

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА И КЛИНИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА**А. А. Вотинцев
СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ
РЕЦИДИВА СЕРОЗНОГО
РАКА ЯИЧНИКОВ***Кировская государственная медицинская
академия*

Рак яичников является одной из самых частых форм злокачественных новообразований женской половой сферы. Ежегодно в мире регистрируется 165 тысяч злокачественных новообразований яичников и 101 тысяча смертей от них, в России – 11,7 тыс. и 7,3 тыс. соответственно [2]. В структуре онкопатологии злокачественные эпителиальные опухоли яичников занимают 6-е место [8]. Эпидемиологические исследования показывают, что за последнее десятилетие в России, как и во всём мире, отмечается отчётливая тенденция роста заболеваемости опухолями яичников, причём ежегодно число больных новообразованиями гонад возрастает на 1,5%.

Основной причиной смерти больных злокачественными опухолями яичников является возникновение рецидивов после первичной операции, причём у 27% пациенток повторный рост наступает в течение первых полутора лет от начала клинической ремиссии [6]. Имеющиеся клинические сведения [7] касаются выделения группы низкого и высокого риска развития рецидивов заболевания, в которых учитываются лишь стадии болезни. Это ещё раз подтверждает, что на сегодняшний день в прогнозировании оценивается, в основном, клинический аспект заболевания, в то время как морфологические критерии не учитываются. О целесообразности учёта гистологической структуры и степени злокачественности рака яичников для предсказания возобновления его роста указания отсутствуют.

Проведённые многими авторами научные изыскания на материале иных органов показывают достоверную взаимосвязь экспрессии различных опухолевых маркёров (p53, простагландинов серии E, катепсина B, белков апоптоза Bcl-2, Mcl-1) с частотой появления рецидива новообразования [9]. Мы предприняли попытку исследовать возможность их использования самостоятельно или в комплексе с другими морфологическими характеристиками неоплазм для прогноза рецидивирования рака яичников, поскольку их эффективность по отношению к этому органу неизвестна [11].

Цель исследования. Целью настоящей научно-исследовательской работы явилось выявление прогностически значимых патологоанатомических, морфометрических, гистоспектрофотометрических и иммуногистохимических характеристик овариального рака у пациенток с последующей

разработкой алгоритма установления возможности возобновления опухолевого роста после радикального лечения.

Материалы и методы

Материалом настоящего исследования послужили гистологические препараты операционно-биопсийного материала 120 больных серозными злокачественными новообразованиями яичника Ic, II и III клинических стадий (FIGO, 1976), у 60 женщин в последующем был диагностирован рецидив заболевания. Использовались амбулаторные карты, операционные журналы, клинические истории болезни и парафиновые блоки патоморфологических лабораторий.

Пациентки с первичными карциномами женских гонад подвергались хирургическому лечению (экстирпация матки с придатками и резекцией сальника). У всех пациенток отсутствовала противораковая предоперационная терапия. Послеоперационное лечение представляло собой химиотерапию в сочетании с гормонотерапией по известной онкологической схеме. В нашей работе методы лечения первичного рака яичника не учитывались.

Рецидивом рака яичника считали возобновление опухолевого роста в пределах локализации первичной опухоли после проведённого радикального лечения.

Клиническая стадия опухоли у больных определялась по Международным классификациям TNM (1997) и FIGO (1976). Степень гистологической дифференцировки опухоли устанавливалась по критериям А.С.Бродерса (1926) [10].

Для морфометрической характеристики опухолевых клеток использовались системы анализа цифрового изображения Quantimet 500 C+ QWin (Leica Cambridge Ltd., 1998) и AxioVision 3.0 (Carl Zeiss GmbH, 2001). Цифровое изображение для анализа получали с микроскопа Leica REICHERT POLIVAR 2 с план-объективом FI APO 40x/0,30, совмещённого с цифровой видеокамерой JVC разрешением 800 x 600 pixel. Были определены площадь раковых клеток, площадь их ядер, ядерноклеточное соотношение. С целью обеспечения высокой точности измерений в каждом наблюдении исследовалось по 100 клеток. Измерение гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, выполняли в 5 произвольных полях зрения.

