

ИНДИВИДУАЛЬНЫЙ ПРОГНОЗ ПРИ ЛЕЙОМИОСАРКОМЕ ТЕЛА МАТКИ I И II СТАДИИ (ПО КРИТЕРИЯМ FIGO): КОМБИНИРОВАННАЯ БИОМОЛЕКУЛЯРНАЯ И КЛИНИКО- МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ 10-ЛЕТНЕЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ

А.Ф. Лазарев, А.М. Авдалян

*Алтайский краевой онкологический диспансер, г. Барнаул,
Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Барнаул
656049, г. Барнаул, ул. Никитина, 77; e-mail: ashot_avdalyan@mail.ru*

Проведено ретроспективное исследование 66 случаев лейомиосаркомы тела матки и перитуморозной зоны с известным прогнозом. При помощи регрессионного многофакторного анализа Кокса определили наиболее значимые прогностические клинико-морфологических и биомолекулярных критерии опухоли: ПМЦР перитуморозной зоны, плоидность опухолевых клеток, количество AgNORs, BrdU-метка опухолевых клеток, степень зрелости ангиогенеза опухоли, степень злокачественности по критериям FNCLCC, ядерная транслокация шаперона HSP70, уровень экспрессии Ki-67, рецепторный статус опухоли, стадия по FIGO, возраст, размер опухоли. В зависимости от степени риска неблагоприятного исхода по сумме баллов были сформированы 3 группы пациентов. Группа I характеризовалась благоприятным исходом – 83,5 % пациентов этой группы доживали до 10 лет, в группе III 5-летняя выживаемость составила 5,4 %, до 10 лет не дожила ни одна больная. Группа II занимала промежуточное положение. На основании стандартизованного подхода к анализу и установления различий в 10-летней выживаемости 3 групп риска при $\chi^2=41,9$, комбинированная модель индивидуальной выживаемости является предиктором прогноза при лейомиосаркоме тела матки.

Ключевые слова: лейомиосаркома тела матки, выживаемость, индивидуальный прогноз.

INDIVIDUAL PROGNOSIS FOR STAGE I-II UTERINE LEIOMYOSARCOMA (BY FIGO CLASSIFICATION): COMBINED BIOMOLECULAR AND CLINIC-MORPHOLOGICAL MODEL OF THE 10-YEAR SURVIVAL

A.M. Avdalyan, A.F. Lazarev

*Altai branch of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS, Barnaul
Altai Regional Cancer Center, Barnaul
77, Nikitina Street, 656049-Barnaul, Russia, e-mail: ashot_avdalyan@mail.ru*

The retrospective study of 66 cases with uterine leiomyosarcoma and peritumorous tissue with a known prognosis was carried out. The most significant prognostic clinical and morphological criteria and biomolecular characteristics of sarcoma (microvessel density (MVD) of peritumorous tissue, tumor cell ploidy, AgNORs quantity, BrdU-label of tumor cells, degree of maturity of tumor angiogenesis, grade of malignancy by FNCLCC, nuclear translocation HSP70, level of Ki-67 expression, tumor receptor status, FIGO stage, age and tumor size) were determined by the Cox regressive multifactor analysis. Three groups of patients were formed depending on the risk level of unfavorable outcome. Group I was characterized by a favorable outcome and 83,7 % of patients in this group survived up to 10 years. In group III patients, the 5-year survival rate was 5,4 %, and none of the patients survived 10 years. Group II occupied an intermediate position. Based on the standardized approach to the analysis and difference in the 10-year survival between 3 groups at $\chi^2=41,9$, the combined model of individual survival is a predictor of the prognosis and promotes definition of the patients with favorable and unfavorable outcomes for uterine leiomyosarcoma.

Key words: uterine leiomyosarcoma, survival, individual prognosis.

