616-006.363.04:577.217.348[611.018.13/611.66

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЛОТНОСТИ СОСУДОВ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА В ОПУХОЛИ И ПЕРИТУМОРОЗНОЙ ЗОНЕ ПО ДАННЫМ ВЫЯВЛЕНИЯ БЕЛКА CD31 И КОЛИЧЕСТВА АРГИРОФИЛЬНЫХ БЕЛКОВ ОБЛАСТИ ЯДРЫШКОВОГО ОРГАНИЗАТОРА (AGNOR) В ЭНДОТЕЛИИ ПРИ ЛЕЙОМИОСАРКОМЕ ТЕЛА МАТКИ

А.М. Авдалян, И.П. Бобров, В.В. Климачев, Н.М. Круглова, А.Ф. Лазарев

Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, РФ, г. Барнаул, ashot_avdalyan@mail.ru

Установлено, что средние показатели плотности микроциркуляторного русла (ПМЦР) опухоли и перитуморозной зоны (ПЗ) значимо не отличались (p=0.9), более того нередко ПМЦР ПЗ превышала таковую опухоли. Активность AgNOR-белков эндотелия опухоли была значимо выше в сосудах опухоли, нежели в ПЗ (p<0.005). Анализ прогностической значимости ПМЦР лейомиосаркомы тела матки и ПЗ показал, что ПМЦР опухоли не являлась независимым критерием, в то время как ПМЦР ПЗ значимо в большей степени влиял на 10-летнюю выживаемость (χ^2=27,5; p=0,0003). На выживаемость больных ЛМС немаловажное значение оказывала также активность AgNOR-белков: при превышении порогового значения в 11,6 гранулы прогноз был значимо неблагоприятней, чем до этого значения, однако это требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: лейомиосаркома, матка, перитуморозная зона, плотность сосудов, CD31, AgNOR эндотелия, прогноз.

THE PROGNOSTIC VALUE OF RESEARCH OF MICRO VESSELS DENSITY OF IN A TUMOUR AND PERITUMOUROSES AREA ACCORDING TO REVEALING PROTEIN CD31 AND QUANTITY ARGYROPHILIC NUCLEOLAR ORGANIZER (AGNOR) IN ENDOTHELIUM AT A LEIOMYOSARCOMA OF A UTERI

A.M. Avdalyan, I.P. Bobrov, V.V. Klimachev, N.M. Kruglova, A.F. Lazarev

Altay branch ROSC N.N.Blochin of Russian Academy of Medical Science, Barnaul, ashot_avdalyan@mail.ru

Is determined, that average indices of micro vessels density (MVD) of a tumour and peritumouroses area (PT) significantly did not differ (p=0.9), moreover is frequent MVD in

PT exceeded those tumours. Activity of AgNOR-protein of tumours endothelium was significantly above in vessels of a tumour, rather than in PT (p <0.005). The analysis of survival rates consequence of a leiomyosarcoma uteri and PT has to importance MVD, that MVD tumours was not independent criterion while MVD in PT it is significant in the greater degree influenced 10-years survival rate (χ^2 =27.5; p=0.0003). On survival rate of patients LMS also important value was rendered with activity of AgNOR- protein: at excess of threshold value in 11.6 granules the forecast was significant more adversely, than up to this value, however it demands the further studying.

Keywords leiomyosarcoma uteri, peritumouroses area, density of vessels, CD31, AgNOR-protein of endothelium, survival.

Введение

Лейомиосаркома тела матки (ЛМС) является редко встречающейся высокозлокачественной опухолью женской репродуктивной системы, 5-летняя выживаемость при которой колеблется в пределах от 29% до 67,4% по данным различных авторов [6]. В настоящее время накоплено немало данных о прогностической значимости ряда клинико-патологических параметров при опухоли данной локализации: стадии, степени злокачественности, а также некоторых молекулярно-биологических критериях [5]. Вместе с тем представляет большой интерес определение роли ангиогенеза и степени развития микроциркуляторного русла в прогнозе лейомиосаркомы тела матки, а литературные данные по изучаемому вопросу крайне скудны и несистематизированы [1].

