

Наши исследования продолжаются, в ближайшее время планируется использование ручного гамма-детектора в сочетании с двумя вышеуказанными методами. По нашему мнению, методика биопсии СЛУ является перспективной. Дальнейшие исследования в этой области могут привести к разработке объективных критериев, позволяющих выделить группы больных, подлежащих и не подлежащих подмышечной лимфодиссекции. Это поможет уменьшить количество пациенток, страдающих различными функциональными нарушениями вследствие перенесенной лимфаденэктомии. Использование методики обнаружения СЛУ позволит составить схему лимфооттока (лимфодренажа) для каждой конкретной больной, что даст возможность подойти к лечению больных более индивидуально (проведение парастеральной лимфодиссекции, проведение адъювантной химиотерапии и лучевой терапии).

Перспективным также является использование методики при меланоме, раке полости рта, полового члена, вульвы и, возможно, при других локализациях опухолей.

Поступила 02.04.2001 / Submitted 02/04/2001

© Коллектив авторов, 2002

УДК 616.71-006.3.04

Р. А. Кешта¹, Е. В. Степанова², М. Р. Личиницер¹

ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРИ САРКОМАХ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

¹НИИ клинической онкологии, ²НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

В структуре злокачественных опухолей человека саркомы мягких тканей (СМТ) занимают весьма скромное место, составляя около 1% всех онкологических заболеваний. Наиболее высокая заболеваемость наблюдается в возрасте 20—30 и 40—50 лет. Под общим названием «саркомы мягких тканей» объединяют большое количество злокачественных опухолей, различающихся по клиническим и морфологическим признакам. Выделяют опухоли и опухолеподобные образования следующих тканей и элементов сложных структурных образований: фиброзной, жировой, мышечной, лимфоидной, синовиальной ткани, мезотелия, кровеносных сосудов, периферических нервов, симпатических ганглиев, параганглиозных структур, мультипотентной мезенхимы и эмбриональных структур. Многие из них вызывают у патологоанатомов существенные трудности как в аспекте практической морфологической диагностики, так и в решении вопросов их клеточной дифференцировки. Наибольший прогресс в решении указанных проблем связан с использованием иммуногистохимии.

За последние несколько десятилетий достигнут значительный прогресс в понимании молекулярной биологии клетки. Стали известны многие механизмы контроля клеточного

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Atkins C. D., Warshaw M. //Lancet. — 1997. — Vol. 13, N 350. — P. 808.
2. Bakalakos E. A., Burak W. E. Jr. //Surg. Oncol. Clin. N. Am. — 1999. — Vol. 8, N 1. — P. 129—144.
3. Cabanas R. //Cancer. — 1977. — Vol. 39. — P. 456—466.
4. Chung M. N., Ye W., Giuliano A. E. //Ann. Surg. Oncol. — 2001. — Vol. 8, N 9. — P. 688—692.
5. Cox C. E., Pendas S., Cox J. M. //Ann. Surg. — 1998. — Vol. 227, N 5. — P. 645—651.
6. Keshitgar M. R., Baum M. //World J. Surg. — 2001. — Vol. 25, N 6. — P. 761.
7. Morton d. L., Wen D.-R., Wong J. H. et al. //Arch. Surg. — 1992. — Vol. 27. — P. 392—399.
8. Veronesi U., Galimberti V., Zurrida S. //Eur. J. Cancer. — 2001. — Vol. 37, N 4. — P. 454—458.
9. Veronesi U., Paganelli G., Galimberti V. //Lancet. — 1997. — Vol. 28, N 349. — P. 1864—1867.
10. Waddington W. A., Keshitgar M. R., Ell P. J. //Ann. Surg. Oncol. — 2001. — Vol. 8, N 9. — P. 9S—12S.
11. Waddington W. A., Keshitgar M. R., Taylor I. //Eur. J. Nucl. Med. — 2000. — Vol. 27, N 4. — P. 377—391.

R.A.Keshta¹, E.V.Stepanova², M.R.Lichinitser¹

MOLECULAR BIOLOGICAL MARKER EXPRESSION IN SOFT-TISSUE SARCOMAS

¹Institute of Clinical Oncology, ²Institute of Experimental Diagnosis and Therapy of Tumors

Soft tissue sarcomas (STS) are not common tumors being reported at 1% of all human malignancies. The highest incidence is reported in age categories 20 H30 and 40—50 years. The term 'soft-tissue sarcomas' is a general name for a large number of malignant tumors different in clinical and morphological features. The tumors and tumor-like lesions are classified into those originating in fibrous, adipose, muscular, lymphoid, synovial tissues, mesothelium, vessels, peripheral nerves, sympatic ganglia, pluripotent mesenchyma. Many of them are associated with certain difficulties related to practical morphological diagnosis and cell differentiation. The greatest advance in solution of these problems was associated with immunohistochemistry.

Over the last decades there was a significant progress in the understanding of molecular biology of the cell. Many mechanisms were discovered that were responsible for cell division and death control, maintenance of genetic stability, pathways of signal transmission from receptors to nuclei, etc. It has been found that mutations of some genes whose protein products are involved in regulation of the above-mentioned processes (oncogenes) may result in cell transformation. These processes are also controlled by tumor growth suppressor genes. Intercellular interactions

деления и смерти, поддержания генетической стабильности, путей передачи сигнала от рецепторов в ядро и т. д. Оказалось, что изменения некоторых белков этих процессов — онкобелков — может приводить к трансформации клеток. И эти же пути находятся под контролем генов-супрессоров опухолевого роста. Межклеточные взаимодействия, регулирующие статус и поведение нормальных клеток, определяют также и способность опухолевых клеток к инвазии и метастазированию. На сегодняшний день известно более 100 белков и/или генов, изменения которых находят в злокачественных клетках. Каждая опухоль является уникальной по набору нарушений, вовлеченных в процессы канцерогенеза. Такие нарушения, определяемые в опухолевой ткани, и получили название молекулярно-биологических (молекулярных) маркеров опухоли. Все они участвуют в регуляции клеточного цикла, апоптоза, дифференцировки, морфогенетических реакций клетки. Появилось множество сообщений, что определение молекулярно-биологических маркеров в ткани опухоли может давать прогностическую и предсказывающую химиорезистентность информацию.

