

ЛЕЙОМИОСАРКОМА ТЕЛА МАТКИ: НЕКОТОРЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ПРОГНОЗА

А.М. Авдалян¹, И.П. Бобров¹, В.В. Климачев², Е.В. Мищенко², А.Ф. Лазарев¹

*Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Барнаул¹
Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул²
656049, г. Барнаул, ул. Никитина, 77; e-mail: ashot_avdalyan@mail.ru¹*

Проведен ретроспективный анализ экспрессии молекулярно-биологических маркеров Ki-67, p53, BCL-2, Ag-ОЯОР-белков в клетках опухоли и прилежащем миометрии с определением прогностической значимости степени экспрессии каждого маркера. Относительно неизмененного миометрия лейомиосаркома характеризовалась значительным увеличением экспрессии белка Ki-67 в 71,1 ± 6,7 % случаев, со степенью до 24,8 ± 7,4 %; BCL-2 – в 71,1 % случаев, со степенью до 72,6 ± 6,1 %; гиперэкспрессией p53 до 14,5 ± 4,5 % и ростом числа Ag-ОЯОР-белков до 23,7 ± 2,9. Многофакторный регрессионный анализ прогностической значимости изученных маркеров по Коксу для 10-летней выживаемости показал, что экспрессия Ki-67 более 12,2 %, снижение степени или отсутствие экспрессии BCL-2, гиперэкспрессия p53, увеличение числа Ag-ОЯОР-белков более 23,6 являются показателями неблагоприятного прогноза. Однако лишь количество Ag-ОЯОР-белков при показателе $\chi^2=16,8$ ($p=0,00007$) является независимым критерием прогноза у больных лейомиосаркомой тела матки.

Ключевые слова: лейомиосаркома тела матки, молекулярно-биологические маркеры, критерии прогноза.

UTERINE CORPUS LEIOMYOSARCOMA: SOME MOLECULAR AND BIOLOGICAL PROGNOSTIC CRITERIA

A.M. Avdalyan¹, I.P. Bobrov¹, V.V. Klimachev², E.V. Mischenko², A.F. Lazarev¹

Altai Affiliation of N.N. Blokhin RCRC RAMS, Barnaul¹,

Altai State Medical University, Barnaul²

77, Nikitina str., 656049-Barnaul, e-mail: ashot_avdalyan@mail.ru¹

Retrospective analysis of Ki-67, p53, BCL-2, Ag-NOR-proteins expression in tumor cells and adjacent myometrium was carried out. With regard to unchanged myometrium, leiomyosarcoma was characterized by significant increase in Ki-67 expression to 24,8 ± 7,4 % in 71,1 ± 6,7 % of cases and BCL-2 expression to 72,6 ± 6,1 % in 71,1 % of cases as well as by p53 hyperexpression to 14,5 ± 4,5 % and increase in the level of Ag-NOR-proteins to 23,7 ± 2,9. Multi-factor regression analysis of prognostic significance of investigated markers by Cox for 10-year recurrence-free survival of patients having sarcoma demonstrated that Ki-67 expression of more than 12,2 %, decrease in or absence of BCL-2 expression, p53 hyperexpression and increase in the level of Ag-NOR proteins more than 23,6 were the factors of unfavorable prognosis. However, only the number of Ag-NOR-proteins at index of $\chi^2=16,8$ ($p=0,00007$) was independent prognostic factor in patients with leiomyosarcoma of the uterus.

Key words: uterine corpus leiomyosarcoma, molecular and biological markers, prognostic criteria.

Лейомиосаркома (ЛМС) тела матки является относительно редкой злокачественной опухолью, заболеваемость которой в США составляет 0,64 на 100000 населения [11]. В Алтайском крае за период с 1996 по 2006 г. было выявлено 266 первичных больных с данной патологией. До настоящего времени остается дискуссионным вопрос о критериях, определяющих прогноз при ЛМС, по данным различных авторов, 5-летняя выживаемость у данной категории больных колеблется от 18,8 до 65 % [3, 5, 9, 12]. Такой разброс в показателях выживаемости обусловлен различными причинами, ведущими из которых являются клинико-морфологические факторы [17]. Достаточно изученными морфологическими критериями, влияющими на отдаленную

выживаемость при ЛМС, являются глубина инвазии миометрия и сосудов, наличие некрозов опухолевых клеток, степень выраженности клеточной атипии, уровень митотической активности. Эти параметры легли в основу системы определения степени злокачественности мягкотканых сарком, предложенной французским центром борьбы с раком FNCLCC [10].