Лейомиосаркома тела матки (ЛМС) продолжает оставаться одной из малоизученных опухолей тела матки ввиду своей редкой встречаемости [3]. Частота ЛМС, по данным различных авторов, колеблется в диапазоне 1–1,3 %

от всех злокачественных неоплазий матки и 25–60 % от всех неэпителиальных опухолей этой локализации [7, 12, 13]. До настоящего времени ввиду сложности рандомизации продолжают дискуссии относительно важности целого ряда

клинико-морфологических и биомолекулярных критериев выживаемости при этой патологии, однако единого мнения относительно предиктора прогноза пока не существует [1, 10, 11]. Вместе с тем особый интерес исследователей в аспекте научно-практических знаний вызывает использование математических моделей прогноза, включающих данные об уровнях экспрессии различных молекулярных маркеров при неоплазиях различных локализаций с целью выделения групп больных с благоприятным и неблагоприятным исходом заболевания [6]. Тем не менее исследований о возможности индивидуального прогнозирования исхода при ЛМС, основанных на многофакторной комбинированной модели, в настоящее время нет.

Целью исследования стало использование многофакторного регрессионного анализа выживаемости больных ЛМС, включающего клинико-морфологические и биомолекулярные критерии для создания модели индивидуального прогнозирования.

Материал и методы

Ретроспективно исследовали 66 случаев ЛМС и перитуморозной зоны с известным прогнозом I–II стадии по критериям FIGO [4], полученных при оперативным вмешательствах с 1997 по 2009 г. Клинические данные получали из историй болезни и канцер-регистра Алтайского края.

Патоморфологическое исследование проводили по одинаковой схеме: вырезка из центра, периферии и непосредственно прилежащего к опухоли миометрия (на одном препарате). Препараты фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине, проводили через этиловые спирты восходящей концентрации, заливали в парафин. Готовили срезы 4 мкм. При патоморфологической диагностике, кроме рутинных, использовали иммуногистохимические и гистохимические методы окраски.

Для исследования НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ на замораживающем микро-томе готовили срезы толщиной 10–15 мкм. Свежезамороженные нефиксированные срезы инкубировали в субстрате соответствующего фермента: НАДН2-диафораза (IUBMB 1.6.99.1), сукцинатдегидрогеназа СДГ (IUBMB 1.3.99.1) и лактатдегидрогеназа ЛДГ (IUBMB 1.1.1.27).

Активность ферментов в гладкомышечных клетках оценивали количественным методом Р.П. Нарциссова, основанным на подсчете образованных в клетке видимых гранул формазана, при использовании п-нитротетразолия фиолетового в абсолютных цифрах. Кроме того, на свежемороженых нефиксированных срезах опухоли толщиной 30–40 мкм, окрашенных на щелочную фосфатазу по Гомори ЩФ (IUBMB 3.1.3.1), оценивали характер и степень выраженности реакции эндотелия сосудистого русла.

Для изучения аргирофильных белков области ядрышковых организаторов срезы окрашивали AgNO_3 по двухступенчатому методу Y. Daskal et al. (1980). Подсчет гранул вели на компьютерном анализаторе изображений в автоматическом режиме с помощью программы Image J 1.35. Кроме того, использовали просчет в ручном режиме. Оценивали среднее количество ядрышек на 1 ядро, их морфологический тип по морфофункциональной классификации ядрышек [5]. В классификации видов ядрышек и распределения нуклеолярного кластера гранул учитывали следующие типы [2]:

- нуклеолонемные, характерные для клеток зреющих, новообразованных, фактически недифференцированных;
- кольцевидные, характерные для зрелых клеток;
- переходные, характерные для вызревающих.

Для ИГХ реакции использовался стрептавидин-биотиновый метод с применением системы визуализации EnVision+Dual Link и BioGenex Super Sensitive Polymer-HRP Detection System, в обоих случаях использовали хромоген DAB. Первичные антитела к белкам Ki-67 (клон MIB-1), p53 (клон DO-7), Bcl-2 (клон MKA 124), BrdU (клон Bu20a), Topoisomerase II α (клон Ki-S), HSP70 (клон W27) использовали согласно рекомендованным протоколам и системам просчета производителя с оценкой активности (%) и степени экспрессии белков (полуколичественный метод).