Особенности экспрессии молекулярно-биологических маркеров активно изучаются при многих злокачественных заболеваниях: раке молочной железы, опухолях легкого, толстой кишки, яичников. Некоторые из них широко используются в клинической онкологии для прогнозирования течения заболевания и эффективности химиотерапии у каждого отдельного больного. Однако при саркомах мягких тканей такие нарушения в экспрессии белков изучены плохо.

Использование в рутинной патологоанатомической практике определения молекулярно-биологических маркеров позволит прогнозировать течение злокачественного заболевания, оценить чувствительность опухоли к химиотерапии. Кроме того, прогресс в изучении молекулярных механизмов канцерогенеза опухолей мягких тканей, возможно, обеспечит появление новых подходов к лечению саркомы мягких тканей.

Изменения в процессах, контролируемых p53

Молекула p53 состоит из 392 аминокислот и образует тетрамерный комплекс. В клетке происходит постоянный синтез белка p53, однако он быстро подвергается убиквитинзависимому разрушению в протеосомах. Поэтому в клетках большинства тканей уровень белка очень низкий и находится на пороге детекции. Этот белок является ключевым компонентом внутриклеточной защитной системы, предотвращающей появление в организме аномальных клеток. При различных стрессорных и аномальных процессах в клетке (при повреждениях ДНК, оксидативном стрессе, гипоксии, гипо- и гипертермии, активации онкогенов, вирусной инфекции и изменении архитектуры клетки) происходит активация p53, что приводит к остановке клеточного цикла в сверхточных точках и репарации ДНК или апоптозу. При активации p53 может выступать как транскрипционный фактор, регулирующий экспрессию таких генов, как p21/WAF, mdm2, GADD45 (growth arrest and DNA damage-inducible), Bax, циклин G, которые опосредуют основные механизмы действия p53.

Под действием стрессорных факторов происходит модификация p53 путем присоединения киназных остатков фосфорной кислоты к серину в положениях 15 и 20, что приводит

regulating state and behavior of normal cells also determine invasion and metastatic potential of cells. Today we know more than 100 proteins and/or genes whose anomalies are found in malignant cells. Every tumor is unique as to its set of abnormalities involved in carcinogenesis. These abnormalities discovered in tumor tissue are referred to as molecular biological (or molecular) tumor markers. All of them are involved in regulation of cell cycle, apoptosis, differentiation, cell morphogenetic reactions. There are a large number of reports demonstrating that molecular biological markers in tumor tissue may be factors of disease prognosis and predictors of resistance to chemotherapy.

Active study of molecular biological marker expression is in progress for many cancer sites such as cancer of the breast, lung, colon, ovary. Some of the markers are widely used in clinical oncology to prognosticate disease course and to predict response to chemotherapy in individual patients. However, there was no considerable study of such protein expression anomalies in STS.

Routine pathological testing for molecular biological markers will help in future to prognosticate cancer course and to predict response to chemotherapy. Besides, the advance in study of molecular mechanisms of carcinogenesis in soft tissue may lead to development of new rational approaches to the treatment of STS.

Changes in p53-Controlled Processes

The p53 molecule is a tetramer complex of 302 amino acids. The cell continuously produces protein p53 that however undergoes ubiquitin-mediated decay in proteasomes. This protein is therefore present in cells of most tissues in very low concentrations next to detection threshold. It is a key component of intracellular defense preventing appearance of anomalies in the cell. Stress and abnormal processes (DNA damage, oxidative stress, hypoxia, hypo- and hyperthermia, oncogene activation, virus infection, changes in cell architectonics) inside the cell lead to p53 activation and induction of cell cycle arrest and DNA repair or apoptosis. When activated the p53 may act as a transcription factor regulating expression of genes such as p21/WAF, mdm2, GADD45 (growth arrest and DNA damage inducible), Bax, cyclin G that mediate p53 main mechanisms of action.

Under stress p53 undergoes modification consisting of connection of phosphoric acid kinase residues to serin in positions 15 and 20 leading to cell cycle arrest and DNA repair. If the DNA damage is too severe and cannot be repaired an additional serin residue is phosphorylated in position 46 which leads to AIP1 gene transcription and launching of apoptosis.

p53 Mutations may be associated with aggressive disease course and tumor resistance to chemo- or radiotherapy. Mutant p53 is found in all human tumors at a rate 50-80% per individual site. However, this does not mean that the apoptosis program is intact in the remaining 20-50%. There is evidence of the fact that impairment of wild p53 functioning may be related to wild p53 block by other proteins, in particular Bcl-2, MDM-2 and some others. Most of these mutations are missense mutations and increase the protein life by several fold and thus make it detectable by immunohistochemical analysis of tumor sections.

Active study of p53 mutation and accumulation in STS is in progress. Some investigators study several sarcoma types [4,17,33,34,37], while others are interested in individual histological types such as dermatofibrosarcoma protuberans [13],

к остановке клеточного цикла и репарации ДНК. При сильных повреждениях ДНК, которые невозможно репарировать, фосфорилируется дополнительный сериновый остаток в положении 46, что приводит к транскрипции гена *AIP1* и, в конечном итоге, к запуску апоптоза.

Мутации *p53* могут быть ассоциированы с агрессивностью течения заболевания и устойчивостью опухолевых клеток к химио- или лучевой терапии. Мутантный тип *p53* встречается во всех типах опухолей человека в среднем в 50–80% случаев при каждой локализации. Однако это не значит, что в остальных 20–50% случаев программа апоптоза остается интактной. Есть доказательства, что в опухолях человека нарушение функции *p53* дикого типа может быть связано и с блокадой *p53* «дикого» типа другими протеинами, в частности *Bcl-2*, *MDM-2* и др. Большинство из этих мутаций являются миссенс-мутациями и удлиняют время жизни белка в несколько раз, что делает возможным его определение иммуногистохимическими методами на срезах опухолей.

Присутствие мутаций *p53* и его накопление активно изучается при СМТ. Ряд исследований включает несколько различных типов сарком [4, 17, 33, 34, 37], другие — только определенный гистологический тип: дерматофиброматосаркому [13], злокачественную фиброзную гистиоцитому [29], лейомиосаркому [19], синовиальную саркому [2, 7, 31], липосаркому [6, 28].