Вместе с тем остается много нерешенных вопросов о прогностической значимости целого ряда молекулярно-биологических характеристик клеток лейомиосаркомы тела матки, таких как состояние системы регуляции апоптоза по данным амплификации генов p53 и BCL-2, пролиферативная активность по уровню экспрессии белка Ki-67, активность аргирофильных бел-

ков области ядрышковых организаторов (Ag-ОЯОР), хотя эти маркеры являются достаточно изученными молекулярно-биологическими параметрами прогноза при злокачественных опухолях других локализаций, в том числе и неэпителиальных [6, 14, 15].

Исходя из вышеизложенного, целью исследования стало определение уровня экспрессии Ki-67, BCL-2, p53, Ag-ОЯОР с установлением их прогностической значимости.

Материал и методы

В исследование вошли 76 случаев ЛМС тела матки с известным исходом заболевания у больных, оперированных в Алтайском краевом онкологическом диспансере в период с 1996 по 2006 г. Во всех случаях исследовали прилежащий миометрий и опухоль. Степень злокачественности определяли по 3-степенной (G1-3) системе FNCLCC [7]. Уровень экспрессии молекулярно-биологических маркеров (в %) p53 (клон DO-7, «ДАКО»), BCL-2 (клон 124, «ДАКО») и Ki-67 (клон MIB-1, «ДАКО») определяли при помощи иммуногистохимического метода по рекомендованному производителем протоколом. Степень экспрессии определяли полуколичественным способом по интенсивности окраски DAB (1+; 2+; 3+). Оценку активности аргирофильных белков ядра проводили на препаратах, окрашенных нитратом серебра по стандартизованной методике, предложенной «Международным комитетом по количественной оценке Ag-ЯОР-белков» [8, 16], в ручном режиме просчета с помощью программы Image Tool 3.0 [1]. Безрецидивную

10-летнюю выживаемость определяли методом Каплан–Мейера. Статистическую обработку проводили при помощи компьютерной программы STATISTICA 6.0.

Результаты и обсуждение

В неизменном миометрии экспрессия Ki-67 выявлена в 34,2 % случаев, при этом уровень экспрессии в среднем составил $0,2 \pm 0,05$ %, не превышая 1,1 % (таблица). В ткани ЛМС белок Ki-67 находили в $71,1 \pm 6,7$ % случаев. Средний уровень экспрессии составил $12,2 \pm 2,9$ %, однако этот показатель значительно варьировал в зависимости от степени злокачественности опухолевых клеток. Так, в ЛМС со степенью G1 он был статистически значимо ниже по отношению к G3 – $5,1 \pm 1,3$ % и $24,8 \pm 7,4$ % соответственно (рис. 1а, б).

При анализе зависимости 10-летней выживаемости от уровня экспрессии Ki-67 было отмечено, что при отсутствии экспрессии либо при ее средних значениях ниже $12,2$ % 10 лет пережили $61,7 \pm 9,7$ % больных (рис. 2а.). При превышении данного уровня отдаленные результаты были значительно хуже: до 10 лет не дожила ни одна больная, 5-летняя выживаемость равнялась $15,9 \pm 7,6$ %, медиана – 2 года. Многофакторный анализ прогностической значимости критериев по Коксу определил показатель $\chi^2=10,7$, при $p=0,001$.