Для определения плотности сосудов микроциркуляторного русла (ПМЦР) оценивали все сосуды микроциркуляции с позитивно окрашенным эндотелием к белку CD31 в не менее чем 3 полях зрения при увеличении $\times 200$, площадь

исследуемого объекта при этом составила 2,1 мм². Определяли сосудистую плотность как опухоли, так и перитуморозной зоны.

Рецепторный статус оценивали при помощи антител к прогестерону и эстрогену α по методике ER/PR pharmDx 2004 [8], а опухоль считали позитивной при сумме баллов не менее 3.

При морфоденситометрическом исследовании определяли площадь ядер исследуемых клеток и на основании оптической плотности объекта вычисляли содержание Фельген-ДНК ядер при эталоне в виде малых лимфоцитов (2с). Содержание ДНК в ядрах клеток определяли на компьютерном анализаторе изображений (микроскоп Zeiss AxioStar +, план объектив 100X/0,65, светофильтр 570 нм, цифровая интегрированная камера 2.1 MgPixel, компьютер Pentium DUO, с программой системы анализа изображения «Image J» 1.35, и «Image Tool» 3.0).

При помощи регрессионного многофакторного анализа Кокса определяли прогностическую значимость ряда клинко-морфологических

критериев и биомолекулярных характеристик саркомы с выделением наиболее значимых по параметру χ^2 . Для оценки индивидуального прогноза использовали комбинированную модель, предложенную I. Frank et al. [9]. При определении уровня значимости критерия использовали показатель средних (допороговых) величин. Статистическую гипотезу проверяли непараметрическими методами: однофакторным тестом Краскела–Уоллиса, U-тестом Манна–Уитни в рамках программы Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

При многофакторном регрессионном анализе выживаемости больных ЛМС были определены следующие значимые факторы прогноза (в порядке убывания показателя χ^2): ангиогенез и ПМЦР перитуморозной зоны (26,9), плоидность опухолевых клеток (25,9), количество AgNORs (17,6), BrdU-метка опухолевых клеток (15,2), степень зрелости ангиогенеза опухоли (15,1), степень злокачественности по критериям FNCLCC (14,1), ядерная транслокация шаперона HSP70 (11,2), уровень экспрессии Ki-67

Таблица 1

Влияние клинко-морфологических и биомолекулярных факторов на выживаемость больных ЛМС (по результатам многофакторного регрессионного анализа)

Фактор	χ^2	Стандартная ошибка	Различие (p)
Клинко-морфологический фактор			
Стадия по FIGO	9,4	0,5	0,002
Степень злокачественности по FNCLCC	14,1	0,7	0,00018
Возраст	6,1	1,1	0,0123
Размер опухоли	5,5	0,5	0,019
Гистотип опухоли*	3,7	1,4	0,058
Биомолекулярный фактор			
Ангиогенез перитуморозной зоны	26,9	0,4	0,00001
Плоидность	25,9	0,4	0,00002
Ангиогенез опухоли*	0,02	0,5	0,8
Количество AgNORs	17,6	0,5	0,0003
BrdU-метка	15,2	0,47	0,0002
Зрелость сосудов опухоли	15,1	0,51	0,0001
Тип реакции шаперона HSP70	11,2	1,6	0,008
Экспрессия Ki-67	10,2	0,49	0,001
Экспрессия p53*	1,5	16,1	0,2
Экспрессия Bcl-2*	0,7	42,1	0,9
Экспрессия TopoII*	0,2	10,1	0,5
Экспрессия РП	9,8	0,5	0,0012
Экспрессия РЭ*	3,5	0,47	0,06

Примечание: * – факторы, не имеющие значимого влияния на выживаемость.

