

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
АЗЕРБАЙДЖАНСКОЙ РЕСПУБЛИКИ  
АЗЕРБАЙДЖАНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

*На правах рукописи*

**САМИРА САМЕД кызы КАЛАНТАРЛИ**

**МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ  
Ki 67 и pHH3 ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

2407.01 – «Клеточная биология, цитология и гистология»

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора философии по биологии

Баку – 2015

Работа выполнена в Национальном онкологическом центре Министерства  
Здравоохранения Азербайджанской Республики

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук,  
профессор:

**Д.Е.МАЦКО**

**Официальные оппоненты:**

доктор наук по биологии,  
профессор:

**Дж.А.НАДЖАФОВ**

доктор философии по медицине:

**Э.А.МАМЕДОВ**

**Ведущее учреждение:** Азербайджанский государственный институт усовершенствования врачей им. А.Алиева, кафедра лабораторного дела и Центральная исследовательская лаборатория

Защита диссертации состоится « 25 » 12 2015 г. в « \_\_\_\_\_ » часов на заседании разового Диссертационного совета BFD 03.013 при Азербайджанском медицинском университете

Адрес: AZ-1078, г. Баку, ул. Марданов Гардашлары, 100 (физико-химический корпус АМУ, кафедра патофизиологии, II этаж)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Азербайджанского медицинского университета.

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета BFD 03.013

доктор наук по медицине,  
профессор

**М.Г.АЛЛАХВЕРДИЕВ**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Злокачественные образования молочной железы (МЖ) в Азербайджане, по сводным данным, занимают первое место по отношению к другим факторам неопластических процессов у женского пола населения. Это является причиной высокой смертности как у нас в стране, так и за рубежом [ВОЗ, 2003]. Примерно у 8% женщин (одной из 13) развивается злокачественная опухоль МЖ [Амирасланов А., Казиев А., Мехтиева Н., 2013].

Определение степени злокачественности карциномы молочной железы основано на субъективной визуальной оценке таких морфологических критериев, как образование железистых структур, полиморфизм ядер и число митозов в 10 полях зрения [Алиев Дж., Ализаде В., Джафаров Р., 2009].

На уровне экспертов определение гистологической степени злокачественности обладает средними показателями воспроизводимости, и поэтому давно ведутся поиски точных высоко воспроизводимых систем для оценки прогноза и исхода заболевания [Tosi P., Luzi P., Sforza V. et al., 1986].

Одним из таких подходов может стать морфометрическое исследование образцов опухоли, окрашенных как гистологическими, так и иммуногистохимическими окрасками.

Для прогноза рака молочной железы (РМЖ) важным диагностическим критерием является иммуногистохимическое определение количества пролиферирующих клеток, которые определялись в работе моноклональным антителом Ki-67 и выявление митотически активных клеток фосфорилированным гистонам рННЗ. Белок Ki-67 используют в качестве универсального маркера пролиферации при оценке активности роста злокачественных новообразований.

В последние годы интенсивно анализируются диагностические и технические возможности, с помощью которых в опухоли определяют число (удельный вес) делящихся клеток, или другими словами, индекс пролиферативной активности новообразования.

Многие маркеры являются слабыми для распознавания митотических клеток, потому что фигуры митоза появляются на очень короткое время в течение клеточного цикла. Ki-67 относится к регуляторным белкам и окрашивает клетки во всех фазах клеточного цикла, исключая G<sub>0</sub> фазу. Для выявления более четких маркеров пролиферации и митотической активности при РМЖ, некоторые авторы использовали маркер M фазы клеточного цикла рННЗ, который выявил близкие значения с митотическим

индексом [Leong A.S.Y., 2004].

Другие авторы исследовали антитела селективированных к Ser10 фосфорилированному гистону рННЗ для определения пролиферативной активности эндометрия, колоректального рака, серозных карцином яичника, астроцитом и менингиом и обнаружили близкую корреляцию этого маркера с подсчетом митотического индекса. В связи с этим было целесообразно изучить корреляцию данного белка при РМЖ, где маркер М фазы клеточного цикла рННЗ также обнаружил близкие значения с митотическим индексом и большую прогностическую значимость [Liu D., Baltayan A., Naritoku W. Y., Barr N. J., 2000].

Анализ литературных данных показал, что исследования по обработке всех трех препаратов (гистологических, иммуногистохимических – Ki-67 и рННЗ) при раке молочной железы ранее не проводилось.

Изучение всех вышеперечисленных вопросов направляют на дифференцированный подход к рассмотрению аспектов иммуногистохимических параметров маркеров (Ki-67 и рННЗ) при раке молочной железы и определяют актуальность данного исследования.

**Цель работы.** Объективизация морфологических и морфометрических критериев опухолевых клеток рака молочной железы; сопоставление количества митозов и пролиферативного индекса по экспрессии Ki-67 и рННЗ.

**Задачи исследования:**

1. Определить суммарную клеточную плотность на единицу площади опухоли и прилежащих неопухолевых структурах молочной железы.
2. Определить линейные размеры клеток неопухолевых структур (протоки, дольки) молочной железы.
3. Определить линейные размеры клеток РМЖ и провести сравнительный анализ линейных размеров и градаций полиморфизма ядер при рутинном исследовании.
4. Выделить долю пролиферирующих клеток по экспрессии Ki-67 на единицу площади, сопоставить индекс пролиферативной активности клеток РМЖ с градациями линейных размеров опухолевых клеток.
5. Выделить долю, произвести количественную оценку митотических клеток по экспрессии рННЗ на единицу площади и сопоставить с линейными размерами опухолевых клеток.
6. Провести сравнительный анализ разных методов восстановления антигенной активности для адекватного выявления уровня пролиферативной активности по экспрессии Ki-67.

