

О.А.Савченко  
І.С.Шпонька  
О.В.Пославська  
П.В.Савченко

ДЗ «Дніпропетровська  
медична академія МОЗ  
України»

**Ключові слова:** пух-  
лини епітелію, циклін  
7, циклін 20, p53, Ki-  
67.

Надійшла: 07.11.2017  
Прийнята: 28.11.2017

УДК: 618.11:611.018.7]-006-07:616-091.8

## АНАЛІЗ ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ ТА РІВНІВ ЕКСПРЕСІЇ ДІАГНОСТИЧНИХ ЦИТОКЕРАТИНІВ В ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ ПУХЛИНАХ ЯЄЧНИКІВ З РІЗНИМ ПОТЕНЦІАЛОМ ЗЛОЯКІСНОСТІ

**Реферат.** У роботі був проведений ретроспективний аналіз матеріалу 70 жінок віком від 19 до 76 років (середній вік  $46,95 \pm 14,84$ ; медіана 46) з діагнозом епітеліальної пухлини яєчників (ЕПЯ). Метою дослідження стало порівняння рівнів експресії маркерів проміжних філаментів цитокератинів (СК7, СК20), онкопротеїну p53 та індексу проліферації за Ki-67 для покращення діагностичних критеріїв патогістологічного дослідження епітеліальних пухлин яєчників. Авторами виділені вагомі гістологічні характеристики та імунофенотипи серозних і муцинозних пухлин яєчників, розраховані показники проліферації за Ki-67 та оцінені рівні експресії p53, СК7, СК20 в залежності від потенціалу злоякісності пухлин.

**Morphologia.** – 2017. – Т. 11, № 4. – С. 48-52.

© О.А.Савченко, І.С.Шпонька, О.В.Пославська, П.В.Савченко, 2017

✉ [pollina.savchenko@gmail.com](mailto:pollina.savchenko@gmail.com)

**Savchenko O.A., Shpon'ka I.S., Poslavs'ka O.V., Savchenko P.V. Analysis of proliferative activity and levels of diagnostic cytokeratins expression in epithelial tumors of the ovaries with different malignancy potential.**

**ABSTRACT. Background.** Epithelial tumors of the ovaries are quite a diverse group of tumors that have similar macroscopic and variable histological structures with different malignancy potential and make up about half of all ovarian tumors. Depending on the potential of the malignancy, EPAs are divided into benign (25%), borderline (56%) and malignant. **Objective.** The aim of the study was to compare the expression's levels of markers of intermediate phylloenes of cytokeratins (CK7, CK20), oncoprotein p53, and the Ki-67 proliferation index, with the observations epithelial tumors to improve the quality of differential-diagnostic immunomorphological criteria. **Methods.** A prospective immunohistochemical study of 70 samples of tumors was carried out among women age from 19 till 76 for comparing histological and immunomorphological characteristics and making retrospective analysis according to cytokeratins (CK7, CK20), p53, Ki-67. **Results.** The authors distinguished the significant histological characteristics of serous and mucinous epithelial tumors, calculated the proliferation indices for Ki-67 and estimated levels of expression of p53, CK 7 and CK20, depend on the potential of malignancy of tumors. **Conclusion.** The use of diagnostic cytokeratins CK7 and CK20 is an effective way of determining the type of differentiation of epithelial ovarian tumors (except for the light-cell and endometrioid variants), but only the proliferation index and expression of the p53 tumor marker are important for determining the potential of malignancy.

**Key words:** epithelial tumors, cyclin 7, cyclin 20, p 53, Ki-67.

### Citation:

Savchenko OA, Shpon'ka IS, Poslavs'ka OV, Savchenko PV. [Analysis of proliferative activity and levels of diagnostic cytokeratins expression in epithelial tumors of the ovaries with different malignancy potential]. *Morphologia*. 2017;11(4):48-52. Ukrainian.

