

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МИКРОСПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ДНК ПРИ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОМ РАКЕ

Черданцева Т. М.¹, Бобров И. П.¹, Климачев В. В.¹, Брюханов В. М.¹, Лазарев А. Ф.², Сеченев Е. И.¹, Смирнов П. В.¹

¹Алтайский государственный медицинский университет, e-mail: drakon@agmu.ru

²Алтайский филиал РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, г. Барнаул, e-mail: atcr@mail.ru

В работе исследовано прогностическое значение плоидности опухолевых клеток при почечно-клеточном раке. Материалом для исследования послужил операционный материал 107 больных раком почки. Средний возраст пациентов составил $57,8 \pm 0,9$ лет. Мужчин было 48 (44,9 %), женщин – 59 (55,1 %). Выявлены корреляционные взаимосвязи между плоидностью, клинической стадией ($r = 0,64$; $p = 0,0001$), размером опухолевого узла ($r = 0,44$; $p = 0,0001$), наличием регионарных и дистантных метастазов ($r = 0,68$; $p = 0,0001$) и градацией опухоли по Fuhrman ($r = 0,75$; $p = 0,001$). Не было обнаружено взаимосвязи плоидности с полом ($r = 0,10$; $p = 0,30$), возрастом ($r = 0,08$; $r = 0,41$) больных и гистологическим вариантом опухоли ($r = 0,09$; $p = 0,32$). Полиплоидию клеток опухоли можно рассматривать в качестве критерия вероятного возникновения метастазов. Обнаружена взаимосвязь плоидности новообразований с общей выживаемостью больных. Высокий уровень плоидности клеток опухоли – неблагоприятный фактор в предсказании выживаемости больных.

Ключевые слова: рак почки, плоидность, прогноз.

PROGNOSTIC VALUE OF THE DNA MIKROSPEKTROFOTOMETRICHESKY RESEARCH AT RENAL-CELL CANCER

Cherdantseva T. M.¹, Bobrov I. P.¹, Klimachev V. V.¹, Brukhanov V. M.², Lasarev A. F.², Sechenev E. I.¹, Smirnov P. V.¹

¹The Altay state medical university

²The Altay branch of Russian oncology scientific center N. N. Blokhina of the Russian Academy of Medical Science, Barnaul

In work prognostic of a ploidy value of tumoral cells is investigated in renal-cell cancer. The material for the study served a surgical material of 107 patients with renal cancer. The average patient age was $57,8 \pm 0,9$ years. Men were 48 (44.9%), women – 59 (55.1%). It was revealed correlations between ploidy, clinical stage ($r = 0,64$; $p = 0,0001$), the size of the tumor site ($r = 0,44$; $p = 0,0001$), the presence of regional and distant metastases ($r = 0,68$; $p = 0,0001$) and the grading of the Fuhrman tumor ($r = 0,75$; $p = 0,001$). Relationship of ploidy to gender ($r = 0,10$; $p = 0,30$), age ($r = 0,08$; $r = 0,41$) of patients and histological types of tumor ($r = 0,09$; $p = 0,32$) was not revealed. Polyploidy of tumor cells can be considered as a criterion for the probable occurrence of metastases. An interconnection ploidy tumors with overall survival of patients was revealed. The high level of tumor cells of ploidy - is an unfavorable factor in predicting survival.

Key words: cancer of a kidney, ploidy, prognosis.

Интерес к изучению прогностического значения биомолекулярных маркеров и в том числе к плоидности опухоли при почечно-клеточном раке (ПКР) сохраняется на протяжении последних десятилетий. Не ослабевают усилия исследователей по поиску взаимосвязей между плоидностью новообразования, традиционными классическими факторами прогноза и отдаленными результатами после хирургического лечения ПКР.

В ряде работ авторы обнаружили взаимосвязь между плоидностью опухоли и градацией опухоли по Fuhrman [3, 10, 15,16]. В то же время в работах других авторов не обнаружена взаимосвязь между плоидностью и степенью дифференцировки клеток опухоли [6,14,17].