**Научная новизна.** Впервые были представлены данные о клеточной плотности на единицу площади в опухоли МЖ. Также впервые были

проанализировано соотношение линейных размеров ядер с градацией полиморфизма ядер и наличием позитивного или негативного окрашивания Ki-67 и pHH3. В ходе работы определен оптимальный режим проведения иммуногистохимического восстановления антигенной активности, который минимизирует потерю клеток в ходе процедуры.

**Практическая значимость.** Результаты исследования такие как: определение абсолютной клеточной плотности на единицу площади опухоли; определение абсолютного числа пролиферирующих и митотических клеток в единице площади; определение линейных размеров клеток в опухоли и в прилежащей к опухоли неизменной ткани МЖ, могут быть полезными в качестве дополнительных критериев морфологической диагностики рака молочной железы. Данные исследования с одной стороны помогают установить новые объективные диагностические и классификационные критерии, с другой стороны позволяют улучшить лечебную тактику.

### **Основные положения диссертации, представленные к защите:**

1. Корректное проведение процедуры восстановления антигенной активности является залогом адекватного выявления пролиферативного пула опухоли по экспрессии Ki-67. При недостаточном уровне процедуры существует достоверно высокий процент потери окрашивающихся клеток; для контроля достаточности или недостаточности иммуногистохимического ретривела необходимо использовать как внешние тканевые контроли с известным уровнем экспрессии Ki-67, так и внутренние, например, митотические клетки, с заведомо высоким уровнем экспрессии этого белка.

2. Морфометрические показатели, такие как площадь и периметр ядер опухолевых клеток имеют четкое бимодальное распределение. Получено статистически достоверное подтверждение морфологической неоднородности ядер опухолевых клеток РМЖ. Нами показаны линейные размеры ядер опухолевых клеток для градации 1-ой степени полиморфизма ядер, которые составили  $33,72 \pm 1,03 \text{ мкм}^2$ , и градации 2-ой степени –  $44,9 \pm 1,16 \text{ мкм}^2$  соответственно.

3. Сопоставление митотического и пролиферативного индексов, показало, что доля занятых в митозе пролиферирующих клеток составила 16% (1/6) от всего пролиферативного пула, т.е. клеток, окрашенных Ki-67 около 3% от всего клеточного состава опухоли. При этом однофакторный корреляционный анализ выявил умеренную степень влияния митотического индекса на количество пролиферирующих клеток ( $r=0,44$ ) и клеточную плотность ( $r=0,36$ ).

**Практическое внедрение.** Результаты исследования внедрены в работу патоморфологической лаборатории Центрального таможенного госпиталя и Национального онкологического центра.

**Апробация диссертации.** Материалы диссертации представлены и обсуждены: на научной конференции Онкологического научного центра МЗ Азербайджана по современной диагностике рака молочной железы (Баку, 2008); стендовыми докладами на 23-ем Европейском конгрессе патологов (Хельсинки, 2011) и 24-ом Европейском конгрессе патологов (Прага, 2012). Первичная апробация диссертации прошла на совместном заседании кафедр гистологии, эмбриологии и цитологии, биологии, онкологии (27.01.2014), на научном семинаре Апробационной комиссии Диссертационного совета BFD 03.015 при АМУ (12.11.2015).

**Публикации.** Основные теоретические положения, лежащие в основе работы и основные результаты проведенных исследований, были отражены в 8 научных статьях и 3 тезисах, опубликованных в Азербайджане и за его пределами.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 150 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, указателя литературы. Работа иллюстрирована 10 рисунками, 5 таблицами и 30 диаграммами. Указатель литературы включает 193 источника.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В процессе работы было исследовано 46 залитых в парафин и фиксированных в формалине образца рака молочной железы пациенток, проходивших оперативное лечение с последующей химиотерапией в Национальном онкологическом центре г. Баку в 1997-2005 гг. Возраст пациенток варьировал от 36 до 77 лет, средний возраст составил 53,67 $\pm$ 1,71 года. Наиболее часто встречались большие стадии T2N1M0 – 14 пациенток, T2N0M0 – 8 пациенток, T1N0M0 – 4 пациентки, T2N2M0 – 4 пациентки, по одному наблюдению в группах T1N1M0, T3N1M0, T3N3M0, T2N3M0. Как видно из приведенных данных, стадия T2 встречалась чаще всего и составила 27 наблюдений, T1 – 5 наблюдений, T3 – 3 наблюдения.

С каждого гистологического блока было подготовлено по 4 параллельных среза. Один препарат окрашивался гематоксилином и эозином, три препарата окрашивались иммуногистохимически. Парафиновые сре-

зы толщиной 2-3 микрона монтировались на покрытые 1% водным раствором поли-Л-лизина предметные стекла и высушивались при температуре 37°C в течение 18 часов. Затем после депарафинизации и блокирования эндогенной пероксидазы в 3% растворе перекиси водорода (5 минут) помещались в буферы для восстановления антигенной активности TRS (pH 6,0, Dako) для выявления phh3 и TRS 9,0 (pH 9,0, Dako) для выявления Ki-67.

Кроме того, для окрашивания Ki-67 было использовано два разных метода восстановления антигенной активности. Одна группа препаратов была помещена в водяную баню (PT Module, Dako), другая – в автоклав с поддержкой постоянного давления (Pascal, Dako). Обе группы исследуемых препаратов сопровождалась постановкой реакции с контрольными срезами миндалин, и окрашивание контрольных препаратов при разных методах восстановления антигенной активности было адекватным. Восстановление антигенной активности проводилась с использованием высокотемпературной обработки и давления (Pascal) и путем высокотемпературной обработки в водяной бане.

