

УДК 618.11-006.6-091.8

**КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА И МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ
ПРОГНОЗА РАКА ЯИЧНИКОВ**

А.В. Шульга; С.А. Ляликов, к.м.н., доцент; В.А. Басинский, д.м.н., профессор
УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Проведено морфологическое исследование 69 овариальных карцином различного гистологического строения. Во всех случаях были определены экспрессия E-кадгерина, β -катенина, циклинов B1 и D1, p53 и c-erbB-2 онкопротеинов, рецепторов к прогестерону и эстрогенам. С помощью методов математического моделирования изучена значимость комплекса клинико-морфологических и иммуногистохимических показателей для прогнозирования риска появления метастазов и общей выживаемости больных после операции.

Ключевые слова: рак яичников, иммуногистохимия, E-кадгерин, β -катенин, циклин B1, циклин D1, p53 и c-erbB-2 онкопротеины, рецепторы к прогестерону и эстрогенам, прогноз.

Morphological investigation of 69 cases of ovarian carcinoma of various histological types was carried out. Expression of E-cadherin, β -catenin, cyclin B1 and D1, p53, c-erbB-2 oncoproteins, estrogen and progesterone receptors was investigated in all cases. Mathematical models for prognosis of the general survival period after operation and occurrence of metastases were constructed taking into account clinico-morphological parameters and level of markers expression.

Key words: ovarian cancer, immunohistochemistry, E-cadherin, β -catenin, p53, c-erbB-2 oncoproteins, cyclin B1, cyclin D1, estrogen and progesterone receptors, prognosis.

Введение

Рак яичников (РЯ) занимает шестое место по частоте среди злокачественных новообразований у женщин и составляет 4-6% от их общего объема. Ежегодно в мире регистрируется более 200 тыс. новых случаев овариальных карцином, при этом 5-летняя выживаемость у таких больных даже при высоком уровне медицинской помощи составляет около 40% [8]. Согласно эпидемиологическим исследованиям, в настоящее время отмечается отчетливая тенденция к росту заболеваемости женщин злокачественными опухолями яичников [1], так в Республике Беларусь за последние 35 лет она увеличилась практически в 2 раза [5]. Таким образом, углубление знаний о патогенезе РЯ является актуальной задачей, поскольку будет способствовать совершенствованию методов диагностики и лечения.

Стандартным способом исследования роли клеточных поломок в прогрессии опухоли является оценка их связи с метастатическим потенциалом новообразования и продолжительностью жизни больного. К настоящему времени накоплено большое количество данных о морфологических и иммуногистохимических (ИГХ) особенностях РЯ, однако в большинстве работ, посвященных этой теме, отсутствует комплексный подход, необходимый для оценки биологической агрессивности опухоли [6]. Как правило, исследуется патогенетическая значимость только отдельных факторов без учета характера их взаимосвязи. Вероятно, поэтому такие характеристики, как клиническая стадия, размер остаточной опухоли после циторедуктивной операции, степень злокачественности, гистологический тип овариальной карциномы имеют прогностическое значение [11], но используемые по отдельности, не позволяют с достаточной точностью оценить риск метастазирования и возможную продолжительность безрецидивного течения болезни у больных [10]. По данным литературы, для определения клинического прогноза могут быть полезны показатели, выявляемые ИГХ методами [2], среди них такие, как адгезивные молекулы, онкопротеины p53 и c-erbB-2, рецепторы прогестерона (РП) и эстрогенов (РЭ), а также регуляторы клеточного цикла, в частности, циклины B1 и D1. Вместе с тем, литературные данные об их патогенетической роли и направленности связи с клиническими характеристиками весьма противоречивы [3, 9].

Комплексная оценка значимости отдельных факторов для прогноза течения РЯ с использованием методов многофакторного анализа может в значительной степени объективизировать представления об их патогенетической роли [4].

Цель исследования: провести комплексный анализ значимости клинико-морфологических и ИГХ характеристик РЯ в оценке прогноза новообразования с помощью методов математического моделирования.

Материал и методы

Исследование выполнено на архивном гистологическом материале 69 больных, оперированных по поводу РЯ в период с 1999 по 2002 гг. Критерием отбора послужили максимально приближенные стандартные схемы оперативного и адьювантного лечения. Наиболее частым гистологическим типом РЯ был серозный (49), в 8 наблюдениях выявлена эндометриоидная аденокарцинома, в 7 случаях – светлоклеточный рак, а в 5 – муцинозный вариант новообразования. При этом в 14 наблюдениях степень дифференцировки рака была отнесена к G1, в 35 – к G2, а в 20 – к G3. Первая стадия, согласно классификации FIGO, была установлена у 15 женщин, вторая – у 12, а генерализация процесса наблюдалась в 42 случаях (третья стадия – 37, четвертая – 5). Анализ гистологических срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по ван Гизону проводился согласно классификации ВОЗ.