### Вступ

Епітеліальні пухлини яєчників (ЕПЯ) доволі різноманітна група пухлин, які мають подібну макроскопічну та варіабельну гістологічну будову з різним потенціалом злоякісності і складають близько половини всіх пухлин яєчників [1-2]. В залежності від потенціалу злоякісності ЕПЯ поділяють на доброякісні (25%), пограничні (56%) та злоякісні. В багатьох неоплазіях яєчників різного походження і схожій мікроскопічній будові відсутні специфічні ознаки, як клінічні, так і макроскопічні (всі ці пухлини виглядають зазвичай

як кісти) не залежно від рівня диференціювання.

Відсутність специфічних ознак ЕПЯ на сучасному етапі діагностики не дозволяє патоморфологу в сумнівних випадках після звичайної оглядової мікроскопії з забарвленням гематоксиліном і созином зробити висновок про первинний або вторинний характер пухлинного процесу та можливий ступень злоякісного потенціалу. Гістохімія та електронна мікроскопія є малоінформативними і не вирішують головних діагностичних питань [1]. Головну роль в верифікації складних випадків відводять імуногістохімічному

дослідженню (ІГХ). Використання високоспецифічних моноклональних антитіл підвищує точність диференційної діагностики пухлин багатьох локалізацій.

Згідно національному канцер-реєстру за 2015 рік, загальна кількість випадків злоякісних новоутворень яєчників склала 3477, кількість померлих від них - 1862, не прожили і 1-го року з числа вперше захворілих в 2014р. біля 26,3%. За 2016 рік у Дніпропетровській області зареєстровано 261 нових випадків, кількість зареєстрованих смертей – 161 випадок. Таким чином Дніпропетровська область займає друге місце за хворюваністю на пухлини яєчників (після м. Київ) і перше за показником смертності [3], що обумовлює актуальність та необхідність детального дослідження канцерогенезу пухлин цієї локалізації.

#### Мета

Покращити діагностичні критерії патогістологічного дослідження епітеліальних пухлин яєчників на підставі вивчення рівнів експресії маркерів проміжних філаментів цитокератинів (СК7, СК20), онкопротеїну р53 та індексу проліферації за Ki-67.

#### Матеріали та методи

У роботі проведено ретроспективний аналіз,

гістологічні та ІГХ дослідження післяопераційного матеріалу 70 пухлин яєчників жінок віком від 19 до 76 років (середнє 46,95±14,84; медіана 46), що зверталися з КЗ «ДОКОД» ДОР, КЗ «КОД» ДОР, КЗ «ОКЛІМ» ДОР продовж січня-грудня 2015 року з метою проведення ІГХ дослідження для виключення злоякісного новоутворення в морфологічний відділ діагностичного центру ТОВ «Аптеки медичної академії» м. Дніпра. Діагнози встановлювалися двома досвідченими патоморфологами незалежно один від одного за сучасними класифікаціями ВООЗ [2].

Для проведення ІГХ дослідження ми використовували формалін-фіксовані і парафін-залиті примірники біопсійного матеріалу. ІГХ дослідження проводилося згідно протоколів компанії ThermoScientific (TS), (США). У зрізах завтовшки 4 мкм використовували систему візуалізації Lab Vision Quanto (TS, США) з виявленням білкового ланцюга за допомогою DAB Quanto Chromogen (TS, США). Первинна панель ІГХ антитіл включала діагностичні антитіла до Cytokeratin 7, Cytokeratin 20 та прогностичні до р53 і Ki 67 (ThermoScientific, США). Титр антитіл підбирався індивідуально для кожного маркеру з використанням спеціального розчину antibody diluent (табл. 1).