Экспрессию *p53* при СМТ находят примерно в 10–30% случаев, частота экспрессии *p53* варьирует в зависимости от гистологического типа опухоли. В исследованиях находят повышенную экспрессию *p53* при синовиальной саркоме по сравнению с другими типами опухолей. Высокую экспрессию *p53* находят при рабдомиосаркоме (70%) и злокачественной шванноме (20%), низкую — при фибросаркоме и липосаркоме (13%) [16, 17].

Большое значение имеет степень злокачественности опухолей: так, если мутантный *p53* не находят в опухолях низкой степени злокачественности, то в опухолях высокой степени злокачественности экспрессия мутантного *p53* достигает 33% [8]. Опухоли больших размеров (более 5 см) могут иметь более высокую частоту экспрессии *p53* (36%), чем саркомы малого размера (менее 5 см) (3%). По другим данным, присутствие *p53* в опухолевых клетках не коррелирует с гистологическим типом СМТ, размером опухоли, клеточностью, наличием некрозов [24].

Нерешенным остается вопрос о стандартизации критериев оценки гиперэкспрессии *p53*. В некоторых исследованиях критерием разделения на *p53*-положительные и *p53*-отрицательные опухоли была выбрана точка 20% положительных клеток [8]. Количество положительных по *p53* случаев составило 25%. В других исследованиях cut-off точкой служило значение 10% *p53*-положительных клеток [17]. Опухоли имели сильное окрашивание ядер опухолевых клеток. В исследовании, включающем 101 случай сарком мягких тканей, среднее количество *p53*-положительных клеток составило только 20,3% [5].

Роль прогностической значимости экспрессии *p53* при саркомах мягких тканей остается недостаточно изученной. А. Kawai показал, что присутствие *p53* в ядрах клеток коррелирует с плохим прогнозом общей группы, а также M0 стадией мягкотканых опухолей [17]. *p53* является прогностическим

malignant fibrous histiocytoma [29], leiomyosarcoma [19], synovial sarcoma [2,7,31], liposarcoma [6,28].

p53 Overexpression is found in about 10-30% of STS, the *p53* overexpression frequency varying in different histopathology types. The *p53* overexpression is found more frequently in synovial sarcoma than in other tumor types. The *p53* overexpression is also encountered in rhabdomyosarcoma (70%) and malignant schwannoma (20%), and much less frequently in fibrosarcoma and liposarcoma (13%) [16,17].

Of much importance is tumor malignancy grade: mutant *p53* is rarely found in low-grade tumors but is present in 33% of high-grade sarcomas [8]. *p53* Expression is found in more than 36% of tumors greater than 5 cm in diameter and in 3% of tumors less than 5 cm. According to other authors *p53* expression on tumor cells is not correlated with STS histology, tumor size, cellularity, necrosis [24].

Assessment criteria for *p53* overexpression are not clearly defined yet. Some investigators define *p53* overexpression as 20% of *p53*-positive tumor cells [8]. The *p53*-positive cases were 25% in this study. Other investigators consider a tumor to have *p53* overexpression if it contains 10% of *p53*-positive cells [17]. The tumors demonstrated intensive nucleus staining. In a study of 101 STS patients *p53*-positive tumors were 20.3% only [5].

The prognostic value of *p53* expression in STS is unclear. A. Kawai demonstrated correlation of the presence of *p53* in cell nuclei with poor prognosis for STS general population and for M0 disease [17]. The *p53* is a prognostic marker in synovial sarcoma [2,31]. The 5-year disease-free survival is 18% (median diseasefree survival 20 months) for *p53*-positive synovial sarcomas, cf. 71% (median 145 months) for the *p53*-negative tumors ($p = 0.0001$) [2]. The 6-year survival of patients with *p53*-positive synovial sarcoma was 29% versus 47% for the *p53*-negative disease [8]. B. Skytting failed to establish prognostic value of *p53* [32].

p53 Mutation is associated with neurofibroma type I (Recklinghausen disease) transformation into malignant neoplasm of peripheral nerves. There was no *p53* accumulation in 11 Recklinghausen disease-associated neurofibromas (in contrast, inherited neurofibroma did demonstrate anti-*p53* antibody staining), while 6 of 10 malignant schwannomas were mutant *p53*-positive. The *p53*-positivity of malignant schwannoma in patients with Recklinghausen disease was associated with recurrence and metastasis within 2 years from diagnosis, while patients with *p53*-positive sporadic neoplasms of peripheral nerves were disease-free within 1-7 years from diagnosis [22].

Therapeutic effect of some antitumor agents is related to DNA damage and, after that, to apoptosis induction. In general, *p53* mutations switch-off normal *p53* functions such as arrest of G1 or G2 phases during DNA repair. The *p53* mutations may therefore be a genetic basis for drug resistance.

Expression of *Bcl-2* Family Proteins and Apoptosis

Bcl-2 is a main apoptosis inhibitor. The *Bcl-2* is located on mitochondrial external membrane and belongs to a large family consisting of 16 members. Some of the family proteins (*Bcl-2*, *Bcl-XL* and others) are apoptosis inhibitors, while others (*Bax*, *Bad*, *Bid*, etc.) enhance apoptosis. The *Bcl-2* is found in many normal cell types. Its expression is extremely high in long-living

маркером группы синовиальных сарком [2, 31]. Так, больные с p53-положительной синовиальной саркомой имеют 5-летнюю безрецидивную выживаемость — 18% (медиана безрецидивной выживаемости 20 мес), а с p53-отрицательными опухолями — 71% (медиана 145 мес) ($p=0,0001$) [2]. 6-летняя выживаемость p53-положительных больных составила 29%, а p53-отрицательных — 47% [8]. В исследовании В. Skytting p53 не имел прогностической значимости [32].