Инкубация с первичными кроличьими моноклональными антителами к Ki-67 (1:50, клон SP6, LabVision) проходила в течение 30 минут. Для выявления phh3 использовались кроличьи моноклональные антитела (1:5000, клон Epitomics), инкубация длилась 30 минут при комнатной температуре. Иммунный комплекс выявлялся с помощью системы визуализации Dako REAL EnVision. В качестве растворителя использовался буфер для разведения первичных антител DAKO. Гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином, фотографировали при 400-1000 кратном увеличении, где отмечались митотические ядра и ядра вне митоза. Затем, с помощью программы для анализа изображений, проводили измерение площади и периметра опухолевых клеток в митозе и вне митоза. Готовые полностью гистологические и иммуногистохимические препараты сканировались при помощи MIRAX MIDI (Zeiss) с целью получения цифровых изображений данных препаратов. После, с помощью программы просмотра изображений Panoramic Viewer (3D Histech), находили эпителиальные комплексы с максимальной экспрессией Ki-67 и позиционировали препараты, окрашенные гематоксилином, эозином и pHH3 соответственно зонам максимальной экспрессии Ki-67. Во всех трех препаратах проводили фотографирование или захват изображений, соответствующих друг другу зон в трех различных окрасках при увеличении 400 крат. Затем с помощью системы компьютерного анализа микроскопических изображений «Leica QWin PRO» проводился морфометрический анализ количества окрашенных Ki-67 ядер (% пози-

тивно окрашенных ядер), которое рассчитывалось как отношение количества иммунопозитивных опухолевых клеток к общему числу опухолевых клеток в единице поля зрения, составлявшего  $0,054\text{мм}^2$ . Было исследовано не менее 2000 клеток в каждом препарате, после чего вычислялось среднее значение относительного количества окрашенных элементов. Отдельно исследовались такие параметры как площадь и периметр опухолевых клеток, окрашенных и неокрашенных Ki-67. Такой же анализ был применен и к препаратам, окрашенным рННЗ.

Статистическая обработка всех данных проводилась с помощью методов описательной, а также параметрической (t-критерий Стьюдента) статистики с применением программы Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Проблема воспроизводимости в биологии и в частности медицине, связана с высокой биологической вариабельностью изучаемых объектов. Ее можно минимизировать, используя один и тот же биологический материал и разные условия эксперимента.

Относительно нашего исследования, когда и данные литературы и личный опыт говорят о высокой вариабельности и низкой воспроизводимости при определении важных, с точки зрения прогноза, критериев заболевания, мы решили уточнить несколько – наиболее спорных моментов и использовать современные средства, в первую очередь, автоматизированные системы анализа изображений для достижения максимальной воспроизводимости и транспарентности исследования.

**Методические различия проведения иммуногистохимического ретривела и количественная разница при выявлении Ki-67.** При проведении процедуры восстановления антигенной активности в водяной бане среднее число позитивно окрашенных опухолевых клеток оказалось  $9,61 \pm 2,39$ . Минимальное значение составило 0%, максимальное – 51%. При этом нами наблюдались случаи, где часть клеток, в которых визуализируются фигуры митозов, были негативны с Ki-67.

При процедуре, где материалы обрабатывались в водяной бане клетки, состоящие в митозе не была окрашены. При обработке материалов в Pascal, количество окрашенных Ki-67 клеток намного было выше, чем при обработке в водяной бане; неокрашенных в митозе клеток в данном случае выявлено не было.

При сравнении двух групп нами было обнаружено, что процент выявления Ki-67 при восстановлении антигенной активности в Pascal статистически достоверно выше, чем при использовании водяной бани. В пре-



паратах, восстановление антигенной активности которых проходило в более жестких условиях нагрева (до 125°C) и подъеме давления в скороварке, процент позитивно окрашенных опухолевых клеток составил 28,5+/- 3,46. Окрашивание ядер имело интенсивный характер и случаев наблюдения фигур митозов, негативных с Ki-67 не обнаружилось. Распределение значений имело нормальный (гауссовский вид).

Таким образом, нами получено подтверждение обеих точек зрения относительно индекса Ki-67. И тех авторов, которые сообщают о низкой пролиферативной активности в РМЖ и предлагают вносить опухоли с индексом Ki-67 более 5% или 10% (пороговое значение) в группу позитивных, а данных пациенток – в группу с неблагоприятным прогнозом. И других исследователей, выделяющих группу, как прогностически неблагоприятную, с индексом Ki-67 25% и выше. Мы исследовали один и тот же материал. Гистологические препараты были позиционированы и исследовались корреспондирующие участки. Нами получена достоверная разница, подтверждающая критическую важность правильно проведенной процедуры иммуногистохимического ретривела для дальнейшего анализа прогностических и предсказательных критериев.

**Морфометрический анализ клеточной плотности в раке молочной железы и прилежащих нормальных структурах органа.** При исследовании гистологического среза опухоли увеличение плотности клеток по сравнению с нормой является одним из самых ярких и убедительных визуальных диагностических феноменов. Кардинальным визуальным впечатлением является именно относительное увеличение клеточной плотности, которое позволяет врачу с малого увеличения микроскопа (x5) в течение короткого времени сформулировать первоначальную диагностическую гипотезу наличия злокачественной опухоли, и затем уже проводить более точные исследования при больших увеличениях, чтобы дать детальную характеристику степени злокачественности или провести дифференциально-диагностический поиск, в случае сомнений в морфологическом диагнозе (рак/ лимфома/ меланома и т.д.).

