

© Воробьева О.В., Новичков Е.В., 2015

УДК 618.11-006.86-047.72

**ПРОГНОЗ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ
ЭНДОМЕТРИОИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКОВ
НА ОСНОВАНИИ ГИСТОСПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
ЯДЕР ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

О.В. Воробьева, Е.В. Новичков

ФГОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»,
г. Чебоксары

В работе, на основании изучения 76 случаев эндометриоидного рак яичников показана значительная роль количественных и качественных изменений нуклеиновых кислот в опухолевых клетках, которые сопряжены с увеличением вероятности развития метастазов. Также указывается на роль и значение фотометрических и плоидометрических исследований в практике врачей онкологического профиля для последующего составления плана лечения больных и прогноза течения заболевания.

Ключевые слова: рак, яичник, ДНК, плоидность, эндометриоидный, прогноз, пролиферация, метастаз.

Весь колоссальный спектр проблем рака яичников объясняется особенностью этиологии, патогенеза новообразования этой железы, а также в неповторимости самой инкреторной природы яичника и его значения в гомеостазе женского организма. Мультикомпонентное строение половой эндокринной железы, сочетание тканевых структур самых различных физиологических направлений обеспечивают разнообразный спектр гистологических типов опухолей этого органа. Вместе с тем, приняв во внимание промежуточные варианты и новообразования, в которых диагностируются два и более гистологических варианта, число форм опухолей яичников увеличивается в геометрической прогрессии.

Сегодня все большую актуальность приобретают работы, посвященные оценке содержания нуклеиновых кислот в ядрах опухолевых клеток рака яичников [4, 6]. Проанализировав мировой научный опыт мы обратили внимание на отсутст-

вие единодушной оценки связи количественных и качественных изменений нуклеиновых кислот в клеточных ядрах овариального рака с прогнозом рака яичников. Так одни исследователи пришли к выводу, что нет зависимости между количеством ДНК и выживаемостью пациенток, однако, анэуплоидные клетки преобладают в низкодифференцированных новообразованиях женских гонад. Другие же напротив убеждены в том, что большая продолжительность жизни констатируется у больных с двойным набором хромосом в клетках опухолевой ткани, а увеличение уровня анэуплоидии в неоплазмах сопряжено с укорочением безрецидивного периода. В литературе получили освещение, например, такие факты, что стадия заболевания и плоидность связаны друг с другом – в 3 и 4 стадии онкологического заболевания раковые клетки характеризуются анэуплоидией. Также индекс ДНК связан со степенью гистологической дифференцировки новообразо-

вания, а число клеток в синтетической фазе цикла существенно выше в анеуплоидных опухолях, по сравнению с диплоидными [6].

Е.В. Новичков (2010) определил значение количества ДНК в комплексе с площадью, периметром и форм-фактором ядра опухолевой клетки, исследуя паренхиматозную ткань в 222 резецированных неоплазмах яичников серозного гистотипа, при этом установил, что больные с высоким содержанием ДНК и с анеуплоидными опухолями попадают в группу с весьма плохим прогнозом, чем с диплоидными [5]. Статистическая обработка подтвердила, что содержание ДНК имеет существенное прогностическое значение при первичных карциномах яичников.

Анализ количества дезоксирибонуклеиновой кислоты в сочетании с иммуногистохимическими маркерами пролиферации и апоптоза в опухолевых клетках используется для предсказания рецидивирования рака женских гонад. Имеются сведения, указывающие на возможность прогноза повторного развития опухоли при многофакторном анализе с учётом количества ДНК, активности апоптоза, стадии заболевания [2]. Одновременно с этим, содержание ДНК рассматривается как независимый фактор прогноза выживаемости больных.

В последние годы одним из информативных, легко воспроизводимых в практике, дешевых и доступных способов определения уровня клеточного полиморфизма и степени злокачественности карциномы признается фотометрический метод определения плоидности ядер клеток злокачественных эпителиальных опухолей. В его основу заложено гистоспектрофотометрическое измерение содержания дезоксирибонуклеиновой кислоты в ядрах неопластических клеток в гистологических препаратах, окрашенных по методу Фельгена. В фазе покоя (интерфаза) плоидность клеточного ядра равна $2c$, то есть имеет два набора хромосом. В S фазу клеточного цикла содержание ДНК в клеточном ядре увеличивается в два раза, клетка становится тетраплоидной ($4c$), и лишь затем делится (M фаза, митоз). Следовательно, превышение

значений плоидности $2c$ в ядрах опухолевых клеток будет отражать активность пролиферации и степень полиморфизма клеток в исследуемой ткани.