Перитуморозная зона (ПЗ) любого злокачественного новообразования имеет особое биологическое значение. Именно к этой зоне относится понятие «опухолевое поле», так как в ней начинается рост опухоли и по ней же распространяется опухоль. Изменения тканей, не вовлеченных в злокачественный рост, представляют интерес для выявления фоновых процессов, способствующих развитию опухоли. Перитуморозный фон может быть охарактеризован рядом количественных показателей с учетом морфологических характеристик гистогематического барьера, закономерностей пролиферации клеточных популяций, их взаимоотношений друг с другом, в том числе и элементов микроциркуляторного русла [4].

Ангиогенез имеет фундаментальное значение для роста и распространения опухолей различных локализаций. В то же время достаточно известным фактом является возможность антиангиогенного терапевтического (в т.ч. таргетного (например, авастин) воздействия на неоангиогенез [3]. Вместе с тем в настоящее время остается практически неизученной роль развития сосудистого русла ПЗ в исходе онкозаболевания [9]. Имеются данные о том, что имеет большое клиническое значение степень развитости сосудистого русла центральной части опухоли и периферической зоны (инвазивный компартмент). В нестоящее время для определения степени развитости микроциркуляторного русла (МЦР) опухоли широко используется выявление белка CD 31. Данный белок является

маркером, способным селективно выявлять гликопротеин с массой 130 kDa в эндотелии сосудов, тем самым способствуя определению васкуляризации и соответственно плотности сосудистого русла ткани.

Одним из интересных и перспективных методов для определения скорости прохождения клеткой митотического цикла является выявление активности аргирофильных белков ядрышка (AgNOR) регулирующих активность рибосомальных генов [8]. Экспрессия Ag-NOR зависит от фазы клеточного цикла, причем в G_0-периоде активность их экспрессии минимальна, а в S-фазе и G_2- периоде наиболее высока и степень этой активности зависит прежде всего от темпа роста и степени злокачественности опухоли. Число AgNOR в интерфазе строго связано с рРНК транскрипционной активностью и в непрерывной пролиферации клеток ускоряют этот процесс [2]. Поэтому исследование активности AgNOR позволяет не только выявить фракцию пролиферирующих клеток, но и оценить скорость их пролиферации. Данное заключение становится особо ценным относительно возможности определения скорости неоваскуляризации и зрелости сосудов ЛМС тела матки и влияния этого параметра на ряд клинико-морфологических параметров, в том числе и прогноз. Вместе с тем данных об активности AgNOR в эндотелии МЦР лейомиосарком нет.

Исходя из вышеизложенного, целью исследования стало определение прогностического значения плотности сосудов микроциркуляторного русла (ПМЦР) в лейомиосаркоме тела матки и в ПЗ по данным экспрессии белка CD31 и числа AgNOR в эндотелии сосудов.

Материалы и методы

В ретроспективном исследовании материалом для работы служили удаленные матки от пациенток с клиникой быстрорастущей опухоли тела матки за период 1996–2009 г.г. в Алтайском крае Российской Федерации. В клинической картине отмечали боли, кровотечения, двукратное и более увеличение опухоли по данным УЗИ в течение года. В случае ЛМС наиболее часто проводили экстирпацию матки с шейкой и придатками (86.4%). В исследование вошли 66 случаев ЛМС тела матки у прооперированных больных с известным прогнозом. Средний возраст пациенток ЛМС составил 52,1±1,3 (min. 23; max. 77; moda 50). Практически 80% больных ЛМС были пре- и менопаузального возраста. Оставшаяся часть больных была репродуктивного возраста, прооперированы во вторую половину менструального цикла. Единичный опухолевый узел обнаруживали в 89,4% случаев, более 1-го — в 10,6%. Степень злокачественности определяли по 3-степенной (G1-3) системе, предложенной французским противораковым центром (FNCLCC), коррелирующей с выживаемостью больных саркомами различных локализаций, включающих в себя дифференцировку, митотическую активность и массивность некрозов, и имеющей выражение в балльной оценке совокупности этих критериев. Стадию заболевания определяли по классификации FIGO. Образцы забирали из центра и периферической части опухоли. Кроме того, в каждом случае исследовали ПЗ (не более 0,5 см от опухоли). Материал фиксировали в 4%-ном нейтральном формалине не позднее чем через 1 час после удаления матки. Обзорные гистологические методы исследования включали окраску

