

*В. М. Нечушкина, В. В. Кузнецов, В. Н. Богатырев, Н. И. Лазарева,
К. Ю. Морхов, Т. И. Захарова*

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ДНК-ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРОМЕТРИИ ПРИ РАКЕ ТЕЛА МАТКИ

НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Статья посвящена анализу прогностического значения параметров ДНК-проточной цитофлуорометрии при раке тела матки. Изучена 5-летняя общая и безрецидивная выживаемость больных в зависимости от плоидности, индекса ДНК, содержания клеток в G0/G1, S- и G2+M-фазах клеточного цикла и индекса пролиферации опухоли. Представлены результаты многофакторного анализа риска прогрессирования РТМ. Наиболее значимыми независимыми факторами прогноза при РТМ являются индекс ДНК, степень дифференцировки опухоли, индекс пролиферации, гистологический тип опухоли и глубина инвазии миометрия (перечислены в порядке убывания коэффициента информативности).

Ключевые слова: рак тела матки, ДНК-проточная цитофлуорометрия, прогноз.

Рак тела матки (РТМ) занимает 4-е место в структуре заболеваемости женщин злокачественными новообразованиями. Это самая частая злокачественная опухоль женских половых органов [3; 13]. Заболеваемость РТМ в России неуклонно растет. С 1995 по 2002 г. она увеличилась на 19,1% и заняла по темпам прироста 5-е место [3].

Прогноз при РТМ и выживаемость больных во многом зависят от стадии заболевания, определенной на основании интраоперационных находок и результатов гистологического исследования. Помимо стадии к классическим факторам прогноза при РТМ относят степень дифференцировки и гистологический тип опухоли, глубину инвазии миометрия, возраст, переход опухоли на шейку матки, а также наличие метастазов. Реже учитывают такие факторы прогноза, как размеры опухоли, наличие раковых эмболов в лимфатических щелях, присутствие опухолевых клеток в смывах из брюшной полости, уровни рецепторов эстрогенов и прогестерона в опухоли, результаты ДНК-проточной цитофлуорометрии и исследование экспрессии некоторых онкогенов [11].

Опухолевые клетки несут многочисленные мутации. Они касаются прежде всего генов, регулирующих пролиферацию и апоптоз. Мутации могут приводить к значительному изменению количества ДНК. Прогностическое значение параметров ДНК-проточной цитофлуорометрии основано на зависимости между содержанием ДНК и степенью злокачественности опухоли. Диплоидные опухоли чаще всего ведут себя менее агрессивно, чем анеуплоидные [7]. Такая закономерность характерна для опухолей мочевого пузыря, предстательной железы, молочной железы, яичников, легкого [1; 4; 5; 9; 12]. Существует и обратная зависимость. Анеуплоидия прогности-

чески более благоприятна при нейробластоме [6; 10]. Помимо плоидности ДНК-проточная цитофлуорометрия позволяет получить точные данные о распределении опухолевых клеток по фазам клеточного цикла. Высокое содержание клеток в S- и G2+M-фазах свидетельствует о неблагоприятном прогнозе при многих злокачественных опухолях, в частности при раке мочевого пузыря и толстой кишки [8; 18].

Имеющиеся в литературе данные о прогностической роли плоидности и распределения клеток по фазам клеточного цикла при РТМ противоречивы [2; 14; 15]. Многочисленность уже известных независимых факторов прогноза (стадия по классификации FIGO, возраст, степень дифференцировки, глубина инвазии миометрия и т. д.) затрудняет оценку прогностической значимости параметров ДНК-проточной цитофлуорометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 102 больные РТМ I-IV стадий, получавшие лечение в ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН с 1997 по 2000 г. Средний возраст больных составил $59,7 \pm 0,8$ года (34—78 лет). Стадии РТМ по результатам послеоперационного гистологического исследования представлены в табл. 1. При послеоперационном гистологическом исследовании у 68 (66,7%) больных была выявлена аденокарцинома эндометрия, у 23 (22,5%) — аденокарцинома эндометрия имела участки плоскоклеточной метаплазии. У 11 (10,8%) больных были диагностированы прогностически неблагоприятные гистологические типы РТМ (папиллярный серозный, плоскоклеточный и светлоклеточный рак). Медиана периода наблюдения за больными составила 62 мес.