Плоидометрию опухолевых клеток рака женских гонад осуществляли при окраске микропрепаратов по методу Фельгена посредством компьютерного анализатора изображений Quantimet 500 C+ QWin (Leica Cambridge Ltd., 1998), совмещённого с микроскопом Leica REICHERT POLIVAR 2 на монохроматическом светофильтре длиной волны 570 нм. Для получения «тканевого стан-

дарты плоидности» в тех же гистологических срезах определяли среднюю интегральную яркость ядер малых лимфоцитов, которая соответствует параплоидному набору хромосом (2c). Вычисляя плоидность ядер исследуемых эпителиальных клеток рака яичников в единицах «с», средние показатели интегральной яркости ядер делили на половину указанного тканевого стандарта [1].

В иммуногистохимической оценке пролиферативной активности рецидивирующего и безрецидивного рака яичников нами использовались антитела к PCNA, bcl-2, mt p53. При исследовании использовались мышинные моноклональные антитела к PCNA (антиген ядер пролиферирующих клеток) клон PC 10, Ig G2 (NCL-PCNA Novocastra) в разведении 1 : 200 при времени инкубации 60 мин. Затем суммировали количество клеток (%), в ядрах которых выявлялась экспрессия антигена PCNA на 300 раковых клеток. Bcl-2 обнаруживался нами с помощью моноклональных антител к bcl-2, клон Bcl-2/100/D5, Ig G1 (NCL-bcl-2 Novocastra) в разведении 1:80 при инкубации 60 мин. Положительной считалась реакция при цитоплазматической и мембранной окраске более 10% опухолевых клеток. Mt p53 дифференцировался мышинными моноклональными антителами p53, клон DO-7, IgG2b (M 7001 DakoCytomation) в разведении 1:100 при времени экспозиции 60 мин. Критерием положительной реакции считалась ядерная окраска 10% и более ядер опухолевых клеток.

Для анализа рецепторного статуса опухолевых клеток в прогнозировании рецидивов овариальных карцином предпринималось иммуногистохимическое фенотипирование злокачественных неоплазм яичников с мышинными моноклональными антителами к эстрогеновым рецепторам человека, клон 6F1, IgG1 (NCL-L-ER-6F11 Novocastra) в разведении 1:80 и антител к прогестероновым рецепторам человека, клон 16, IgG1 (NCL-L-PGR-312 Novocastra) в разведении 1:200.

Полученные в ходе исследования результаты подвергнуты автоматизированной обработке с помощью специализированных статистических пакетов SPSS 10.0 с функциональными приложениями. Зависимость между признаками оценивали по коэффициенту корреляции (r), его ошибке (m) и уровню значимости (p), которые высчитывались с помощью метода непараметрической корреляции Спирмена. Применялись непараметрические методы изучения достоверности разницы величин Крускала-Уоллиса и Манна-Уитни.

В своей работе мы использовали многопараметрическую бинарную логистическую регрессионную модель. Доверительный интервал полученной модели определяли по значению Nagelkerke R².

Результаты исследования и их обсуждение.

Наиболее достоверными прогностически значимыми критериями у женщин молодого воз-

раста были признаны площадь опухолевой клетки, средняя плоидность ядер опухолевых клеток, уровень экспрессии онкогена-супрессора mt p53, уровень экспрессии PCNA, уровень экспрессии рецепторов к эстрогенам.

На основании математического анализа полученной информационной матрицы была разработана кибернетическая модель, позволяющая с высокой точностью рассчитывать вероятность возникновения рецидива серозной овариальной карциномы после радикального лечения.

Известен клинический способ прогнозирования ранних рецидивов или/и метастазов рака шейки матки [4], основанный на определении соотношения абсолютного числа лимфоцитов к абсолютному числу моноцитов периферической крови при сочетанной лучевой терапии с последующим делением полученного соотношения на 4,05. При значениях полученного результата выше единицы констатируют отсутствие вероятности рецидива заболевания в течение первого года наблюдения, а при значениях ниже единицы констатируют наличие продолженного роста опухоли и возникновение рецидива рака в первый год после лечения. Однако этот способ может быть применен только при раке шейки матки и не применим к карциномам другой локализации, кроме того, результат не отражает степени вероятности положительного или отрицательного результата по истечении года безрецидивного периода.