Появление мутаций p53 связано с трансформацией нейрофибром I типа (болезнь Реклингхаузена) в злокачественную опухоль периферических нервов. Так, если 11 пациентов с нейрофибромами, ассоциированными с болезнью Реклингхаузена, не имели накопления p53 (врожденная нейрофиброма имела окрашивание антителами к p53), то 6 из 10 больных со злокачественными шванномами имели мутированный p53. Присутствие p53 в шванномах больных, страдающих болезнью Реклингхаузена, ассоциировалось с появлением рецидивов или метастазов в течение 2 лет после установки диагноза, тогда как у всех p53-положительных больных спорадической опухолью периферических нервов метастазы и рецидивы не были обнаружены в течение 1–7 лет после установки диагноза [22].

Терапевтический эффект некоторых противоопухолевых агентов связан с повреждением ДНК и уже вторично — с индукцией апоптоза. В основном мутации белка p53 выключают функции нормального p53, который останавливает клеточный цикл в G1- или G2-фазах во время репарации ДНК. Поэтому мутации p53 могут потенциально обеспечивать генетическую основу устойчивости к химиопрепаратам.

Экспрессия белков семейства Bcl-2 и апоптоз

Bcl-2 — один из главных ингибиторов апоптоза. Он локализуется на наружной мембране митохондрий и принадлежит к большому семейству, насчитывающему 16 членов. Одни из них ингибируют апоптоз (Bcl-2, Bcl-Xl и др.), другие активируют его (Bax, Bad, Bid и др.). Bcl-2 обнаружен во многих типах нормальных клеток. Особенно высока его экспрессия в долгоживущих клетках, например нейронах и др. В митохондриях он стабилизирует мембрану, управляет транспортом ионов, образуя ионные поры, предупреждает выход ряда факторов, индуцирующих апоптоз.

Экспрессию Bcl-2 находят в 40–60% случаев сарком мягких тканей [15, 24]. Экспрессия Bcl-2 выше в опухолях, имеющих размер более 10 см [24]. Экспрессия белков апоптоза, в частности Bcl-2, отличается при различных гистологических типах СМТ. Так, в частности, сообщают, что уровень экспрессии Bcl-2 выше, и соответственно, апоптотический индекс ниже при синовиальной саркоме [5, 18].

Есть данные о том, что гиперэкспрессия Bcl-2 может представлять альтернативный путь множественной лекарственной устойчивости. Исследования, связанные с изучением возможностей подавления экспрессии Bcl-2 в опухолевых клетках, являются одним из перспективных направлений современной экспериментальной генотерапии опухолей.

Влияние маркеров апоптоза на прогноз заболевания спорно. У 49 больных синовиальной саркомой показано, что высокий уровень апоптоза (индекс апоптоза по методу TUNEL выше 0,8%), связан с плохим прогнозом заболевания ($p < 0,0001$) [18]. Экспрессия Bcl-2 была связана с благоприятным прогнозом для

cells such as neurons. In mitochondria its functions include membrane stabilization, ion transport control, prevention of release of some apoptosis inducing factors.

Bcl-2 expression is encountered in 40–60% of STS [15,24]. Bcl-2 expression is higher in tumors greater than 10 cm [24]. Expression of apoptosis proteins, in particular, of Bcl-2, is different in different STS types. In synovial sarcoma Bcl-2 expression is higher and the apoptotic index is lower accordingly [5,18].

There is evidence of the fact that Bcl-2 overexpression may be an alternative mechanism of multiple drug resistance. Study of possible ways to inhibit Bcl-2 expression in tumor cells is a promising field of experimental genotherapy of tumors.

Prognostic value of apoptosis markers is unclear. In 49 patients with synovial sarcoma high level of apoptosis (TUNEL apoptosis index above 0.8%) was associated with poor disease prognosis ($p<0.0001$) [18]. At the same time Bcl-2 expression was associated with favorable prognosis for STS patients [24]. The 5-year survival of Bcl-2-positive cases was 87% versus 53% for Bcl-2-negative disease ($p<0.05$). Bax, p21, Fas, FasL and ki-67 overexpression was not related to STS prognosis in any of the studies [5,18].

FAS(APO-1/CD95)-Receptors in Soft-Tissue Tumors

Tumor cell abnormalities may involve both intracellular mechanisms of apoptosis initiation/progression and reception/transport of extracellular signals (growth factors, cytokines, drugs, etc.) as mediated by a specific FAS(APO-1/CD95)-receptors.

FAS(APO-1/CD95)-receptor overexpression is found on cells of various tumors such as rhabdomyosarcoma, glioblastoma and others. However, percentage of FAS(APO-1/CD95)-positive cells and degree of the receptor expression may vary considerably with respect to tumor type, degree of progression, etc. Degree of FAS(APO-1/CD95) expression is an important factor in other human tumors too: the lower the expression, the poorer the prognosis and the shorter survival time.

Proliferation Activity of Soft-Tissue Tumors

Impairment of cell proliferation and apoptosis are the earliest events of carcinogenesis and tumor progression. At this stage normal control mechanisms of cell division and apoptosis are lost. Unlimited proliferation is a characteristic property of cancer cells. The number of proliferating cells is an integral parameter of independence from growth signals, unresponsiveness to division-arresting signals, unlimited division, adequate angiogenesis.

Evaluation of the proliferative activity may help to predict aggression and malignancy of tumor disease and, in combination with other factors, probability of response to therapy.

Antigen Ki-67 recognizes proliferating cells at different phases of cell cycle, i.e. is a reflection of the whole pool of proliferating cells and the most reliable and strong marker of cell proliferation. The Ki-67 is recognized by appropriate monoclonal antibody and is a short-living protein undergoing decay within 1–1.5 h. Thus, the Ki-67 may detect only dividing cells because it cannot be accumulated and found on resting cells.

Mean proliferative activity of synovial sarcoma is not high 12.9–7.12% [18,26]. There was no correlation between proliferative

больных СМТ [24]. Так, 5-летняя выживаемость больных с экспрессией Bcl-2 составила 87%, а Bcl-2-отрицательных больных — 53% ($p=0,05$). Экспрессия Bax, p21, Fas, FasL и Ki-67 не оказывала влияния на прогноз СМТ ни в одном из исследований [5, 18].

FAS(APO-1/CD95) — рецепторы в опухолях мягких тканей

Нарушения в опухолевых клетках могут касаться как внутриклеточных механизмов инициации и выполнения программы апоптоза, так и восприятия и проведения внеклеточных внешних сигналов (различных факторов роста, цитокинов, химиопрепаратов и др.), опосредуемых соответствующими специфическими FAS(APO-1/CD95)-рецепторами.

