
МОРФОЛОГИЯ

Д. В. Буланов*, А. В. Смирнов, В. Л. Загребин, Д. Ю. Гуров

Московская городская онкологическая больница № 62*,
кафедра патологической анатомии, кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии ВолгГМУ,
Волгоградский медицинский научный центр

АЛГОРИТМ ОЦЕНКИ ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ЭКСПРЕССИИ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ БИОМАРКЕРОВ ПРИ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ОПУХОЛЕЙ СЕМЕЙСТВА САРКОМЫ ЮИНГА

УДК 616-006:616-006.3.04

Представлен алгоритм оценки прогностической значимости экспрессии иммуногистохимических биомаркеров опухолей семейства саркомы Юинга. Показано, что иммуногистохимические характеристики опухоли обуславливают морфологическую гетерогенность и являются значимыми прогностическими факторами.

Ключевые слова: опухоли семейства саркома Юинга, маркеры пролиферации, апоптоз, иммуногистохимические характеристики.

D. V. Bulanov, A. V. Smirnov, V. L. Zagrebin, D. Yu. Gurov

ALGORITHM OF IMMUNOHISTOCHEMICAL BIOMARKERS EXPRESSION PROGNOSTIC SIGNIFICANCE EVALUATION IN MORPHOLOGICAL DIAGNOSIS OF EWING'S SARCOMA FAMILY TUMORS

An algorithm for the evaluation of the prognostic value of immunohistochemical expression of biomarkers of Ewing's sarcoma family tumors is proposed. It is shown that immunohistochemical tumor characteristics determine morphological heterogeneity and are significant predictors.

Key words: Ewing's sarcoma family of tumors, proliferation markers, apoptosis, immunohistochemical characteristics.

С конца 1990-х гг. в литературе стал общепринятым термин «опухоли семейства саркомы Юинга» (ОССЮ), объединяющий классическую саркому Юинга кости (КСЮ), ее экстраскелетный аналог — периферическую примитивную нейроэктодермальную опухоль кости (pPNET) и злокачественную мелкоклеточную опухоль торакопальмональной зоны (опухоль Аскина) [1, 4]. Сегодня количество иммуногистохимических биомаркеров, рассматриваемых в качестве прогностически значимых, увеличивается лавинообразно, отражая достижения и находки в области изучения механизмов регуляции пролиферации и апоптоза опухолевых клеток [5, 6]. Учет морфологических факторов прогноза может послужить важнейшим инструментом выработки стратегии лечения этой группы опухолей, что позволяет надеяться на достижение значимых результатов в лечении больных с данной патологией [2, 3, 10].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определение алгоритма оценки прогностической значимости экспрессии иммуногистохимических биомаркеров опухолей семейства саркомы Юинга.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования — образцы ткани опухолей 35 больных в возрасте от 16 до 37 лет, взятые до начала лечения, с морфологически верифицированным диагнозом ОССЮ. Исследуемые больные с ОССЮ ($n = 35$) были разделены на две возрастные группы, 1-я — пациенты до 30 лет, 2-я — пациенты старше 30 лет. После фиксации образцов тканей опухолей в 10%-м забуференном формалине, изготовления серийных парафиновых срезов 5 мкм по стандартной методике проводили иммуногистохимичес-

кое исследование иммунопероксидазным методом. Оценивали удельное количество позитивно окрашенных клеток с использованием моноклональных антител «ДАКО» (Дания) к следующим белкам: Вах, Bcl-2, p53, Ki-67, PCNA, хромогранин А (Хр А), синаптофизин, нейронспецифическая-енолаза (NSE), S-100, а также частоту обнаружения исследуемых иммуногистохимических маркеров в ткани опухоли — величину, выраженную в процентах и характеризующую количество случаев больных с ОССЮ в образцах (биоптатах) опухолевой ткани, в которых обнаружены иммунопозитивные клетки.