Таблица 2

Клинико-морфологические и биомолекулярные маркеры в индивидуализации прогноза при ЛМС (по данным многофакторного анализа независимых критериев прогноза в балльной системе оценки факторов)

Маркер	Значения	Баллы
CD31 перитуморозной зоны*	До 62,4 в 2 мкм ²	0
	Более 62,4 в 2 мкм ²	9
Плоидность ядер*	До 9,4 с	0
	Более 9,4 с	9
Количество AgNORs**	До 22,1 гранулы	0
	Более 22,1 гранулы	3
BrdU активность**	До 6,3 %	0
	Более 6,3 %	3
Зрелость сосудов опухоли**	Преобладание зрелого ангиогенеза	0
	Преобладание незрелого ангиогенеза	3
Степень злокачественности по FNCLCC**	G ₁	0
	G ₂	2
	G ₃	3
HSP70 тип реакции (транслокация)**	Цитоплазматический, ядерно-цитоплазматический	0
	Ядерно-ядрышковый	3
Экспрессия Ki-67**	До 16,2 %	0
	Более 16,2 %	3
Торизомеразе II интенсивность**	+, ++	0
	+++	3
Рецепторный статус (по РП)**	Позитивно	0
	Негативно	3
Стадия FIGO**	I	0
	II	3
Размер опухоли**	До 7 см	0
	Более 7 см	3
Максимальное количество баллов	50	

Примечание: * – факторы, показатель χ^2 которых более 25; ** – факторы, показатель χ^2 которых менее 25.

Таблица 3

Скорректированная выживаемость больных ЛМС в зависимости от групп различной степени риска

Степень риска неблагоприятного прогноза	Выживаемость			Показатель χ^2
	3 года	5 лет	10 лет	
I (слабая)	92,9 ± 1,8 %	92,9 ± 3,4 %	83,7 ± 6,7 %	41,9 p=0,0000013
II (умеренная)*	68,4 ± 3,4 %	44,3 ± 5,7 %	14,7 ± 4,4 %	
III (высокая)*	10,8 ± 2,3 %	5,4 ± 1,7 %	0	

Примечание: * – группы со значимым различием.

(10,2), рецепторный статус опухоли (9,8), стадия по FIGO (9,4), возраст (6,1), размер опухоли (5,5). Часть факторов не обладала статистически значимым влиянием на прогноз и была исключена из алгоритма модели: гистологический тип, ангиогенез и ПМЦР опухоли, экспрессия p53, Bcl-2, Торо1а и рецепторов эстрогена (табл. 1).

Следует отметить, что независимым показателем выживаемости (предиктором прогноза) стала ПМЦР перитуморозной зоны. Поскольку, кроме ПМЦР, важнейшим фактором был параметр плоидности опухоли, то целесообразным было выделение 2 групп значимых критериев: с показателем χ^2 до 25 и с показателем χ^2 более 25. В связи со степенью влияния критериев на выживаемость для многофакторного анализа была введена балльная система оценки, где меньшему значению изучаемого фактора (до пороговому), как показателю благоприятного прогноза, присваивался 0, а при превышении порогового значения цифры были поделены согласно значимости критерия χ^2 на две группы (табл. 2):

1. В группе факторов χ^2 более 25 (максимальный балл – 9);
2. В группе факторов χ^2 до 25 (максимальный балл – 3).

В дальнейшем высчитывали общий суммарный балл для каждого случая лейомиосаркомы индивидуально каждому пациенту. Для выделения отдельных групп риска в просчете регрессионного анализа по Коксу и для возможности рандомизации было выделено 3 группы (по уровню диапазона баллов просчета) (табл. 3):

- I – от 0 до 20 баллов;
- II – от 21 до 40 баллов;
- III – более 40 баллов.

Анализ выживаемости каждой группы индивидуального прогноза показал статистически значимые различия в показателях 3-, 5- и 10-летней выживаемости в I, II и III группах (табл. 3). Исходя из высокой достоверности различий, стало возможным на основании комбинированной клинко-морфологической и биомолекулярной прогностической модели для больных ЛМС тела матки с самым высоким показателем χ^2 более 40 относительно отдельных факторов проводить оценку в баллах для каждого паци-

ента с выделением больной в соответствующую набранным баллам группу риска.