Экспрессия FAS(APO-1/CD95)-рецепторов обнаруживается в опухолевых клетках различных новообразований. Она найдена в рабдомиосаркомах, глиобластомах и прочих опухолях. Однако количество FAS(APO-1/CD95)-положительных клеток и степень экспрессии могут значительно варьировать в зависимости от типа опухоли, ее прогрессии и т. д. Уровень экспрессии FAS(APO-1/CD95) имеет значение и при других опухолях человека: чем он ниже, тем хуже прогноз и короче продолжительность жизни.

Пролиферативная активность опухолей мягких тканей

Наиболее ранние события канцерогенеза и прогрессирования опухолей — нарушения механизмов пролиферации и апоптоза в опухолевых клетках. На этой стадии теряются нормальные механизмы контроля клеточного деления и апоптоза. Способность к неограниченному размножению — одна из главных особенностей опухолевых клеток. Количество делящихся клеток является интегральным показателем независимости от ростовых сигналов, нечувствительности к сигналам, блокирующим деление, неограниченной возможности деления, адекватного ангиогенеза.

Оценка пролиферативной активности может помочь определить агрессивность и злокачественность течения опухолевого процесса, а также, в совокупности с другими факторами, и вероятность ответа на проводимую терапию.

Ki-67 выявляет пролиферирующие клетки, находящиеся на разных фазах цикла, и таким образом отражает весь пул делящихся клеток, это наиболее надежный и четкий маркер пролиферации. Антиген Ki-67, определяемый соответствующими моноклональными антителами, короткоживущий протеин, который разрушается в течение 1–1,5 ч. В силу этого Ki-67 детектирует только делящиеся клетки, так как не успевает накапливаться и не остается в покоящихся клетках.

Средняя пролиферативная активность синовиальных сарком невысока и составляет 12,9–17,12% [18, 26]. Не найдено корреляций между пролиферативной активностью синовиальных сарком и иммуногистохимической экспрессией p53, MDM2 и p21 [2, 26]. В другом исследовании опухоли, имеющие мутантный p53, определенный иммуногистохимически, имели высокую пролиферативную активность [8].

В исследовании, где для измерения пролиферативной активности использовали антитела к антигену PCNA, индекс PCNA коррелировал с количеством некрозов в опухоли и степенью ядерной атипии синовиальных сарком [25]. Чем выше

активность, p53, MDM2, p21 immunohistochemical expression in synovial sarcoma [2,26]. In another study mutant p53-positive (by immunohistochemistry) tumors were actively proliferating [8].

Proliferative activity of synovial sarcomas may be measured with antibodies to PCNA (proliferating cell nuclear antigen). There was a strong relationship between the tumor necrosis number, degree of nuclear atypia and PCNA index in synovial sarcoma [25]. The higher the tumor proliferative activity, the greater the tumor necrosis. There was no difference in PCNA index between synovial sarcomas with different histology (biphase, monophasic, focal granular).

There are many studies investigating prognostic value of sarcoma proliferative activity [3,8,12,14,21,25,26,32,36].

It was demonstrated in most studies that active proliferation was a poor factor for disease-free survival in STS. Among patients with active proliferation of tumor cells (more than 20%) 39% survived 70 months metastasis-free after removal of the primary versus 47% of those having sarcomas with low proliferative activity [8].

There are no standard criteria for STS classification into those with high and low proliferative activity. Some investigators consider a 10% Ki-67-positivity to be the cut-off value [26,32], while others define the threshold as 20% [2,8] or 30% of Ki-67-positive cells [12,14,21].

This may be due to the use of other factors (tumor grade, size, etc) in the analysis. For instance, the 30% criterion was used in a study of high-grade sarcomas more than 10 cm in size [14]. The 3-year survivals were 18% and 58% for sarcomas with high and low proliferative activity, respectively.

Angiogenic Activity of Soft-Tissue Sarcomas

Generation of new vessels from adjacent postcapillary venules is needed for growth of primary and metastatic tumors. This process is necessary for tumors greater than 0.5 cm. Over the last years there was a great progress in the understanding of mechanisms of neoangiogenesis, characterization of angiogenesis inducers and inhibitors that regulate proliferation and migration of endothelial cells.

Tumor angiogenic activity is a complex balance of angiogenic stimulators and natural angiogenesis inhibitors. VEGF (vascular endothelial growth factor) and bFGF (basic fibroblast growth factor) are important inducers of tumor angiogenesis. There are about 30 natural inhibitors of angiogenesis known today (including thrombospondin).

Tumor angiogenesis may be a prognostic marker in many malignant diseases. However, study of angiogenesis in STS has just been started.

Carcinomas and sarcomas have different angiogenesis intensity. Carcinomas demonstrate uneven vessel distribution (there are areas with increased - "hot spots" - and low number of microvessels) while STS have a uniform vascular distribution [35].

These findings are also supported by data demonstrating angiogenesis in tumors with both epithelioid and sarcomatous components. Studies of carcinosarcomas of the uterus showed that the tumor epithelioid component had a more intense angiogenesis as compared to the sarcomatous one: the number of microvessels and VEGF expression were about two-fold higher [9]. Malignant soft-tissue tumors with epithelioid characteristics

пролиферативная активность опухоли, тем массивнее некрозы в опухолях. Не было замечено разницы в индексе PCNA в опухолях различного гистологического типа синовиальных сарком (бифазной, монофазной, фокальной гранулярной).

Множество исследований посвящено изучению прогностического значения пролиферативной активности сарком [3, 8, 12, 14, 21, 25, 26, 32, 36]. В большинстве из них высокая пролиферативная активность является независимым фактором укорочения безметастатической выживаемости больных СМТ. Так, 39% больных, имеющих опухоль с высокой пролиферативной активностью (более 20%), не развили метастазов в течение 70 мес после удаления первичной опухоли по сравнению с 47% больных с опухолями низкой пролиферативной активности [8].

До сих пор не разработаны стандартные критерии разделения сарком мягких тканей по степени пролиферативной активности. В ряде исследований точкой разделения является 10% Ki-67-положительных клеток [26, 32], в других — 20% [2, 8], в третьих, критерием выбрано 30% Ki-67-положительных клеток [12, 14, 21].