Методика ДНК-проточной цитофлуорометрии

Параметры ДНК-проточной цитофлуорометрии определены у всех больных, включенных в исследование. Диагносты подвергались двойному морфологическому контролю: цитологическому и гистологическому.

Таблица 1
Распределение больных РТМ по стадиям (FIGO, 1988 г.)^а

Стадия								
IA	IB	IC	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IVB
9 (8,8)	56 (54,9)	17 (16,6)	2 (2,0)	6 (5,9)	4 (3,9)	1 (1,0)	6 (5,9)	1 (1,0)

^а В скобках указаны проценты.

Исследование проводили на проточном цитофлуорометре «EPICS-XL» («Coulter», США). Полученные данные записывали в виде гистограмм и затем анализировали с помощью компьютерных программ «System II TM» (версия 3.0, «Coulter», США) и «MultiCycle» («Phoenix Flow Systems», США). Индекс ДНК (иДНК) вычисляли автоматически с помощью компьютерной программы «MultiCycle» («Phoenix Flow Systems», США): иДНК диплоидных клеток соответствовал 1,0, иДНК анеуплоидных клеток был больше или меньше 1,0.

Статистическая обработка данных

Вычисление и сравнение достоверности различий средних величин, а также сравнение достоверности различий частот событий (с использованием критерия Стьюдента) выполнялось с помощью пакета программ для компьютерного анализа «SAS». Параметры ДНК-проточной цитофлуорометрии в большинстве наблюдений подчинялись нормальному распределению, что позволило использовать для статистического анализа параметрический критерий Стьюдента. При числе наблюдений более 30 применялся также непараметрический анализ по Колмогорову—Смирнову. Статистический анализ и графику выполняли с помощью стандартного пакета «Statistica» (версия 5.0, «Statsoft Inc.», США).

Анализ кумулятивной выживаемости больных по методу Каплана—Мейера и сравнение достоверности различий этого показателя проводили с помощью программы «Survival», предоставленной Отделом статистики Онкологического центра М. Д. Андерсона (США). Достоверными считались различия с вероятностью не менее 95% ($p < 0,05$). Определение коэффициентов веса и информативности изучаемых признаков производилось по формуле Шеннона с помощью программы «АСТА», разработанной в лаборатории медицинской кибернетики РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.

Статистический анализ данных включал построение решающих правил по методу Байеса с использованием различных наборов признаков. Оценкой качества решающего правила служила частота правильного определения группы с учетом 95% доверительного интервала. Доверительные интервалы вычислялись с помощью биномиального распределения. Доверительный интервал для лучшего правила определялся по методу Бонферрони (метод учета многократных сравнений). Помимо этого вычислялись коэффициенты информативности Вапника—Червоненкиса. Для проверки достоверности различий значений признаков использовали тест 2 и точный критерий Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы проанализировали 5-летнюю общую (под общей выживаемостью мы подразумеваем только выживаемость,

определяемую основным заболеванием) и безрецидивную выживаемость больных РТМ в зависимости от изученных параметров ДНК-проточной цитофлуорометрии: плоидности опухоли, иДНК, числа клеток в G0/G1-, S- и G2+M-фазах клеточного цикла, а также индекса пролиферации. Пятилетняя общая выживаемость составила $80,0 \pm 4,4\%$, 5-летняя безрецидивная выживаемость — $76,7 \pm 4,6\%$.

Анеуплоидия существенно снижала 5-летнюю общую и безрецидивную выживаемость больных РТМ. При диплоидных опухолях 5-летняя общая и безрецидивная выживаемость составила $96,6 \pm 3,4$ и $93,1 \pm 4,7\%$, при анеуплоидных опухолях — $70,8 \pm 6,2$ и $67,7 \pm 6,4\%$ соответственно ($p < 0,05$).

Пятилетняя общая выживаемость больных РТМ при иДНК = 1,0 (диплоидные опухоли) составила $96,6 \pm 3,4\%$, при иДНК < 1,0 — $74,6 \pm 12,8\%$, при иДНК от 1,1 до 1,5 — $84,5 \pm 6,5\%$, при иДНК > 1,5 — только $15,0 \pm 12,8\%$. Статистически достоверное снижение выживаемости отмечено при иДНК > 1,5 при сравнении со всеми остальными группами. Пятилетняя безрецидивная выживаемость при иДНК < 1,0 составила $67,7 \pm 13,4\%$, при иДНК = 1,0 — $93,1 \pm 4,7\%$, при иДНК от 1,1 до 1,5 — $81,8 \pm 6,8\%$, при иДНК > 1,5 — $13,5 \pm 12,1\%$ ($p < 0,05$ при сравнении со всеми остальными группами).