гематоксилином и эозином и на коллаген по Ван-Гизон. После фиксирования в 4%-ном нейтральном забуференном формалине и стандартной заливки материала в парафин срезы толщиной 4 мкм переносили на стекло, обработанное поли-L-лизином, и сушили в термостате при 55°С в течение 35 мин. Затем срезы депарафинизировали в 2 порциях толуола по 5 минут при комнатной температуре и обезвоживали в нисходящей батарее этиловых спиртов (96%–70%). Дальнейшие этапы проводили при комнатной температуре во влажной камере. Для иммуногистохимического анализа использовали антитела к CD31 (мышиные, моноклональные, клон JC70A «DAKO») в разведении не более 1:10, использовали систему визуализации Super Sensitive Polymer-HRP Detection System/DAB (BioGenex) с хромогеном DAB и последующей докраской ядер гематоксилином Майера. Подсчет производили, оценивая позитивно окрашенный эндотелий сосудов к CD31. Для просчета ПМЦР использовали количественный способ оценки в абсолютных цифрах на площади 0,73 мм² при увеличении х200 (оценивали не менее трех полей зрения, а затем рассчитывали средний показатель).

Окраску AgNOR в ядрах эндотелиоцитов осуществляли с помощью 50%-ного раствора $AgNO_3$ (BioOptica, Milan) по методу Howell W.M, Black D.A., 1980 в модификации Korneyev I.A., 2000 [7]. После серебрения препараты тщательно ополаскивали дистиллированной водой, докрашивали 0,1 %-ным водным раствором метилового зеленого в течение 20 сек. и заключали в полистирол. В каждом случае высчитывали среднее количество ядрышек и гранул серебра на 1 ядро эндотелиоцита в не менее чем 120 клетках.

Статистический анализ

При анализе 10-летней выживаемости использовали кумулятивный пропорциональный анализ по Каплан-Мейеру. Проводили анализ различий между кривыми выживаемости. При проверке статистических гипотез средних величин применяли непараметрические методы: однофакторный тест Краскела-Уоллиса, U-тест Манна-Уитни, критерий Колмогорова, коэффициент корреляции рангов Спирмена (r). Статистически достоверными считали отличия при $p<0,05$. Статистическую обработку проводили при помощи компьютерной программы STATISTICA 6.0.

Полученные результаты

Ag-NOR. Полученные данные показали, что ткань ПЗ характеризовалась модулями зрелых сосудов микроциркуляции с терминально дифференцированным эндотелием. Сосуды же опухоли чаще всего были незрелого капиллярного, посткапиллярного звена микроциркуляции с незрелым интенсивно растущим эндотелием. Активность Ag-NOR эндотелия сосудов ПЗ была невысокой и составила 1.85±0.1 с преимущественным наличием ядрышек кольцевидного типа (табл.1, рис. 1).

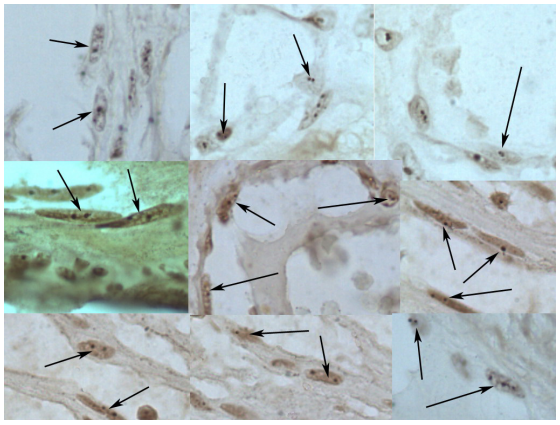

Рис. 1. Активность AgNOR эндотелия сосудов неизмененного миометрия, определяемая при помощи AgNO3. В ядрах эндо-

телиоцитов из разных участков сосудов микроциркуляторного русла количество аргирофильных гранул не превышает 2 — 3 на 2 ядрышка кольцевидного типа (гранулы в ядрышках обозначены стрелками). Окраска нитратом серебра, увеличение х1000

Вместе с тем активность AgNOR эндотелия сосудов в опухоли была значимо выше, чем активность белков эндотелия сосудов ПЗ — 1,85±0,1 против 11,6±3,4, причем преобладающим типом ядрышек становились более активные нуклеолонемные (табл. 1, рис. 2).