Наличие белка супрессора-апоптоза (BCL-2) в слабой и умеренной степени выявляли практически в 95 % случаев в смежном неизменном миометрии, а количество клеток, экспрессиру-

Таблица

Показатели молекулярно-биологических маркеров в неизменном миометрии и при лейомиосаркоме различной степени злокачественности

Маркер	Миометрий	Лейомиосаркома			
		Средний показатель	G1	G2	G3
Ki-67	$0,2 \pm 0,05$ % (0,1–1,1)	$12,2 \pm 2,9$ % (0,3–73,2)	$5,1 \pm 1,3$ %* (0,5–20,6)	$10,1 \pm 4,2$ % (0,5–24,2)	$24,8 \pm 7,4$ %* (0,5–73,2)
BCL-2	$58,1 \pm 7,1$ % (5,9–99,2)	$72,6 \pm 6,1$ % (5,6–99,2)	$71,9 \pm 7,9$ % (7,7–99)	$62,1 \pm 15$ % (12–92)	$83,2 \pm 12,9$ % (5,6–98,3)
p53	0	$14,5 \pm 4,5$ % (0,1–62,5)	$7,8 \pm 5,1$ %* (0,1–62,5)	$0,6 \pm 0,08$ % (0,4–0,7)	$28,1 \pm 8,1$ %* (7,7–59,8)
Ag-NOR	$3,7 \pm 0,3$ (1,7–12)	$23,7 \pm 2,9$ (7,8–108)	$17,8 \pm 1,9$ * (7,8–38,3)	$21,2 \pm 2,3$ (10,8–28,1)	$34,3 \pm 7,8$ * (12,1–108)

Примечание: * – различия между группами статистически значимы ($p < 0,05$)

