

УДК: 616.24-006.6-07:577.112

<sup>1</sup>О.П. КОЛЕСНИК, <sup>1</sup>А.І. ШЕВЧЕНКО, <sup>2</sup>В.О. ТУМАНСЬКИЙ, <sup>2</sup>А.В. ЄВСЄЄВ*Запорізький державний медичний університет, медичний факультет,**<sup>1</sup>кафедра онкології;**<sup>2</sup>кафедра патологічної анатомії та судової медицини з основами права, Запоріжжя***КІ-67 ЯК ПРОГНОСТИЧНИЙ МАРКЕР У ХВОРИХ ІЗ НЕДРІБНОКЛІТИННИМ РАКОМ ЛЕГЕНІВ І–ІІ СТАДІЇ**

Рак легенів залишається основною причиною смерті від злоякісних новоутворень. Навіть після радикальної операції у більш ніж 60 % хворих виникає прогресування хвороби. Відокремити прогностично несприятливу групу пацієнтів допоможуть молекулярно-генетичні маркери, що дозволить індивідуалізувати лікування та покращити виживання хворих. Однією із важливих властивостей пухлинної тканини є її проліферативна активність, однак недостатня кількість інформації не дозволяє використовувати маркери проліферації в рутинній практиці. Метою нашого дослідження було проаналізувати зв'язок між рівнем експресії Кі-67 та клініко-морфологічними характеристиками хворих з ранніми стадіями недрібноклітинного раку легенів, а також вивчити прогностичну роль даного маркера. За даними проведеного дослідження індекс проліферації значно пов'язаний зі статтю хворих ( $p=0,0004$ ), гістологічною формою та диференціюванням пухлини ( $p<0,05$ ), критеріями Т ( $p=0,0001$ ) та N ( $p=0,02$ ). Відзначається значно гірше виживання у хворих з проліферативною активністю в пухлині більш ніж 25 % клітин ( $\log\text{-rank } p=0,029$ ). Експресія Кі-67 є незалежним прогностичним фактором ( $p=0,006$ ), однак необхідне дослідження додаткових прогностичних критеріїв з метою побудови прогностичної та предиктивної моделі у хворих із недрібноклітинним раком легенів.

**Ключові слова:** недрібноклітинний рак легенів, прогноз, Кі-67, виживання

**Вступ.** Рак легенів є основною причиною смерті від злоякісних новоутворень (ЗН) у всьому світі. Так, 31 % смертей від раку у чоловіків та 26 % у жінок припадає на ЗН легень. Незважаючи на успіхи, що досягнені у лікуванні недрібноклітинного раку легенів (НДКРЛ), загальне 5-річне виживання хворих залишається на рівні 15 %. Після радикального лікування більш ніж у 60 % хворих із НДКРЛ виникають рецидиви [1, 9]. Рак легенів є одним із найскладніших ЗН для лікування та прогнозування виживання. Прогноз у значній мірі залежить від стадії захворювання, однак у деяких хворих із І-ІІ стадією спостерігається несприятливий перебіг захворювання [3, 8]. Це свідчить про те, що хворі із НДКРЛ – гетерогенна група пацієнтів та для більш точного виділення групи із однаковою прогнозом необхідно використовувати додаткові маркери. Молекулярна класифікація раку легенів допоможе більш точно діагностувати та більш ефективно призначити лікування [7, 8, 9, 10, 11]. Незважаючи на те, що в теперішній час описано значну кількість прогностичних та предиктивних маркерів, не виділено тих, що рекомендуються у рутинній практиці. Однак відзначається, що комбінація декількох факторів краще прогнозує перебіг захворювання ніж один маркер [1, 8]. Одним із найважливіших властивостей пухлинної тканини є її проліферативна активність. Визначення експресії Кі-67 є маркером клітинної проліферації. Моноклональне антитіло проти антигену Кі-67 визначається тільки у проліферуючих клітинах та не визначається у клітинах, що знаходяться у спокої [3, 12].

**Мета дослідження.** Проаналізувати зв'язок між рівнем експресії Кі-67 та клініко-морфологічними характеристиками хворих із ранніми стадіями НДКРЛ, а також вивчити прогностичну роль даного маркера.