Именно феномен банального увеличения клеточной плотности в опухоли лежит в основе современных представлений о роли пролиферации в канцерогенезе в целом и разработке прогностических критериев для прогноза исхода заболевания.

Между тем, нет ясного представления о том, что же такое увеличение клеточной плотности, так же как и нет представления о количественной характеристике этого признака. Есть субъективные представления различных исследователей о том, что, предположим, в поле зрения высокого разрешения микроскопа (x40) в среднем обнаруживается приблизительно

150-200 опухолевых клеток.

Показатели клеточной плотности в опухоли составили  $4179 \pm 251$ , минимум – 894, максимум 8129 клеток на  $1 \text{ мм}^2$ . Средняя величина количества опухолевых клеток в единице площади достоверно характеризует исследуемый показатель.

При сравнении средних показателей клеточной плотности в норме и самой опухоли различие сравниваемых величин представляется статистически достоверным, т.к. коэффициент Стьюдента составил 2,476 и доверительный интервал  $p \leq 0,0167$ .

Вывод: по показателю суммарной клеточной плотности нормальные структуры имеют статистически достоверно меньшую клеточную плотность, чем опухоль.

**Морфометрический анализ основных характеристик клеточного ядра: площадь, периметр, показатель округлости в РМЖ.** Клетки неопухового эпителия протоков и долек в среднем имели площадь ядер  $41,93 \pm 2,39 \text{ мкм}^2$ , периметр ядер составил  $28,8 \pm 1,55 \text{ мкм}$ , показатель округлости ядер  $0,65 \pm 0,04$ . Всего нами было исследовано 1687 клеток.

Средняя арифметическая и доверительный интервал указывают на то, что 95% исследуемых величин находятся непосредственно в диапазоне средней величины. Это позволяет проводить нам дальнейшие исследования данного признака с уверенностью, что мы характеризуем его с вероятностью 95%, т.е. все неопуховые клетки эпителия протоков.

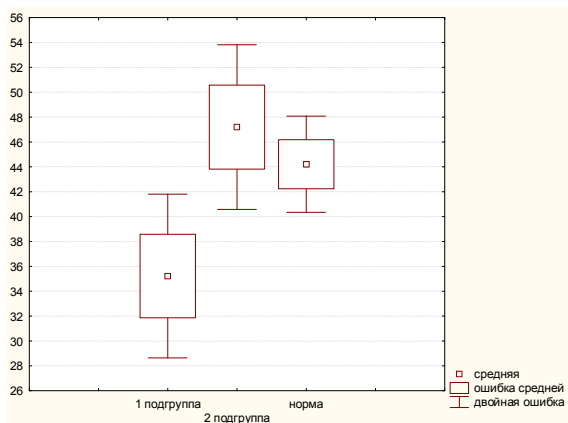
В исследованиях распределения размеров площадей ядер опухолевых клеток определяется бимодальное распределение линейных размеров ядер опухолевых клеток. Причем наблюдается разделение площадей по медиане. Распределения площади, периметра и округлости ядер опухолевых клеток не соответствует нормальному закону, поэтому сравнительная характеристика данных параметров не может быть исследована для всей группы в целом.

В целях получения достоверных данных необходимо разделить исследуемые объекты на две подгруппы, для которых средняя арифметическая будет характеризовать большую часть объектов. В нашем случае – первую и вторую подгруппы опухолевых клеток, разделенных по медиане, которая равна  $40,17 \text{ мкм}^2$ .

Показатели площади ядер опухолевых клеток в первой подгруппе: средняя площадь ядер опухолевых клеток составила  $33,72 \pm 1,03 \text{ мкм}^2$ , во второй подгруппе  $44,9 \pm 1,16 \text{ мкм}^2$ . При сравнении двух подгрупп нами получена статистически достоверная разница:  $t=8,02$ ,  $p \leq 0,001$ . Таким образом, по показателю площади ядер опухолевых клеток инвазивный протоковый РМЖ не является однородным.

Данные наблюдения лежат в основе визуальной оценки степени полиморфизма по трем градациям. Нами получены количественные морфометрические показатели площади ядер опухолевых клеток для различения степени полиморфизма ядер первой и второй градации, а также доказательства того, что обозначенные выше группы достоверно различаются по площади ядер.

При сравнительном анализе полученных данных с размерами площадей ядер в нормальном эпителии перитуморозной зоны нами получены следующие показатели: разница между сравниваемыми величинами была достоверной для показателей нормы и первой подгруппы ( $t=5,74$ ,  $p=0,00004$ ) и недостоверным для показателей нормы и второй подгруппы ( $t=1,89$ ,  $p\geq 0,07$ ). Все данные проиллюстрированы на рисунке 1.



**Рис. 1.** Сравнение средних размеров площадей опухолевых клеток (1 и 2 подгруппы) и эпителия протоков перитуморозной зоны

Периметр ядер опухолевых клеток в первой подгруппе: составил  $22,36\pm 0,75$  мкм, во второй подгруппе  $28,85\pm 0,086$  мкм. При сравнении двух подгрупп нами получена статистически достоверная разница:  $t=8,64$ ,  $p\leq 0,001$ . Таким образом, по периметру ядер опухолевых клеток, также как и по площади ядер опухолевых клеток инвазивный протоковый РМЖ гетерогенен. Нами получены количественные морфометрические показатели периметра ядер опухолевых клеток для различения степени полиморфизма ядер первой и второй градации, а также доказательства того, что эти группы достоверно различаются по периметру ядер. При сравнительном анализе этих данных с размерами периметров ядер в нормальном эпителии перитуморозной зоны нами получены следующие данные: разница между сравниваемыми величинами была достоверной

для показателей нормы и первой подгруппы ( $t=11,64$ ,  $p \leq 0,00001$ ) и недостоверным для показателей нормы и второй подгруппы ( $t=0,93$ ,  $p=0,36$ ).