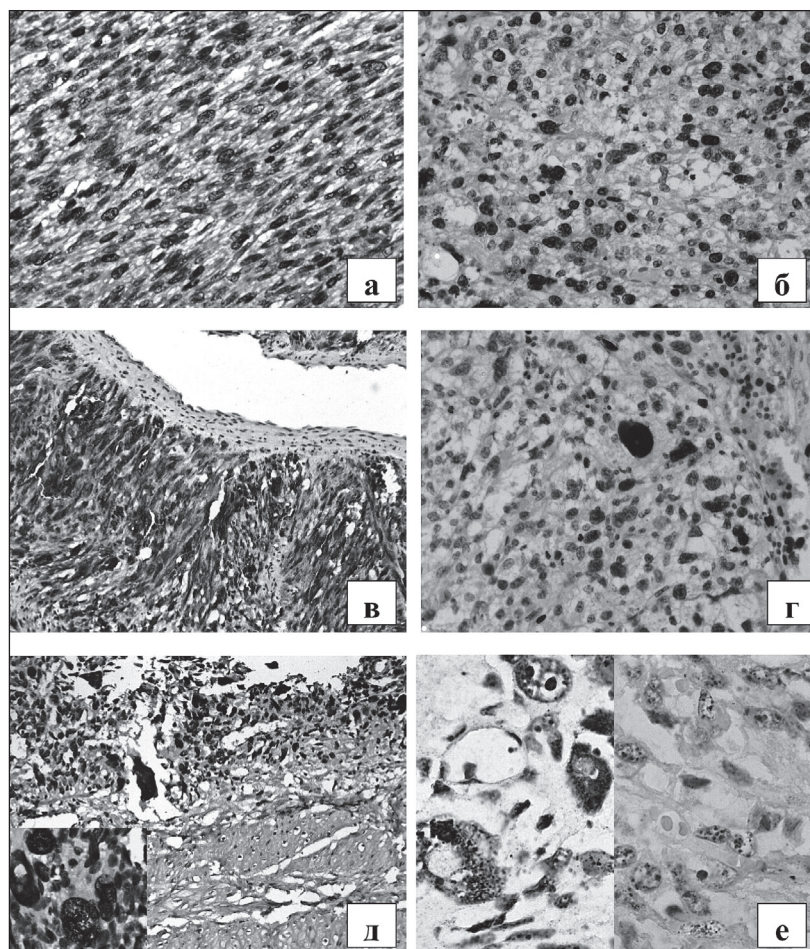


Рис. 1. Микрофото. Экспрессия маркеров клетками лейомиосаркомы:
 а) экспрессия Ki-67 в ЛМС G1 (ИГХ, хромоген DAB, x400);
 б) экспрессия Ki-67 в ЛМС G3 (ИГХ, хромоген DAB, x400);
 в) гиперэкспрессия (3+) BCL-2 в ЛМС, инвазия в сосуды (ИГХ, хромоген DAB, x200);
 г) экспрессия (1+–2+) p53 в ЛМС, в центре гигантская клетка с гиперэкспрессией гена (ИГХ, хромоген DAB, x400);
 д) гиперэкспрессия (3+) p53 в ЛМС, инвазия в миометрий, в нижнем левом углу деталь опухоли (ИГХ, хромоген DAB, x200; x400);
 е) различный уровень экспрессии Ag-ОЯОР-белков (внутриядрышковый и кариоплазматический кластеры) клетками ЛМС: слева – гиперэкспрессия, справа – низкая экспрессия (окраска AgNO₃ по международным рекомендациям [8])

щих белок, составило $58,1 \pm 7,1$ % (таблица), что согласуется с мнением ряда авторов о конституциональном свойстве экспрессии белка в миометрии [13]. При ЛМС BCL-2 определяли значительно реже, чем в неизменном миометрии, – в 71,1 % случаев находили экспрессию белка. Вместе с тем в ЛМС степень экспрессии BCL-2 была значимо выше смежного миометрия – $72,6 \pm 6,1$ % (рис. 1в.). Зависимости от степени злокачественности выявлено не было. Наличие экспрессии белка оказывало статистически значимое влияние на 10-летнюю выживаемость: при экспрессии белка прогноз был значительно лучше – $44,9 \pm 11,2$ %, медиана – 5,8 года (рис. 2б), в то время как при отсутствии экспрессии 10 лет пережило $29,6 \pm 8,3$ % больных, медиана – 1,5 года. Многофакторный анализ прогностической значимости критериев по Коксу определил показатель $\chi^2=5,4$ ($p=0,01$).

В неизменном миометрии экспрессию гена-активатора апоптоза p53 не выявили ни в одном из 76 исследованных случаев. В ЛМС его амплификацию находили в 65,8 % случаев. В среднем активность гена выявлена в $14,5 \pm 4,5$ % клеток. Была обнаружена зависимость экспрессии гена от степени злокачественности: при G1 амплификацию находили в $7,8 \pm 5,1$ %, при G3 – в $28,1 \pm 8,1$ % клеток (таблица). Степень экспрессии при его амплификации в 73,9 % была от 1+ до 2+, в 16,1 % выявлена гиперэкспрессия гена (рис. 1г, д.). Само по себе наличие экспрессии никак не сказывалось на 10-летней выживаемости, однако в группе с наличием амплификации гена прогноз был значимо хуже при его гиперэкспрессии: 3-летняя выживаемость составила $34,3 \pm 10,6$ %, 10-летняя – 0 %, медиана – 2,1 года. При слабой и умеренной