Удельное количество позитивно окрашенных клеток оценивалось стандартизированными методами морфометрии с помощью системы анализа изображений, программы «Видеотест-Морфо-4» (Россия). Микрофотосъемку гистологических препаратов проводили на микроскопе «Axio Scope A1», Carl Zeiss™ (Германия) с использованием цифровой фотокамеры «Canon PowerShot», программного обеспечения AxioVision LE, Carl Zeiss™ (Германия).

Было проведено изучение архивных материалов (истории болезни) для проведения сравнительного анализа между уровнем экспрессии иммуногистохимических маркеров (Вах, Bcl-2, p53, Ki-67, PCNA, хромогранин А, синаптофизин, нейронспецифическая-енолаза, S-100) в исследуемых образцах опухолевой ткани и клиническими данными: прогрессированием заболевания (продолженный рост опухоли, рецидив) и наличием отдаленных метастазов.

Вариационно-статистическую обработку данных (вычисление средней арифметической величины, среднего квадратичного отклонения, доверительный интервал, коэффициент вариации, дисперсию, ошибку репрезентативности для каждого параметра в исследуемых группах пациентов, сравнение средних значений по критерию Стьюдента, сравнение качественных признаков по критерию χ^2) проводили на ЭВМ Intel Core 2 Duo с использованием программы STATISTICA 6.0. Значимыми считали различия, если вероятность ошибки $P < 0,05$. При проведении регрессионного анализа

рассчитывали коэффициент корреляции для нормальных распределений. Для определения характеристики выраженности связей между отдельными структурно-функциональными показателями проводили корреляционный анализ с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Были установлены достоверные ($p < 0,05$) различия между величиной удельного количества иммунопозитивных клеток для маркера S-100 и метастазированием опухоли, уровень экспрессии данного маркера был значимо ниже в образцах опухолевой ткани больных без метастазов, по сравнению с аналогичным параметром у больных с наличием метастазов (табл.).

Установлено, что частота экспрессии фактора пролиферации, белка Ki-67 и ядерного фактора PCNA в ОССЮ была одинаковой, маркер p53 значительно чаще был выявлен в опухолях у 78,6 % больных с метастазами и только в 46,7 % случаев у пациентов с отсутствием таковых. В первичной опухоли определялась экспрессия маркера апоптоза bcl-2 в 35,7 % случаев при наличии метастазов и в 46,7 % случаев — при их отсутствии. Наиболее выраженные отличия были обнаружены при исследовании маркера Вах: отсутствие метастазов у больных с ОССЮ ассоциировалось с его обнаружением в ткани опухоли у 53,3 % больных, в то время как при наличии метастазов данный белок был обнаружен лишь в 14,3 % случаев. Достоверно более высокой была частота обнаружения экспрессии белка p53 при наличии метастазов [(21,1 ± 5,7) %], чем при их отсутствии [(8,7 ± 2,0) %].

Результаты проведенного исследования позволили нам обосновать и предложить к использованию апробированный алгоритм морфологической дифференциальной диагностики и оценки прогноза злокачественных мелкокруглоклеточных опухолей семейства саркомы Юинга.

Характеристика иммуногистохимических реакций в изучаемых группах больных при наличии/отсутствии метастазов

Маркеры	Удельное количество иммунопозитивных клеток, %		Частота обнаружения исследуемого маркера, % случаев, в которых обнаружены иммунореактивные опухолевые клетки	
	Отсутствие Mts (n = 17)	Выявление Mts (n = 18)	Отсутствие Mts (n = 17)	Выявление Mts (n = 18)
Ki-67	28,0 ± 2,9	32,5 ± 4,1	100	100
PCNA	42,5 ± 3,2	45,0 ± 6,9	100	100
p53	8,7 ± 3,0	21,1 ± 5,7*	46,7	78,6*
Bcl-2	16,0 ± 3,5	15,0 ± 5,6	46,7	35,7
Вах	10,7 ± 1,8	3,2 ± 1,3*	53,3	14,3*
S-100	12,9 ± 1,8	8,8 ± 1,2*	71,4	56,3
Хромогранин А	7,9 ± 1,1	5,3 ± 0,9	78,6	50,0*
NSE	54,4 ± 4,6	55,3 ± 5,2	60,2	58,7
Синаптофизин	28,6 ± 3,1	31,3 ± 3,0	38,9	40,1