Исследованию взаимосвязи между плоидностью и клинической стадией заболевания при ПКР посвящены немногочисленные работы. Так, DiCaruaSacotoС. и соавт. (2011) показали, что процент анеуплоидных опухолей увеличивался с возрастанием клинической стадии опухолевого процесса. Сходные данные получили и другие авторы [7]. Однако другие исследователи не обнаружили взаимосвязи плоидности с клинической стадией ПКР [14].

В некоторых исследованиях описаны особенности плоидности опухолевых клеток в различных гистологических вариантах ПКР. По этим данным плоидность была взаимосвязана с гистологическим вариантом опухоли [10]. LiG. и соавт. (2005) указывают на то, что анализ плоидности полезен для дифференциальной диагностики подтипов ПКР в морфологически трудных случаях. Так, AkhtarM. etal. и соавт. (1999) показали, что хромофобные раки характеризовались гипоплоидным хромосомным набором опухолевых клеток. Другие авторы не обнаружили корреляции плоидности с гистологическим типом опухоли [17].

Имеется небольшое количество работ, посвященных изучению плоидности в первичных опухолях при метастазировании. По данным FeilG. и соавт. (1999) плоидность клеток опухоли возрастала в метастазирующих опухолях. Аналогичные данные приводят и другие авторы [13]. В то же время есть исследователи, которые не обнаружили взаимосвязи между плоидностью новообразования и возникновением метастазов [6].

Имеются исследования, в которых найдена корреляция плоидности опухоли с размером опухолевого узла [5,15,17]. По данным LiG. и соавт. (2002) анеуплоидные клоны клеток, главных образом, были обнаружены в опухолях крупных размеров.

В ряде работ была выявлена взаимосвязь между плоидностью ПКР и послеоперационным выживанием больным [1,11,12,], но также имеются работы, в которых данной взаимосвязи обнаружено не было [18]. В то же время по расчетам Vudia A. A. и соавт. (2007) вероятность смерти больных с анеуплоидными опухолями была в 1,7 раза выше, чем больных диплоидными опухолями.

Таким образом, несмотря на обилие работ по изучению прогностического значения плоидности при ПКР, полученные авторами данные противоречивы и поэтому значение данного маркера при прогнозе РП нуждается в дальнейшем изучении.

Целью данной работы стало микроспектрофотометрическое исследование плоидности ДНК при ПКР и поиск взаимосвязей маркера с важнейшими клиничко-анатомическими факторами прогноза и послеоперационной выживаемостью пациентов.

Материал и методы

Изучен операционный материал 107 больных ПКР. Средний возраст пациентов составил $57,8 \pm 0,9$ лет. Мужчин было 48 (44,9 %), женщин – 59 (55,1 %). По гистологическому строению опухоли были представлены следующим образом: светлоклеточный рак – 79; зернистоклеточный рак – 8; папиллярный рак – 12; хромофобный рак – 4; веретенклеточный (саркоматоидный) рак – 1 и нейроэндокринный рак – 3.

При группировке опухолей по клиническим стадиям (I–IV) было выделено: I стадии (T1N0M0) соответствовали 71 (66,3 %) наблюдения; II стадии (T2N0M0) 5 (4,7 %) наблюдения; III стадии (T1N1M0, T2N1M0, T3N0M0, T3N1M0) – 17 (15,9 %) и IV стадии (T4N0M0, T4N1M0, ТлюбаяN2M1, ТлюбаяNлюбаяM1) – 14 (13,1 %). Степень злокачественности оценивали по Fuhrman S.A. и соавт (1982). Изученный материал включал 48 (44,9 %) опухолей степени анаплазии G1; 23 (21,5 %) опухолей степени анаплазии G2; 9 (8,4 %) степени анаплазии G3 и 27 (25,2 %) степени G4.

Метастатических карцином было 18, опухолей без метастазов было – 89. Средний размер опухолевого узла составил – $6,3 \pm 0,3$ см.

Материал фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине на протяжении 12 – 24 часов. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином, на коллаген по ван Гизон и кислые мукополисахариды коллоидным железом по Гале. Нейроэндокринный фенотип карцином выявляли иммуногистохимическим методом с использованием моноклональных антител к хромогранину А и синаптофизину.

