

А. В. Лисак¹, О. О. Дядик²

Фосфогістон Н3 як стандарт імуногістохімічного дослідження в оцінюванні рівня диференціювання плоскоклітинних карцином орофарингеальної зони

¹Центральна патологоанатомічна лабораторія Міністерства оборони України, м. Київ,²Національна академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, м. Київ**Ключові слова:** новоутворення орофарингеальної зони, карцинома, Ki67.

Нині верифікація та градування пухлин орофарингеальної ділянки, визначення їхнього потенціалу злоякісності залишаються актуальною проблемою як у діагностиці, так і прогнозуванні перебігу росту пухлин.

Мета роботи – визначення проліферативного індексу (Ki67) та дійсної кількості мітозів (pHH3), порівняння з морфологічною (гістологічною) картиною.

Матеріали та методи. Досліджено 121 випадок плоскоклітинного раку з використанням моноклональних і поліклональних антитіл. Вивчили залежність між проліферативним індексом (Ki67), кількістю мітозів (pHH3) і морфологічними критеріями. У дослідженні оцінювали рівень диференціювання за методикою Anneroth et al., 1987 і Bryne et al., 1992.

Результати. Після повторного оцінювання рівня диференціювання пацієнтів поділили на три основні групи. У першій, до якої належать G1 пухлини, – 22 пацієнти, у групі 2, G2 – 45 та у групі 3, G3 – 54. Усі ці групи нами морфологічно описані.

Надалі у групах здійснили оцінювання результатів ІГХД за маркерами Ki67 і pHH3. Порівнюючи показники Ki67, pHH3, виявили статистично значущу відмінність між групами ($p < 0,001$ за критерієм Крускала-Волліса для всіх показників). Отже, зі зменшенням Me рівня диференціація Ki67 значно ($p < 0,05$) збільшується, а збільшення pHH3 свідчить про зростання ступеня злоякісності пухлин.

Висновки. Статистично доведений взаємозв'язок Ki67, pHH3 та рівня диференціації плоскоклітинних карцином орофарингеальної ділянки. Встановлена можливість використання pHH3 маркера як вірогідного критерію оцінювання рівня диференціювання пухлин, у тому числі важких, для діагностики плоскоклітинних карцином.

Фосфогістон Н3 как стандарт иммуногистохимического исследования в оценке уровня дифференцировки плоскоклеточных карцином орофарингеальной зоны

А. В. Лысак, Е. А. Дядык

Сегодня верификация и градуировки опухолей орофарингеального участка, определение их потенциала злокачественности остаются актуальной проблемой как в диагностике, так и прогнозировании течения опухолей.

Цель работы – определение пролиферативного индекса (Ki67) и действительного количества митозов (pHH3), сравнение с морфологической (гистологической) картиной.

Материалы и методы. В работе исследован 121 случай плоскоклеточного рака с использованием моноклональных и поликлональных антител. Исследована зависимость между пролиферативным индексом (Ki67), количеством митозов (pHH3) и морфологическими критериями. В работе использовалась оценка уровня дифференцировки по методике Anneroth et al., 1987 і Bryne et al., 1992.

Результаты и их обсуждение. После повторной оценки уровня дифференцировки получили распределение по трём основным группам. К группе 1, в которую входят G1 опухоли, относятся 22 пациента, к группе 2, G2 – 45 и к группе 3, G3 – 54 пациента. Все три группы морфологически нами описаны.

В дальнейшем в группах проведена оценка результатов ИГХИ по маркерам Ki67 и pHH3. При сравнении показателей Ki67, pHH3 обнаружено статистически значимое различие между группами ($p < 0,001$ по критерию Крускала-Уоллиса для всех показателей). Таким образом, с уменьшением Me уровня дифференциация Ki67 существенно ($p < 0,05$) увеличивается, а увеличение pHH3 свидетельствует о росте степени злокачественности опухолей.

Выводы. Статистически в работе доказана взаимосвязь Ki67, pHH3 и уровня дифференцировки плоскоклеточных карцином орофарингеального участка. Установлена возможность использования pHH3 маркера как достоверного критерия оценки уровня дифференцировки опухолей, в том числе тяжёлых, для диагностики плоскоклеточных карцином.

Ключевые слова: новообразования орофарингеальной зоны, карцинома, Ki67.**Патология.** – 2016. – № 2 (37). – С. 4–12

Phosphohistone H3 as the standard of immunohistochemical study in the assessment of differentiation level of oropharyngeal zone squamous cell carcinomas

А. В. Лысак, О. О. Дядык

Verification and grading of tumors of oropharyngeal areas, determination of their malignancy potential remain an urgent problem as well as diagnosis and prognosis today.

The aim of our research was to determine the proliferative index (Ki67), and the actual number of mitoses (pHH3) and to compare them with the morphological (histological) picture.

Materials and methods. 121 cases of flat-cell cancer using monoclonal and polyclonal antibodies were analyzed in this article. The dependence between proliferation index (Ki67), the number of mitoses (pHH3) and morphological criteria was investigated. The assessment of differentiation level with Anneroth et al. 1987 u. Bryne et al. 1992 technique was used.

Results and discussion. We received the following distribution by three main groups after re-assessment of the level of differentiation. Group №1 which contains G1 tumors includes 22 patients, group №2 G2 of 45 patients and №3 G3 of 54 patients.

All three groups were morphologically described.

The groups were evaluated on the results of IHC markers Ki67 and pHH3 further.

Statistically the significant difference between groups ($p < 0.001$ by Kruskal-Wallis test for all indicators) was found when comparing indicators Ki-67, pHH3. So with the decrease of Me level the differentiation of KI67 significantly ($p < 0.05$) increases and the increase of pHH3 reflects the growing of tumors malignancy degree.

Conclusions. The relationship between Ki67, pHH3 and the level of differentiation of squamous cell carcinomas of oropharyngeal area has been statistically proved. The opportunity to use pHH3 marker as a reliable criterion for assessing the level of differentiation of tumors, including squamous cell carcinomas which are difficult to be diagnosed, was set as a result of our work.