* $p < 0,05$

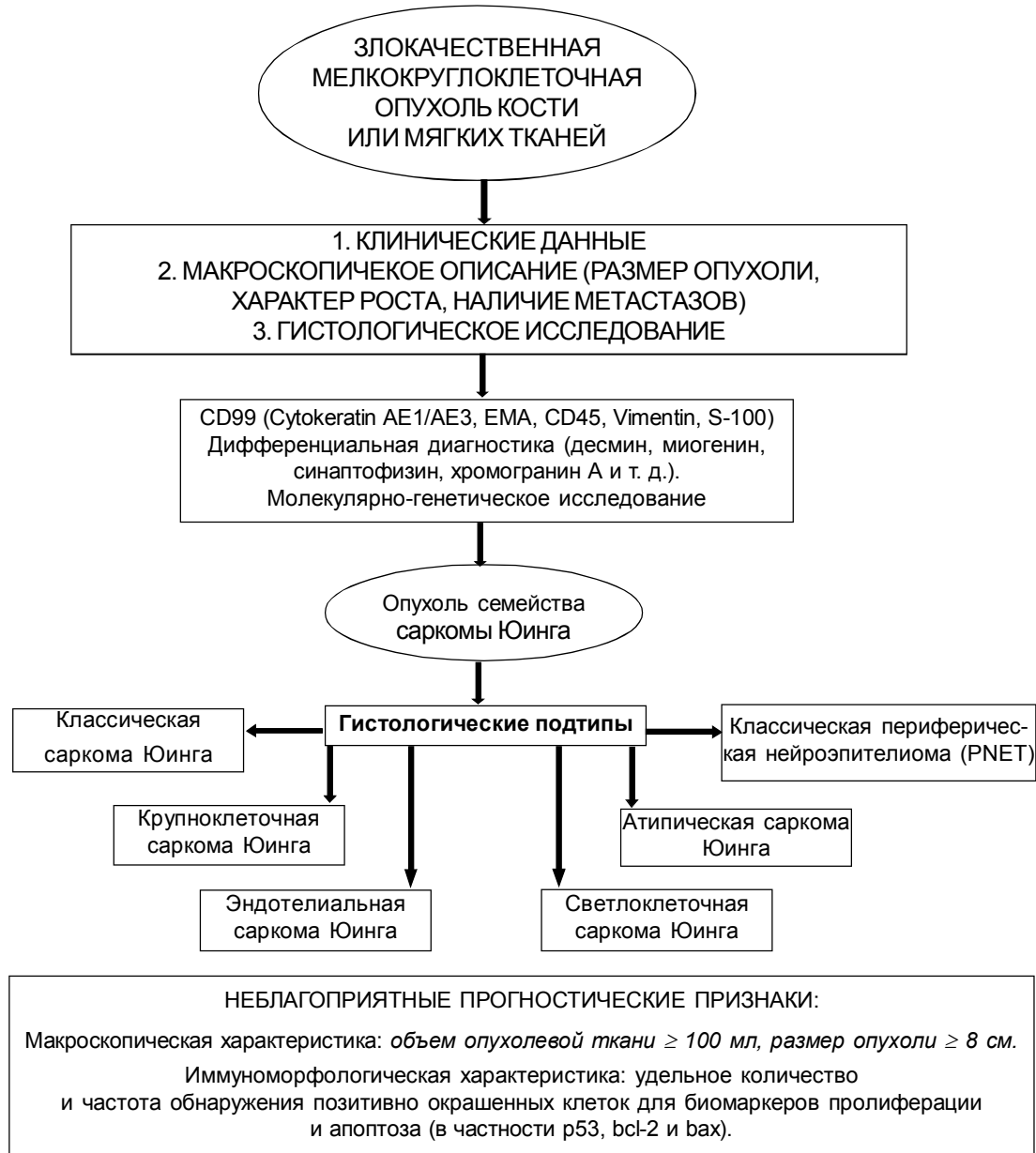


Рис. Алгоритм диагностики и прогностической оценки ОССЮ

Из предлагаемой схемы диагностического алгоритма (рис.) при работе врача-патологоанатома с операционным материалом, полученным в результате операций по поводу опухолей семейства саркомы Юинга, видно, что первичным является макроскопическое исследование, проводимое по общепринятым методикам с оценкой размеров/объема, массы и локализации опухоли.

Следующий этап включает в себя проведение гистологического исследования с описанием гистологических особенностей строения опухоли. В ряде случаев возникает необходимость в дифференциальной диагностике опухолей семейства саркомы Юинга с другими злокачественными мелкокруглоклеточными саркомами костей и мягких тканей (в первую очередь с неходжкинской лимфомой, эмбриональной рабдомиосаркомой, мел-

клеточным вариантом остеосаркомы) с проведением иммуно-гистохимической (ИГХ) реакции с широкой панелью антител (CD99, Cytokeratin AE1/AE3, EMA, CD45, Vimentin, S-100), дифференциальная диагностика (десмин, миогенин, синаптофизин, хромогранин А и т. д.). Важной составляющей морфологической верификации опухолей семейства саркомы Юинга является молекулярно-генетическое исследование, подтверждающее наличие наиболее часто обнаруживаемого устойчивого типа мутации [t (11; 22) (q24;q12)]. Также считаем необходимым в алгоритме диагностики указывать гистологический вариант опухолей семейства саркомы Юинга, несмотря на отсутствие, согласно данным литературы, наличия прогностической значимости выявления гистологического варианта данного семейства неоплазий.