Сведения о выживаемости больных получали по данным канцер-регистра и амбулаторных карт.

Микроспектрофотометрическое исследование ДНК проводили с использованием системы компьютерного анализа изображений, состоящей из микроскопа Leica DME, цифровой камеры Leica EC3 (Leica Microsystems AG, Германия), персонального компьютера и программного обеспечения ВидеоТест – Морфология 5.2. Пloidометрию ДНК проводили на гистологических срезах, окрашенных по Фельгену. Среднее содержание ДНК в ядрах малых лимфоцитов принимали за диплоидное (2с) и использовали в качестве стандарта. Для получения стандарта в каждом срезе оценивали 25 – 30 лимфоцитов. Затем в исследуемых опухолевых клетках высчитывали индекс накопления ДНК (ИНДНК) в единицах ploидности (с).

Статистическую обработку материала проводили при помощи статистического пакета Statistica 6.0. При нормальном распределении данных при проверке статистических гипотез применяли методы параметрической статистики (t – test Стьюдента), а если полученные данные не соответствовали критериям нормального распределения (критерий Шапиро – Уилка $W = 0,89$, $p < 0,01$), то применяли тест Колмогорова – Смирнова или U – тест Манна – Уитни. Данные считали достоверными при $p < 0,05$. Построение кривых выживаемости проводили по

методу Kaplan – Meier, достоверность различий показателей оценивали с помощью log – rank теста.

Результаты и обсуждение

Среди всех исследованных больных вне зависимости от пола, возраста, варианта ПКР и т.д. разброс значений ИНДНК при ПКР колебался от 2,1с до 10,7с. Среднее значение ИНДНК во всей группе составило $4,7с\pm 0,2$. Низкий ИНДНК (диплоидные и триплоидные опухоли) был обнаружен в 33 (30,8 %) опухолях, а высокий ИНДНК (тетраплоидные и полиплоидные опухоли) в 74 (76,2 %).

Сопоставление ИНДНК опухолей с классическими прогностическими клинико-анатомическими факторами ПКР позволило выявить некоторые корреляционные взаимосвязи.

Корреляционный анализ выявил взаимосвязи ИНДНК с клинической стадией заболевания ($r = 0,64$; $p = 0,0001$), размером опухолевого узла ($r = 0,44$; $p = 0,0001$), наличием регионарных и дистантных метастазов ($r = 0,68$; $p = 0,0001$) и градацией опухоли по Фурману ($r = 0,75$; $p = 0,001$). Не было обнаружено взаимосвязей с полом ($r = 0,10$; $p = 0,30$), возрастом ($r = 0,08$; $r = 0,41$) больных и гистологическим вариантом опухоли ($r = 0,09$; $p = 0,32$).

Среднее значение ИНДНК у мужчин составило $4,9с\pm 0,3$, а у женщин – $4,5с\pm 0,2$ ($p = 0,30$).

В зависимости от возраста средние показатели ИНДНК составили: у больных в возрасте от 30 – 39 лет – $4,1с\pm 0,6$; от 40 до 49 лет – $5,1с\pm 0,6$; от 50 до 59 лет – $5,2с\pm 0,3$; от 60 до 69 лет – $4,3с\pm 0,3$ и от 70 до 79 лет – $4,8с\pm 0,6$. Таким образом, самые высокие показатели ИНДНК наблюдали в возрастной группе больных от 50 до 59 лет, а самые низкие в группе от 30 до 39 лет.

У пациентов с I клинической стадией заболевания среднее значение ИНДНК составило $3,8с\pm 0,1$, со II стадией – $4,7с\pm 0,6$, с III стадией – $6,5с\pm 0,5$ и с IV стадией – $6,7с\pm 0,3$. Таким образом, в III и IV стадиях отмечали увеличение ИНДНК по сравнению с более ранними стадиями патологического процесса.