Таблиця 1

Первинні моноклональні антитіла

Первинні антитіла	Клон (розведення)	Локалізація специфічної реакції
Cytokeratin 20 (СК20)	Ab-5 (1:200)	Цитоплазма
Cytokeratin 7 (СК7)	Ab-2 (1:50)	Цитоплазма
Ki-67	SP6 (1:200)	Ядро
p53	SP5(1:200)	Ядро

*Статистичні методи дослідження.* Дані досліджень, зазнавали статистичної обробки, з використанням варіаційних методів, що включали визначення наступних характеристик:  $\bar{X}$  – середня арифметична;  $S_x^2$  – дисперсія;  $S_x$  – середнє квадратичне відхилення;  $C_v$  – коефіцієнт варіації;  $S_s$  – помилка середнього квадратичного відхилення.

#### Результати та їх обговорення

Рутинне забарвлення (Г-Е) дозволяє відокремити головні морфологічні характеристики ПЯ. Доброякісні епітеліальні пухлини (n=10), характеризувалися утворенням кіст з гладенькими поверхнею та внутрішньою вистілкою, зазвичай містили в собі серозну або муцинозну рідину. Доволі часто ДПЯ мали маленькі папілярні вирости (виступи), які не перебільшували 10% поверхні пухлини, вистелені серозними або муциноподібними клітинами (ендоцервікальний тип), або ендометриодними клітинами (менш часто зу-

стрічалися перехідні або плоскі клітини), пухлини, які містили виражений стромальний компонент – цистаденофіброми (рис. 1 А, Б).

Пограничні пухлини яєчників (ППЯ) (n=27), також виглядали як кістозні утворення, для вистілки яких були характерні клітинна проліферація, ядерна атипія та стратифікація епітелію, але відсутня стромальна інвазія. Треба зазначити, що ППЯ склалися більш ніж з одного типу епітеліальних клітин, найбільш часто, серозних та ендометриодного типу (однак, інколи виявлялися ендометриодні, світлоклітинні, перехідні або плоскоклітинні патерни) (рис. 1 Г, рис. 2 А, Б).

Злоякісні пухлини (n=19) виглядали як одно- або багатокамерні кісти з м'якими пухкими папілами, порожнини кіст містили серозну, мутну або геморагічну рідину. Також були характерні клітинна проліферація, ядерна атипія, стромальна інвазія, наявність крововиливів та некротів (рис. 1 В).