Возможно, это связано с другими клинко-морфологическими характеристиками всей группы больных (степень злокачественности, размер опухоли и т. п.), включенной в исследование. Так, в исследовании сарком высокой степени злокачественности размером более 10 см использовался критерий 30% положительных клеток [14]. 3-летняя безрецидивная выживаемость составила 18 и 58% у больных с высокой и низкой пролиферативной активностью соответственно.

Ангиогенная активность сарком мягких тканей

Рост первичной и метастатической опухоли требует образования новых сосудов из близлежащих посткапиллярных венул. Этот процесс необходим для роста опухоли более 0,5 см. В последнее время достигнут большой прогресс в понимании механизмов неоангиогенеза, охарактеризованы индукторы и ингибиторы ангиогенеза, которые регулируют пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток.

Ангиогенная активность опухоли является сложным балансом между ангиогенными стимуляторами и природными ингибиторами ангиогенеза. VEGF (сосудистый фактор роста эндотелия) и bFGF (основной фактор роста фибробластов) считаются одними из важных индукторов опухолевого ангиогенеза. На сегодняшний день известно около 30 различных природных ингибиторов ангиогенеза (в том числе и тромбоспондин). Оценка ангиогенеза опухоли может служить предсказывающим маркером при многих злокачественных опухолях. Однако при СМТ различного генеза исследования ангиогенеза только начинаются.

Показано, что интенсивность ангиогенеза в карциномах и саркомах значительно различается. Так, если в карциномах наблюдается неравномерное распределение сосудов (выделяют поля с повышенным — «hot spots» — и низким количеством микрососудов), то при СМТ наблюдается равномерное распределение сосудов в опухоли [35].

Эти наблюдения подтверждаются данными об ангиогенезе в опухолях, содержащих как эпителиоидный, так и саркоматозный компоненты. Исследования карциносарком матки показывают, что эпителиоидная часть опухоли имеет более интенсивный ангиогенез, чем саркоматозная: примерно в 2 раза увеличены количество микрососудов и уровень экспрессии VEGF [9]. В злокачественных мягкотканых опухолях

(epithelioid and alveolar sarcomas, epithelioid component of synovial sarcoma) demonstrated a more intense VEGF expression as compared to other sarcoma types [20].

Recent reports failed to find prognostic value of microvessel density in STS tissue [27, 30, 35, 38]. The microvessel density was not related to distant metastasis or local recurrence in STS, in contrast, prognostic importance of vascularity was demonstrated for carcinomas of the breast, lung, colon and other sites.

It seems more reasonable to study angiogenesis stimulators (VEGF and bFGF) in tumor tissue or sera from STS patients.

Cancer patients have increased levels of VEGF and bFGF in comparison with normal donors of the same age. Most sarcomas also have increased levels of VEGF and bFGF. VEGF expression on tumor cells and, therefore, its content in sera from STS patients increase with increase in disease stage and malignancy [11]. It is not surprising therefore that VEGF may predict metastasis and relapse in STS.

In a study of 115 patients with STS of different histogenesis mono- and multifactorial analysis demonstrated that tissue VEGF concentration measured by enzyme immunoassay predicted sarcoma metastasis and relapse [38].

Spindle-cell sarcomas demonstrate a lower VEGF expression rate (by immunohistochemistry and enzyme immunoassay) than malignant sarcomas with an epithelioid component [20].

The role of angiogenesis inhibitor expression in STS is unknown.

A study of 5 sarcoma patients demonstrated the absence of thrombospondin (TSP), plasminogen and interferon- α (angiogenesis inhibitors) in tumor matrix, though the patients presented with increased levels of type I matrix metalloprotease inhibitor [35]. TSP-1 mRNA was found in 7 of 7 cases with myxofibrosarcoma and in none of 7 liposarcoma cases [23]. Patients with STS presented with elevated levels of serum endostatin, the increased endostatin concentrations (above 55 ng/ml) being associated with high risk of metastasis after removal of the primary [10].

The problem of angiogenesis in STS requires further study.

There are publications studying anti-angiogenic therapy in STS. Most investigators demonstrate dependence of sarcoma growth and metastatic potential upon angiogenesis, in particular, on VEGF level.

Administration of monoclonal antibody to VEGF resulted in a considerable inhibition of VEGF-positive cells in human rhabdomyosarcoma A673 transplanted subcutaneously to athymic mice. VEGF type II receptor inhibitor, SU5416, inhibited growth of neurogenic sarcomas in athymic mice (an about 50% tumor decrease) [1].

The poor progress in improvement of treatment results in sarcoma requires development of new, rational treatment approaches. Understanding of mechanisms involved in soft-tissue tumor progression will open prospects for improvement in the prognosis and rational treatment for STS.

с эпителиоидными характеристиками (эпителиоидная и альвеолярная саркомы, эпителиоидный компонент синовиальной саркомы) имеется более интенсивная экспрессия VEGF по сравнению с другими типами сарком [20].

В недавно опубликованных сообщениях не находят прогностической значимости плотности микрососудов в ткани

мягкотканых сарком [27, 30, 35, 38]. Количество микрососудов не связано с появлением отдаленных метастазов или локальным рецидивом СМТ, тогда как показана прогностическая значимость определения количества сосудов для рака молочной железы, легкого, толстой кишки и др.

Более целесообразным представляется изучение ангиогенных стимуляторов (VEGF и bFGF) в ткани опухоли или в сыворотке больных СМТ.

Обнаружено, что уровень VEGF и bFGF значительно возрастает у больных по сравнению с группой доноров соответствующего возраста и пола. Замечено, что в большинстве сарком наблюдается повышение уровня VEGF, и bFGF. Экспрессия VEGF в опухолевых клетках и соответственно в сыворотке больных СМТ возрастает со стадией заболевания и степенью злокачественности опухоли [11]. Неудивительно, что уровень VEGF может предсказывать появление метастазов и рецидивов у больных с мягкоткаными саркомами.

Исследование 115 больных СМТ различного гистогенеза показало, что концентрация VEGF в ткани, измеренная иммуноферментным методом, предсказывает появление метастазов и рецидивов сарком при однофакторном и многофакторном анализе [38].