**Матеріали та методи.** Досліджено 137 хворих із ранніми (І–ІІ) стадіями НДКРЛ, які лікувалися у Запорізькому обласному клінічному онкологічному диспансері з червня 2008 року по червень 2011 року. Серед них було 118 чоловіків (85,9 %) та 19 жінок (14,1 %). Середній вік хворих склав 60,4 року (95 % ВІ, 59,2–61,6). Усім хворим виконано радикальне оперативне втручання з наступним патогістологічним дослідженням матеріалу та імуногістохімічним визначенням експресії маркера клітинної проліферації Кі-67 з використанням первинних антитіл Мо а-Ну Кі-67 Antigen, Clone MIB-1 та системи візуалізації EnVision FLEX (всі реактиви фірми „ДАКО”, США). Індекс клітинної проліферації розраховували за ядерною експресією антигена Кі-67 наступним чином: 0–5 % імунобарвлених ядер пухлинних клітин – 0 балів, 6–25 % – 1 бал, 26–50 % – 2 бали, 51–75 % – 3 бали, 76–100 % – 4 бали. Високою вважали експресію  $\geq 2$  бали.

Для оцінки зв'язку між експресією Кі-67 та іншими критеріями використовували критерій  $\chi^2$  та тест Пірсона. Виживання оцінювали з використанням функції Каплан-Майєра. Різницю виживання окремих груп оцінювали за допомогою  $\log\text{-rank}$  критерію. Для багатофакторного аналізу використовували регресійну модель Кокса. Рівень вірогідності визначений як  $p<0,05$ .

**Результати досліджень та їх обговорення.**

Середній індекс проліферації (ІІ) в пухлинах хворих з ранніми (І–ІІ) стадіями НДКРЛ склав 19,3 %. Для аденокарцином – 10,7 %, для плоскоклітинних ЗН легенів – 35,4 %. У таблиці 1 представлені дані щодо зв'язку ІІ з різними клініко-морфологічними факторами пацієнтів.

Зв'язок клініко-морфологічних факторів з проліферативною активністю пухлини

Характеристика	Ki-67 статус		p
	Висока експресія	Низька експресія	
Вік (рік середнє±стандартне відхилення)	61±7,1	58,9±8,5	0,2
Чоловіки	48	31	0,0004
Жінки	8	8	
Гістологія			
Неплюсклітинний рак	16	17	0,003
Плюсклітинний рак	40	22	
Диференціювання			
G1	13	7	0,0001
G2-3	43	32	
pT			
T1	3	4	0,0001
T2-4	53	35	
pN			
N0	41	31	0,02
N1	15	8	
Локалізація:			
Периферичний рак	29	26	1,0
Центральний рак	27	13	

Як видно із представленої таблиці 1 у чоловіків відзначається значно більш висока проліферативна активність пухлини у порівнянні з пацієнтами жіночої статі. Також статистично більш висока проліферація відзначена у хворих з плюсклітинними формами ЗН, високим диференціюванням пухлини, критеріями T2-4 та N1. Не відзначено зв'язку локалізації пухлини з її проліферативною активністю.

З урахуванням кореляції ІІ з окремими клініко-морфологічними характеристиками пацієнту та

пухлини можливо прогнозувати рівень проліферації у хворих знаючи їх особливості. Однак більш важливо прогнозувати виживання хворих в залежності від різних факторів, у тому числі і в залежності від ІІІ. Для проведення багатофакторного прогностичного аналізу різних критеріїв використовували регресійну модель Кокса (табл. 2). Згідно з аналізом незалежними прогностичними факторами є розмір пухлини ( $p=0,005$ ), індекс проліферації (ІІІ) ( $p=0,006$ ), гістологічний тип пухлини ( $p=0,001$ ).