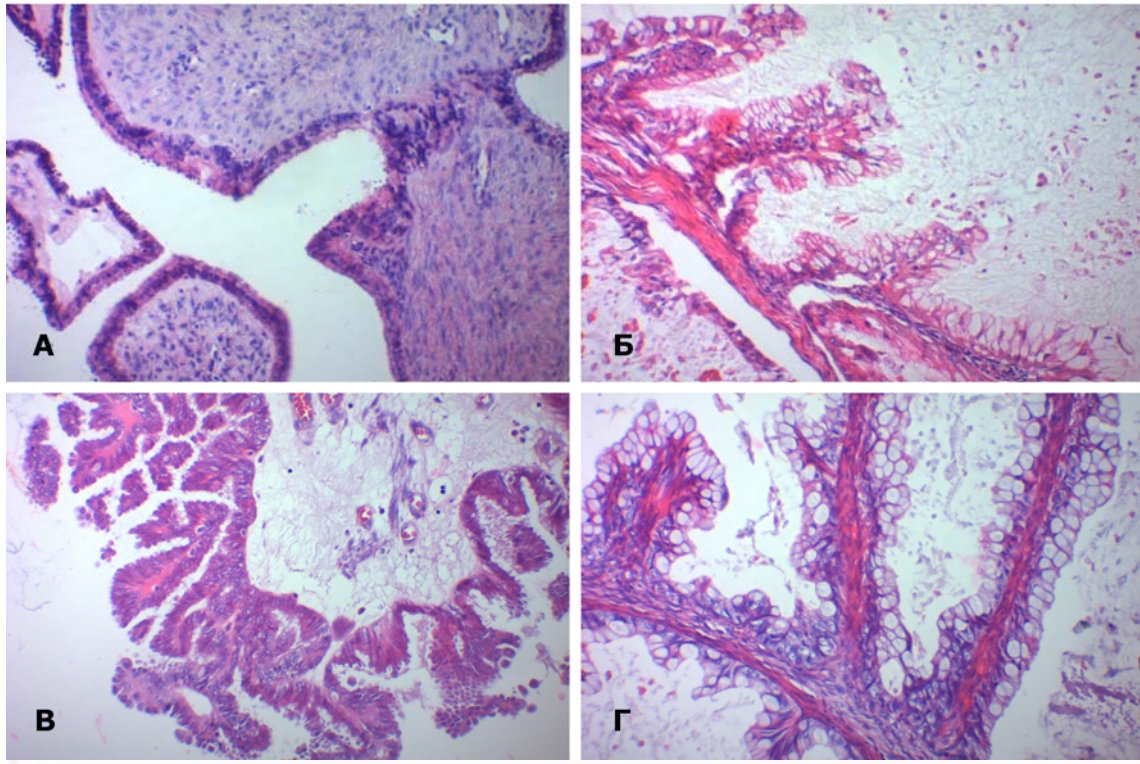


Рис. 1. А. Серозна цистаденома, забарвлення гематоксиліном і еозином.  $\times 400$ . Б. Муцинозна цистаденома, забарвлення гематоксиліном і еозином.  $\times 400$ . В. Високодиференційована серозна карцинома, забарвлення гематоксиліном і еозином.  $\times 200$ ). Г. Муцинозна погранична пухлина, забарвлення гематоксиліном і еозином.  $\times 400$ .