Key words: Oropharyngeal Neoplasms, Carcinoma, Ki67.

Pathologia 2016; № 2 (37): 4–12

Мітотична активність будь-якого новоутворення є важливою складовою діагностики та оцінювання рівня диференціювання пухлин. Крім того, визначення проліферативного індексу є важливим критерієм верифікації доброякісних і злоякісних пухлин. Нині визначення рівня мітотичної активності є рутинною в роботі патолога.

Першим імуногістохімічним маркером для визначення проліферативного індексу був Ki67. Винайшов у 1983 році J. Gerdes та використовував для дослідження периферичної крові (периферичних лімфоцитів і макрофагів) [1]. Цей ядерний протеїн визначає проліферативну активність у клітині. Є дві ізоформи Ki67–345 і 395 kDa. [2–6]. Ki67 – моноклональний проліферативний маркер, позитивний у G1A, G1B, S, G2 та M-Phasen і негативний у G0, G1T, G1a, G1b фазах. Цей маркер став альтернативою для оцінювання проліферативної активності в пухлинних клітинах. Поряд з цим одним із недоліків Ki67 є те, що він експресується клітинами протягом усього клітинного циклу від пізньої G1 фази. Суб'єктивність методу полягає в неможливості диференціювання мітотичних клітин серед апоптичних. Багато клітин, котрі експресують Ki67 під час дослідження, надалі можуть не «витримати» клітинний цикл і закінчити свій життєвий цикл апоптозом, тим самим «розмиваючи» прогностичне значення Ki67 індексу (рис. 1). Клітини з ознаками каріорексису та змінами, що можуть виникнути під час фіксації та проведення матеріалу, також сприяють суб'єктивності методу [7].

Крім того, підрахунок Ki67-позитивних ядер варіює залежно від особливостей фарбування та від лабораторії, з цим і пов'язана важкість стандартизації методу [7].

Останнім часом опублікована низка статей на тему визначення рівня диференціації пухлин, включаючи рак молочної залози, яєчників, передміхурової залози, меланоцитарні пухлини, гастроінтестинальні стромальні пухлини, де наведені дані щодо експресії фосфогістону H3 (pHH3). Експресія pHH3 асоціюється з прогностично несприятливим прогнозом. Доведено, що pHH3 фарбування корелює із прогресуванням захворювання [9–12].

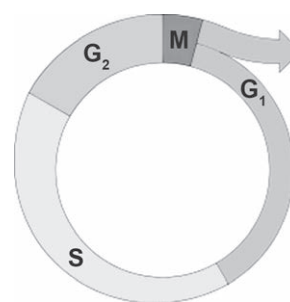


Рис. 1. Схема клітинного циклу. М – фаза мітозу. Далі, після інтерфази, настають G1, S і G2 фази [8].

Фосфорилювання гістонів під час конденсації хроматину відомо більше ніж 20 років, однак лише нещодавно pHH3 оцінений як потенційний вірогідний прогностичний маркер, що реагує винятково наприкінці G2 та у M фазах. Цей маркер є негативним у клітинах з апоптозом ядер. Враховуючи такі характеристики, pHH3 – більш стабільний та уніфікований критерій оцінювання диференціювання пухлин [7,9]. Мітози – дуже пізні маркери клітинного циклу, котрі є надійними маркерами проліферативної активності. Тому в ідеалі будь-які маркери проліферації під час імуногістохімічного дослідження повинні бути вираженими лише наприкінці G2 і M фаз (табл. 1) [9,13,14].

Таблиця 1

Порівняльна характеристика Ki67 і pHH3 в різних фазах клітинного циклу

Фази клітинного циклу	pHH3	Ki67
G0 фаза	–	–
Інтерфаза		
G1 фаза	–	+
S фаза	–	+
G2 фаза	–	+
Фази мітозу		
Профаза	+	+
Метафаза	+	+
Анафаза	+	+
Телофаза	+	+

Мета роботи

Визначення проліферативного індексу (Ki67) та дійсної кількості мітозів (pHH3), порівняння з морфологічною (гістологічною) картиною з метою використання надалі маркера pHH3 як надійного діагностичного критерію для градування плоскоклітинних карцином орофарингеальної зони.

Матеріали і методи дослідження

У нашій роботі, що виконана на базі патологоанатомічного та діагностичного відділень військового госпіталю Бундесверу (м. Ульм, ФРН), залучені матеріали 121 пацієнта, які пролікувались у госпіталі з 1 травня 2012 р. до 1 січня 2015 р.

Середній вік пацієнтів (медіанне значення) – 65 років (35–95 років), серед них – 101 чоловік (83,5 %) та 20 жінок (16,5 %).

Весь матеріал для визначення рівня диференціювання класифікований за Anneroth et al., 1987 і Bryne et al. (табл. 2) [15].

Ця класифікація включає багато параметрів морфологічної будови та росту пухлини (гістологічну структуру, рівень ороговіння, поліморфізм ядер, кількість мітозів), до цієї класифікації належить також оцінювання суміжних до пухлини тканин, вид інвазії, запалення прилеглої строми. За результатами морфологічної будови пухлини та відповідно до кількості набраних балів встановлюється рівень диференціювання: G1 пухлини – 4–8 балів, G2 пухлини – 9–12 балів, G3 пухлини – 13–16 балів (табл. 2).

Світлову мікроскопію виконали на мікроскопі Leica DM 6000 B, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar з об'єктивами x5, x10, x20, x40, x100. Гістологічні зрізи товщиною 4 мкм виконували на ротаційному мікротомі HM 355S, Section-Transfer-System, Walldorf. Фарбування виконували в автоматі Ventana BenchMark (Ventana Medical Systems, Ventana, USA). Крім того, всім пацієнтам здійснили імуногістохімічне дослідження (ІГХД) із моноклональними антитілами до Ki67 (моноклональний, мишачий анти-Ki67 антиген, готовий до використання Clone MIB-1, ZYTOMED Systems GmbH-Berlin), pHH3 (кролячий поліклональний антиген, Clone BC37, готовий

до використання Biocare Medical Inc, 4040 Pike Lane, Concord, CA 94520, USA).