Целью нашего исследования стало изучение особенностей нуклеиновых кислот в опухолевых клетках и их ядер метастазирующих карцином яичников эндометриоидного гистологического происхождения.

Материалы и методы

Для изучения содержания нуклеиновых кислот в ядрах и цитоплазме опухолевых клеток первичных эндометриоидных карцином яичников все гистологические срезы окрашивались метиловым зелёным – пиронином G по методу Браше. Использовалась система фотометрического измерения MpvBio Leica, включающая в себя: компьютер с операционной системой Windows 7, совмещённый с микроскопом Leica оснащенный спектральным анализатором. Тщательно соблюдались требования, предъявляемые к сравнительной гистоспектрофотометрии, в частности: толщина гистологических срезов была одинаковой 5 мкм, предметные и покровные стёкла одинаковой толщины, одного производителя. Все сравниваемые срезы окрашивались одновременно, строго контролировались условия освещённости и пороги яркости исследуемых микрообъектов во всех случаях. Замеры осуществляли в 1000 опухолевых клеток при увеличении микроскопического объекта в 900 раз в режиме «2-lambda method» для длины волн 500 и 650 нм светового спектра с изучением степени пропускания и поглощения монохроматического света. Количество нуклеиновых кислот фиксировалось в условных единицах оптической плотности (у.е.), что соответствовало величине поглощения света с длиной волн – 500 нм для рибонуклеиновой кислоты и 650 нм для дезоксирибонуклеиновой кислоты. Распределение рибонуклеиновой кислоты по видам мы не проводили. В дальнейшем оценивались взаимосвязи между количеством хроматина в ядрах, содержанием рибонуклеиновой кислоты в клетках карциномы яичников с вероятностью развития метастазов.

Плоидометрию ядер клеток ракового узла проводили на гистологических микропрепаратах, окрашенных по методу Фельгена с помощью автоматического анализатора видео изображения Quantimet 500, интегрированного с микроскопом Leica, оснащенного монохроматичным светофильтром с длиной волны 570 нм. «Тканевой стандарт плоидности» определяли в тех же гистологических срезах путем измерения средней интегральной яркости ядер малых лимфоцитов, являющейся постоянной равной двойному набору хромосом (2c) [1]. Плоидность клеточных ядер паренхимы исследуемых злокачественных новообразований яичников в единицах «с», вычисляли посредством деления среднего показателя интегральной яркости ядер опухолевой паренхимы на 0,5 «тканевого стандарта».

Результаты, полученные в ходе научного изыскания, были обработаны с помощью статистического пакета SPSS 14.0. В нашем случае прибегли к непара-

метрическим статистическим методам. При определении значимости разницы между средними величинами двух групп учитывался U-критерий Манна-Уитни, между несколькими группами – H-критерий Крускала-Уоллиса.

Результаты и их обсуждение

Для установления фотометрических параметров, патогномоничных для эндометриоидных новообразований яичников, имеющих тенденцию к опухолевой прогрессии в форме метастазирования все 76 случаев карцином были распределены на 2 группы:

1. неоплазмы без метастазов (18 случаев);
2. карциномы яичников с наличием опухолевых депозитов в других органах и тканях (58 случаев).

В дальнейшем все гистологические препараты, окрашенные по методу Браше, были подвергнуты фотометрическому анализу. Результаты, полученные при исследовании представлены в таблице 1.

Таблица 1

Гистоспектрофотометрические характеристики эпителиальных клеток рака яичников эндометриоидного гистологического происхождения с учётом наличия вторичных опухолевых очагов

| Показатель | Исследуемая группа | | Достоверность, p= |
|---------------------------|--------------------|---------------|-------------------|
| | Без метастазов | С метастазами | |
| Индекс РНК, у.е. | 0,17±0,065 | 0,16±0,068 | 0,765 |
| Индекс ДНК, у.е. | 0,22±0,127 | 0,19±0,088 | 0,645 |
| $\frac{Инд.РНК}{Инд.ДНК}$ | 0,92±0,367 | 0,89±0,339 | 0,241 |

При оценке содержания дезоксирибонуклеиновой кислоты в ядрах неопластических клеток меньшие значения диагностированы в условиях прогрессии неоплазмы в другие органы и ткани (0,19±0,088 у.е., p=0,645), одновременно отношение индексов нуклеиновых кислот констатировалось статистически незначимо ниже (0,89±0,339, p=0,241).