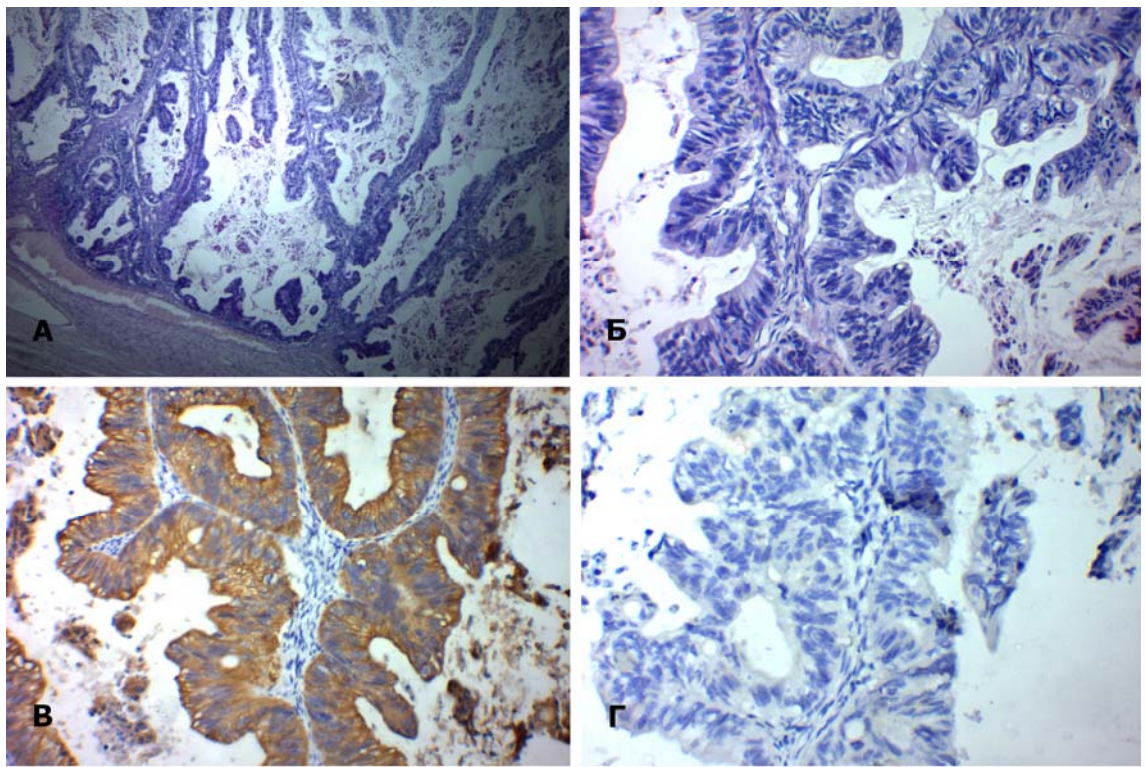


Рис. 2. А. Серозна аденокарцинома яєчника (проліферація епітелію зсередини капсули), забарвлення гематоксиліном і еозином.  $\times 100$ . Б. Серозна аденокарцинома яєчника: багаторядність епітелію, патологічні мітози, втрата базальної мембрани, забарвлення гематоксиліном і еозином.  $\times 400$ . В. позитивна реакція з маркером CK7, ІГХ метод з гематоксиліном Майєра.  $\times 400$ .

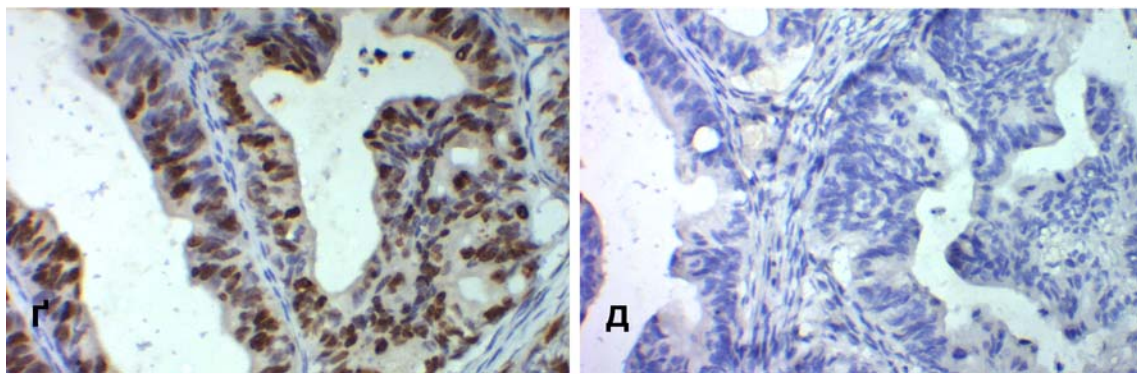


Рис. 2. (продовження). Г. Серозна аденокарцинома яєчника. Негативна реакція з маркером СК20, ІГХ метод з гематоксиліном Майєра.  $\times 400$ . Г. Високий індекс проліферації за маркером Кі-67, ІГХ метод з гематоксиліном Майєра.  $\times 400$ . Д. Негативна експресія маркеру р53, ІГХ метод з гематоксиліном Майєра.  $\times 400$ .

Аналізуючи розподіл гістологічних типів ПЯ серед відібраних нами випадків, можна виявити певну тенденцію перевищення серозних типів серед інших, а саме: в 70 досліджуваних пухлинах 10 випадків доброякісних пухлин яєчників (ДПЯ) (8 – серозних (11,42%), 2 – муцинозних (2,85%)), 27 випадків пограничних (ППЯ) (20 – серозних (28,57%), 7 – муцинозних (10%)), 19 випадків злоякісних (ЗПЯ) (5 – серозних (7,14%), 1 – муцинозна (1,43%), 2 – ендометриюїдних (2,86%), 1 – світлоклітинна (1,43%), 10 – низькодиференційованих та недиференційованих карцином (14,28%)), 14 – не епітеліального походження (20%). Ці дані розподілу співпадають з результатами інших авторів [1-5].