Оцінюючи ядерні реакції із вказаними вище маркерами, кількість позитивних забарвлень визначали в 10 полях зору при збільшенні x400. Реакція з маркером Ki67 визначалась у відсотковому співвідношенні, реакція з маркером pHH3 визначалась у безпосередній кількості позитивних ядер (рис. 2 А).

Аналізуючи результати дослідження, використали методи біостатистики [16]. Під час перевірки закону розподілу аналізованих показників на нормальність (за критерієм Шапіро-Уїлка) виявили відмінність закону розподілу від нормального ($p < 0,05$), тому для представлення кількісних ознак розраховано медіанне значення показників (Me), значення першого та третього квантилів (Q_I, Q_{III}), розраховано також 95 % вірогідний інтервал (95 % ВІ) аналізованих показників [16]. Для порівняння показників у трьох групах використали критерій Крускала-Волліса, при здійсненні апостеріорних порівнянь – критерій множинних порівнянь Данна [16]. У всіх випадках за критичний рівень значущості прийнято $\alpha_{\text{крит.}} = 0,05$.

Для аналізу прогностичних характеристик тесту за маркерами pHH3 та Ki67 використали метод побудови та аналізу кривих операційних характеристик (ROC-кривих) [16]. Адекватність тесту оцінювали за площею під ROC-кривою (AUC), наведено і її 95 % ВІ [16]. Оптимальний поріг прийняття рішення для тесту розраховали за показником Youden $Inex = \text{Max}$ (чутливість тесту + специфічність тесту – 100 %), оцінювання прогностичних характеристик тесту при вибраному порозі здійснили за показником чутливості (95 % ВІ) та специфічності (95 % ВІ) тесту. Під час аналізу використали статистичний пакет MedCalc v.16.8 (MedCalc Software bvba, 1993–2016).

Результати та їх обговорення

У дослідженні використали матеріали 121 пацієнта. Після повторного оцінювання рівня диференціювання за методикою Anneroth et al., 1987 і Bryne et al., 1992 пацієнтів поділили на три основні групи: група 1, до якої належать G1 пухлини, – 22 пацієнти, група 2, G2 – 45 і група 3, G3 – 54 пацієнти.

Таблиця 2

Оцінювання рівня диференціювання за методикою Anneroth et al., 1987 і Bryne et al., 1992

Критерій	Кількість балів			
	1	2	3	4
Рівень ороговіння	більше ніж 50 % клітин	20–50 % клітин	5–20 % клітин	0–5 % клітин
Поліморфізм ядер	більше ніж 75 % зрілих клітин	50–75 % зрілих клітин	25–50 % зрілих клітин	0–25
Кількість мітозів	0–1	2–3	4–5	>5
Вид інвазії	чітко обмежені краї	інфільтрує солідними полями	дрібні групи або вирости інфільтрувальних клітин ($n < 15$ клітин)	поширені поля дисоційованих клітин у дрібних групах або у вигляді поодиноких клітин ($n > 15$ клітин)
Лімфо-плазмоцитарна інфільтрація	сильне запалення	помірне запалення	незначне запалення	немає запалення