В зависимости от гистологического варианта ПКР наименьшее среднее значение ИНДНК было обнаружено в хромофобной карциноме ($3,7с\pm 0,4$). Промежуточное положение занимали папиллярный ($4,4с\pm 0,4$), светлоклеточный ($4,5с\pm 0,2$) и нейроэндокринный раки ($5,0с\pm 0,8$). Наибольшие показатели ИНДНК отмечали при зернистоклеточном ($6,0с\pm 0,5$) и веретенклеточном варианте ($9,3 с$).

С увеличением степени ядерной атипии по Фурману обнаруживали увеличение ИНДНК: при GI ИНДНК составил $3,3с\pm 0,1$, при GII – $4,8с\pm 0,2$, при GIII – $5,4с\pm 0,4$ и при GIV – $7,0с\pm 0,4$ (рис.1).

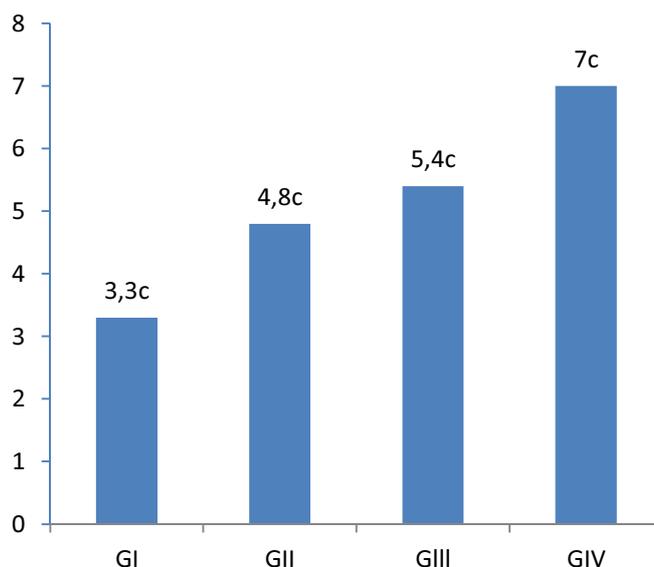


Рис.1. Гистограмма, характеризующая ИНДНК в зависимости от степени ядерной атипии опухоли. По оси абсцисс – степень ядерной атипии по Фурману; по оси ординат – ИНДНК ($p < 0,05$)

При размере опухолевого узла $< 7,0$ см ИНДНК был $4,2 \pm 0,2$, а при размере $\geq 7,0$ см ИНДНК достоверно увеличивался до $5,9 \pm 0,3$ ($p = 0,000005$).

У больных без регионарных и отдаленных метастазов уровень ИНДНК составил $3,9 \pm 0,1$, а при наличии метастазов он достоверно возростал до $6,6 \pm 0,3$ ($p = 0,0000001$) (табл.).

Таблица

Показатели уровня ИНДНК в зависимости от наличия регионарных и отдаленных метастазов

Отдаленные и регионарные метастазы	ИНДНК (с)
Без метастазов	$3,9 \pm 0,1^*$
С метастазами	$6,6 \pm 0,3^*$

Примечание: * - $p < 0,05$.

Для оценки отдаленных результатов послеоперационной выживаемости больных в зависимости от ИНДНК опухоли, новообразования нами были разделены на 3 группы: 1-ю группу составили диплоидные и паратетраплоидные опухоли (менее 3,5 с); 2-ю группу составили паратетраплоидные и тетраплоидные опухоли (более 3,5 с); 3-ю группу составили полиплоидные и анеуплоидные опухоли (5 с и более). При анализе по Каплан - Мейеру было обнаружено, что когда ИНДНК опухоли составлял менее 3,5 с, то кумулятивная доля выживших к 1800 дню составила 0,98, когда ИНДНК составлял более 3,5 с, то кумулятивная доля выживших к 1800 дню была 0,75, а когда ИНДНК опухоли возрастал до 5 с и более, то кумулятивная доля выживших к 1800 дню снижалась до 0,50 (рис. 2).