У 56 випадках епітеліальних пухлин яєчни-

ків виявлена експресія маркерів СК7, СК20 незалежно від їх рівня диференціювання. Варіант експресії маркерів 100% СК7 «+»/СК20 «-» виявлена у 33 серозних пухлинах (рис. 2 В, Г), 2 – ендометриюїдних пухлинах; зворотній варіант експресії маркерів 100% СК20 «+»/СК7 «-» виявлена у 10 випадках муцинозних пухлин; цікавим виявилось вогнищеве забарвлення СК7 «+»/СК20 «+» в 10 низькодиференційованих ПЯ та в 1 світлоклітинній ПЯ. Зазначені маркери можна використовувати в панелі діагностичних антитіл як первинних так і вторинних пухлин яєчників, але з урахуванням морфологічних ознак клітинного диференціювання, в незалежності від ступеня злоякісного потенціалу (рис. 3).

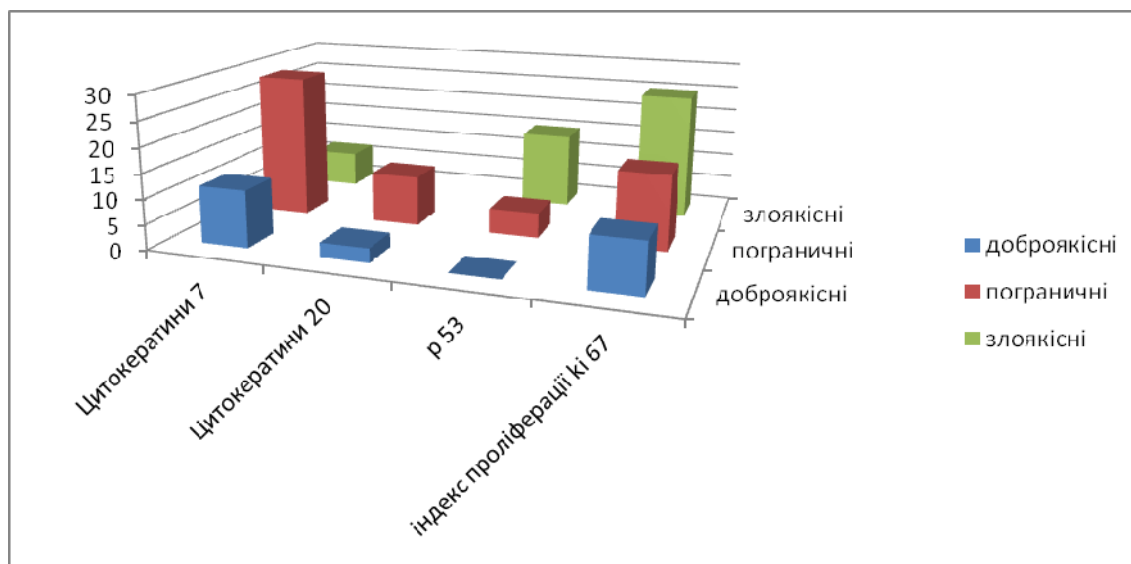


Рис. 3. Графічне зображення показників експресії діагностичних (СК20, СК7) та прогностичних (р53, Кі-67) маркерів в залежності від потенціалу злоякісності епітеліальних пухлин яєчників (%).

Маркер р53 виявляє надекспресію відповідного протеїну, що відіграє роль у патогенезі епітеліальних пухлин яєчників, проте не є достовірним діагностичним критерієм, його відсутність

не завжди свідчить про доброякісний перебіг пухлин, але інтрануклеарна експресія р53 на рівні більше 3-4% вірогідно свідчить про набуття злоякісного фенотипу. Використання даного маркера



є доцільним для визначення прогнозу захворювання, тому що високий рівень експресії маркера р53 частіше спостерігається у злоякісних пухлинах з більш агресивним перебігом. Ці дані відображені на рис. 3 і співпадають з результатами інших авторів [6-10].

Маркер Ki-67 (індекс проліферації) продемонстрував чітку тенденцію збільшення інтрануклеарних реакцій із зменшенням ступеня диференціювання ПЯ. Показники ПП коливались в таких коридорах: в доброякісних пухлинах він не перевищував 15%, в пограничних – відзначалися коливання від 15 до 30%, а в злоякісних від 25% і більше (рис. 3).