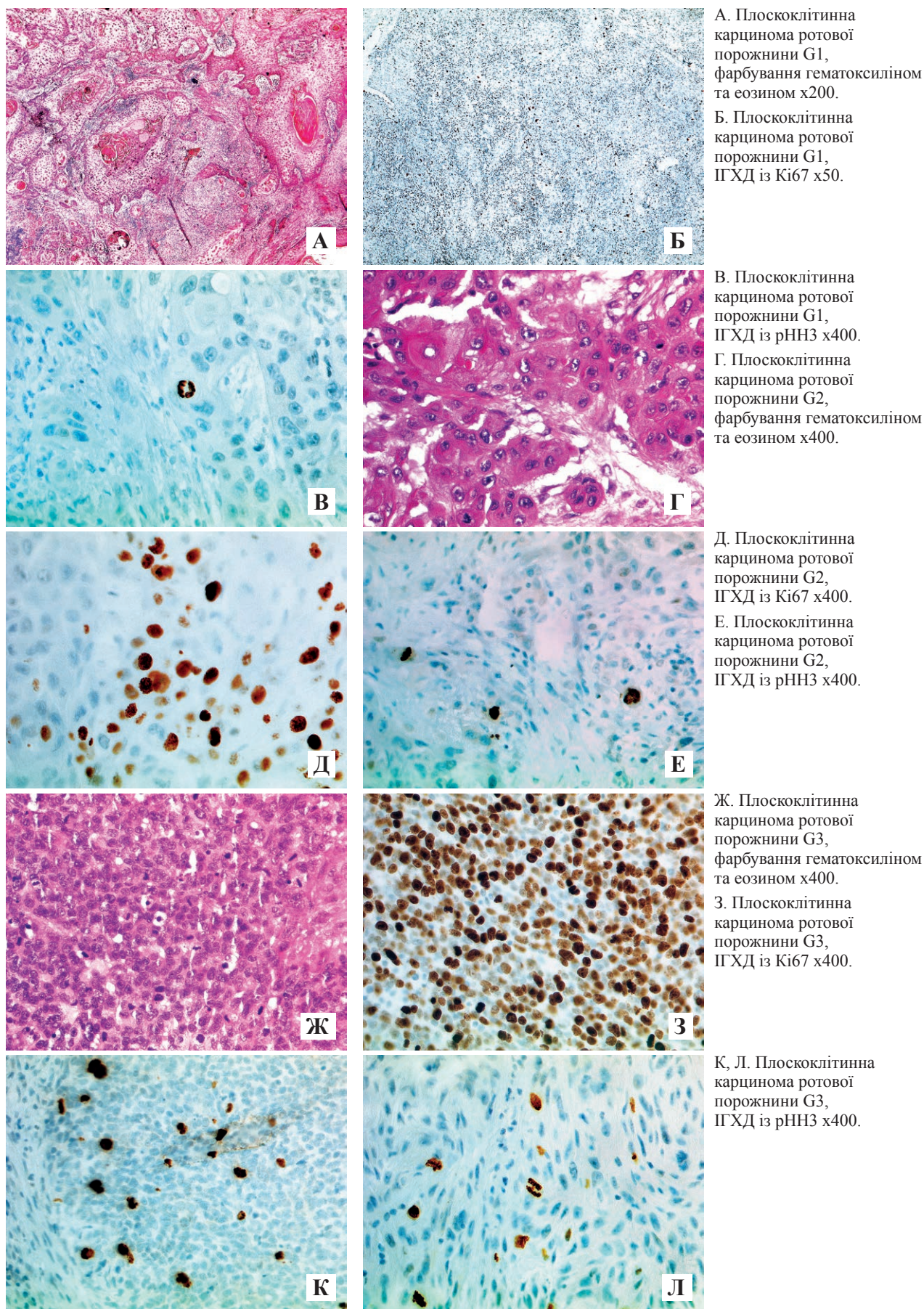


Рис. 2. Плоскоклітинні карциноми ротової порожнини різного ступеня диференціювання.

Згідно з методикою градування матеріалу морфологічно ці групи можна описати так:

Група 1. Плоскоклітинні карциноми з рівнем ороговіння не менше ніж 20 %, слабким чи помірно-вираженим поліморфізмом, не менше ніж 50 % зрілих клітин, із чітким ростом солідними полями. У тканині пухлини спостерігається незначна кількість мітозів – від 0 до 3 у полі зору, можливе виражене чи помірне запалення.

Група 2. Плоскоклітинні карциноми з рівнем ороговіння не менше ніж 5 %, зрілих клітин не менше ніж 25 %, помірно вираженим поліморфізмом ядер, інфільтративний ріст можливий дрібними групами клітин, але не менше ніж 15 клітин у групі. Спостерігається також помірна кількість мітозів і незначна або відсутня запальна реакція.

Група 3. До цієї групи належать пухлини з незначним рівнем ороговіння, вираженим поліморфізмом ядер (зрілих клітин менше ніж 25 %), кількістю мітозів 5 і більше. Інвазія дрібними групами клітин менше ніж 15 клітин або поодинокими клітинами, запалення відсутнє.

Надалі для визначення залежності між рівнем диференціювання пухлини G1, G2, G3; проліферативним індексом і кількістю мітозів у всіх випадках виконали ІГХД (рис. 2 Б, В, Г). Порівнюючи результати, отримали такі дані: у групі 1 (високодиференційовані пухлини) – G1, що становлять 18,2 % вибірки, середнє значення позитивних до Кі67 клітин – 27,5 %.

У групі 2, до якої належать пухлини G2, що становить 37,2 % від об'єму всієї групи дослідження, середнє значення позитивних клітин – 55 %.

Поділ у групах 1 і 2 наведений на *рисунках 3А, 3Б*.

У 3 групу з низькодиференційованими карциномами G3 увійшли 54 пацієнти (44,6 % від об'єму досліджуваних). Середнє значення в цій групі – 67 % позитивних клітин (рис. 3В). У всіх групах виконали рННЗ фарбування. Отримали результати:

- у групі 1 G1 пухлини мали в середньому по 3 мітози в полі зору при x400;
- у групі 2 G2 пухлини середнє значення для мітозів – 6;
- для групи 3 G3 пухлини – середнє значення 9 мітозів у полі зору.

На *рисунку 3* наведені результати ІГХД із маркерами рННЗ, Кі67. Як видно з *рисунка 3А*, у групі 1 кількість мітозів становила від 1 до 3, в одному з випадків було 9 мітозів. На *рисунку 3 Г* показана кількість позитивних клітин при фарбуванні з маркером Кі67, частина зразків, що має 10 % позитивних клітин, у цій групі є найбільшою.

Пацієнти групи 2 здебільшого мають по 10 мітозів, 18 пацієнтів мають від 1 до 4 мітозів у полі зору (рис. 3Б). При фарбуванні Кі67 50 % фарбування клітин відзначається у 8 пацієнтів (рис. 3Д). У 22 пацієнтів відзначається фарбування від 60 % до 95 % клітин.

У групі 3 при фарбуванні рННЗ розподіл зразків виглядає так: 15 випадків із кількістю мітозів від 10 до 12 в полі зору, у 7 пацієнтів – із кількістю мітозів по 5 у полі зору (рис. 3Е). При фарбуванні Кі67 у 14 пацієнтів, які становлять більшість вибірки, спостерігається 90 % фарбування пухлинних клітин (рис. 3В).

Під час здійснення аналізу (критерій Шапіро-Уїлка) виявили, що розподіл значень показників у групах відрізнявся від нормального, тому результати представлені у форматі Me (медіанне значення), $Q_1 \div Q_{III}$ (значення першого та третього квартиля).

Під час здійснення аналізу (*табл. 3*) не виявили відмінності між групами за віком ($p=0,382$ за критерієм Крускала-Волліса), тобто у вікових групах не відрізняється диференціація. Під час порівняння показників Кі67, рННЗ виявили статистично значущу відмінність між групами ($p<0,001$ за критерієм Крускала-Волліса для всіх показників). Отже, зі зменшенням Me рівня диференціація Кі67 значно ($p<0,05$) збільшується. При цьому для всіх аналізованих показників найменше ($p<0,05$ у всіх випадках) значення відповідало пацієнтам групи G1, а найбільше ($p<0,05$ у всіх випадках) – пацієнтам групи G3. Показники для пацієнтів групи G2 мали проміжне значення та були статистично значущі ($p<0,05$) вищими, ніж для групи G1, але нижчими ($p<0,05$), ніж для групи G3. Також виявили збільшення рННЗ зі зростанням ступеня злоякісності, що дає змогу передбачити можливість використання цього маркера для диференціації пухлин.