Замечено, что веретенноклеточные саркомы имеют более низкую экспрессию VEGF (по иммуногистохимическим и иммуноферментным данным), чем злокачественные саркомы с эпителиоидным компонентом [20].

Мало известно об экспрессии ингибиторов ангиогенеза при СМТ. Исследование 5 больных саркомой показало отсутствие тромбоспондина, плазминогена и интерферона- α (ингибиторов ангиогенеза) в матриксе опухоли, но у больных был найден высокий уровень ингибитора матриксной металлопротеиназы I типа [35]. У больных миксофибросаркомой (в 7 из 7 случаев) была найдена мРНК тромбоспондина-1, тогда как ни у одного из 7 больных с липосаркомой мРНК тромбоспондина-1 определена не была [23]. У больных с СМТ наблюдался повышенный уровень эндостатина в сыворотке, причем повышенное количество эндостатина (более 55 нг/мл) ассоциировалось с повышенным риском появления метастазов после удаления первичной опухоли [10].

Таким образом, процесс ангиогенеза в мягкотканых саркомах требует дальнейшего изучения.

Имеется несколько исследований, посвященных изучению возможности использования антиангиогенной терапии при СМТ. В большинстве исследований показана высокая степень зависимости роста и метастазирования сарком от ангиогенеза и, в частности, от уровня VEGF.

Так, использование моноклональных антител против VEGF приводило к значительному подавлению роста экспрессирующих VEGF опухолевых клеток человека — рабдомиосаркомы A673 — при подкожной перевивке бестимусным мышам. Ингибитор рецептора к VEGF II типа — SU5416 — блокировал рост нейрогенных сарком у бестимусных мышей (уменьшение размеров опухолей составило около 50%) [1].

Отсутствие прогресса в улучшении лечения сарком требует разработки новых подходов к рациональному лечению этих опухолей. Понимание механизмов, задействованных в процессах прогрессирования опухолей мягких тканей, — один из возможных путей совершенствования методов прогноза СМТ и, соответственно, рационализации их лечения.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Angelov L., Sathia B., Roncari L. et al. // Cancer Res. — 1999. — Vol. 59. — P. 5536—5541.
2. Antonescu C. K., Leung D. H., Dudas M. et al. // Am. J. Pathol. — 2000. — Vol. 156. — P. 977—983.
3. Choong P. F., Akerman M., Willen H. et al. // APMIS. — 1994. — Vol. 102. — P. 915—924.
4. Cordon-Cardo C., Latres E., Drobnjak M. et al. // Cancer Res. — 1994. — Vol. 54. — P. 794—799.
5. Dan'ura T., Kawai A., Morimoto Y. et al. // Cancer Lett. — 2002. — Vol. 178, N 2. — P. 167—174.
6. Dei Tos A. P., Doglioni C., Piccinin S. et al. // J. Pathol. — 1997. — Vol. 181. — P. 8—13.
7. Dei Tos A. P., Doglioni C., Muffato R. et al. // Mod. Pathol. — 1999. — Vol. 12. — P. 10A.
8. Drobnjak M., Latres E., Pollack D. et al. // J. Natl. Cancer Inst. — 1994. — Vol. 86. — P. 549—554.
9. Emoto M., Iwasaki H., Ishiguro M. et al. // Hum. Pathol. — 1999. — Vol. 30. — P. 1232—1241.
10. Feldman A. L., Pak H., Yang J. C. et al. // Cancer. — 2001. — Vol. 91. — P. 1525—1529.
11. Graeven U., Andre N., Achilles E. et al. // J. Cancer Res. Clin. Oncol. — 1999. — Vol. 125. — P. 577—581.
12. Heslin M. J., Cordon-Cardo C., Lewis J. J. et al. // Cancer. — 1998. — Vol. 83. — P. 490—497.
13. Hisaoka M., Okamoto S., Morimitsu Y. et al. // Virchows Arch. — 1998. — Vol. 433. — P. 323—329.
14. Hoos A., Stojaldinovic A., Mastorides S. et al. // Cancer. — 2001. — Vol. 92. — P. 869—874.
15. Jensen V., Hoyer M., Sorensen F. B. et al. // Histopathology. — 1996. — Vol. 28, N 5. — P. 437—444.
16. Jensen V., Sorensen F. B., Bentzen S. M. et al. // Ibid. — 1998. — Vol. 32, N 6. — P. 536.
17. Kawai A., Noguchi M., Beppu Y. et al. // Cancer. — 1994. — Vol. 73. — P. 2499—2505.
18. Kawachi S., Fukuda T., Oda Y. et al. // Mod. Pathol. — 2000. — Vol. 13, N 7. — P. 755—765.
19. Konomoto T., Fukuda T., Hayashi K. et al. // Hum. Pathol. — 1998. — Vol. 29. — P. 74—81.
20. Kuhen C., Lehnhardt M., Tolnay E. et al. // J. Cancer Res. Clin. Oncol. — 2000. — Vol. 126. — P. 219—225.
21. Levine E. A., Holzmayer T., Bacus S. et al. // J. Clin. Oncol. — 1997. — Vol. 15. — P. 3249—3257.
22. Liapis H., Marley E. F., Lin Y., Dehner L. P. // Pediatr. Dev. Pathol. — 2001. — Vol. 2. — P. 377—384.
23. Mentzel T., Brown L. F., Dvorak H. F. et al. // Virchows Arch. — 2001. — Vol. 438. — P. 13—22.
24. Nakanashi H., Ohsawa M., Naka N. et al. // Oncology. — 1997. — Vol. 54, N 3. — P. 238—244.
25. Oda Y., Hashimoto H., Takeshita S., Tsuneyoshi M. // Cancer. — 1993. — Vol. 172. — P. 478—485.
26. Oda Y., Sakamoto A., Satino T. et al. // Mod. Pathol. — 2000. — Vol. 13, N 9. — P. 994—1004.
27. Ohsawa M., Tomita Y., Kuratsu S. et al. // Oncology. — 1995. — Vol. 52. — P. 51—54.
28. Pilotti S., Torre G. D., Lavarino C. et al. // J. Pathol. — 1997. — Vol. 181. — P. 14—24.
29. Reid A. H., Tsai M. M., Venzon D. J. et al. // Diag. Mol. Pathol. — 1996. — Vol. 5. — P. 65—73.
30. Saenz N., Heslin M., Adsay V. et al. // Ann. Surg. Oncol. — 1998. — Vol. 5. — P. 48—53.
31. Schneider-Stock R., Onnasch D., Haackel C. et al. // Virchow Archiv. — 1999. — Vol. 435. — P. 407—412.
32. Skjyting B. T., Bauer H. C., Perfekt R. et al. // Br. J. Cancer. — 1999. — Vol. 80. — P. 1809—1814.
33. Taubert H., Meys A., Wurl P. // Cancer Res. — 1996. — Vol. 56. — P. 4134—4136.