На последнем заключительном этапе мы предлагаем проведение комплексной прогностической оценки предполагаемого течения опухолевого процесса с учетом макроскопических характеристик (размера опухоли/объема опухолевой ткани), удельного количества позитивно окрашенных опухолевых клеток для следующих биомаркеров пролиферации и апоптоза: p53, bcl-2, bax, S-100, Хр А.

Независимыми факторами плохого прогноза являются размер первичной опухоли более 8 см в диаметре или объем более 100—200 см³. Большой объем опухолевой массы коррелирует с уменьшением вероятности достижения локального контроля после лучевой терапии или оперативного вмешательства. Наличие экстраоссального мягкотканного компонента также сопряжено с увеличением риска местного рецидива.

Согласно количественным результатам нашего исследования, у пациента старше 20 лет с опухолью семейства саркомы Юинга может быть спрогнозировано относительно благоприятное течение заболевания вне зависимости от пола при наличии следующих условий: при ИГХ-окрашивании опухолевой ткани bax удельное количество позитивно окрашенных опухолевых клеток равно или выше 15,3 %; при ИГХ-окрашивании опухолевой ткани p53 иммунореактивный материал отсутствует, а в случае позитивного окрашивания удельное количество позитивно окрашенных опухолевых клеток равно или ниже 2,7 %; при ИГХ-окрашивании опухолевой ткани bcl-2 иммунореактивный материал отсутствует, а в случае позитивного окрашивания удельное количество позитивно окрашенных опухолевых клеток равно или ниже 2,8 %; при ИГХ-окрашивании опухолевой ткани S-100 удельное количество позитивно окрашенных опухолевых клеток равно или выше 20,7 %; при ИГХ-окрашивании опухолевой ткани Хр А удельное количество позитивно окрашенных опухолевых клеток равно или выше 9,8 %.