Пятилетнюю общую выживаемость статистически достоверно снижало низкое содержание клеток в G₀/G₁-фазах клеточного цикла. Так, у больных с опухолями, содержащими более 90% таких клеток, 5-летняя общая выживаемость была $91,7 \pm 7,8\%$, 80-90% — $89,8 \pm 4,3\%$, менее 80% — $53,3 \pm 10,6\%$ ($p < 0,05$ при сравнении группы больных с опухолями, содержащими менее 80% клеток в G₀/G₁-фазах клеточного цикла, с двумя другими группами). Пятилетняя безрецидивная выживаемость больных с опухолями, содержащими более 90% клеток в G₀/G₁-фазах клеточного цикла, составила $83,3 \pm 10,8\%$, 80—90% — $87,9 \pm 4,6\%$, менее 80% — $49,6 \pm 10,6\%$ ($p < 0,05$ при сравнении с двумя другими группами).

Статистически достоверные различия были отмечены и при анализе 5-летней общей выживаемости больных РТМ в зависимости от числа клеток в S-фазе клеточного цикла. Так, 5-летняя общая выживаемость больных с опухолями, содержащими 6% и менее клеток в S-фазе клеточного цикла, была $94,4 \pm 5,4\%$, с опухолями, содержащими более 6% таких клеток, — $75,5 \pm 5,4\%$ ($p < 0,05$). Пятилетняя безрецидивная выживаемость больных с опухолями, содержащими 6% и менее клеток в S-фазе клеточного цикла, составила $84,3 \pm 8,4\%$, более 6% — $74,4 \pm 5,4\%$.

На 5-летнюю общую и безрецидивную выживаемость влияло также число клеток в G₂+M-фазах клеточного цикла. Пятилетняя общая выживаемость больных с опухолями, содержащими не более 10% таких клеток, соста-

вила $87,8 \pm 4,3\%$, более 10% — $63,7 \pm 9,3\%$ ($p < 0,05$). Статистически достоверные различия были получены и при анализе 5-летней безрецидивной выживаемости в зависимости от этого фактора прогноза. При опухолях, содержащих 10% и менее клеток в G2+M-фазах клеточного цикла, она составила $84,6 \pm 4,7\%$, более 10% клеток — $60,3 \pm 9,4\%$ ($p < 0,05$).

Наиболее точно пролиферативную активность отражает индекс пролиферации, представляющий собой сумму содержания клеток в S- и G2+M-фазах клеточного цикла. При индексе пролиферации более 25% 5-летняя общая выживаемость составила $48,2 \pm 12,4\%$ и была статистически достоверно ниже, чем при индексе пролиферации 18–25% ($79,8 \pm 8,1\%$) и менее 18% ($93,0 \pm 3,9\%$). Сходная картина была получена при анализе 5-летней безрецидивной выживаемости. При индексе пролиферации менее 18% она составила $88,0 \pm 4,6\%$, 18–25% — $77,4 \pm 10,0\%$, более 25% — $43,1 \pm 12,3\%$ ($p < 0,05$ при сравнении группы больных с индексом пролиферации более 25% с остальными группами).

Таким образом, и общая, и безрецидивная 5-летняя выживаемость больных РТМ зависела от плоидности опухоли, иДНК, распределения клеток по фазам клеточного цикла, а также от индекса пролиферации. Неблагоприятными факторами прогноза, приводящими к статистически достоверному снижению 5-летней общей выживаемости, являлись анеуплоидия опухоли, иДНК $> 1,5$, содержание в опухоли менее 80% клеток в G0/G1-фазах клеточного цикла, более 6% клеток в S-фазе клеточного цикла и более 10% клеток в G2+M-фазах клеточного цикла, а также индекс пролиферации более 25%. Эти же факторы, за исключением числа клеток в S-фазе клеточного цикла, приводили к статистически достоверному снижению 5-летней безрецидивной выживаемости. Повышение пролиферативной активности указывает на более агрессивное биологическое поведение опухоли и объясняет снижение выживаемости больных.