Коэффициент округлости. Коэффициент округлости для первой подгруппы составил  $0,838 \pm 0,12$ , во второй подгруппе  $0,679 \pm 0,15$ . При сравнении двух подгрупп нами получена статистически достоверная разница:  $t=7,099$ ,  $p \leq 0,00000001$ . Таким образом, по коэффициенту округлости ядер опухолевых клеток ядра клеток первой группы, более округлые и мелкие, в то время как ядра клеток из второй группы менее округлые, или употребляя термины описательной морфологии, более полиморфны.

При сравнительном анализе полученных данных с показателем округлости ядер в нормальном эпителии перитуморозной зоны нами зафиксированы следующие результаты: разница между сравниваемыми величинами была достоверной для показателей нормы и первой подгруппы ( $t=11,00$ ,  $p=0,000001$ ) и недостоверным для показателей нормы и второй подгруппы ( $t=1,26$ ,  $p \geq 0,08$ ).

В процессе работы, нами было замечено, что ядра из первой подгруппы – более округлые, коэффициент округлости которых приближается к единице, характеризуются меньшими размерами площади и периметра ядра. Ядра опухолевых клеток из второй подгруппы имеют сопоставимые по морфометрическим характеристикам (площадь, периметр, округлость ядер) с нормальным эпителием протоков.

**Морфометрическая характеристика митотических ядер и ядер вне митоза.** В процессе митотического деления на первом этапе происходит лизис ядерной мембраны, после чего ядерный аппарат клетки не принадлежит только структурам ядра клетки, а располагается вне этих структур, на месте самого ядра образуется двойной набор хромосом и происходит собственно митотическое деление.

Мы решили проверить, насколько изменяются параметры площади ядра в зависимости от того, что находится ли клетка в митозе или нет, поэтому было проведено отдельное исследование площади ядер при 100-кратном увеличении, масляная иммерсия в митозе и вне митоза. Как видно из диаграммы 15, распределение размеров площадей ядер в митотических ядрах имеет нормальный характер. Средняя площадь ядра в митозе составляла  $45,30 \pm 3,17$  мкм<sup>2</sup> вне митоза –  $39,34 \pm 1,69$  мкм<sup>2</sup>.

Распределение размеров площадей ядер в митотических ядрах имеет нормальный характер. Хотя средние величины площадей ядер в митозе оказались шире, чем вне митоза, эти различия статистически недостоверны, т.к.  $t$  коэффициент Стьюдента  $1,66$  при  $p \geq 0,1$ .

Сравнивая митотические клетки и клетки вне митоза, становится оче-

видным отсутствие статистически достоверных различий. Исходя из чего, следует вывод о следующем: в полиморфизм ядер основной вклад вносит не митоз, а другие процессы, происходящие в клетке.

**Количественный анализ экспрессии Ki-67 в раке молочной железы.** Однофакторный корреляционный анализ показателей пролиферативной активности и других морфометрических данных. Пролиферативная активность исследовалась по показателю процентного отношения положительно окрашенных Ki-67 клеток к общему количеству клеток. Средние показатели индекса пролиферативной активности составили  $31,7 \pm 3,49\%$ .

Наблюдалась также тенденция к бимодальному распределению индекса пролиферативной активности. Однако небольшое число наблюдений (10 случаев) не позволяет нам провести детальное статистическое исследование группы с высоким пролиферативным индексом.

Линейные размеры позитивных и негативных Ki-67. Считается, что белок Ki-67 начинает определяться в ядре с середины G1 фазы клеточного цикла и в последующих S-, G2-фазах его количество нарастает, достигая пика в митозе. По окончании митотического цикла белок быстро катаболизируется и перестает выявляться.

Мы решили проверить, насколько изменяются параметры площади ядра в зависимости от того, вступила ли клетка в клеточный цикл (и началась ли ядерная экспрессия Ki-67) или клетка находится в состоянии покоя (нет ядерной экспрессии Ki-67). Для этого было проведено отдельное исследование площади ядер Ki-67 без экспрессии и с экспрессией данного маркера.

В процессе морфометрической, а затем статистической обработки площадь Ki-67 негативных ядер составила  $39,12 \pm 1,07 \text{ мкм}^2$ .

В Ki-67 позитивных ядрах мы оценивали площадь в зависимости от интенсивности окрашивания. Нами получены следующие показатели площади ядер: при низкой интенсивности окрашивания Ki-67 (+) ядра имели площадь  $39,75 \pm 1,07 \text{ мкм}^2$ ; при средней интенсивности Ki-67(++) –  $41,03 \pm 1,33 \text{ мкм}^2$  и при высокой интенсивности Ki-67 (+++) –  $47,15 \pm 1,05 \text{ мкм}^2$ .

Наблюдалась четкая динамика увеличения площади ядер при увеличении интенсивности экспрессии Ki-67.

Нами получена умеренная степень корреляционной зависимости показателей клеточной плотности и индекса пролиферативной активности  $r=0,42$  при  $p \leq 0,0032$ .

Таким образом, можно сделать вывод, что клеточная плотность в инвазивном протоковом раке молочной железы связана с пролиферативной

активностью.

