

**КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ КЛИНИКО-
МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ**

УО «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно, Беларусь

Проведено морфологическое и иммуногистохимическое исследование 69 овариальных карцином различных гистологических вариантов. Во всех случаях были определены степень дифференцировки опухоли, стадия, согласно классификации FIGO, а также экспрессия Е-кадгерина, β -катенина, циклинов В1 и D1, p53 и c-erbB-2 онкопротейнов, рецепторов к прогестерону и эстрогенам. С помощью регрессионного и дискриминантного анализов изучена значимость комплекса клинико-морфологических и иммуногистохимических показателей для прогнозирования длительности безрецидивного течения и 5-летней выживаемости больных после операции.

Ключевые слова: рак яичников, иммуногистохимия, прогноз выживаемости.

Введение

Рак яичников (РЯ) занимает шестое место по частоте среди злокачественных новообразований у женщин [1]. Ежегодно в мире регистрируется более 200 тыс. новых случаев овариальных карцином, а в связи с тем, что 5-летняя выживаемость у больных РЯ даже при высоком уровне медицинской помощи составляет около 40% [11] – более 100 тыс. женщин каждый год умирают от данной патологии [5]. Согласно эпидемиологическим исследованиям в Республике Беларусь, за последние 35 лет заболеваемость РЯ увеличилась практически в 2 раза [15]. Таким образом, углубление знаний о морфогенезе и особенностях прогрессии РЯ является актуальной задачей, поскольку будет способствовать совершенствованию методов диагностики и лечения.

Стандартным способом исследования роли клеточных поломок в опухолевой прогрессии является оценка их связи с метастатическим потенциалом опухоли и продолжительностью жизни больного [4]. К настоящему времени накоплено громадное количество данных о морфологических и иммуногистохимических особенностях РЯ, однако, в большинстве работ, посвященных этой теме, отсутствует комплексный подход, необходимый для оценки биологической агрессивности опухоли

[2], исследуется патогенетическая значимость только отдельных факторов без учета их взаимосвязей. Вероятно, поэтому, такие характеристики, как клиническая стадия, размер остаточной опухоли после циторедуктивной операции, степень злокачественности, гистологический тип овариальной карциномы имеют прогностическое значение [1, 9], но используемые по отдельности не позволяют с достаточной точностью оценить возможную продолжительность безрецидивного течения заболевания у пациентов [8]. По данным литературы для определения клинического прогноза могут быть полезны показатели, выявляемые иммуногистохимическими (ИГХ) методами [12], такие как адгезивные молекулы, онкопротейны p53 и c-erbB-2, рецепторы прогестерона (РП) и эстрогенов (РЭ), а также регуляторы клеточного цикла, в частности циклины В1 и D1, однако литературные данные об их прогностической значимости и направленности связи с клиническими характеристиками весьма противоречивы [6, 7, 13].

Комплексная оценка значимости отдельных факторов для прогноза течения РЯ с использованием методов многофакторного анализа может в значительной степени объективизировать представления о роли этих факторов [14].

Цель исследования: провести комплексный анализ значимости клинико-морфологических и иммуногистохимических характеристик рака яичника при прогнозировании длительности безрецидивного течения и 5-летней выживаемости с помощью методов математического моделирования.

Материал и методы исследования

Исследование выполнено на архивном гистологическом материале 69 больных, оперированных по поводу РЯ в период с 1999 по 2002 г. В 49 случаях опухоли были представлены серозным гистологическим типом, 8 – эндометриоидным, 7 – светлоклеточным, и 5 – муцинозным. 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 (Е-кадгерина, β -катенина) проводилась по методике, предложенной С. Gamallo с соавторами [3]. 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 [10].

Статистическая обработка проводилась с использованием стандартного пакета прикладных программ Statistica 6.0. Поскольку исходные данные не соответствовали нормальному распределению, для анализа использовались непараметриче-

ские методы: сравнение двух независимых выборок – U-критерий Манна-Уитни, сравнение трех и более независимых выборок – H-критерий Краскела-Уоллиса. Для оценки выживаемости использовалась регрессионная модель Каплана-Мейера (Z-критерий). Для комплексной оценки влияния анализируемых факторов использовались регрессионный и дискриминантный анализы. Нулевая гипотеза (о нормальности распределения, отсутствии различий между переменными, отсутствии влияния группирующей переменной, отсутствии связи между переменными) отвергалась на уровне значимости $\alpha=0,05$ ($p \leq 0,05$) для каждого из использованных тестов.

Результаты исследования

Данные ИГХ исследования показали, что в опухолевых клетках серозного гистологического варианта низкой степени дифференцировки распространенность и интенсивность экспрессии Е-кадгерина статистически значимо ниже, чем в высокодифференцированных опухолях (H=10,3, $p=0,006$; H=6,3, $p=0,04$, соответственно). Общая и безрецидивная выживаемость была достоверно связана с суммарной экспрессией Е-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, $p=0,01$). Наличие ядерной гиперэкспрессии циклина D1 в клетках сопряжено с низкой общей выживаемостью (Z=2,3, $p=0,02$). Уровень экспрессии циклина B1 в высокодифференцированных серозных опухолях III–IV клинических стадий достоверно выше, чем в низкодифференцированных (H=5,8, $p=0,05$).