Таблиця 2

Прогностичне значення клініко-морфологічних характеристик пацієнтів

Фактор	Категорія	Hazard ratio	Значення p
Вік	<50 років vs* ≥50 років	0,009	0,99
Стать	ч vs ж	1,39	0,16
гістологія	Плюсклітинний рак vs Неплюсклітинний рак	3,27	0,001
G	G1 vs G2-3	0,1	0,916
T	T1 vs T2-3	0,01	0,99
N	N0 vs N1	0,7	0,46
Локалізація	Центральний vs периферичний	1,33	0,18
Розмір пухлини	До 3 см vs більше ніж 3 см	2,78	0,005
Ki-67	≥25 % vs <25 %	2,73	0,006

\*vs – проти

Таким чином, найменш сприятливий перебіг НДКРЛ спостерігається у хворих із розміром пухлини понад 3 см, плюсклітинним гістологічним диференціюванням та ІІІ ≥25 %. Даний висновок підтверджено при вивченні виживання хворих із

ранніми стадіями НДКРЛ в залежності від рівня проліферативної активності.

На рисунку 1 представлено виживання в залежності від рівня експресії Ki-67. Так, при експресії маркера в більш ніж 25 % клітин пухлини,

медіана виживання склала 28,7 місяця, а при забарвлені менше 25 % клітин пухлини медіана виживання не досягнена (log-rank  $p=0,029$ ). Це

вказує на значний прогностичний вплив рівня проліферації, що визначений за допомогою експресії рівня Ki-67.

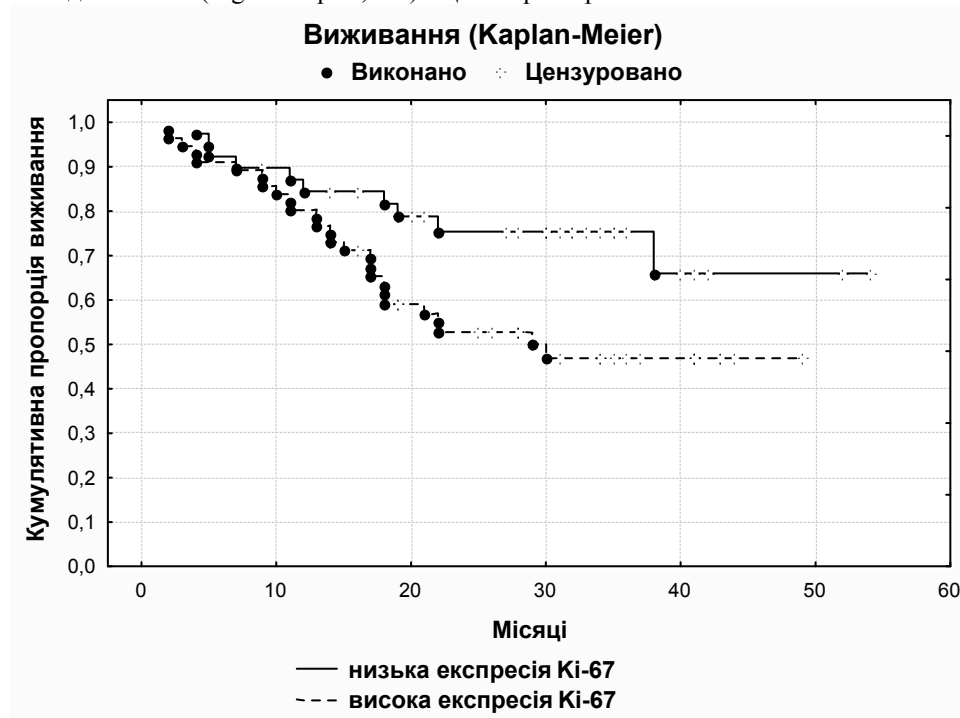


Рис. 1. Вплив рівня проліферації на виживання хворих із раніми стадіями НДКРЛ

Визначення проліферативної активності можливе як в біопсійному матеріалі пухлини до виконання радикальної операції, так і в препараті, що отримано після оперативного втручання (резекція легені). За даними Taillade та співавт. у 2007 р. відзначається висока кореляція між рівнем експресії Ki-67 в передопераційному біоптаті та післяопераційному зразку пухлини ( $r=0,64$ ) [7]. Дане спостереження особливо важливе у хворих, яким планується проведення передопераційної хіміотерапії та ад'ювантного лікування.