ИГХ исследование проводили на серийных парафиновых срезах с использованием антител (Ат) фирмы DakoCytomation. Оценка экспрессии молекул клеточной адгезии (E-кадгерина, β -катенина) проводилась по методике, предложенной С. Gamallo с соавторами [7]. Заключение о наличии ядерной и (или) цитоплазматической гиперэкспрессии циклинов B1, D1 и мутантного типа p53 (mt p53) делалось в случае окрашивания более чем 10% опухолевых клеток. Подсчет мембранной экспрессии c-erbB-2 проводили согласно балльной системе HerceptestTM. Анализ экспрессии РП и РЭ проводился с помощью метода, предложенного W. Remelle с соавторами [12].

Статистическая обработка проводилась с использованием стандартного пакета прикладных программ Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования выявлена значительная морфологическая гетерогенность РЯ, касающаяся гистологических вариантов, степени дифференцировки, стромально-паренхиматозных взаимоотношений, выраженности некрозов, кровоизлияний, лимфоплазмоцитарной инфильтрации, морфометрических параметров ядер. Оценка прогностического значения морфологических параметров показала, что практическое их применение ограничено определенным гистологическим вариантом, клинической стадией и другими признаками овариальных карцином. В частности, при I–II клинических стадиях наибольший процент больных, проживших более 5-ти лет, был в группе с эндометриоидным и муцинозным вариантами РЯ, а наименьший – при светлоклеточном гистологическом строении новообразований ($\chi^2=11,8$, $p=0,008$). При I–II клинических стадиях серозного РЯ низкая степень дифференцировки, меньшая площадь стромы в первичной опухоли сопровождалась снижением 5-летней выживаемости больных ($\chi^2=7,1$, $p=0,029$, $Z=-2,0$, $p=0,045$, соответственно). В эндометриоидных опухолях большая площадь некрозов была ассоциирована с ростом их метастатического потенциала ($H=3,9$, $p=0,049$).

Данные ИГХ исследования показали, что в опухолевых клетках серозного гистологического варианта низкой степени дифференцировки распространенность и интенсивность экспрессии E-кадгерина статистически значимо ниже, чем в высокодифференцированных опухолях ($H=10,3$, $p=0,006$; $H=6,3$, $p=0,043$, соответственно). У пациентов с серозным РЯ при наличии регионарных и отдаленных метастазов определялась более низкая экспрессия E-кадгерина и β -катенина ($U=2,0$, $p=0,0004$; $U=44,0$, $p=0,029$, соответственно), чем при их отсутствии. Общая и безрецидивная выживаемость была достоверно связана с суммарной экспрессией E-кадгерина в первичной серозной опухоли ($Z=-3,4$, $p=0,0006$; $Z=-3,5$, $p=0,0005$, соответственно): низкой выживаемости сопутствовало угнетение экспрессии. Наличие β -катенина в ядрах клеток опухолей эндометриоидного гистологического строения свидетельствует об относительно благоприятном прогнозе заболевания.

При III–IV клинических стадиях серозного РЯ выявлены более высокие значения экспрессии циклина D1, чем при I–II ($U=113,5$, $p=0,012$). Наличие ядерной гиперэкспрессии циклина D1 в клетках сопряжено с низкой общей выживаемостью ($Z=2,3$, $p=0,023$). Уровень экспрессии циклина B1 в высокодифференцированных серозных опухолях III–IV клинических стадий был достоверно выше, чем в низкодифференцированных ($H=5,8$, $p=0,049$).

Повышение уровня экспрессии mt p53 существенно чаще обнаруживалось при наличии метастазов карциномы ($U=49,5$, $p=0,046$) и сочеталось со снижением общей выживаемости у больных серозным РЯ ($Z=2,2$, $p=0,027$).

Гиперэкспрессия c-erbB-2 при серозном варианте РЯ сопровождалась снижением как общей, так и безрецидивной выживаемости ($Z=2,2$, $p=0,026$; $Z=2,2$, $p=0,029$, соответственно). При эндометриоидном и светлоклеточном гистологическом строении новообразования данный маркер не имел прогностической ценности.

Отсутствие или низкий уровень экспрессии РП в опухоли при серозном РЯ были характерны для больных с низкой общей и безрецидивной выживаемостью ($Z=-2,49$, $p=0,013$; $Z=-2,66$, $p=0,008$, соответственно).