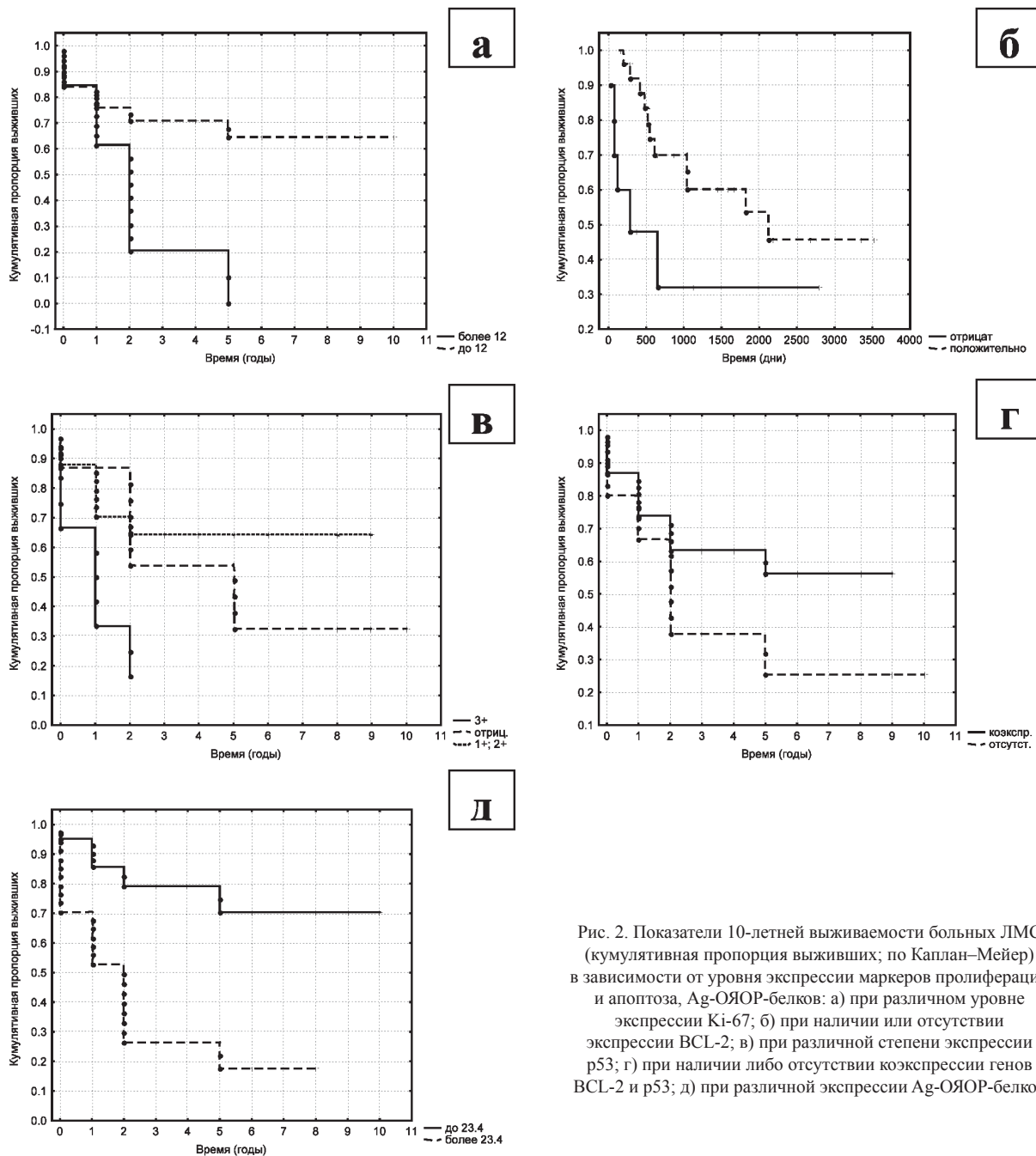


Рис. 2. Показатели 10-летней выживаемости больных ЛМС (кумулятивная пропорция выживших; по Каплан–Мейер) в зависимости от уровня экспрессии маркеров пролиферации и апоптоза, Ag-ОЯОР-белков: а) при различном уровне экспрессии Ki-67; б) при наличии или отсутствии экспрессии BCL-2; в) при различной степени экспрессии p53; г) при наличии либо отсутствии коэкспрессии генов BCL-2 и p53; д) при различной экспрессии Ag-ОЯОР-белков

экспрессии гена прогноз был значительно лучше – $63,4 \pm 5,2$ % (рис. 2в.). Многофакторный анализ прогностической значимости критериев по Коксу определил показатель $\chi^2=8,3$, при $p=0,003$.

Известно, что появление и прогрессия наиболее злокачественного пула клеток в опухолевом поле сопровождается ростом пролиферативной активности, ингибированием активации и снижением уровня апоптоза [2, 4]. Можно

предположить, что данные взаимоотношения должны определяться паритетом между геном супрессором и активатором апоптоза (BCL-2 и p53 соответственно). При нарушении этого равновесия в ту или иную сторону должен активироваться злокачественный пул клеток с итогом в виде значительной опухолевой прогрессии и ухудшением прогноза. Анализ коэкспрессии маркеров показал, что отсутствие того или иного гена (отрицательный паритет) значимо ухудшало 10-летнюю выживаемость: $22,8 \pm 11,6\%$, против $54,9 \pm 9,5\%$ при коэкспрессии генов (положительный апопаратет; рис. 2г). χ^2 для изученных параметров – 5,4; $p=0,05$.