Также известен способ прогнозирования рецидива рака молочной железы [3], основанный на биохимическом исследовании менопаузальных больных после комплексного лечения. Развитие рецидива констатируют при снижении соотношения концентрации эстриола к концентрации эстрона и эстрадиола в моче в зависимости от длительности безрецидивного периода. Следует отметить, что способ применим только при раке молочной железы у женщин в постменопаузе и использует параметры, определяемые при биохимическом исследовании.

Наиболее близкий способ описан в [5]. Он заключается в том, что прогноз развития рецидива рака эндометрия выставляется по значению коэффициента соотношения катепсина Д и кислотостабильных ингибиторов, определяемых при помощи биохимического исследования в ткани злокачественной опухоли и эндометрия. При уровне коэффициента, превышающем показатели, характерные для ткани интактного эндометрия, более чем в 2,4-2,8 раза, прогнозируют развитие рецидива рака эндометрия в срок до 6 месяцев.

Недостатками способа являются невозможность использования при раке яичников, прогностическое суждение не носит вероятностного характера, а используемые параметры требуют проведения специфических биохимических методов.

Сущность изобретения заключается в том, что прогноз наступления рецидива устанавлива-

ется на основании значения вероятности, вычисленной по формуле, определённой с помощью логистической регрессии. В формулу входит комбинация нескольких переменных, являющихся морфологическими параметрами опухоли.

Техническим результатом изобретения является возможность прогноза повторного ракового роста по морфологическим характеристикам первичной опухоли до клинического появления рецидива, а также возможность использования его при планировании тактики ведения больных, а также в выборе метода лечения.

Способ реализуется следующим образом: определяются такие параметры опухоли, как площадь опухолевой клетки, средняя плоидность ядер опухолевых клеток, уровень экспрессии p53, уровень экспрессии рецепторов эстрогена, уровень экспрессии PCNA.

Площадь раковой клетки измеряется окуляром-микрометром или анализатором телевизионного изображения в $\mu\text{м}^2$.

Средняя плоидность ядер опухолевых клеток измеряется фотометром в единицах количества наборов хромосом, с.

Величина экспрессии p53 выражается в баллах: отсутствие экспрессии p53 в опухолевых клетках – 0 баллов; экспрессия p53 выявлена в 1-10% клеток – 1 балл; p53 визуализируется в 11-50% клеток опухоли – 2 балла; p53 определяется в 51-100% раковых клеток – 3 балла.

Уровень экспрессии рецепторов эстрогена выражался в баллах: отсутствие экспрессии рецепторов эстрогена в опухолевых клетках – 0 баллов; экспрессия рецепторов эстрогена выявлена в 1-10% клеток – 1 балл; рецепторы эстрогена визуализируются в 11-50% клеток опухоли – 2 балла; рецепторы эстрогена определяются в 51-100% раковых клеток – 3 балла.

Величина экспрессии PCNA (ядерного антигена пролиферирующих клеток) определяется в процентах по количеству PCNA – позитивных клеток в опухоли.

Далее вычисляется вероятность рецидива по формуле:

$$Y = \frac{1}{1 + e^{-z}} ;$$

$$Z = 266,67 - 2,30 \cdot X_1 - 26,93 \cdot X_2 + 68,06 \cdot X_3 - 24,33 \cdot X_4 - 0,78 \cdot X_5$$

где X_1 – площадь раковой клетки ($\mu\text{м}^2$);

X_2 – средняя плоидность ядер опухолевых клеток (с);

X_3 – интенсивность мечения p53 (в баллах);

X_4 – интенсивность мечения рецепторов эстрогена (в баллах);

X_5 – величина экспрессии PCNA (%).

При этом конечная переменная Y может принимать значения в диапазоне от 0 до 1. Значения $0 \leq Y \leq 0,5$ следует расценивать как показатель низ-

кого риска возобновления опухолевого роста, в то время как $0,5 < Y \leq 1$ свидетельствует в пользу высокого риска развития рецидива.