34. Toguchida J., Yamaguchi T., Ritchie B. et al. // *Ibid.* — 1992. — Vol. 52. — P. 6194–6199.
35. Tomilson J., Barsky S., Nelson S. et al. // *Clin. Cancer Res.* — 1999. — Vol. 5. — P. 3516–3522.
36. Ueda T., Aozasa K., Tsujimoto M. et al. // *Cancer.* — 1989. — Vol. 63. — P. 1607–1611.

37. Wurl P., Meye A., Schmidt H. // *Oncogene.* — 1998. — Vol. 16. — P. 1183–1185.
38. Yodoh K., Kanamori M., Ohmori K. et al. // *Br. J. Cancer.* — 2001. — Vol. 84. — P. 1610–1615.

Поступила 28.06.02 / Submitted 28.06.02

© Коллектив авторов, 2002

УДК 616.24-006.6-091.8

Н. А. Филиппова, А. Г. Перевошиков, А. А. Махарашвили,
Ю. А. Барсуков, В. И. Книш

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЛЕЧЕБНОГО ПАТОМОРФОЗА РАКА ПРЯМОЙ КИШКИ ПОСЛЕ ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ТЕРМОЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

НИИ клинической онкологии

Одним из перспективных методов комбинированного лечения больных раком прямой кишки является проведение предоперационного интенсивного крупнофракционного облучения в сочетании с локальной СВЧ-гипертермией. Применение гипертермического воздействия, по данным литературы [1–3, 6], повышает эффективность лучевой терапии и способствует улучшению отдаленных результатов лечения. В основе этого метода лежит положение об избирательном поражающем действии повышенной температуры на опухолевые клетки по сравнению с нормальными. Показано, что резистентность опухоли в основном определяется наличием в ней гипоксических клеток, которые при действии температурных режимов выше 40,5–41 °C оказываются наиболее чувствительными.

К числу основных критериев оценки эффективности предоперационной терморадии относятся изменения в опухоли на гистологическом и ультраструктурном уровнях, которые могут служить объективными показателями ее чувствительности к данному лечению. Работы, посвященные изучению действия СВЧ-гипертермии в сочетании с гамма-облучением на морфологическую структуру опухолей желудочно-кишечного тракта, немногочисленны [1, 4, 7] и не раскрывают в полном объеме специфических особенностей лечебного патоморфоза этих новообразований.

Целью настоящего исследования явилось определение на светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях степени выраженности лечебного патоморфоза в раковых опухолях прямой кишки разной гистологической структуры после предоперационной терморадии в зависимости от разных временных интервалов последующего оперативного вмешательства.

Материал и методы. Объектом гистологического исследования был послеоперационный материал 52 больных раком прямой кишки в возрасте от 30 до 69 лет. Дистанционная гамма-терапия проводилась на аппаратах «Рокс-М» и «Агат-Р» или линейных ускорителях, генерирующих энергию

N.A. Filippova, A.G. Perevoschikov, A.A. Makharashvili,
Yu.A. Barsukov, V.I. Knys

MORPHOLOGICAL ASPECTS OF THERAPEUTIC PATHOMORPHOSIS OF RECTAL CANCER AFTER PREOPERATIVE THERMORADIOTHERAPY

Institute of Clinical Oncology

Preoperative intensive large-fraction irradiation in combination with local micro-wave hyperthermia is a promising combination modality treatment for rectal cancer. As reported in the literature [1–3, 6], hyperthermia increases response to radiotherapy and improves follow-up results. This methodology is based on the assumption that high temperature produces a selective effect on tumor cells as compared to normal ones. Tumor resistance depends upon the presence of hypoxic cells that are most labile to high temperature (above 40.5–41 °C).

Histological and ultrastructural changes in the tumor, i.e. objective evidence of tumor sensitivity to treatment, are the principal test for efficacy of preoperative thermoradiotherapy. There are few reports on the effect of micro-wave hyperthermia in combination with gamma-irradiation on morphological structure of gastrointestinal tumors [1, 4, 7] that fail to describe in detail the specific features of radiation pathomorphosis in this tumor type.

The purpose of this study was to assess by light and electron microscopy degree of therapeutic pathomorphosis in rectal cancers of different histology as a result of preoperative thermoradiotherapy with respect to time to surgery.

Materials and Methods. The study was performed on surgical specimens from 52 patients with rectal cancer aged 30 to 69 years. Distant gamma-therapy was performed using a Pocus-M and an Agat-R units or linear accelerators generating 15 MeV braking radiation. The patients were exposed to radiation at a single dose 5 Gy for 5 days prior to surgery. Intracavitary micro-wave hyperthermia was given using Yakhta-3 and Yakhta-4 apparatus at 915 and 460 MHz electromagnetic oscillation frequencies for 60 min. Local hyperthermia was given immediately before radiotherapy (1–3 sessions depending upon individual sensitivity) prior to 2–5 irradiation sessions.

Specimens from 12 patients were also studied by electron microscopy. Tumor specimens from the central and peripheral segments and from normal rectal mucosa immediately adjacent to the tumor were embedded to EPON-812 by standard procedure to study in detail areas of interest after preliminary review of semi-thin sections. Study of tumor ultrastructure was made using a JEM-1200 EX-II (Japan) electron microscope. Biopsy specimens taken from the same tumors before treatment were used as control.

Results. Histological study discovered well differentiated adenocarcinoma in 8, moderately differentiated adenocarcinoma in 21,