#### Підсумок

Фенотип муцинозних епітеліальних пухлин яєчників здебільшого відповідає складу цитокератинів СК20 «+»/СК7 «-», навпаки фенотип се-

розних пухлин – частіше СК7 «+»/СК20 «-», незалежно від потенціалу злоякісності. Ендометріодні та світлоклітинні фенотипи ЕПЯ мають варіабельну експресію СК20/СК7 і потребують включення в первинну панель інших діагностичних маркерів. Онкопротеїн р53 не є достовірним діагностичним критерієм, але інтрануклеарна експресія р53 на рівні більше 3-4% вірогідно свідчить про набуття злоякісного фенотипу. Високі індекси проліферації та рівень експресії маркера р53 частіше спостерігаються у злоякісних пухлинах яєчників і тому можуть бути використані в якості прогностичних.

**Перспективи подальших досліджень** пов'язані з вивченням діагностичних критеріїв патогістологічного дослідження епітеліальних пухлин яєчників на підставі визначення рівнів експресії різних маркерів.

### Літературні джерела References

1. Kurman R J. Blaustein's pathology of the female genital tract . Springer. 2001. p. 791-904.
2. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington C S, Young RH. WHO Classification of tumors of female reproductive organs. Revised 4th ed. Lyon: IARC. 2014. 307 p.
3. Fedorenko ZP, Gulak LO, Mikhailovich YY. [Assessment of the state of the organization of oncological assistance to the population according to the data of the national registry chancellery]. Clinichna Oncologiya. 2015;3(19):7-12. Ukrainian.
4. Priya C, Sunesh Kumar and Lalit Kumar. Borderline ovarian tumors: an update . Indian journal of medical & Pediatric oncology. 2008;2:19-27.
5. Christopher DM, Fletcher. Diagnostic histopathology of tumors. ELSEVIER SAUNDERS. 2013; 1: 658-688.
6. Pozharsky KM, Raskin GA, Vinokurov VL, Yurkova LE, Mukhina MS. [Immunohistochemical features of cells of serous ovarian adenocarcinoma, which determines the clinical course of the disease and the survival of patients]. Arkhiv patologii. 2015;1:38-40.
7. Hanahan D, Robert A. Weinberg. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011; 4: 646-674.
8. Romeo M, Pons F, Barretina P, Radua J. Incomplete staging surgery as a major predictor of relapse of borderline ovarian tumor . World journal of surgical oncology. 2013; 13: 1-7.
9. Mills SE, Carter D, Greenson JK. Diagnostic surgical pathology. Wolters Kluwer. 2010; 2: 2278-2308.
10. Tummala M, McGuire W. Recurrent ovarian cancer. Clin Adv Hematol Oncol. 2005; 3: 723-736.

**Савченко О.А., Шпонька И.С., Пославская А.В., Савченко П.В. Анализ пролиферативной активности и уровней экспрессии диагностических цитокератинов в эпителиальных опухолях яичников с различным потенциалом злокачественности.**

**Реферат.** В работе был проведен ретроспективный анализ материала 70 женщин в возрасте от 19 до 76 лет (средний возраст  $46,95 \pm 14,84$ ; медиана 46) с диагнозом эпителиальной опухоли яичников (ЕПЯ). Целью исследования стало сравнение уровней экспрессии маркеров промежуточных филаментов цитокератинов (СК7, СК20), онкопротеинов р53 и индекса пролиферации по Ki-67 для улучшения диагностических критериев патогістологического исследования эпителиальных опухолей яичников. Авторами выделены значительные гистологические характеристики и иммунофенотипа серозных и муцинозная опухолей яичников, рассчитаны показатели пролиферации за Ki-67 и оценены уровни экспрессии р53, СК7, СК20 в зависимости от потенциала злокачественности опухолей.

**Ключевые слова:** эпителиальные опухоли, cyclin 7, cyclin 20, p53, Ki-67.