Напротив, у пациента старше 20 лет с опухолью семейства саркомы Юинга может быть спрогнозировано относительно неблагоприятное течение заболевания вне зависимости от пола при наличии следующих условий: при ИГХ-окрашивании опухолевой ткани bax иммунореактивный материал отсутствует, а в случае позитивного окрашивания удельное количество позитивно окрашенных опухолевых клеток равно или ниже 0,7 %; при ИГХ-окрашивании опухолевой ткани p53 удельное количество позитивно окрашенных опухолевых клеток равно или выше 27,5 %; при ИГХ-окрашивании опухолевой ткани bcl-2 удельное количество позитивно окрашенных опухолевых клеток равно или выше 22,7 %; при ИГХ-окрашивании опухолевой ткани S-100 иммунореактивный материал отсутствует, а в случае позитивного окрашивания удельное количество позитивно окрашенных опухолевых клеток равно или ниже 4,2 %; при ИГХ-окраши-

вании опухолевой ткани Хр А иммунореактивный материал отсутствует, а в случае позитивного окрашивания удельное количество позитивно окрашенных опухолевых клеток равно или ниже 3,2 %.

В случаях, когда значения удельного количества позитивно окрашенных опухолевых клеток хотя бы по одному из указанных прогностических биомаркеров не укладываются в вышеуказанные диапазоны, прогноз течения заболевания опухоли семейства саркомы Юинга необходимо считать менее определенным.

В последние годы сверхэкспрессия белков, участвующих в регуляции процессов апоптоза, была исследована в различных злокачественных новообразованиях. Исследование одного какого-либо маркера не обеспечивает необходимой базы для прогнозирования течения заболевания и соответственно принятия решения о дальнейшем лечении пациента [8]. Проводимое в последние годы активное и целенаправленное изучение опухолей данной группы позволило выявить значительное число опухолевых специфических генетических повреждений, являющихся промоторами неконтролируемой клональной пролиферации, что во многом определяет характер и прогноз клинического течения заболевания [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при оценке иммуногистохимических характеристик опухолей семейства саркомы Юинга у пациента старше 20 лет выявлено, что для биомаркеров p53, bcl-2, bax, S-100, Хр А удельное количество и частота обнаружения иммунопозитивных клеток являются независимыми факторами прогноза клинического течения для опухолей семейства саркомы Юинга и их количественное исследование можно рекомендовать в качестве алгоритма морфологической дифференциальной диагностики и оценки прогноза злокачественных мелкокруглоклеточных опухолей семейства саркомы Юинга.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Иванова Н. М., Дзампаев А. З.* Злокачественные опухоли костей: Руководство / Под ред. М. Д. Алиева. — М.: Издательская группа РОНЦ, 2008. — С. 295—356.
2. *Киселев Л. П.* Молекулярная диагностика и интенсификация химиотерапии прогностически неблагоприятных форм саркомы Юинга у детей: автореф. дис. ... к. м. н. — Минск, 2007. — 21 с.
3. *Леенман Е. Е., Кочурова Н. В., Белогурова М. Б. и др.* // *Вопр. онкол.* — 2003. — Т. 49, № 2. — С. 21—25.
4. *Bacci G., Balladelli A., Forni C., et al.* // *J. Bone Joint Surg. Br.* — 2007. — Vol. 89, № 9. — P. 1229—1233.
5. *Berghuis D., de Hooge A. S., Santos S. J.* // *J. Pathol.* — 2009. — Vol. 218. — P. 222—231.
6. *Hancock J. D., Lessnick S. L.* // *Cell Cycle.* — 2008. — Vol. 7. — P. 250—256.
7. *Iwamoto Y.* // *Jpn. J. Clin. Oncol.* — 2007. — Vol. 37, № 2. — P. 79—89.
8. *Scottlandi K., Remondini D., Castellani G., et al.* // *Journal of Clinical Oncology.* — 2009. — Vol. 27, № 13. — P. 2209—2216.
9. *Zagar T. M., Triche T. J., Kinsella T. J.* // *Journal of Clinical Oncology.* — 2008. — Vol. 26, № 26. — P. 4230—4232.