При сравнении индексов пролиферативной активности в двух подгруппах (1 и 2), полученных нами при анализе площади ядер опухолевых клеток, выявлены следующие показатели: индекс Ki-67 в группе с мелкими ядрами был несколько выше и составил 34,49%, чем в группе с широкими ядрами – 26,66%; нами не получена статистически достоверная разница пролиферативной активности в сравниваемых группах  $t=0,83$  при  $p \geq 0,41$ .

Проведённый нами сравнительный анализ не выявил наличия корреляционных связей между линейными размерами ядер (периметр, площадь и коэффициент округлости) и индексом пролиферативной активности.

**Количественный анализ экспрессии pHH3 в РМЖ. Однофакторный корреляционный анализ показателей митотической активности и других морфометрических данных.** Так как иммуногистохимический маркер М-фазы митоза значительно лучше выявляет клетки в митозе, а методика компьютерного анализа изображений позволяет быстро проанализировать маркеры с ядерной экспрессией, мы провели исследование митотического индекса не на обычных ГЭ препаратах, а на препаратах, окрашенных pHH3 в сопоставлении с индексом пролиферативной активности по Ki-67.

Поскольку маркер pHH3 отражает активность митотического индекса, мы применили его оценку, как это принято при оценке числа митозов: количество позитивных ядер на единицу площади. Средние показатели индекса митотической активности составили  $124 \pm 23$  клетки на  $1 \text{ мм}^2$ . Показатель митотического индекса имеет нормальное распределение, что позволяет нам работать дальше со средней величиной.

Линейные размеры pHH3 позитивных и негативных ядер. В разделе о митозах нами было зафиксировано увеличение линейных размеров площади ядер в митотических ядрах и в ядрах вне митоза. Разница статистически недостоверна, и составила для клеток в митозе  $45,30 \pm 3,17 \text{ мкм}^2$ , вне митоза –  $39,34 \pm 1,69 \text{ мкм}^2$ .

Было принято решение: проверить, изменяются ли параметры площади ядра в зависимости от окраски. Первое исследование было проведено на препаратах, окрашенных ГЭ, настоящее исследование – на препаратах, окрашенных pHH3 – тех, где митотические ядра недвусмысленно окрашиваются ДАВ в коричневый цвет, а неделящие клетки – остаются окрашенными только гематоксилином. Площадь pHH3 негативных ядер составила  $39,19 \pm 1,09 \text{ мкм}^2$  – показатель, абсолютно сопоставимый с данными, полученными при работе с ГЭ, препаратами и масляной им-

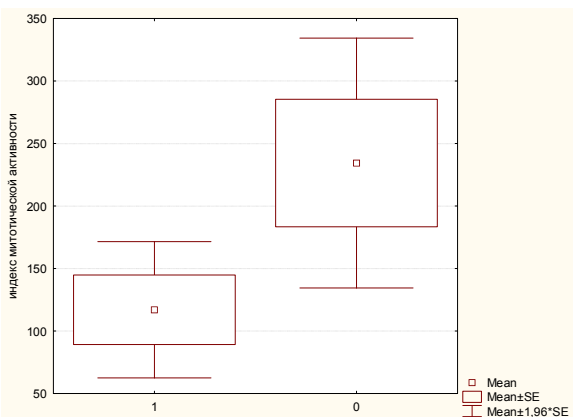
мерсией.

При сравнении площадей pph3 и Ki-67 негативных ядер мы не получили статистически достоверных различий в сравниваемых показателях. Это закономерно, т.к. непролиферирующие (Ki-67 негативные ядра) и ядра вне митоза (pph3 негативные ядра) имеют одинаковые линейные размеры, что позволяет нам утверждать: линейные размеры (в частности, площадь ядра) могут характеризовать функциональный покой клетки.

В pННЗ позитивных ядрах мы оценивали площадь в зависимости от интенсивности окрашивания. Нами были получены следующие показатели: площади ядер при низкой интенсивности окрашивания pННЗ (+) имели площадь  $35,86 \pm 1,35 \text{ мкм}^2$ , при средней интенсивности pННЗ(++) –  $37,74 \pm 1,36 \text{ мкм}^2$  и высокой интенсивности pph3 (+++) –  $42,25 \pm 1,89 \text{ мкм}^2$ .

Была выявлена очевидная динамика увеличения площади ядер при увеличении интенсивности экспрессии pННЗ. Наибольшей площадью обладают ядра с высокой экспрессией этого маркера, наименьшей площадью обладают клетки со слабой ядерной экспрессией pph3. Возможно, редукция площади ядра даже по сравнению с неокрашенными ядрами (ядра вне митоза и вне клеточного цикла) связана как раз с лизисом ядерной мембраны в начале митотического деления.

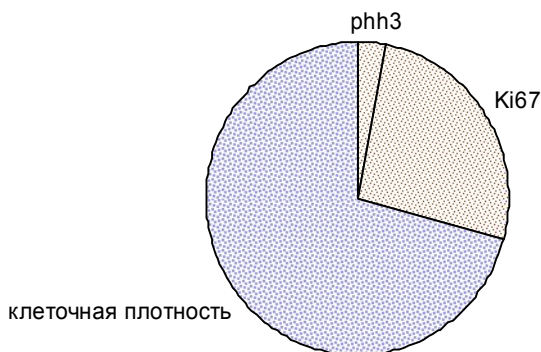
При корреляционном анализе количественных показателей клеточной плотности на единицу площади с митотическим индексом на той же площади нами получена умеренная степень корреляционной зависимости показателей клеточной плотности и индекса митотической активности  $r=0,44$  при  $p \leq 0,0018$  (рис. 2).



**Рис. 2.** Сравнительный анализ митотической активности в подгруппах с мелкими и крупными ядрами

Таким образом, можно сделать вывод о том, что клеточная плотность в инвазивном протоковом раке молочной железы связана с митотической активностью, а не с другими процессами.