Межі вірогідних інтервалів медіанного значення віку

Таблиця 3

Розподіл значень аналізованих показників у форматі Me ($Q_1 \div Q_{III}$)

Показники	Me ($Q_1 \div Q_{III}$)			Рівень значущості відмінності між групами, p
	G1 (n=22)	G2 (n=45)	G3 (n=54)	
Вік, роки	70,0 (61,0÷73,0)	64,0 (57,0÷71,3)	66,5 (60,0÷75,0)	<0,382
Кі67, %	20,0 ^{#s} (10,0÷50,0)	60,0 ^{*s} (40,0÷76,3)	70,0 ^{**} (60,0÷90,0)	<0,001
рННЗ	2 ^{#s} (1÷3)	6 ^{*s} (2÷10)	8,5 ^{**} (5÷12)	<0,001

Примітки: під час аналізу використали критерій Крускала-Волліса, для парного апостеріорного порівняння використали критерій множинних порівнянь Данна; * – відмінність від показника для G1 статистично значуща, $p<0,05$; # – відмінність від показника для G2 статистично значуща, $p<0,05$; s – відмінність від показника для G3 статистично значуща, $p<0,05$.

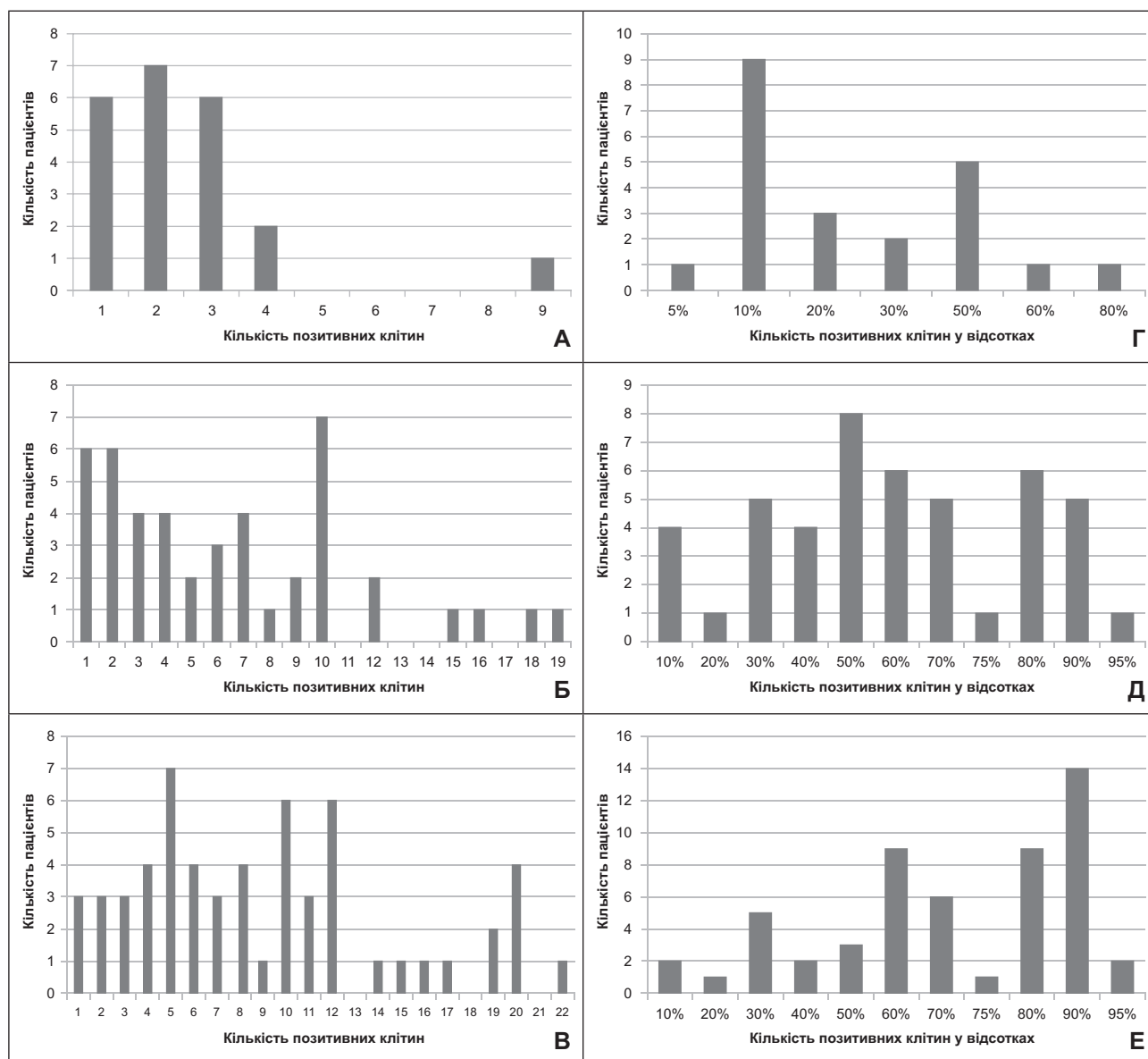


Рис. 3. А. Розподіл у групі G1 пухлин при забарвленні маркером рННЗ. Б. Розподіл у групі G2 пухлин при забарвленні маркером рННЗ. В. Розподіл у групі G3 пухлин при забарвленні маркером рННЗ. Г. Розподіл у групі G1 пухлин при забарвленні маркером Кі67. Д. Розподіл у групі G2 пухлин при забарвленні маркером Кі67. Е. Розподіл у групі G3 пухлин при забарвленні маркером Кі67.

пацієнтів у трьох групах (рис. 4) перетинаються, що дає змогу зробити висновок про відсутність залежності диференціації пухлин від віку.

На рисунку 5 видно позитивний тренд зростання медіанного значення показника Кі67 зі зменшенням ступеня диференціації пухлин.

Виявили зростання показника рННЗ зі зростанням ступеня злоякісності пухлин (рис. 6). Отже, можна запропонувати використання рННЗ маркера поряд із Кі67 маркером для визначення диференціації пухлин.