Проведенное исследование показало, что независимыми факторами прогноза при ЛМС тела матки были ПМЦР перитуморозной ткани и плоидность опухолевых клеток, причем прогностическим предиктором стала ПМЦР перитуморозной зоны. Немаловажными факторами были также (по мере убывания значимости): количество AgNORs, BrdU-метка, степень зрелости сосудов опухоли, степень злокачественности по критериям FNCLCC, ядерная транслокация шаперона HSP70, уровень экспрессии Ki-67, рецепторный статус опухоли, стадия по FIGO, возраст, размер опухоли. Все данные факторы являются основой комбинированной модели индивидуальной выживаемости с выделением 3 групп риска неблагоприятного прогноза. На основании стандартизованного подхода к анализу и установленных различий в 10-летней выживаемости 3 групп риска при $\chi^2=41,9$, $p=0,0000013$, что превысило значение ПМЦР практически в 2 раза, комбинированная клинко-морфологическая и биомолекулярная модель индивидуальной выживаемости является предиктором прогноза и способствует выделению пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходом при ЛМС тела матки. Использование данной модели возможно при формировании групп риска практически всех локализаций злокачественных неоплазий с корректировкой значимости факторов согласно локализации опухоли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдьян А.М., Бобров И.П., Лазарев А.Ф. и др. Прогностическая значимость определения степени злокачественности по системе FNCLCC и экспрессии белков-регуляторов клеточного цикла при лейомиосаркоме тела матки // Российский онкологический журнал. 2011. № 1. С. 17–20.
2. Арвеладзе Ю.Р., Приворотский В.Ф. Оценка функционального состояния эндотелиоцитов сосудов микроциркуляторного русла у белых крыс // Морфология. 2001. Т. 120, № 6. С. 27–29.
3. Завольская Ж.А., Кузнецов В.В., Лазарева Н.И. и др. Факторы прогноза и тактика лечения больных эндометриальными стромальными саркомами матки // Сибирский онкологический журнал. 2008. № 3. С. 16–20.
4. Козаченко В.П. Клиническая онкогинекология. М.: ОАО «Издательство Медицина», 2005. 376 с.
5. Челидзе П.В., Зацепина О.В. Морфофункциональная классификация ядрышек // Успехи современной биологии. 1988. Т. 105, № 2. С. 252–266.
6. Юрин А.Г., Ковальский Б.Г. Анализ выживаемости больных и модели прогноза при нематастическом светлоклеточном раке почек // Архив патологии. 2009. № 6. С. 15–20.
7. Echt G., Jepson J., Steel J. et al. Treatment of uterine sarcomas // Cancer. 1990. Vol. 66 (1). P. 35–39.

8. *ER/PR pharmDx*. Targeted therapies require targeted diagnostics. Denmark, 2004.
9. Frank I., Blute M.L., Cheville J.C. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score // *J. Urol.* 2002. Vol. 168 (2). P. 2395–2400.
10. Ghaemmaghami F., Karimi-Zarchi M., Zarchi M.K., et al. Uterine sarcoma: clinicopathological characteristics, treatment and outcome in Iran // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* Vol. 9 (3). P. 421–426.
11. Gokaslan H., Turkeri L., Kavak Z.N. et al. Differential diagnosis of smooth muscle tumors utilizing p53, pTEN and Ki-67 expression with estrogen and progesterone receptors // *Gynecol. Obstet. Invest.* 2005. Vol. 59 (1). P. 36–40.
12. Giuntoli R.L. 2nd, Metzinger D.S., DiMarco C.S. et al. Retrospective review of 208 patients with leiomyosarcoma of the uterus: prognostic indicators, surgical management, and adjuvant therapy // *Gynecol. Oncol.* 2003. Vol. 89 (3). P. 460–469.
13. Harry V.N., Narayansingh G.V., Parkin D.E. Uterine leiomyosarcomas: a review of the diagnostic and therapeutic pitfalls // *Obstet. Gynecol.* 2007. Vol. 9. Issue 2. P. 88–94.

Поступила 5.05.11