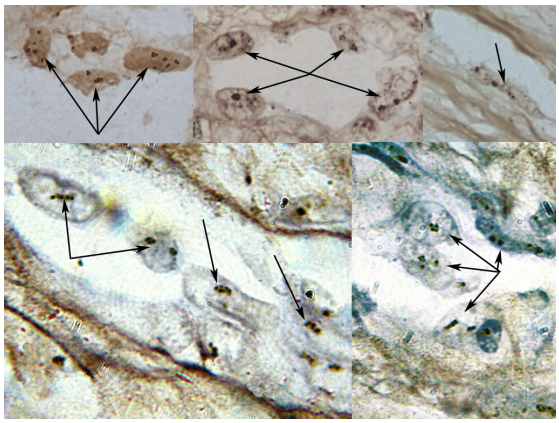

Рис. 2. Активность AgNOR эндотелия сосудов ЛМС, определяемая при помощи AgNO3. В ядрах эндотелиоцитов из разных участков сосудов микроциркуляторного русла количество аргирофильных гранул от 4 до 17 на 2-3 ядрышка нуклеолонемного типа (гранулы в ядрышках обозначены стрелками). Окраска нитратом серебра, увеличение х1000 в верхней части рисунка; х1200 — в нижней

Интересно отметить, что по мере увеличения степени злокачественности экспоненциально возрастало и количество Ag-NOR эндотелия с 8,3±1,3 гранул при G1 до 16,7±4,8 при саркоме высокой степени злокачественности (табл. 1). Была отмечена умеренная корреляция степени злокачественности и активности AgNOR эндотелия сосудов опухоли (r=0.36; p=0.03). Не было выявлено коррелятивной связи белков эндотелия сосудов ПЗ, со степенью злокачественности саркомы и размером опухолевого узла (r=0,21; p=0,1; r=0,22), также не было выявлено зависимости активности AgNOR эндотелия опухоли и эндотелия сосудов ПЗ от количества узлов, стадии процесса.

CD31. ПМЦР ПЗ в среднем была несколько ниже, чем плотность сосудов в опухоли: 64,4±4,4 против 68,8±11,4, хотя различия недостоверны и с выраженным статистическим эксцессом (p=0,9; эксцесс=2,3; табл. 1, рис. 3 a-g). Нами не было обнаружено связи и зависимости уровня ангиогенеза опухоли от стадии и степени злокачественности ЛМС (r=0,1). Так, при низкой степени злокачественности ЛМС ПМЦР была 79,3±8,5, а при высокой — 59,1±9,1, различия статистически недостоверны (табл. 1, рис 3 b, g). Также не было выявлено коррелятивной взаимосвязи ПМЦР как опухоли, так и перитуморозной ткани с размером опухоли (r=0,13; 0,21 соответственно).

Несомненный интерес представляет анализ влияния ПМЦР опухоли и перитуморозной ткани на выживаемость больных ЛМС тела матки. В расчетах использовали средние показатели изучаемых характеристик: для AgNOR-белков эндотелия сосудов ПЗ и опухоли 3,4 и 11,6 соответственно, для ПМЦР перитуморозной ткани и опухоли 64,4 и 71,4 соответственно. Кумулятивный анализ выживаемости по Каплан-Мейер по-

Таблица 1

Активность AgNOR эндотелия и ПМЦР ПЗ и ЛМС различной стадии и степени злокачественности