Для здійснення аналізу можливості та оцінювання прогностичних характеристик рівня диференціювання пухлини (G1, G2, G3) за допомогою маркерів рННЗ і Кі67 використані методи побудови та аналізу кривих операційних характеристик тестів. Випадком вважався

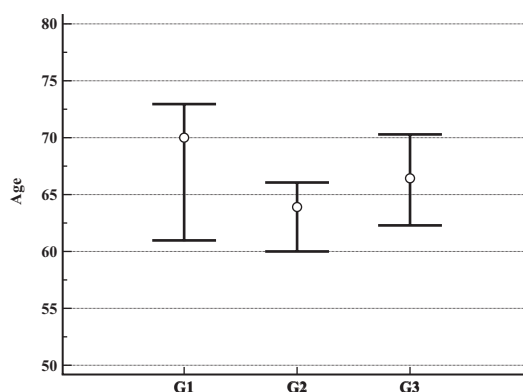


Рис. 4. Медіанне значення віку хворих по групах. Вік пацієнтів у трьох групах, наведене медіанне значення та 95 % ВІ.

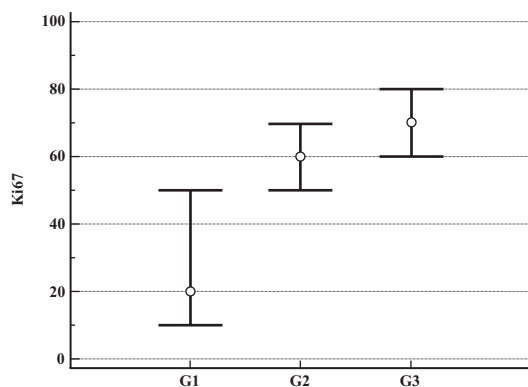


Рис. 5. Медіанне значення Ki67 для трьох груп пацієнтів. Значення показника Ki67 для пацієнтів у трьох групах, наведене медіанне значення та 95 % ВІ.

ступінь важкості захворювання для пацієнтів груп G2 та G3, для пацієнтів групи G1 прогноз вважався сприятливим (не випадок).

Під час здійснення аналізу тесту за показником Ki67 встановлена адекватність моделі прогнозування (AUC=0,85 95 % ВІ 0,77–0,91, статистично значуще, $p < 0,001$ перевищує 0,5), на *рисунку 7* наведена ROC-крива тесту.

Вибираючи оптимальний поріг (за Youden Index) встановлено критичне значення показника 50 % (при перевищенні цього значення прогнозується низька диференціація пухлин (G2–G3)). При обраному порозі чутливість тесту становить 64,6 % (95 % ВІ 54,4 –74,0 %), специфічність тесту – 90,9 % (95% ВІ 70,8 –98,9 %).

Аналізуючи тест за показником рННЗ, встановили адекватність моделі прогнозування (AUC=0,85 95 % ВІ 0,77–0,91, статистично значуще, $p < 0,001$ перевищує 0,5), на *рисунку 8* наведена ROC-крива тесту.

При виборі оптимального порога (за Youden Index) встановлено критичне значення показника 4 мітози (при перевищенні цього значення прогнозується важкий

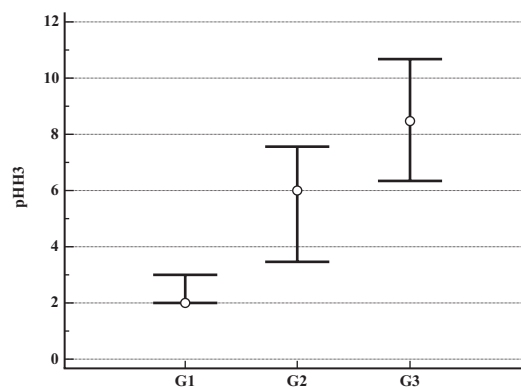


Рис. 6. Медіанне значення рННЗ для трьох груп пацієнтів. Значення показника рННЗ для пацієнтів у трьох групах, наведене медіанне значення та 95 % ВІ.

стан). При обраному порозі чутливість тесту становить 70,7 % (95% ВІ 60,7–79,4 %), специфічність тесту – 95,5 % (95 % ВІ 77,2–99,9 %).

Отже, порівнюючи прогностичні якості тестів із Ki67 і рННЗ, робимо висновок: використання запропонованого методу рННЗ дає такі самі або навіть кращі результати за чутливістю та специфічністю.

Аналогічні роботи виконані для низки пухлин: раку передміхурової залози, меланокітарних пухлин, пухлин молочної залози

Прогностичне значення фосфогістону НЗ при карциномах передміхурової залози дослідили М. Nowak, М. А Swenson, (World J. Urol, 2014). Результатом цієї роботи було встановлення кореляційного зв'язку між експресією Ki67 і рННЗ. Що більше, статистичний аналіз показав позитивну кореляцію між експресією рННЗ й рівнем PSA під час встановлення діагнозу та негативно корелює із загальним виживанням пацієнтів. Однак на відміну від Ki67 фарбування експресія рННЗ не корелює зі ступенем Глісона [9].

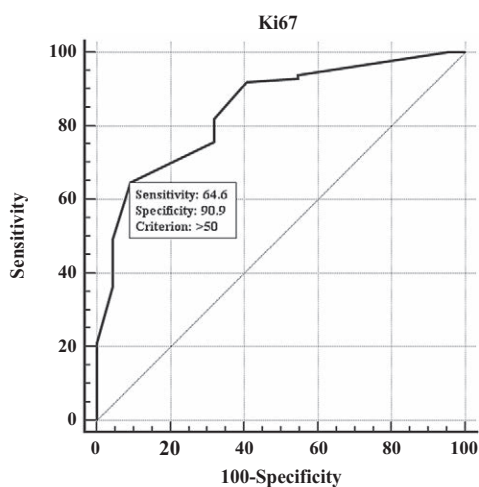


Рис. 7. Специфічність і чутливість для Ki67 маркера. ROC-крива тесту прогнозування рівня диференціювання пухлин за маркером Ki67. Указано оптимальний (за Youden Index) поріг прийняття рішення, чутливість і специфічність тесту.