Повышение уровня экспрессии mt p53 существенно чаще обнаружива-

Таблица 1 – Статистическая характеристика независимых переменных, включенных в регрессионную модель прогноза продолжительности безрецидивного периода заболевания

Независимые переменные	B	Std.Err.	t	p
Константа	69,59	13,18	5,28	$2 \cdot 10^{-6}$
Клиническая стадия (FIGO)	-19,95	3,69	-5,40	$1 \cdot 10^{-6}$
Интенсивность экспрессии циклина B1 в цитоплазме	24,11	8,44	2,85	0,005
Процент клеток, экспрессирующих РП	6,66	2,56	2,59	0,01
Интенсивность экспрессии циклина D1 в ядре	-4,27	3,66	-1,16	0,2
Интенсивность экспрессии c-erbB-2	-5,47	2,83	-1,93	0,05
Интенсивность экспрессии mt p53	3,46	2,67	1,29	0,2
Интенсивность экспрессии циклина D1 в цитоплазме	-3,56	2,80	-1,26	0,2
Наличие β -катенина в ядре	16,01	11,83	1,35	0,1
Процент клеток, экспрессирующих E-кадгерин	-3,01	2,84	-1,06	0,2

лось при наличии метастазов карциномы ($U=49,5$, $p=0,05$) и сочеталось со снижением общей выживаемости у больных серозным РЯ ($Z=2,2$, $p=0,03$).

Гиперэкспрессия c-erbB-2 при серозном варианте РЯ сопровождалась снижением как общей, так и безрецидивной выживаемости ($Z=2,2$, $p=0,03$; $Z=2,2$, $p=0,03$, соответственно). При эндометриоидном и светлоклеточном гистологических типах 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 ($Z=-2,49$, $p=0,01$; $Z=-2,66$, $p=0,008$, соответственно).

Комплексная оценка значимости влияния клиничко-морфологических и ИГХ факторов на продолжительность безрецидивного периода заболевания и показатель 5-летней выживаемости у пациентов с РЯ проводилась с помощью регрессионного и дискриминантного анализов. Исходно, в качестве независимых переменных были использованы 17 факторов: степень дифференцировки рака (G), клиническая стадия, 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 безрецидивного

периода у больных РЯ и независимыми переменными производился с помощью множественного регрессионного анализа (метод Backward stepwise). В результате было установлено, что 9 факторов, приведенных в таблице 1, описывают 60% дисперсии зависимой переменной (ожидаемой продолжительности безрецидивного периода заболевания). Полученная регрессионная модель характеризуется следующими показателями: множественный коэффициент корреляции равен 0,77 ($R^2=0,60$), $F=9,76$, $p=6 \times 10^{-9}$, стандартная ошибка оценки равна 20,36.

Чтобы рассчитать ожидаемую продолжительность безрецидивного периода у больных РЯ необходимо перемножить значения параметров на соответствующие коэффициенты из графы «B» и сложить полученные произведения. Приведенная модель наглядно демонстрирует, какие факторы наиболее тесно связаны с продолжительностью жизни больных РЯ. Величина коэффициента говорит о том, насколько месяцев изменится продолжительность безрецидивного периода при изменении фактора на 1 единицу, знак перед коэффициентом показывает, в каком направлении произойдет изменение (минус – уменьшение, плюс – увеличение).

Оценка 5-летней выживаемости производилась с помощью дискриминантного анализа. Метод Backward stepwise позволил выделить из исходных факторов 10 наиболее значимых (таблица 2).

Для расчета 5-летней выживаемости больных РЯ необходимо перемножить показатели, приведенные в графе «независи-

Таблица 2 – Переменные, включенные в дискриминантную модель прогноза 5-летней выживаемости

Независимые переменные	G0	G1
<i>Клиническая стадия (FIGO)</i>	9,7797	4,3004
<i>Интенсивность экспрессии циклина B1 в цитоплазме</i>	0,1806	1,2533
<i>Интенсивность экспрессии циклина D1 в цитоплазме</i>	1,3870	-0,1422
Интенсивность экспрессии β -катенина в цитоплазме	-0,1639	2,6291
Процент клеток, экспрессирующих β -катенин	1,9632	-0,4690
<i>Наличие β-катенина в ядре</i>	1,6317	14,5931
<i>Процент клеток, экспрессирующих РП</i>	-0,4446	0,7495
<i>Интенсивность экспрессии mt p53</i>	-0,6034	1,9925
Процент клеток, экспрессирующих mt p53	0,0195	-0,0344
<i>Интенсивность экспрессии c-erbB-2</i>	1,1140	-0,2656
Константа	-18,5181	-11,7985

Примечание: курсивом выделены факторы, принимающие участие в обеих моделях

мые переменные» на соответственные коэффициенты из граф «G0» и «G1», а затем сложить полученные произведения. Окончательное заключение дается на основании сравнения вычисленных показателей: если $G0 > G1$, то вероятность прожить 5 лет у больного минимальная, а если $G0 \leq G1$ – с высокой надежностью можно прогнозировать, что продолжительность жизни пациента превысит пятилетний срок. Чем больше различия G0 и G1, тем выше достоверность прогноза.