Нами проведен многофакторный анализ риска прогрессирования РТМ. Наиболее значимыми независимыми факторами прогноза являются иДНК, степень дифференцировки опухоли, индекс пролиферации, гистологический тип опухоли и глубина инвазии миометрия (рис. 1). Самый высокий коэффициент информативности отмечен у иДНК. Он равен 0,173. Коэффициенты информативности остальных факторов прогноза составляют 0,095 для степени дифференцировки, 0,089 для гистологического типа опухоли, 0,080 для индекса пролиферации и 0,068 для глубины инвазии.

Нами проведен также анализ риска прогрессирования РТМ с использованием только параметров ДНК-проточной цитофлуорометрии. При этом выбраны лишь те параметры, которые являлись независимыми факторами прогноза. Как уже отмечалось выше, это иДНК и индекс пролиферации опухоли. Показано, что с вероятностью 79,4% можно ожидать прогрессирование РТМ у больных с иДНК опухоли более 1,5, а также у больных с анеуплоидными опухолями и индексом пролиферации более 25%. Наиболее высокий риск прогрессирования имеется у больных с иДНК опухоли более 1,5 и индексом пролиферации более 25%.

Возможность проведения ДНК-проточной цитофлуорометрии при РТМ на доклиническом этапе обследования,

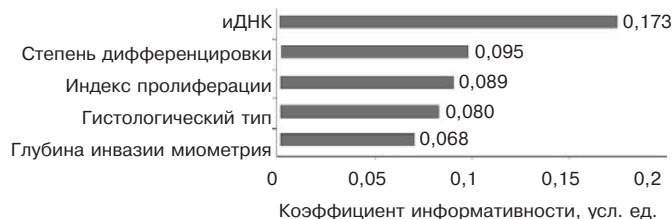


Рисунок 1. Информативность факторов прогноза при РТМ.

о которой пишут ряд авторов [16; 17], позволяет по-новому взглянуть на эти данные. Если у больной при исследовании аспирата из полости матки выявлена опухоль с высокими иДНК и индексом пролиферации, то у нее с вероятностью 79,4% в будущем разовьется прогрессирование. Оно может быть связано с субклиническими метастазами в лимфатические узлы, прогностически неблагоприятным гистологическим типом РТМ (который часто выявляется только при послеоперационном гистологическом исследовании), наличием диссеминации по брюшине или раковых эмболов в лимфатических щелях. В любом случае ДНК-проточная цитофлуорометрия позволяет предсказать неблагоприятный исход и индивидуально планировать лечение. Поскольку частота опухолей с иДНК $> 1,5$, а также анеуплоидных опухолей с индексом пролиферации более 25%, по данным нашего исследования, составляет 22,5% (23 из 102 больных), ДНК-проточная цитофлуорометрия позволяет выделить группу больных РТМ с достаточно высоким риском прогрессирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Неблагоприятными факторами прогноза, приводящими к статистически достоверному снижению 5-летней общей выживаемости при РТМ, являются анеуплоидия, иДНК $> 1,5$, содержание в опухоли менее 80% клеток в G0/G1-фазах клеточного цикла, более 6% клеток в S-фазе клеточного цикла и более 10% клеток в G2+M-фазах клеточного цикла, а также индекс пролиферации более 25%. Наиболее значимыми независимыми факторами прогноза при РТМ являются иДНК, степень дифференцировки опухоли, индекс пролиферации, гистологический тип опухоли и глубина инвазии миометрия (перечислены в порядке убывания коэффициента информативности). С вероятностью 79,4% можно ожидать прогрессирование РТМ у больных с иДНК опухоли более 1,5, а также у больных с анеуплоидными опухолями и индексом пролиферации более 25%. Частота таких прогностически неблагоприятных сочетаний при РТМ составляет 22,5%. Наиболее высокий риск прогрессирования имеется у больных с иДНК опухоли более 1,5 и индексом пролиферации более 25%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богатырев В. Н. Значение количественных методов исследования (морфометрии, проточной цитофлуорометрии, сканирующей морфометрии) в клинической онкоцитологии: Дис... д-ра мед. наук. — М., 1991. — 426 с.
2. Бычкова Н. В., Мешкова И. Е., Пожарисский К. М. Сравнительное исследование плоидности и пролиферации эпителиальных злокачественных опухолей разной локализации (проточная цитометрия) // Вопр. онкол. — 1998. — Т. 44, №1. — С. 54—59.
3. Давыдов М. И., Аксель Е. М. Злокачественные новообразова-

ния в России и странах СНГ в 2002 г. — М.: МИА, 2004. — С. 279.