При сравнительном анализе митотической активности в подгруппах с мелкими и крупными ядрами нами получены близкие к статистически достоверной разнице ( $t=1,92$ ,  $p \leq 0,055$ ) показатели. РННЗ в первой группе составил  $234 \pm 5,7$  клеток на  $\text{мм}^2$ , во второй группе –  $117 \pm 7,9$  на  $\text{мм}^2$ . Другими словами митотическая активность в группе опухолей с мелкими клетками выше, хотя и статистически недостоверна.



**Рис. 3.** Соотношение общего числа клеток в единице площади

На данном рис. 3 проиллюстрировано соотношение общего числа клеток в единице площади, где полный круг  $4179 \pm 251$  (100%) – все клетки,  $1185 \pm 166$  (31,7%) – пролиферирующие клетки или с экспрессией Ki-67,  $124 \pm 23$  (3%) – клетки в митозе. По данным однофакторного корреляционного анализа, именно митотически активные клетки имеют умеренную степень влияния на общую клеточную плотность в опухоли.

## ВЫВОДЫ

1. Суммарная клеточная плотность в неопухолевых структурах составила  $2409 \pm 405$  в  $1 \text{ мм}^2$ , что статистически достоверно меньше, чем клеточная плотность в опухоли  $4179 \pm 251$  в  $1 \text{ мм}^2$ .

2. Клетки неопухолевого эпителия протоков и долек в среднем имели площадь ядер  $41,93 \pm 2,39 \text{ мкм}^2$ , периметр ядер составил  $28,8 \pm 1,55 \text{ мкм}$ , показатель округлости ядер  $0,65 \pm 0,04$ .

3. В опухоли имеется четкое бимодальное распределение размеров ядер: в первой группе клеток площадь ядер составила  $33,72 \pm 1,03 \text{ мкм}^2$ ,



что статистически достоверно меньше, чем в неопухоловом эпителии; во второй группе –  $44,9 \pm 1,16$  мкм<sup>2</sup>.

4. Средние показатели индекса пролиферативной активности составили  $31,7 \pm 3,49\%$ , при сравнении индекса Ki-67 в первой группе опухолей (с мелкими ядрами) оказался несколько выше и составил  $34,49\%$ , чем в группе с широкими ядрами –  $26,66\%$ .

5. Средние показатели индекса митотической активности по phh3 составили  $124 \pm 23$  клетки на  $1 \text{ мм}^2$ , митотическая активность в первой группе составила  $234 \pm 5,7$  клетки на  $1 \text{ мм}^2$ , во второй группе выше –  $117 \pm 7,9$  клетки на  $1 \text{ мм}^2$ , хотя полученные данные статистически недостоверны.

6. При оценке индекса пролиферативной активности критически важным является корректное проведение процедуры восстановления антигенной активности – при неадекватном проведении иммуногистохимического ретривела имеется достоверно высокий процент потери позитивных клеток с Ki-67.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Для адекватного выявления клеток, экспрессирующих антиген Ki-67, контроля процедуры восстановления антигенной активности и иммуногистохимической реакции необходимо использовать тканевые (миндалина) и внутренние (митотические клетки) позитивные контроли.

2. При оценке степени полиморфизма ядер опухолевых клеток важно учитывать, что ядра эпителиальных клеток прилежащих к опухоли, но неопухоловых протоков имеют сопоставимые размеры с градацией степени полиморфизма 2, для градации 1 полиморфизма ядер опухолевых клеток необходимо иметь более мелкие и округлые ядра, чем в неопухоловых эпителиальных клетках прилежащих к опухоли протоков.

3. Для достоверного выявления митозов при оценке митотического индекса следует использовать антитела к фосфорилированному гистону H3 (pHH3).

## СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Клинико-морфологические параллели рака молочной железы // *Azərbaycan onkologiya və hematologiya jurnalı*, Bakı, 2007, №2, s. 57-60 (соавт.: Ализаде В.А.).
2. Корреляционные связи плотности и структуры венозного русла зон, прилежащих к опухоли, с TNM-параметрами при раке молочной железы / Матер. V съезда онкологов и радиологов СНГ, Ташкент, 2008, с. 225 (соавт.: Алиев Д.А., Ализаде В.А., Джафаров Р.Д.).
3. Клинико-морфологические параллели митотической активности и экспрессии HER 2 при инфильтративном протоковом раке молочной железы // *Azərbaycan onkologiya və hematologiya jurnalı*. Bakı, 2009, №1, s.79 (соавт.: Алиев Д.А., Ализаде В.А., Джафаров Р.Д.).
4. Клинико-морфологические параллели митотической активности и экспрессии HER 2 при инфильтративном протоковом раке молочной железы / Матер. VII съезда онкологов России, Москва, 2009, т. I, с.208 (соавт.: Алиев Д.А., Ализаде В.А., Джафаров Р.Д.).
5. Quantitative morphometry by image analysis of invasive ductal carcinoma / 23<sup>rd</sup> European Congress of pathology // *Virchows Arch.* 2011, v. 459, p.s 76, poster 037 (соавт.: Matsko D.E., Kundaybergenova A.G.).
6. Объективизация определения степени полиморфизма ядер при определении степени злокачественности в раке молочной железы // *Академический Журнал Западной Сибири*, 2011, №4-5, с. 63-64 (соавт.: Гюльмалиева С.).
7. Определение клеточной плотности в раке молочной железы и прилежащих нормальных структурах органа // *Azərbaycan təbabətin nailiyyətləri*, Bakı, №4, 2011, s. 91-94 (соавт.: Мацко Д.Е.).
8. Технологические аспекты иммуногистохимического восстановления антигенной активности (ретривел) Ki-67 // *Sağlamlıq*, Bakı, 2011, №5, с. 128-133.
9. К вопросу об определении Ki-67 в биологических тканях, залитых в парафин, на примере рака молочной железы // *Журнал Вестник, Санкт-Петербургский Университет*, 2012, серия 11, выпуск 1, с.80-86 (соавт.: Мацко Д.Е.).