Данная модель хорошо визуализирует вклад каждого из отобранной совокупности значимых факторов в показатель 5-летней выживаемости: если коэффициент, стоящий перед переменной в графе «G1» больше, чем коэффициент этой же переменной в графе «G0», значит, этот фактор способствует выживаемости, чем больше различие между коэффициентами, тем сильнее влияние этого фактора на продолжительность жизни.

При оценке качества модели методами доказательной медицины было установлено, что наиболее точный прогноз по-

лучается в случае, если РЯ имеет серозное гистологическое строение, при муцинозном и светлоклеточном вариантах надежность прогноза низкая (таблица 3).

Заключение

Таким образом, математические модели, построенные для прогнозирования длительно-

сти безрецидивного периода и 5-летней выживаемости больных РЯ на основании клинико-морфологических параметров и уровня экспрессии изученных ИГХ маркеров, позволяют с высокой точностью предсказать ожидаемую продолжительность безрецидивного течения заболевания после оперативного лечения, а также дают возможность оценить роль отдельных факторов, совместно принимающих участие в патогенезе опухолевого роста.

Результаты дискриминантного анализа также доказывают, что вклад отдельных факторов, характеризующих адгезивные свойства опухолевых клеток, белков, принимающих участие в клеточном цикле, гормональных рецепторов, в биологический потенциал злокачественного новообразования существенно варьирует в опухолях различного гистологического строения.

Библиографический список

1. A prognostic model for ovarian cancer / T.G.Clark [et al.] // Br. J. Cancer. – 2001. – Vol. 85, № 7. – P. 944-952.

Таблица 3 – Результат оценки качества дискриминантной модели

Гистологический вариант опухоли	Чувствительность	Специфичность	ПЦОР (умер)	ПЦП (жив)
Серозный	100,0	91,67	100,0	91,96
Муцинозный	67,66	50,0	67,66	50,0
Эндометриоидный	67,66	100,0	100,0	83,33
Светлоклеточный	71,43	-	100,0	0,0

Примечание: ПЦОР – прогностическая ценность отрицательного результата, ПЦП – прогностическая ценность положительного результата

2. 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.
3. 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.
4. Boyle, P. World cancer report 2008 / P. Boyle, B. Levin // *Lyon 2008*. – 510 p.
5. Cancer Statistics, 2008 / A. Jemal [et al.] // *CA Cancer J. Clin.* – 2008. – Vol. 58. – P. 71-96.
6. C-erbB-2, p53, and nm23 proteins as prognostic factors in patients with epithelial ovarian carcinoma / S. Tomić [et al.] // *Croat. Med. J.* – 2003. – Vol. 44 – P. 429-434.
7. Cyclin D1, p53, and p21Waf1/Cip1 expression is predictive of poor clinical outcome in serous epithelial ovarian cancer/ A. Bali [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2004. – Vol. 10. – P. 5168-5177.
8. 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.
9. Ochiai, K. Prognostic factors of ovarian cancer / K. Ochiai // *Gan To Kagaku Ryoho*. – 2006 – Vol. 33. – P. 2014-2019.
10. 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 // *Pathology*. – 1987. – Vol. 8, № 3. – P. 1380-140.
11. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EURO-CARE-4 study / F. Berrino [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2007. – Vol. 8, № 9. – P. 773-783.
12. Введение в молекулярную биологию канцерогенеза: учеб. пособие / А.А. Новик [и др.]; под ред. Ю.Л. Шевченко. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 224 с.
13. 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.
14. 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.
15. 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.

S.A. Lialikau, A.V. Shulga, V.A. Basinsky

COMPLEX EVALUATION OF THE PROGNOSTIC VALUE OF CLINIKO-MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL PARAMETERS IN OVARIAN CANCER

Morphological investigation of 69 cases of ovarian carcinoma with various histological types is carried out. Degree of tumor differentiation and stage (according FIGO classification) was determined, as well as expression of E-cadherin, β -catenin, cyclin B1, cyclin D1, p53, c-erbB-2 oncoproteins, estrogen and progesterone receptors was investigated with immunohistochemical method in all tumors. Regressive and discriminate models for prognosis of the duration of recurrence-free period and 5-yr survival after operation are constructed taking into account clinico-morphological and immunohistochemical parameters.

Key words: *ovarian cancer, immunohistochemistry, survival prognosis*

Поступила 30.03.10