4. Мустя А. И. Изучение факторов прогноза при раке мочевого пузыря: Дис... канд. мед. наук. — М., 1995. — 143 с.

5. Паниченко И. В. Факторы прогноза у больных раком яичников: Дис... канд. мед. наук. — М., 1998. — 120 с.

6. Askin F. B., Perlman E. J. Neuroblastoma and peripheral neuroectodermal tumors // *Am. J. Clin. Pathol.* — 1998. — Vol. 109, N 4 (suppl. 1). — P. 23—30.

7. Auer G. U., Falkner U. G., Zetterberg A. G. Image cytometric nuclear DNA analysis in clinical tumor material // *Manual of Quantitative Pathology in Cancer Diagnosis and Prognosis.* — Berlin: Heidelberg, Springer Verlag, 1991. — P. 213—232.

8. Bauer K. D., Bagwell C. B., Giaretti W. Consensus review of the clinical utility of DNA flow cytometry in colorectal cancer // *Cytometry.* — 1993. — Vol. 14, N 5. — P. 486—491.

9. Haghighi M., McCue P. A., Mansfield C. M. Correlation of flow cytometry to clinical factors, hormone receptors, and histopathological grade in stage I and II invasive breast carcinoma // *Am. J. Clin. Oncol.* — 1996. — Vol. 19, N 1. — P. 54—58.

10. Herman C. J. Cytometric DNA analysis in the management of cancer. Clinical and laboratory considerations // *Cancer.* — 1992. — Vol. 69, N 6 (suppl.). — P. 1553—1556.

11. Homesley H. D. Epithelial Uterine Tumors // Shingleton H., Fowler W., Jordan J. et al. (eds.). *Gynecologic Oncology: Current Diagnosis and Treatment.* — W. B. Saunders, 1996. — P. 146—156.

12. Jeanfaivre T., Chassevent A., Larra F. Contribution of flow cytometry in the prognostic evaluation of non-small-cell lung cancers // *Bull. Cancer Paris.* — 1994. — Vol. 81, N 7. — P. 605—609.

13. Jemal A., Timari R., Murray T. et al. Cancer statistics, 2004 // *CA Cancer J. Clin.* — 2004. — Vol. 54, N 1. — P. 8—29.

14. Lindahl B., Willen R. Flow cytometrical comparison of different nuclear preparation methods upon number of DNA populations and S phase fraction using fresh and formalin-treated normal endometrial tissue // *In Vivo.* — 1995. — Vol. 9, N 3. — P. 207—210.

15. Pfisterer J., Kommoss F., Sauerbrei W. Prognostic value of DNA ploidy and S-phase fraction in stage I endometrial carcinoma // *Gynecol. Oncol.* — 1995. — Vol. 58, N 2. — P. 149—156.

16. Rapi S., Caldini A., Fanelli A. Hypothesis of clinical use of preoperative evaluation of DNA-index in endometrial carcinoma management // *Eur. J. Histochem.* — 1997. — Vol. 41 (suppl. 2). — P. 143—144.

17. Susini T., Rapi S., Massi D. Preoperative evaluation of tumor ploidy in endometrial carcinoma: An accurate tool to identify patients at risk for extrauterine disease and recurrence // *Cancer.* — 1999. — Vol. 86, N 6. — P. 1005—1012.

18. Wheelless L. L., Badalament R. A., de Vere White R. W. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in bladder cancer. Report of the DNA Cytometry Consensus Conference // *Cytometry.* — 1993. — Vol. 14, N 5. — P. 478—481.

Поступила 01.11.2005

V. M. Nechushkina, V. V. Kuznetsov, V. N. Bogatyrev, N. I. Lazareva, K. Yu. Morkhov, T. I. Zakharova

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF FLOW CYTOMETRY PARAMETERS IN ENDOMETRIAL CANCER

Institute of Clinical Oncology, N. N. Blokhin RCRC RAMS, Moscow

This paper is devoted to prognostic significance of flow cytometry parameters in endometrial cancer. Five-year overall and disease-free survival depending on ploidy, DNA index, cells quantity in G0/G1-, S- and G2+M and proliferative index were studied. Results of multivariate analysis of endometrial cancer progression are presented. The most significant independent factors influencing prognosis for disease progression were iDNA, grade, proliferative index, histologic type, myometrial invasion (in descending order).

Key words: endometrial cancer, flow cytometry, prognosis.