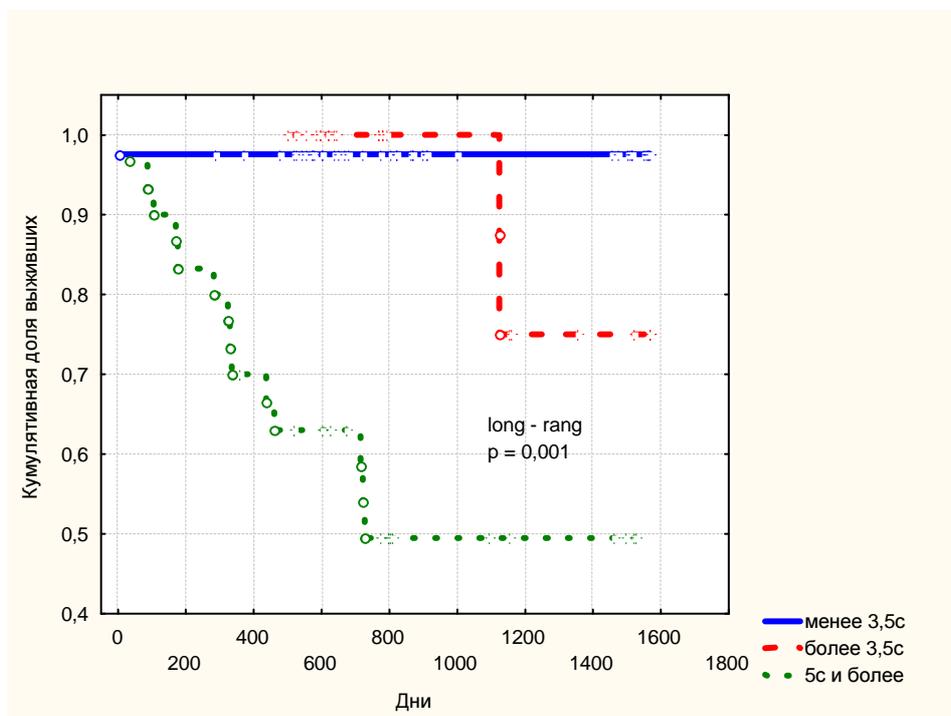


Рис. 2. Кумулятивная пропорция 5-летней выживаемости больных ПКР в зависимости плоидности опухоли

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что ИНДНК был взаимосвязан с рядом важных прогностических клинико-анатомических факторов ПКР и поэтому может быть использован в качестве дополнительного фактора прогноза. Возрастание ИНДНК в клетках опухоли можно рассматривать в качестве критерия вероятного возникновения метастазов опухоли. Выявлена взаимосвязь величины ИНДНК и общей выживаемости больных. Высокий уровень значения ИНДНК – неблагоприятный фактор в предсказании послеоперационной выживаемости больных.

Список литературы

1. Abou-Rebyeh H., Borgmann V., Nagel R., Al-Abadi H. DNA ploidy is a valuable predictor for prognosis of patients with resected renal cell carcinoma // Cancer. – 2001. – Vol.92. – P. 2280 – 2285.
2. Akhtar M, Chantziantoniou N. Quantitative image cell analysis of cytologic smears for DNA ploidy in renal parenchymal neoplasms // DiagnCytopathol. – 1999 – Vol.21. – P. 223 – 229.