Достоинствами способа являются небольшое количество используемых морфологических критериев, простота и небольшая стоимость реактивов для получения необходимых параметров, возможность использования в рутинной патоморфологической практике и медицинской науке.

Примеры использования:

1. Больная М., 53 лет, № истории болезни 4533, поступила в Республиканский клинический онкологический диспансер гор. Чебоксары 25 сентября 1998 г. по направлению участкового гинеколога. При поступлении предъявляла жалобы на тяжесть в низу живота, увеличение живота. Наследственность не отягощена, беременностей не было. Объективно: состояние пациента удовлетворительное, кожные покровы физиологической окраски, гемодинамические показатели в пределах нормы, в легких везикулярное дыхание. При пальпации живот увеличен, мягкий, безболезненный, при глубокой пальпации по Образцову определяется свободная жидкость в брюшной полости. При влажной исследовании выявлено опухолевидное плотное образование в малом тазу слева размером около 10 см. Патологических выделений из влагалища нет. При цитологическом исследовании асцитической жидкости в пунктате Дугласова пространства выявлены атипичные клетки. Иных изменений в лабораторных показателях не установлено. При лапаротомии диагностировано опухолевое поражение левого яичника солидного характера размером 7 см, капсула поражена. Произведена экстирпация матки с придатками и резекцией сальника с последующими 6 курсами химио- и гормонотерапии по стандартной схеме. Клинический диагноз: рак левого яичника, клиническая стадия Ic (FIGO), T₁N₀M₀, асцит.

При гистологическом исследовании был выявлен серозный гистологический тип карциномы яичника низкой степени гистологической дифференцировки. После проведения цитоморфометрического исследования установлено, что средняя площадь опухолевой клетки равна 82,35 $\mu\text{м}^2$. Средняя плоидность ядер опухолевых клеток составила 4,19 с. Экспрессия антигена p53 была умеренной (2 балла), уровень экспрессии PCNA – 70%, а реакция на рецепторы эстрогена слабая (1 балл)

Таким образом, вычисляем дихотомическую переменную Y :

$$Z = 266,67 - 2,30 \cdot 82,35 - 26,93 \cdot 4,19 + 68,06 \cdot 2 - 24,33 \cdot 1 - 0,78 \cdot 70 = 21,62$$

$$Y = \frac{1}{1 + e^{-1 \cdot (21,62)}} = 1$$

Делаем заключение, что у данной больной очень высокий риск возобновления ракового роста.

По данным диспансерного наблюдения за больной, полученным из онкологического диспансера, установлено, что у пациентки М. диагностирован рецидив злокачественного новообразования 9.04.2001 года.

2. Больная А., 58 лет, № истории болезни 1598, поступила в Республиканский клинический онкологический диспансер гор. Чебоксары 3 февраля 1998 г. с жалобами на тянущие боли в низу живота, слабость. В анамнезе 4 беременности, наследственность не отягощена. Объективно: состояние пациента удовлетворительное, кожные покровы физиологической окраски, гемодинамические показатели в пределах нормы, в легких везикулярное дыхание. При пальпации живот увеличен, мягкий, безболезненный, при глубокой пальпации по Образову определяется свободная жидкость в брюшной полости. При влагалитном исследовании в области правого придатка диагностируется бугристый опухолевый узел размером до 5 см. Патологических выделений из влагалитца нет. При пункции Дугласова пространства в брюшинной жидкости выявлены атипичные клетки. Иных изменений в лабораторных показателях не установлено. При лапаротомии диагностировано опухолевое поражение правого яичника солидного характера размером 5 см, капсула поражена. Произведена экстирпация матки с придатками и резекцией сальника с последующими 2 курсами химио- и гормонотерапии по стандартной схеме. Клинический диагноз: рак правого яичника, клиническая стадия Ic (FIGO), T₁N₀M₀, асцит.

