – $7,8 \pm 7,8$ мес, медиана – 5,5 мес (интервал изменения – от 0 до 22 мес). Данные различия статистически значимы ($p < 0,05$).

В описанных выше группах пациентов с низкой и высокой ПА проанализировали отдаленные результаты. Полученные данные приведены в табл. 2.

Отмечено значительное уменьшение показателей общей выживаемости, как средних, так и медианы, в зависимости от увеличения величины ПА по индексу Ki-67. Причем средние показатели выживаемости в группе с низкой ПА по индексу Ki-67 были

Таблица 2. Соотношение значения индекса Ki-67 и показателей общей выживаемости

Показатель	ПА по индексу Ki-67		p
	низкая	высокая	
Среднее значение, мес	56,3±18,6	30,2±24,7	<0,05
Медиана, мес	60,5	23	–

на 26,1 мес, а медиана – на 37,5 мес больше, чем в группе с высокой ПА. Данные различия – статистически значимы ($p < 0,05$). В соответствии с этими данными изучаемый антиген является специфическим для предсказания выживаемости больных.

Заключение

Для ПКР характерны низкие показатели ПА. Высокие показатели индекса Ki-67 при ПКР (более 5,0%) являются неблагоприятным фактором появления отдаленных метастазов. Значение индекса пролиферации Ki-67 можно рассматривать в качестве прогностического критерия при определении сроков вероятного возникновения отдаленных метастазов. Выявлена взаимосвязь величины индекса Ki-67 и общей выживаемости больных. Высокие значения изучаемого антигена – неблагоприятный фактор для предсказания выживаемости больных. Выявлена статистически достоверная взаимосвязь изучаемого антигена с полом больных, гистологическим вариантом ПКР и степенью ядерной атипии (по S.A. Fuhrman).

Литература

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2002 г. М., Медицинское информационное агентство; 2004. с. 279.
2. Матвеев В.Б., Волкова М.И. Рак почки. М., Федеральная целевая программа «Предупреждение и борьба с заболеваниями социального характера»; 2005. с. 255–62.
3. Романенко А.М., Бош-Ломбарт Л. Иммуногистохимическая диагностика опухолей почек. Под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей. 2-е изд. Казань, «Титул»; 2004. с. 93–100.
4. Delahunt B. Histopatologic prognostic indicators for renal cell carcinoma. *Semin Diagn Pathol* 1998;15:68–76.
5. Fuhrman S.A., Lasky L.S., Limas C. Prognostic significance of morfologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982;(6):655–63.
6. Usubutum A., Ayhan A., Uygur M.C. et al. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 1998;17:77–81.
7. Bui M.H., Visapaa H., Seligson D. et al. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and Ki-67 as predictors of survival for renal cell carcinoma. *J Urol* 2004;171(6):2461–6.
8. Rioux-Leclercq N., Turlin B., Bansard J. et al. Value of immunohistochemical Ki-67 and p53 determinations as predictive factors of outcome in renal cell carcinoma. *Urology* 2000;55:501–5.
9. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;152(3):311–22.
10. Slaton J.W., Inoue K., Perrotte P. et al. Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renall cell carcinoma. *Am J Path* 2001;158(2):735–43.

Уважаемые коллеги!

Подписку на журнал «ОНКОУРОЛОГИЯ» на 2008 г. можно оформить в любом отделении связи. Подписной индекс в каталоге «Почта России» — 12312.