Комплексная оценка значимости влияния клинико-морфологических и ИГХ факторов на показатели выжи-

ваемости и метастатический потенциал проводилась с помощью регрессионного и дискриминантного анализов. Исходно, в качестве независимых переменных были использованы 17 факторов: степень дифференцировки рака (G), клиническая стадия (использовалась только для расчета ожидаемой продолжительности жизни), процент положительно окрашенных клеток и интенсивность реакции с Ат к РП, РЭ, E-кадгерину, β -катенину, интенсивность экспрессии циклинов B1 и D1 в ядре и цитоплазме, процент положительно окрашенных клеток и интенсивность реакции с Ат к mt p53, и интенсивность экспрессии c-erbB-2.

Исследование связи между ожидаемой продолжительностью жизни больных РЯ и независимыми переменными производилось с помощью множественного регрессионного анализа (метод Backward stepwise). В результате было установлено, что 6 факторов, приведенных в таблице 1, описывают 61% дисперсии зависимой переменной (ожидаемой продолжительности жизни). Полученная регрессионная модель характеризуется следующими показателями: множественный коэффициент корреляции равен 0,78 ($R^2=0,61$), $F=15,91$, $p=6*10^{-11}$, стандартная ошибка оценки равна 19,73.

Таблица 1 – Статистическая характеристика независимых переменных, включенных в регрессионную модель

Независимые переменные	B	Std. Err.	t	p
Константа	77,47	11,09	6,98	$2*10^{-9}$
Клиническая стадия (FIGO)	-19,55	2,93	-6,67	$8*10^{-9}$
Интенсивность экспрессии циклина B1 в цитоплазме	2,85	2,02	1,41	0,16
Интенсивность экспрессии циклина D1 в ядре	-9,68	3,13	-3,09	0,003
Процент клеток, экспрессирующих ?-катенин	2,92	2,43	1,2	0,23
Процент клеток, экспрессирующих РП	4,72	2,32	2,03	0,04
Интенсивность экспрессии c-erbB-2	-6,01	2,73	-2,19	0,03

Чтобы рассчитать ожидаемую продолжительность жизни больных РЯ, необходимо подставить в приведенную ниже формулу вместо переменных m_1, m_2, \dots, m_6 их значения для анализируемого случая:

$$Y = 77,47 - 19,55 m_1 + 2,85 m_2 - 9,68 m_3 + 2,92 m_4 + 4,72 m_5 - 6,01 m_6$$

где: Y – ожидаемая продолжительность жизни в месяцах; m_1 – клиническая стадия; m_2 – интенсивность экспрессии циклина B1 в цитоплазме; m_3 – интенсивность экспрессии циклина D1 в ядре; m_4 – процент клеток, экспрессирующих β -катенин; m_5 – процент клеток, экспрессирующих РП; m_6 – интенсивность экспрессии c-erbB-2 в клеточных мембранах.

Приведенная модель наглядно демонстрирует, какие факторы наиболее тесно связаны с продолжительностью жизни больных РЯ. Величина коэффициента говорит о том, на сколько месяцев изменится продолжительность жизни при изменении фактора на 1 единицу, знак перед коэффициентом показывает, в каком направлении произойдет изменение (минус – уменьшение, плюс – увеличение).

Оценка метастатического потенциала производилась с помощью дискриминантного анализа. Метод Backward stepwise позволил выделить из 17 исходных факторов 11 наиболее значимых. Для расчета риска возникновения

метастазов необходимо подставить в приведенные ниже формулы вместо переменных m_1, m_2, \dots, m_{11} их значения для анализируемого случая:

$$y_1 = -1,48 m_1 + 1,94 m_2 + 1,36 m_3 + 0,28 m_4 + 4,37 m_5 + 0,19 m_6 + 0,70 m_7 - 1,02 m_8 + 0,32 m_9 + 1,28 m_{10} + 0,55 m_{11} - 13,35$$

$$y_2 = -0,89 m_1 + 2,31 m_2 - 0,53 m_3 + 0,95 m_4 + 0,98 m_5 + 0,92 m_6 - 0,62 m_7 - 1,52 m_8 - 1,32 m_9 + 2,04 m_{10} + 1,55 m_{11} - 8,82$$

где: m_1 – экспрессия циклина В1 в ядре; m_2 – экспрессия циклина В1 в цитоплазме; m_3 – экспрессия циклина D1 в ядре; m_4 – экспрессия циклина D1 в цитоплазме; m_5 – процент клеток, экспрессирующих Е-кадгерин; m_6 – интенсивность реакции с Ат к РП; m_7 – процент клеток, экспрессирующих РП; m_8 – интенсивность реакции с Ат к РЭ; m_9 – процент клеток, экспрессирующих РЭ; m_{10} – интенсивность реакции с Ат к mt p53; m_{11} – величина экспрессии c-erbB-2 в клеточных мембранах.