Гіперекспресія Ki-67 визначена у нашому дослідженні у 31,6 % хворих із I-II стадіями НДКРЛ. За даними літератури, рівень гіперекспресії може бути від 18 до 57,2 % [4, 8, 13]. Така різниця обумовлена різним підходом до визначення гіперекспресії маркеру. Окремі автори вважають гіперекспресією Ki-67 рівень забарвлення вище 10 % клітин пухлини [2, 8]. Tsuboshi та співавт. (2006 р.) відзначає гіперекспресію при наявності 20 % забарвлених клітин, а Maddau та співавт. (2006 р.) – 35 % та вище [4, 10, 11]. Нами рівень гіперекспресії Ki-67 визначений як 25 % та більше забарвлених клітин пухлини, що пов'язано із прогностичним впливом.

За даними літератури, III вище у хворих з плоскоклітинним раком легенів, ніж у хворих із аденокарциною [8, 14]. Згідно з нашими даними, III дійсно вище у хворих із плоскоклітинним раком. За даними Нага та співавт. (2003 р.) рівень проліферації корелює із диференціювання пухлини, що також спостерігається у нашому дослідженні [8].

Дані про прогностичну роль Ki-67 суперечливі. За результатами досліджень деяких дослідників не відзначається прогностичного значення експресії Ki-67. Ці автори вважають, що це може бути пов'язано із недостатньою кількістю спостережень та рекомендують проведення більшої кількості досліджень, що присвячені даній проблемі [2, 5, 6]. Інші дослідники відзначають значну прогностичну роль експресії Ki-67 у хворих із НДКРЛ, вказуючи на гірше виживання у хворих з високою експресією даного маркеру [11, 12]. Виживання хворих, що брали участь у нашому дослідженні, залежала від проліферативної активності первинної пухлини легенів. Дійсно, у хворих із високим рівнем проліферативної активності первинної пухлини легені ( $\geq 25$  % клітин) спостерігалось значно гірша виживаність в порівнянні з хворими, у яких відзначена низька проліферативна активність новоутворення. За даними літератури, високий III асоціюється з гіршою безрецидивною виживаністю хворих на НДКРЛ. Багатофакторний аналіз показав, що експресія Ki-67 є незалежним прогностичним фактором ризику рецидиву та погіршення виживання хворих із НДКРЛ [7, 8, 11, 13].

#### Висновки.

1. Хворі на рак легенів є прогностично гетерогенною групою пацієнтів. Відсутні рекомендації щодо використання молекулярних маркерів для прогнозування перебігу раку легенів.

2. У хворих різної статі, з різними гістологічними формами та морфологічним диференціюван-

ням новоутворення, критеріями T та N спостерігається статистично вірогідна різниця показників індексу проліферації.

3. Відзначається значно гірша виживаність у хворих із НДКРЛ з проліферативною активністю

пухлини більш ніж 25 % клітин. Експресія Ki-67 є незалежним прогностичним маркером ( $p=0,006$ ).