Общее число Ag-ОЯОР-белков в ядре (внутриядрышковый и кариоплазматический кластер) в клетках саркомы было $23,6 \pm 15,1$ (таблица; рис. 1е), что было статистически значимо выше прилежащего миометрия – $3,7 \pm 0,3$. Анализ влияния параметра на прогноз показал, что при среднем уровне аргирофильных белков ниже $23,6$ 10-летняя выживаемость составила $66,8 \pm 8,9\%$. При количестве белков, превышающем этот средний уровень, 10-летняя выживаемость была достоверно ниже и не превышала $17,2 \pm 9,6\%$ ($p=0,003$; рис. 2д). При многофакторном анализе по Коксу количество белков стало независимым критерием – $\chi^2=16,8$; $p=0,00007$.

Таким образом, полученные данные позволяют утверждать, что высокий пролиферативный статус опухоли по уровню экспрессии Ki-67 (более 12%) является показателем неблагоприятного прогноза у больных лейомиосаркомой тела матки. Кроме того, слабая и умеренная экспрессия BCL-2 в неизменном миометрии оказывается органоспецифичной для ГМК миометрия, в то же время отсутствие экспрессии этого белка в ГМК лейомиосаркомы матки является прогностически неблагоприятным

критерием. Гиперэкспрессия p53 является показателем худшего прогноза по сравнению с ЛМС, в которых выявляется относительно слабый и умеренный уровень экспрессии p53. Коэкспрессия BCL-2 и p53 (положительный апопаратет) являются прогностически благоприятным показателем, тогда как отсутствие экспрессии одного из маркеров приводит к снижению 10-летней выживаемости. Увеличение числа Ag-ОЯОР-белков более 23,4 оказывает негативное влияние на исход заболевания при лейомиосаркоме тела матки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. // Вопросы онкологии. 2000. Т. 46, № 4. С. 423–426.
2. Введение в молекулярную биологию канцерогенеза / Под ред. Ю.Л. Шевченко. М.: Гэотар-Мед, 2003. 222 с.
3. Гагуа И.Р., Кузнецов В.В., Лазарева Н.И. и др. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2007. Т. 18, № 3. С. 23–31.
4. Имянитов Е.Н., Хансон К.П. Молекулярная онкология: клинические аспекты. СПб.: СПбМАПО, 2007. 211 с.
5. Клиническая онкогинекология: Руководство для врачей / Под ред. В.П. Козаченко. М.: Медицина, 2005. С. 178–220.
6. Райхлин Н.Т., Букаева И.А., Смирнова Е.А. и др. // Архив патологии. 2008. Т. 70, № 3. С. 15–18.
7. Франк Г.А. // Практическая онкология. 2004. Т. 5, № 4. С. 231–236.
8. Aubele M., Bieterferd S., Derenzini M. et al. // Zentralbl. Pathol. 1994. Vol. 140 (1). P. 107–108.
9. Coindre J.M., Terrier P., Guillou L. et al. // Cancer. 2001. Vol. 19 (10). P. 1914–1926.
10. Fédération Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer. Standards, Options, et Recommandations. Sarcomes des Tissus Mous et Ostéosarcomes, Vol. 1, 1st edition. Paris: Arnette Blackwell, 1995. P. 6–113.
11. Harlow B.L., Weiss N.S., Lofton S. // J. Nat. Canc. Inst. 1986. Vol. 76 (3). P. 160–161.
12. Livi L., Paiar F., Shah N. et al. // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2003. Vol. 57 (5). P. 1366–1373.
13. Matsuo H., Maruo T., Samoto T. // J. Clin. Endocrinol. Metabol. 1997. Vol. 82 (1). P. 293–299.
14. Nordal R.R., Kristensen G.B., Kaern J. et al. // Acta Oncol. 1995. Vol. 34. P. 797–802.
15. Pich A., Chiusa L., Margaria E. // Micron. 2000. Vol. 31 (2). P. 133–141.
16. Trere D. // Micron. 2000. Vol. 31 (2). P. 127–131.
17. Trojani M., Contesso G., Coindre J.M. et al. // Int. J. Cancer. 1984. Vol. 33. P. 37–42.

Поступила 6.07.09