Для более точного установления роли фотометрических критериев в прогнозе метастатического процесса мы уточнили значение индексов нуклеиновых кислот в раковом эпителии в соответствии со степенью гистологической зрелости эндометриоидного рака женских гонад.

При анализе содержания дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой кислот в неопластических клетках констатировались схожие тенденции не зависимо от степени дифференцировки. Наибольшие значения ДНК и РНК выявлены в неметастазирующих карциномах, также как и отношение индексов нуклеиновых кислот констатировалось статистически незначимо выше.

Исследование гистоспектрофотометрических характеристик злокачественных эндометриоидных новообразований яичников с учётом распространения на брюшину, большой сальник, плевру и печень представлен в таблице 2.

Таблица 2

Гистоспектрофотометрическая характеристика эпителия метастазирующих овариальных карцином в зависимости от локализации раковых депозитов

| Локализация метастазов | Индекс РНК, у.е. | Индекс ДНК, у.е. | Инд.РНК/Инд.ДНК | ПЖ ¹ , мес |
|---------------------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------------|
| 1. Брюшина | 0,23±0,120 | 0,23±0,078 | 0,97±0,201 | 42,6±24,55 |
| 2. Большой сальник | 0,13±0,033 | 0,17±0,106 | 0,89±0,106 | 27,2±19,59 |
| 3. Без метастазов | 0,17±0,065 | 0,22±0,127 | 0,92±0,367 | 66,1±42,12 |
| Достоверность, p ₁₋₄ | 0,124 | 0,126 | 0,864 | 0,140 |
| Достоверность, p ₁₋₃ | 0,048 | 0,084 | 0,457 | 0,627 |
| Достоверность, p _{1,2} | 0,035 | 0,05 | 0,05 | 0,768 |
| критерии | 0,029 | 0,094 | 0,034 | 0,180 |
| Достоверность, p _{1,4} | 0,039 | 0,846 | 0,098 | 0,296 |
| Достоверность, p _{2,4} | 0,067 | 0,049 | 0,453 | 0,092 |
| Достоверность, p _{3,4} | 0,072 | 0,084 | 0,024 | 0,033 |

Сопоставляя данные таблицы 2, можно констатировать, что фотометрические свойства клеток и клеточных ядер паренхимы эндометриоидной карциномы различаются в соответствии с топографией метастатических депозитов. Так, наивысшие значения количества РНК и ДНК (0,23±0,120 у.е. и 0,23±0,078 у.е. соответственно) определялись в карциномах, распространяющихся только по брюшине. Одновременно эти неоплазмы характеризовались самыми высокими показателями коэффициента Инд.РНК/Инд.ДНК (0,97±0,201), а также имели наилучший прогноз заболевания в группе карцином с метастазами (42,6±24,55 мес.).

Что касается возможности прогнозирования ранних имплантационных метастазов по листкам брюшины, необходимо отметить закономерное снижение содержания как РНК так и ДНК при резком убывании Инд.РНК/Инд.ДНК по сравнению с непрогрессирующими эндометриоидными неоплазмами.

При исследовании числа наборов хромосом в ядрах опухолевых клеток эндометриоидных карцином яичников нами установлено, что в новообразованиях не склонных к формированию неопластических отсевов этот показатель был несколько ниже, чем в аналогах с имплантационными метастазами. Так, средняя ploidy клеточных ядер опухолевой паренхимы без метастатической активности колебалась в пределах 4,08±0,949с,

тогда как при наличии метастазов, ploidy ядер клеток ракового эпителия колебалась в диапазоне 4,58±1,189с. Однако, выявленные различия не показали статистической достоверности (p= 0,546).