4. Необхідно вивчення додаткових прогностичних маркерів з метою створення прогностичної та предиктивної моделі у хворих на НДКРЛ.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. A Risk-Stratification Model of Non-Small Cell Lung Cancers Using Cyclin E, Ki-67, and ras p21: Different Roles of G1 Cyclins in Cell Proliferation and Prognosis / H. Dosaka-Akita, F. Hommura, T. Mishina [et al.] // *Cancer Research*. — 2001. — № 61. — P. 2500—2504.
2. Cell cycle regulators and benefit of adjuvant chemotherapy in patients with non-small cell lungcancer / R. Pirker, M. Filipits, A. Dunant, [et al.] // *Journal of Clinical Oncology ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)*. — 2006. — Vol 24, № 18.
3. Cell Cycle Regulators and Outcome of Adjuvant Cisplatin-Based Chemotherapy in Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer: The International Adjuvant Lung Cancer Trial Biologic Program / M. Filipits, R. Pirker, A. Dunant [et al.] // *J. Clin. Oncol.* — 2007. — № 25. — P. 2735—2740.
4. Combined Analysis of Cyclooxygenase-2 Expression With p53 and Ki-67 in Nonsmall Cell Lung Cancer / H. Tsubochi, N. Sato, M. Hiyama [et al.] // *Ann Thorac Surg*. — 2006. — № 82. — P. 1198 — 1204.
5. Correlation between expression of p53, EGFR, cell proliferation defined by Ki67, and survival in stage III/IV non-small cell lungcancer (NSCLC) / G.B. Malika, K. Bouzid, G.R. Baba-Ahmed [et al.] // *Journal of Clinical Oncology ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)*. — 2007. — Vol 25, № 18.
6. Evaluation of the Prognostic Role of a Panel of Biomarkers in Stage IB-III A Non-small Cell Lung Cancer Patients / E. Timotheadou, D-V. Skarlos, E. Samantas [et al.] // *Anticancer Research*. — 2007. — № 27. — P. 4814 — 4490.
7. Immunohistochemical expression of biomarkers: a comparative study between diagnostic bronchial biopsies and surgical specimens of non-small-cell lung cancer / L. Taillade, F. Penault-Llorca, T. Boulet [et al.] // *Annals of Oncology*. — 2007. — № 18. — P. 1043—1050.
8. Ki-67 Expression and Prognosis for Smokers With Resected Stage I Non-Small Cell Lung Cancer / Y. Haga, K. Hiroshima, A. Iyoda [et al.] // *Ann. Thorac. Surg*. — 2003. — № 75. — P. 1727—1733.
9. Konopa K. Do we have markers to select patients for adjuvant therapies of non-small-cell lung cancer? / K. Konopa // *Annals of Oncology*. — 2010. — № 21 (S. 7). — P. 199 — 202.
10. Prognostic Significance of p27KIP1 Protein and Ki-67 Growth Fraction in Non-small Cell Lung Cancers / F. Hommura, H. Dosaka-Akita, T. Mishina [et al.] // *Clin. Cancer Res*. — 2000. — № 6. — P. 4073—4081.
11. Prognostic Significance of p53 and Ki-67 Antigen Expression in Surgically Treated Non—Small Cell Lung Cancer / C. Maddau, M. Confortini, S. Bisanzii [et al.] // *Am. J. Clin. Pathol.* — 2006. — № 125. — P. 425-431.
12. Role of Ki-67 expression on survival of patients with lung cancer: A systematic review of the literature with meta-analysis / C. Mascaux, B. Martin, M. Paesmans [et al.] // *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res*. — 2004. — Vol. 45. — P. 265—269.
13. The Expression of Ki-67, but Not Proliferating Cell Nuclear Antigen, Predicts Poor Disease Free Survival in Patients with Adenocarcinoma of the Lung / S. Oka, H. Uramoto, H. Shimokava [et al.] // *Anticancer Res*. — 2011. — № 31 (12). — P. 4277 — 4282.
14. The Prognostic Impact of Sex on Surgically Resected Non—Small Cell Lung Cancer Depends on Clinicopathologic Characteristics / W. Sterlacci, A. Tzankov, L. Veits [et al.] // *Am. J. Clin. Pathol.* — 2011. — № 135. — P. 611—618.

A.P. KOLESNIKH, A.I. SHEVCHENKO, V.A. TUMANSKY, A.V. YEVSYEYEV

*Zaporizhzhya State Medical University, Faculty of Medicine, Department of Oncology, Department of Pathological Anatomy and Judicial Medicine with bases right, Zaporizhzhya*

#### KI-67 AS PROGNOSTIC MARKER IN PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER STAGE I-II

Lung cancer is the main reason cancer death all over the world. There are 605 recurrent disease after radical operation in patients with lung cancer. Molecular-genetic markers could select patient with worth prognosis and that help conduct a special treatment for each patient. One of the most important feature of tumor is a proliferative activity, but lack of information do not allow use this marker in routine practice. Aim of our study was analyzed relationship between Ki-67 expression and clinico-morphological features of patients with early stages of NSCLC. Also we investigate prognostic role of Ki-67. Proliferation index correlated with sex, histological type, differentiation of tumor, "T" and "N" criteria. Patient with high proliferation (more than 25 % cells) have worth survival. Expression of Ki-67 there is independent prognostic factors ( $p=0,006$ ). It is necessary to study additional prognostic criteria for prognostic and predictive model in patient with NSCLC.

**Key words:** non-small cell lung cancer, prognosis, Ki-67, survival

**Стаття надійшла до редакції: 4.03.2013 р.**