Объект исследования		CD31	Ag-NOR эндотелия
ПЗ (n=66)		64.4±4.4 (min — 10; max — 104)	1.85±0.1 (min — 1; max — 3)
Саркома различной степени злокачественности	G1	79.3±8.5 (min — 9.0; max — 201)	8.3±1.3 (min — 3; max — 13)
	G2	68.2±16.6 (min — 8.6; max — 268)	9.8±1.5 (min — 2; max — 14)
	G3	59.1±9.1 (min — 13; max — 148)	16.7±4.8 (min — 5; max — 62)
Саркома различной стадии	I	80.7±8.3 (min — 9; max — 268)	10.3±1.5 (min — 3; max — 32)
	II	52.2±8.7 (min — 8.6; max — 148)	13.5±4.3 (min — 5; max — 62)

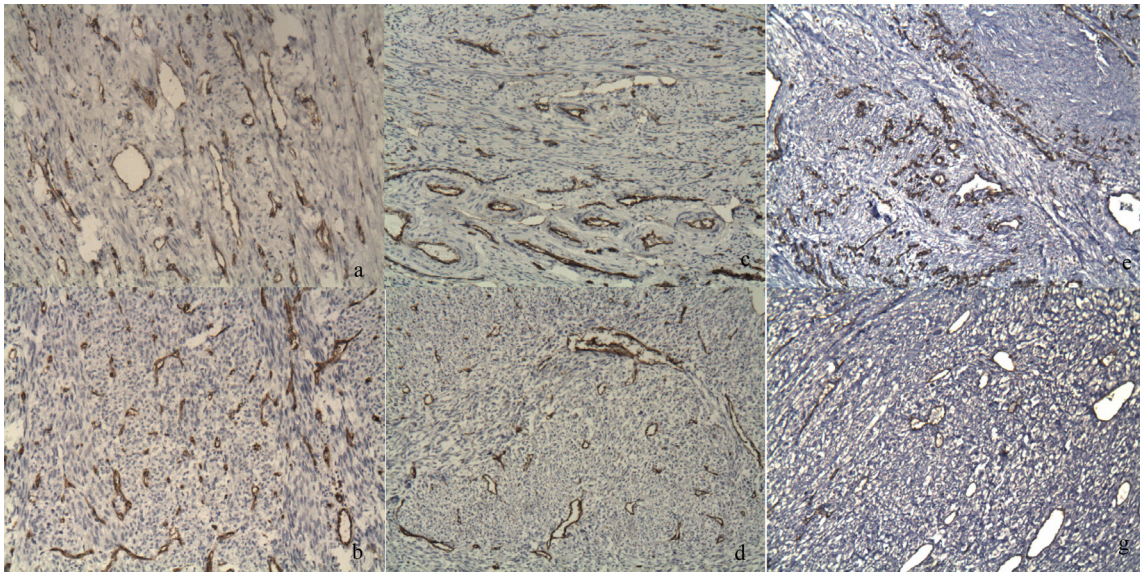

Рис. 3. ПМЦР (по данным экспрессии CD31) в сосудах ЛМС (b, d, g) и перитуморозной зоны (a, c, e). ИГХ методика, увеличение x200. В ЛМС и ПЗ ПМЦР значимо не отличается. ПМЦР ЛМС G1 (b) выше, чем при G2 и G3, однако в каждом случае опухоли показатели вариабельны, так же, как и ПМЦР в ПЗ. Иммуногистохимический метод, хромоген DAB, увеличение x200

казал, что общая 5-летняя выживаемость без учета степени злокачественности и стадии заболевания составила 52,8%±6, а 10-летняя — 35,4%±8,6, медиана — 5,6 лет.

Были получены данные, говорящие о том, что ПМЦР ПЗ в большей степени оказывала влияние на выживаемость больных саркомой, чем ПМЦР самой опухоли. Так, при ПМЦР перитуморозной зоны до уровня среднего показателя в 64,4 на 0,73 мм² 5-летняя выживаемость была 79,9%±9,7, а 10-летняя несколько ниже — 63,3%±10,1 (рис. 5 а).