Сведения, полученные нами в ходе научной работы, находят подтверждение, как в отечественной, так и в зарубежной литературе. В этих работах коллеги однозначно указывают на негативное воздействие на клетки в S и G₂ фазы, которые приводят к нарушению процесса репарации ДНК и, в свою очередь, к появлению анеуплоидных клеток [3, 7]. Образование клеток с анеуплоидным профилем генетического материала потенциально опасно не только, как фактор развития злокачественного новообразования, но может учитываться и, как неотъемлемый компонент прогрессии рака яичников [4, 8].

Выводы

1. Увеличение количества нуклеиновых кислот в паренхиматозных клетках эндометриоидного рака яичников может свидетельствовать об уменьшении риска развития опухолевых депозитов (p=0,765 и p=0,645) и закономерно снижается при генерализации канцероматозного процесса (p=0,035 и p=0,05), с одновременным снижением индекса соотношения нуклеиновых кислот (p=0,05).

2. Изолированная оценка фотометрических параметров опухолевых клеток при прогнозе возможного метастазирования на наш взгляд не допустима, но

должна применяться в комплексе с клиническими, морфометрическими, гистохимическими и иммуногистохимическими маркерами заболевания.

3. Пloidометрия структурных элементов раковой паренхимы может быть использована как современный, высокоинформативный, легко воспроизводимый и достоверный метод диагностики вероятного развития прогрессии опухолевого процесса при эндометриоидном раке яичников.

4. Нарастание величины ploидности ядер опухолевых клеток сопряжено с возрастом клеточного атипизма, повышением уровня катаплазии опухоли и развитием метастазов при эндометриоидном раке яичников ($p=0,546$).

Литература

1. Автандилов Г.Г. Методика ploидометрии в диагностике стадий новообразований: методические рекомендации / Г.Г. Автандилов. – М.: РМАПО, 2005. – 12 с.
2. Колосов А.Е. Ploidометрические и иммуногистохимические сопоставления в практике доклинической диагностики рецидива рака яичника / А.Е. Колосов, Е.В. Новичков, А.А. Вотинцев // Рос. мед. вестн. – 2006. – Т. 11, № 1. – С. 46-49.
3. Мнихович М.В. Роль нарушений механизмов пролиферации и апоптоза в морфогенезе фиброзно-кистозной мастопатии / М.В. Мнихович // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2011. – № 1. – С. 146-153.
4. Новичков Е.В. Значение гистоспектрофотометрических параметров опухоли в прогнозе метастазирования серозной овариальной карциномы / Е.В. Новичков, А.А. Вотинцев // Пермский мед. журн. – 2006. – Т. 23, №2. – С. 87-93.
5. Новичков Е.В. Патоморфологические критерии прогноза возобновления опухолевого роста и метастазирования рака яичников: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Е.В. Новичков. – Челябинск, 2010. – 46 с.
6. Cell-free DNA level as a prognostic biomarker for epithelial ovarian cancer / J.H. No [et al.] // Anticancer Research. – 2012. – Vol. 32, № 8. – P. 3467-3472.
7. Benefits and harms associated with hormone replacement therapy: clinical decision analysis / C. Minelli [et al.] // BMJ. – 2004. – Vol. 328, № 7436. – P. 371-385.
8. Association between DNA damage response and repair genes and risk of invasive serous ovarian cancer / J.M. Schildkraut [et al.] // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5, № 4. – P. 10061.

THE PROGNOSIS OF METASTASIS OF THE OVARY ENDOMETRIOID CARCINOMA ON THE BASIS HISTOPATHOLOGICALLY INDICATORS NUCLEI OF TUMOR CELLS

O.V. Vorobeva, E.V. Novichkov

In operation, on the basis of a study of 76 cases of endometrioid ovarian cancer shows a significant role of quantitative and qualitative changes of nucleic acids in tumor cells, which are associated with increased likelihood of developing metastases. Also indicated on the role and importance of photometric and ploidometric diagnosis of uveal melanomas research in the practice of medical Oncology profile for the subsequent plan treatment of patients and the prognosis of the disease.

Keywords: cancer, ovarian cancer, DNA ploidy, endometrioid, forecast, proliferation, metastasis.

Воробьева О.В. – к.м.н., доц. кафедры патофизиологии, патологической анатомии с клинической патологической анатомией и судебной медицины.

E-mail: olavorobeva@mail.ru

Новичков Е.В. – к.м.н., доц. кафедры патофизиологии, патологической анатомии с клинической патологической анатомией и судебной медицины.

E-mail: novichkovjenya@mail.ru