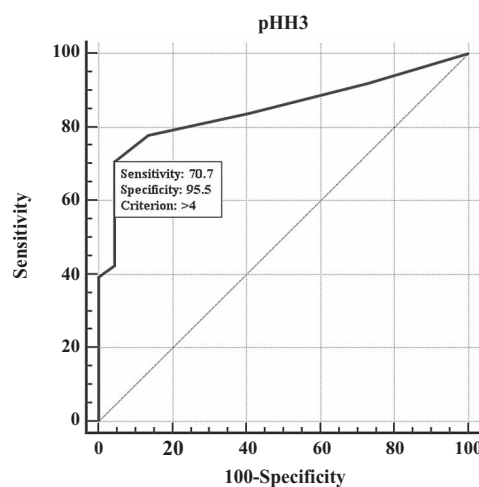


Рис. 8. Специфічність і чутливість для рННЗ маркера. ROC-крива тесту прогнозування рівня диференціювання пухлин за маркером рННЗ. Указано оптимальний (за Youden Index) поріг прийняття рішення, чутливість і специфічність тесту.

В Університеті Сіракузи (англ. Syracuse University) вченими Nasr MR, El-Zammar O. досліджена експресія рНН3 та Ki67 у доброякісних та злроякісних меланоцитарних новоутвореннях шкіри.

Диференціювання злроякісної меланоми від доброякісних меланоцитарних вражень може бути складним завданням. У цій роботі здійснили дослідження з оцінювання використання імуногістохімічного маркера мітозу фосфогістона H3 (рНН3) і маркера проліферації Ki67 у диференціюванні злроякісної меланоми від доброякісних невусів. 66 пігментних пухлин (18 злроякісних меланом, 8 Шпіц невусів, 20 диспластичних невусів і 20 комбінованих невусів) фарбували антитілами до рНН3, Ki-67. У цій роботі доведена можливість використання двох вищевказаних маркерів для верифікації пухлин і тісний кореляційний зв'язок між ними [10].

Також виконали декілька робіт із приводу пухлин молочної залози, одна з них – I. Skaland, E. Janssen, в якій доведено, що фосфогістон H3 має набагато сильніше прогностичне значення, ніж класичні провісники інвазивної карциноми молочної залози без метастазів у лімфатичні вузли в жінок молодше 55 років [11].

Висновки

1. Імуногістохімічний маркер Ki67, на жаль, не є абсолютним показником проліфераційної активності пухлин.

2. Результати свідчать про залежність ($p < 0,001$) проліфераційного індексу Ki67 і рНН3 від кількості мітозів у пухлині та рівня гістологічного диференціювання пухлини.

3. Довели можливість використовувати рНН3 маркер як вірогідний критерій оцінювання рівня диференціювання пухлин, зокрема важких, для діагностики плоскоклітинних карцином.

4. Чутливість тесту прогнозування рівня диференціювання пухлин за показником рНН3 становила 70,7 % (95 % ВІ 60,7–79,4 %), специфічність тесту – 95,5 % (95 % ВІ 77,2–99,9 %).

Перспективи подальших досліджень. Згідно з останніми закордонними роботами, імуногістохімічний маркер рНН3 дає можливість точно встановити агресивність пухлин, незважаючи на індивідуальні особливості пухлини чи лабораторні особливості проведення та фарбування матеріалу.

Фосфогістон H3, за міжнародними рекомендаціями, входить до стандартів діагностики низки пухлин (меланоцитарних, пухлин головного мозку, шлунково-кишкового тракту та передміхурової залози). З нашого погляду, використання імуногістохімічного маркера рНН3 є перспективним напрямом для морфологічної діагностики та градування пухлин різного походження та різного ступеня прогресії, включаючи пухлини орофарингеальної ділянки. Перспективним є створення нової системи оцінювання рівня диференціювання пухлин залежно від показника рНН3, що повністю показує мітотичну активність у клітинах і своєю чергою – рівень диференціювання.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Список літератури

- Human dendritic reticulum cells of lymphoid follicles: Their antigenic profile and their identification as multinucleated giant cells / J. Gerdes, H. Stein, D.Y. Mason, A. Ziegler // *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology*. – 1983. – Vol. 42(1). – P. 161–172.
- Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67 / J. Gerdes, H. Lemke, H. Baisch, et al. // *The Journal of Immunology*. – 1984. – Vol. 133(4). – P. 1710–1715.
- Nuclear Distribution of the Ki-67 Antigen during the Cell Cycle: Comparison with Growth Fraction in Human Breast Cancer Cells / J. van Dierendonck, R. Keijzer, C.J. van de Velde, C.J. Cornelisse // *Cancer Research*. – 1989. – Vol. 49(11). – P. 2999–3006.
- Scholzen T. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown / T. Scholzen, J. Gerdes // *Journal of cellular physiology*. – 2000. – Vol. 182(1). – P. 311–322.
- Ki-67 Labeling in Postmitotic Cell Defines Different Ki-67 Pathways Within the 2c Compartment / S. Manoir, P. Guillaud, E. Camus et al. // *Cytometry*. – 1991. – Vol. 12(1). – P. 455–463.
- Modalities of Synthesis of Ki-67 Antigen During the Stimulation of Lymphocytes / F. Lopez, F. Belloc, F. Lacombe, et al. // *Cytometry*. – 1991. – Vol. 12(1). – P. 42–49.
- Georg G.Y. Phosphohistone H3: new standard ICH marker for rating tumors via mitotic indexing / G.Y. Georg // *MLO Med Lab Obs*. – 2011. – Vol. 43(7). – P. 20–23.
- Retrieved from: <https://de.wikipedia.org/wiki/Zellzyklus>.
- Prognostic significance of phospho-histone H3 in prostate carcinoma / M. Nowak, M.A. Swenson, J. Clarson, et al. // *World J. Urol*. – 2014. – Vol. 32(1). – P. 703–707.