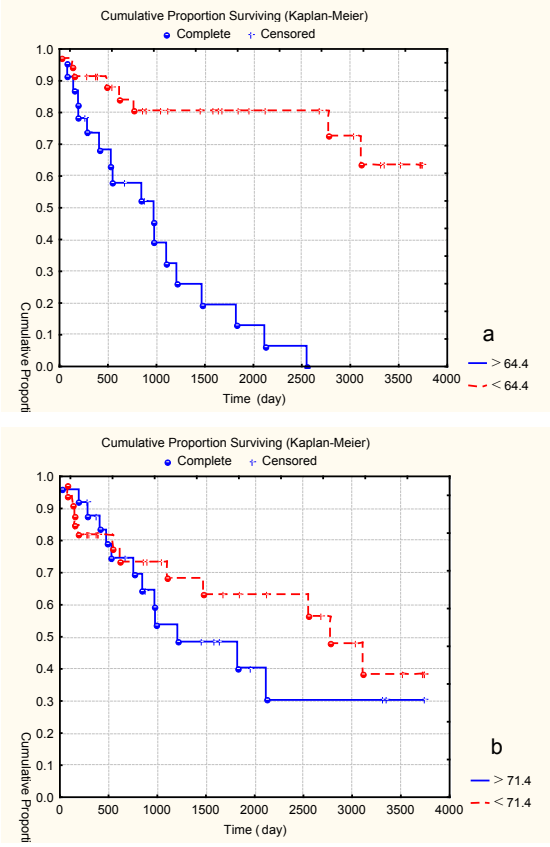

Рис. 4. Кумулятивная пропорция 10-летней выживаемости больных ЛМС в зависимости от ПМЦР ПЗ (a) и ПМЦР опухоли (b)

Однако при превышении среднего показателя выживаемость значимо ухудшалась и составила: 5-летняя — 20,3%±8,6, а до 10 лет не дожила ни одна больная. В то же время выживаемость больных ЛМС в зависимости от ПМЦР непосредственно опухоли практически не отличалась от показателей выживаемости как до среднего уровня в 71,4 на 0,73 мм², так и более этого показателя. Так, 5-летняя выживаемость при плотности до 71,4 была 61,5%±11,2, а при превышении среднего показателя 38,8%±9,7 (p=0.9), а при 10-летней выживаемости данный показатель составил 49,5%±15,3 и 31,2%±10,7% соответственно (p=0,9; рис. 5 b). Анализ значимости активности AgNOR для 10-летней выживаемости показал, что при количестве гранул в эндотелии сосудов ПЗ до уровня среднего показателя в 1,9 10-летняя выживаемость составила 43,8%±9,2, а при превышении среднего показателя — 31,5%±7,3, различия недостоверны (p>0,3). В тоже время при анализе влияния активности AgNOR эндотелия сосудов опухоли на выживаемость больных при количестве гранул до уровня среднего показателя в 11,6 10-летняя выживаемость составила 61,5%±12,3, а при превышении среднего показателя до 10 лет не дожила ни одна больная (p<0,05; рис. 6 a, b).

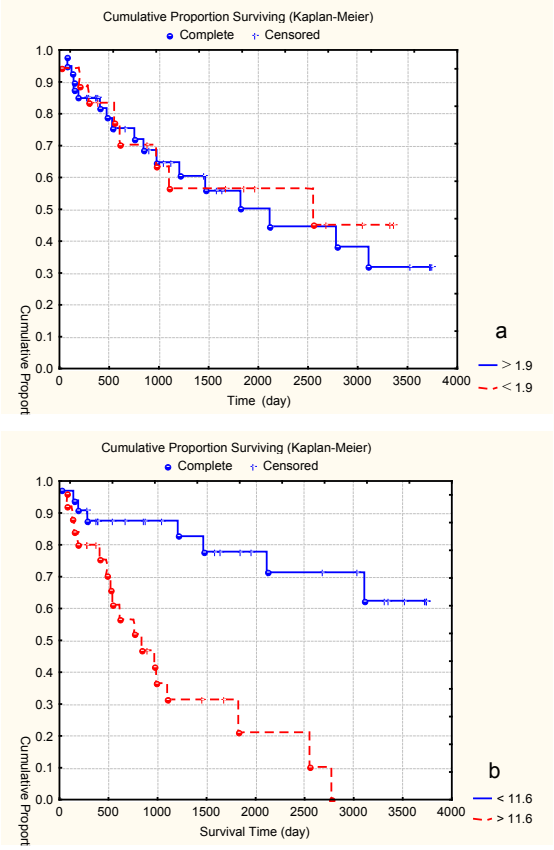

Рис. 5 Кумулятивная пропорция 10-летней выживаемости больных ЛМС в зависимости от количества AgNOR белков эндотелия ПЗ (a) и опухоли (b).