Окончательное заключение дается на основании сравнения вычисленных показателей y_1 и y_2 : если $y_1 > y_2$, то риск возникновения метастазов минимальный, а если $y_1 \leq y_2$ – риск возникновения метастазов высокий. Чем больше различие y_1 и y_2 , тем выше достоверность прогноза.

Результаты использования этой модели для прогнозирования риска возникновения метастазов у больных РЯ представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результат испытания разработанной модели

Данные анамнеза	Положительный прогноз	Отрицательный прогноз	Всего
Метастазы образовались	55	1	56
Метастазы отсутствовали	1	12	13
Всего	56	13	69

При оценке качества модели методами доказательной медицины было установлено, что ее чувствительность составляет 98,21%, специфичность – 92,31%, прогностическая ценность положительного результата – 98,21%, прогностическая ценность отрицательного результата – 92,31%, отношение правдоподобия – 12,77.

Данная модель хорошо визуализирует вклад каждого из отобранной совокупности значимых факторов в метастатический потенциал опухоли: если коэффициент, стоящий перед переменной во 2-м уравнении больше, чем коэффициент этой же переменной в 1-м уравнении, значит, этот фактор способствует метастазированию; чем больше различие, тем сильнее связь.

Таким образом, математические модели, построенные для прогнозирования развития метастазов и общей выживаемости больных РЯ на основании клинико-морфологических параметров и уровня экспрессии изучен-

ных ИГХ маркеров, характеризуются достаточной надежностью, позволяют с высокой точностью предсказать ожидаемую продолжительность жизни больных после оперативного лечения и метастатический потенциал опухоли, а также дают возможность оценить роль отдельных факторов, совместно принимающих участие в патогенезе опухолевого роста.

Добавление в обязательную ИГХ панель, определяемую в операционном материале больных РЯ, факторов, характеризующих адгезивные свойства опухолевых клеток, белков, принимающих участие в клеточном цикле, гормональных рецепторов позволяет объективизировать оценку биологического потенциала злокачественного новообразования.

Литература

1. Антонеева, И.И. Анализ срока жизни больных раком яичников в Ульяновской области, 1999-2005 гг. / И.И. Антонеева // Вопросы онкологии – 2007. – Т. 53, № 4. – С. 393–395.
2. Введение в молекулярную биологию канцерогенеза: учеб. пособие / А.А. Новик [и др.] ; под ред. Ю.Л. Шевченко. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 224 с.
3. Новичков, Е.В. Зависимость прогноза рака яичников от экспрессии рецепторов к половым гормонам и пролиферативной активности опухолевых клеток / Е.В. Новичков, А.А. Вотинцев // Архив патологии. – 2006. – № 2. – С. 10–13.
4. Новичков, Е.В. Способ прогнозирования продолжительности жизни больных серозной карциномой яичника в климактерическом периоде и постменопаузе / Е.В. Новичков // Вятский мед. вестник – 2005. – № 3-4. – С. 52–56.
5. Поляков, С.М. Злокачественные новообразования в Беларуси 1997–2006гг. / С.М. Поляков, Л.Ф. Левин, Н.Г. Шебеко; под ред. А.А. Граковича [и др.]. – Минск : БелЦМТИУЭ, 2007. – 198 с.
6. Bast, R.J. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation / R.J. Bast, B. Hennessy, G. Mills // Nat. Rev. Cancer. – 2009. – Vol. 9, № 6. – P. 415–426.
7. Beta-catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas: relationship with beta-catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome. / C. Gamallo [et al.] // Am. J. Pathol. – 1999. – Vol. 155, № 5. – P.527–536.
8. Cancer Statistics, 2008 / A. Jemal [et al.] // CA Cancer J. Clin. – 2008. – Vol. 58. – P. 71–96.
9. C-erbB-2, p53, and nm23 proteins as prognostic factors in patients with epithelial ovarian carcinoma / S. Tomic [et al.] // Croat. Med. J. – 2003. – Vol. 44 – P. 429–434.
10. Histological grading in a large series of advanced stage ovarian carcinomas by three widely used grading systems: consistent lack of prognostic significance / S. Kommos [et al.] // Virchows Arch. – 2009. – Vol. 454, № 3. – P. 249–256.
11. Ochiai, K. Prognostic factors of ovarian cancer / K. Ochiai / Gan To Kagaku Ryoho. – 2006 – Vol. 33. – P. 2014–2019.
12. Remmele, W. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue / W. Remmele, H.E. Stegner // Pathologie. – 1987. – Vol. 8, № 3. – P. 138–140.

Поступила 27.01.10