3. Budía Alba A, Gómez Pérez L, Bango V, Ruiz-Cerdá JI, Sempere A, Queipo JA, Jiménez Cruz JF. Prognostic factors for disease progression in patients with renal cell carcinoma // *ActasUrol Esp.* – 2007. – Vol.31. – P. 831 – 844.
4. Di Capua Sacoto C, Budia Alba A, AlapontAlacreu JM, Ruiz Cerda JL, Jimenez Cruz JF. In vivo aneuploidization during the expansion of renal adenocarcinoma // *Urol Int.* – 2011. – Vol.86. – P. 466 – 469.
5. Di Silverio F, Casale P, Colella D, Andrea L, Seccareccia F, Sciarra A. Independent value of tumor size and DNA ploidy for the prediction of disease progression in patients with organ-confined renal cell carcinoma // *Cancer.* – 2000. – Vol.88. – P. 835 – 843.
6. Eskelinen M, Lipponen P, Nordling S. Prognostic evaluation of DNA flow cytometry and histo-morphological criteria in renal cell carcinoma // *Anticancer Res.* – 1995. – Vol.15. – P. 2279 – 2283.
7. Feil G, Mittermüller B, Bichler KH, Wunderer A, Wechsel HW, Nelde HJ, St Krause F. DNA cytophotometry in renal cell carcinoma: a significant prognostic factor ? // *Anticancer Res.* – 1999. – Vol.19. – P. 1483 - 1486.
8. Li G, Cottier M, Sabido O, Gentil-Perret A, Lambert C, Passebosc-Faure K, Genin C, Tostain J. The in vivo DNA aneuploidization during expansion of conventional renal cell carcinoma // *In Vivo.* – 2002. – Vol.16. – P. 341 – 344.
9. Li G, Cottier M, Sabido O, Gentil-Perret A, Lambert C, Genin C, Tostain J. Different DNA ploidy patterns for the differentiation of common subtypes of renal tumors // *Cell Oncol.* – 2005. – Vol.27. – P. 51 – 56.
10. Liu L, Zhang C. DNA ploidy analysis and Ki-67 examination on renal neoplasms: investigation of degree of malignancy and biological behavior of small renal tumors // *Zhonghua Bing Li XueZaZhi.* – 2001. – Vol.30. – P. 39 – 42.
11. Minervini A, Di Cristofano C, Collecchi P, Salinitri G, Selli C, Bevilacqua G, Minervini R, Cavazzana A. Intracapsular clear cell renal carcinoma: ploidy status improves the prognostic value of the 2002 TNM classification // *J Urol.* – 2005. – Vol.174. – P. 1203 – 1207.
12. Nativ O, Sabo E, Madeb R, Halachmi S, Madjar S, Moskovitz B. Prognostic score for patients with localized renal cell carcinoma treated by nephrectomy // *Isr Med Assoc J.* – 2001. – Vol.3. – P. 24 – 27.
13. Nenning H, Rassler J, Minh DH. DNA cytometry in renal cell carcinoma // *Gen Diagn Pathol.* – 1996. – Vol.141. – P. 243 – 247.
14. Papadopoulos I, Rudolph P, Weichert-Jacobsen K. Value of p53 expression, cellular proliferation, and DNA content as prognostic indicators in renal cell carcinoma // *Eur Urol.* – 1997. – Vol.32. – P. 110 – 117.

15. Pinto AE, Monteiro P, Silva G, Ayres JV, Soares J. Prognostic biomarkers in renal cell carcinoma: relevance of DNA ploidy in predicting disease-related survival // *Int J Biol Markers*. – 2005. – Vol.20. – P. 249 – 256.
16. Schafhauser W, Liedl T, Elsässer D, Zörcher T, Schrott KM. Flow cytometric analysis of DNA-aneuploidy subgroups and proliferation in renal cell carcinoma // *Anticancer Res*. – 1999. – Vol.19. – P. 1471 – 1475.
17. Skolarikos A, Alivizatos G, Bamias A, Mitropoulos D, Ferakis N, Deliveliotis C, Dimopoulos MA. Bcl-2 protein and DNA ploidy in renal cell carcinoma: do they affect patient prognosis? // *Int J Urol*. – 2005. – Vol.12. – P. 563 – 569.
18. Tannapfel A, Hahn HA, Katalinic A, Fietkau RJ, Kghhn R, Wittekind CW. Prognostic value of ploidy and proliferation markers in renal cell carcinoma // *Cancer*. – 1996. – Vol. 77. – P. 164 – 171.

Рецензенты:

Высоцкий Юрий Александрович, д.м.н., профессор, зав. кафедрой нормальной анатомии человека ГБОУ ВПО АГМУ, г. Барнаул.

Лепилов Александр Васильевич, д.м.н., профессор каф. патологической анатомии с секционным курсом ГБОУ ВПО АГМУ, г. Барнаул.