10. Сравнительная морфометрия иммуногистохимической экспрессии активности антигена митотического индекса Phh3 и пролиферации Ki 67 при раке молочной железы // Azərbaycan Tibb Jurnalı, Bakı, 2012, №1, с. 75-82.
11. Quantitative measure proliferative markers by image analysis of invasive ductal carcinoma // The European Journal of Pathology, Virchows Archiv, 2012, PS-17-043, p. 245 (соавт.: Kудайбергенова А.Г.).

## **SAMİRƏ SƏMƏD qızı KƏLƏNTƏRLİ**

### **SÜD VƏZİSİ XƏRÇƏNGİNDƏ İMMUNOHİSTOKİMYƏVİ MARKERLƏRİN Ki 67 və pHH3 MORFOMETRİK XÜSUSİYYƏTLƏRİ**

#### **XÜLASƏ**

Dissertasiya işinin məqsədi süd vəzisi xərçəngində şiş hüceyrələrinin morfoloji və morfometrik meyarlarının təyini və Ki 67 və pHH3-ün ekspressiyasına əsasən mitotik və proliferativ indeksləri göstəricilərinin müqayisəli təhlili olmuşdur.

Qarşıya qoyulan vəzifələrin həlli üçün histoloji, immunohistokimyəvi, morfometrik və statistik tədqiqat üsullarından istifadə edilmişdir.

Süd vəzisinin infiltrativ axacaq xərçəngi zamanı bədxassəliliyin əsas meyarlardan olan I və II bədxassəlik dərəcəsində şiş hüceyrələrinin sıxlığı; nüvə sahəsinin morfometrik parametrləri, retrivel prosedurun düzgün rejimi təyin edilmişdir.

Müəyyən edilmişdir ki, şiş hüceyrələrin nüvələrinin sahə və perimetri kimi morfoloji göstəricilər dəqiq bimodal paylaşmaya malikdir. Süd vəzisi xərçəngində şiş hüceyrələrin nüvələrinin morfometrik qeyri-bircinsliyinin statistik dürüstlüyü təsdiq edilmişdir.

Tədqiqat nəticəsində müəyyən edilmişdir ki, proliferativ indeksin qiymətləndirilməsi üçün antigen aktivliyinin bərpası proseduru düzgün aparılmalıdır, çünki qeyri-adekvat immunohistokimyəvi retrivelin aparılmasında Ki 67 pozitiv hüceyrələrin yüksək faizli itkisi baş verir.

Biramilli korrelyasion təhlil nəticəsində mitotik indeksin proliferativ hüceyrələrin miqdarına və hüceyrə sıxlığına neqativ təsiri aşkar edilmişdir.

Tədqiqatın nəticələri praktik tövsiyələrin işlənib hazırlanmasına və onların tibbi praktikada istifadəsinə imkan verir.

**SAMIRA SAMAD KALANTARLI**

**THE MORPHOMETRICAL FEATURES  
OF IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS Ki 67 AND PHH3  
IN THE BREAST CANCER**

**SUMMARY**

The aim of dissertation is determination of morphological and morphometrical criteria of tumor cells in infiltrative breast carcinoma, comparison of mitotic numbers and proliferative index based on expression of Ki-67 and pHH3.

For the purpose of achievement to the aims set forth in this study were used histological, immunohistochemical, morphometric and statistic research methodologies.

Determination and identification of morphometric parameters such as area of the nuclei of tumor cells for grades 1 and 2 is one of the main points for the establishing of malignancy grade in invasive ductal carcinoma of breast.

Morphometric parameters such as area and nuclear perimeters of tumor cells have a clear bimodal distribution. Statistically significant evidence of morphological heterogeneity of tumor cells nuclei is obtained.

The correct holding of immunohistochemical procedure for the recovering of antigen activity is critical important for the evaluating of proliferative activity and inadequate retrieval can lead to high loss percentage of Ki 67-positive cells.

Univariant correlated analysis is revealed a moderate effect degree of mitotic index to the percentage of proliferative cells and cells density.

The results of the study give the possibility to develop practical suggestions and their application in medical practice.



Kağız formatı 60x84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>.  
Sifariş 678 Tiraj 100.

---

Azərbaycan Tibb Universitetinin  
mətbəəsində çap edilmişdir.

Tel.: 595-55-76

AZƏRBAYCAN RESPUBLİKASI SƏHİYYƏ NAZİRLİYİ

AZƏRBAYCAN TİBB UNİVERSTETİ

*Əlyazması hüququnda*

**SAMİRƏ SƏMƏD QIZI KƏLƏNTƏRLİ**

**SÜD VƏZİSİ XƏRÇƏNGİNDƏ İMMUNOHİSTOKİMYƏVİ  
MARKERLƏRİN KI 67 VƏ PHH3 MORFOMETRİK  
XÜSUSİYYƏTLƏRİ**

2407.01 – «Hüceyrə biologiyası, sitologiya və histologiya»

Biologiya üzrə fəlsəfə doktoru elmi dərəcəsi almaq  
üçün təqdim edilmiş dissertasiyanın

**A V T O R E F E R A T I**

Bakı – 2015