- Nasr M.R. Comparison of pHH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions / M.R. Nasr, O. El-Zammar // *Am J. Dermatopathol*. – 2008. – Vol. 30(2). – P. 117–122.
- Phosphohistone H3 expression has much stronger prognostic value than classical prognosticators in invasive lymph node-negative breast cancer patients less than 55 years of age / I. Skaland, E. Janssen, E. Gudlaugsson, et al. // *Modern Pathology*. – 2007. – Vol. 20. – P. 1307–1315.
- Immunostaining of phosphor-histone H3 and Ki-67 improves reproducibility of recurrence risk assessment of gastrointestinal stromal tumors / A. Uguen, G. Cong, L. Doucet, et al. // *Virchows Arch*. – 2015. – Vol. 467(1). – P. 47–54.
- Diest P. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value / P. Diest, G. Brugal, J. Baak // *Clinical Pathology*. – 1998. – Vol. 51(1). – P. 716–724.
- Kill I. R. Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component / I.R. Kill // *Journal of Cell Science*. – 1996. – Vol. 109(1). – P. 1253–1263.
- Seifert G. *Oralpathologie III. Mundhöhle, angrenzendes Weichteil- und Knochengewebe*. 1st. / G. Seifert. – Berlin (Germany): Springer-Verlag; 2000. – 625 p.
- Петри А. Наглядная статистика в медицине / А. Петри, К. Сэбин; пер. с англ. В.П. Леонова. – М.: ГЭОТАР МЕД., 2003. – 144 с.

References

- Gerdes, J., Stein, H., Mason, D. Y., & Ziegler, A. (1983) Human dendritic reticulum cells of lymphoid follicles: Their antigenic profile and their identification as multinucleated giant cells. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology*, 42(1), 161–172. doi: 10.1007/BF02890379.

2. Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U., & Stein, H. (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal of Immunology*, 133(4), 1710–1715.
3. Van Dierendonck, J., Keijzer, R., van de Velde, C. J., & Cornelisse, C. J. (1989) Nuclear Distribution of the Ki-67 Antigen during the Cell Cycle: Comparison with Growth Fraction in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Research*, 49(11), 2999–3006.
4. Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000) The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *Journal of cellular physiology*, 182(1), 311–322. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
5. Du Manoir, S., Guillaud, P., Camus, E., Seigneurin, D., & Brugal, G. (1991) Ki-67 Labeling in Postmitotic Cell Defines Different Ki-67 Pathways Within the 2c Compartment. *Cytometry*, 12(1), 455–463.
6. Lopez, F., Belloc, F., Lacombe, F., Dumain, P., Reiffers, J., Bernard, P., & Boisseau, M. R. (1991) Modalities of Synthesis of Ki-67 Antigen During the Stimulation of Lymphocytes. *Cytometry*, 12(1), 42–49. doi: 10.1002/cyto.990120107.
7. Georg, G. Y. (2011) Phosphohistone H3: new standard ICH marker for rating tumors via mitotic indexing. *MLO Med Lab Obs.*, 43(7), 20–23.
8. Retrieved from: <https://de.wikipedia.org/wiki/Zellzyklus>.
9. Nowak, M., Swensson, M. A., Clarsson, J., Vogel, W., Kerschull, M., Wernert, N., et al. (2014) Prognostic significance of phospho-histone H3 in prostate carcinoma. *World J. Urol.*, 32(1), 703–707. doi: 10.1007/s00345-013-1135-y.
10. Nasr, M. R., & El-Zammar, O. (2008) Comparison of pHH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J. Dermatopathol.*, 30(2), 117–122. doi: 10.1097/DAD.0b013e3181624054.
11. Skaland, I., Janssen, E., Gudlaugsson, E., Klos, J., Kjellekvold, K. H., & Søliland, H., & Baak, J. P. (2007) Phosphohistone H3 expression has much stronger prognostic value than classical prognosticators in invasive lymph node-negative breast cancer patients less than 55 years of age. *Modern Pathology*, 20, 1307–1315. doi: 10.1038/modpathol.380097.
12. Uguen, A., Cong, G., Doucet, L., Talagas, M., Costa, S., De Braekeleer, M., & Marcorelles, P. (2015) Immunostaining of phospho-histone H3 and Ki-67 improves reproducibility of recurrence risk assessment of gastrointestinal stromal tumors. *Virchows Arch.*, 467(1), 47–54. doi: 10.1007/s00428-015-1763-2.
13. Diest, P., Brugal, G., & Baak, J. (1998) Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *Clinical Pathology*, 51(1), 716–724. doi:10.1136/jcp.51.10.716.
14. Kill, I. R. (1996) Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *Journal of Cell Science*, 109(1), 1253–1263.
15. Seifert, G. (2000) Oralpathologie III. Mundhöhle, angrenzendes Weichteil- und Knochengewebe. 1st. Berlin (Germany): Springer-Verlag.
16. Petri, A., & Se'bin, K. (2003) Nagladnaya statistika v medicine [Transparent statistics in medicine]. Moscow: GE'OTAR MED. [in Russian].

Відомості про авторів:

Лисак А. В., заступник начальника Центральної патологоанатомічної лабораторії – начальник морфологічного відділу Центральної патологоанатомічної лабораторії Міністерства оборони України, E-mail: lisak-a@mail.ru.

Дядик О. О., д-р мед. наук, професор, зав. каф. патологічної та топографічної анатомії, Національна академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика.

Сведения об авторах:

Лысак А. В., заместитель начальника Центральной патологоанатомической лаборатории – начальник морфологического отдела Центральной патологоанатомической лаборатории Министерства обороны Украины, E-mail: lisak-a@mail.ru.

Дядик Е. А., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. патологической и топографической анатомии, Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика.

Information about authors:

Lysak A. V., Deputy Head of the Central Pathoanatomical Laboratory of the Ministry of Defense of Ukraine – Head of Morphological department, Kyiv, E-mail: lisak-a@mail.ru.

Dyadyk O. O., MD, PhD, DSci, Professor, Head of Pathological and Topographic Anatomy Department of the P. L. Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education.

Надійшла в редакцію 05.08.2016 р.