Сопоставление показателей для определения независимого фактора 10-летней выживаемости методом регрессионного многофакторного анализа развития микроциркуляторного русла по Коксу показало, что только ПМЦР является независимым прогностическим предиктором (табл. 2). Данная закономерность выражалась в том, что даже при невысокой ПМЦР опухоли, но при большой ПМЦР ПЗ прогноз был значимо неблагоприятней, чем при обратной ситуации.

Таблица 2

Показатель значимости прогностических изучаемых критериев при многофакторном регрессионном анализе по Коксу

Клинико-патологическая характеристика	Chi square	p
Стадия (по FIGO)	9	0,002
pTNM категория	10,9	0,0009
Степень злокачественности	14,2	0,0002
AgNOR перитуморозной зоны	0,01	0,9
AgNOR опухоли	1,9	0,1
ПМЦР(CD31) перитуморозной зоны	27,5	0,0003
ПМЦР(CD31) опухоли	0,1	0,8

Выводы

1. При ЛМС тела матки ПМЦР не зависела от стадии процесса, размера и степени злокачественности опухоли.

2. Не было выявлено достоверной разницы и корреляции в ПМЦР опухоли и ПЗ.

3. Активность AgNOR эндотелия опухоли и эндотелия ПЗ не имела связи с размером опухоли, стадией процесса, однако была выявлена четкая связь со степенью злокачественности опухоли (r=0,36).

4. Обнаружена взаимосвязь степени неоангиогенеза, степени зрелости и скорости пролиферации эндотелия при ЛМС с рядом клинико-морфологических параметров, в том числе и прогнозом. Показатель среднего числа AgNORs в эндотелии нашел отражение при анализе выживаемости больных ЛМС тела матки, когда при возрастании скорости роста сосудов (причем даже без выраженной плотности сосудов опухоли) снижался показатель 10-летней выживаемости.

5. ПМЦР в перитуморозной зоне опухоли в большей степени влияла на выживаемость больных саркомой, чем ПМЦР в самой опухоли.

6. ПМЦР ПЗ является независимым прогностическим предиктором при ЛМС тела матки относительно стадии и степени злокачественности при χ^2=27,5.

Список литературы

1. Гагуа И.Р., Кузнецов В.В., Лазарева Н.И., Нечушкина В.М., Захарова Т.И., Завольская Ж.А. Факторы прогноза и тактика лечения больных лейомиосаркомой матки // Вест. РОНЦ. — 2007. — №3. — С. 23–29.

2. Derenzini M. The AgNORs // Micron. — 2000. — Vol.31. — P.117–120.

3. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? // J. Natl. Cancer Inst. — 1990. — Vol.82. — P.4–6.

4. Folkman J. The role of angiogenesis in tumour growth. // Semin. Cancer Biol. — 1992. — Vol.3. — P.65 — 71.

5. Giuntoli R.L., Metzinger D.S., DiMarco C.S., Cha S.S., Sloan J.A., Keeney G.L., Goustaut B.S. 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.

6. Kapp D.S., Shin J.Y., Chan J.K. Prognostic factors and survival in 1396 patients with uterine leiomyosarcomas: emphasis on impact of lymphadenectomy and oophorectomy // Cancer. — 2008. — Vol.112. –P.820–830.

7. Korneyev I.A., Mamaev N.N., Kozlov V.V., Rybakova M.G., Al — Shukri S.H. Interphase argyrophilic nucleolar organizer regions and nucleolar counts in transitional cell bladder tumours // J. Clin. Pathol. Mol. Pathol. — 2000. — Vol.53 — P.129–132.

8. Sirri V., Roussel P., Hernandez-Verdun D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle // Micron. — 2000. — Vol.31. — P.121–126.

9. Verheul H.W., Voest E.E., Schlingemann R.O. Are tumours angiogenesis-dependent? // J. Pathol. — 2004. — Vol.202. — P. 5–13.