При гистологическом исследовании был выявлен серозный гистологический тип карциномы яичника низкой степени гистологической дифференцировки. После проведения цитоморфометрического исследования установлено, что средняя площадь опухолевой клетки равна 52,65 мкм². Средняя плоидность ядер опухолевых клеток составила 5,64 с. Экспрессия антигена p53 - умеренная (2 балла), уровень экспрессии PCNA - 100%, а реакция на рецепторы эстрогена высокая (3 балла).

Таким образом, вычисляем дихотомическую переменную Y:

$$Z = 266,67 - 2,30 * 52,65 - 26,93 * 5,64 + 68,06 * 2 - 24,33 * 3 - 0,78 * 100 = -21,18$$

$$Y = \frac{1}{1 + e^{-1 * (-21,18)}} = 0$$

Делаем заключение, что у данной больной риск возобновления ракового роста минимальный.

По данным диспансерного наблюдения за больной, полученным из онкологического диспансера, установлено, что у больной А. на протяжении времени диспансерного наблюдения рецидив не диагностирован.

Список литературы:

1. Автандилов Г.Г. Методика плоидометрии

в диагностике стадий новообразований. Методические рекомендации / Г.Г. Автандилов. - М.: РМАПО. - 2005. - 12 с.

2. Аксель Е.М. Статистика заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в 2000 году / Е.М. Аксель, М.И. Давыдов // Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2000 г. - М., 2002. - С.85-106.

3. Заявка на изобретение №2003124101, опубликованная 27.01.2005, бюллетень №3.

4. Патент Российской Федерации №2247377, опубликованный 27.02.2005, бюллетень №6.

5. Патент Российской Федерации №2250077, опубликованный 20.04.2005, бюллетень №11.

6. Степанова Е.В. Молекулярно-биологические маркеры рака яичников / Е.В. Степанова, И.Н. Полушкина, Ж.Н. Дбар и др. // Российский биотерапевтический журнал. - 2002. - Т.1, №4. - С. 14-20.

7. Урманчеева А.Ф. Вопросы эпидемиологии и диагностики рака яичников / А.Ф. Урманчеева, И.Е. Мешкова // Практическая онкология. - 2000. - №4. - С.7-13.

8. Фролова С.А. О результатах оперативного лечения больных распространённым раком яичников (по материалам Тульского областного онкологического диспансера) / С.А. Фролова, Н.Н. Репина, В.В. Недосекина и др. // Материалы научно-практической конференции «Новые подходы к скринингу, диагностике и лечению опухолей яичников». - Великий Новгород - Санкт-Петербург. - 2001. - С. 111.

9. Baekelandt M. Expression of apoptosis-related proteins is an independent determinant of patient prognosis in advanced ovarian cancer / M. Baekelandt, R.Holm, J.M. Nesland et al. // J. Clin. Oncol. - 2000. - Vol. 18 (22). - P.3775-3781.

10. Broders A.C. Carcinoma: Grading and practical application / A.C. Broders // Arch. Pathol. - 1926. - Vol.2 (1). - P. 376-380.

11. Liu S. Analysis of risk factors for epithelial ovarian cancer recurrence / S. Liu, J.H. Liu, H. Huang et al. // Ai Zheng. - 2003. - Vol.22 (11). - P. 1197- 1200.

Summary

A.A. Votintsev

METHOD OF RELAPSE PREDICTION IN WIDESPREAD OVARIAN CARCINOMA

*Kirov state medical academy, department
of pathological anatomy*

The method could be used for the diagnostics of a cancer relapse after conducted radical treatment in patients with widespread ovarian carcinoma up to clinical manifestations. It can be used in daily practice of pathological anatomy departments in hospitals,

oncological clinics, specialized centers and research institutes. The point of the method is the development of formula including the combination of several variables: morphological parameters of a swelling, mean square of the tumor cell, average nuclear DNA-contention in tumor cells, expression level of p53, expression level of PCNA and the expression level of receptors to estrogens. The main result of that work is the receiving invention that makes possible to forecast recurrent tumoral growth on the base of morphological data of a primary swelling before clinical manifestations of tumor relapse. It also can be used for planning treatment tactics in patients with ovarian carcinoma.