

КОМПЬЮТЕРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНЕУПЛОИДИИ В ОЦЕНКЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ ОПУХОЛИ И ПРОГНОЗА ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ ПРИ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОМ РАКЕ

Тяпкин Д.А.¹, Бобров И.П.¹, Черданцева Т.М.¹, Климачев И.В.¹, Долгатов А.Ю.¹,
Шульц К.В.¹, Обухова Л.Е.¹

¹ГБОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Россия, e-mail: drakon@agmu.ru

В работе исследовано прогностическое значение компьютерной морфометрии содержания ДНК в ядрах опухолевых клеток при почечно-клеточном раке. Материалом для исследования послужил операционный материал 115 больных раком почки. Карциномы почки характеризовались частой анеуплоидией (63,5%). Выявлены корреляционные взаимосвязи наличия анеуплоидии в опухоли с клинической стадией ($r = 0,57$; $p = 0,0001$), размером опухолевого узла ($r = 0,57$; $p = 0,0001$), наличием регионарных и отдаленных метастазов ($r = 0,50$; $p = 0,0001$) и степенью анаплазии опухоли по Fuhrman ($r = 0,85$; $p = 0,001$). При диплоидном содержании ДНК в опухоли к 2000-му дню после операции были живы 100% больных, а при анеуплоидии клеток в опухоли к 2000-му были живы 63% больных (log-rank, $p = 0,00005$). Таким образом, наличие анеуплоидии в опухоли является неблагоприятным фактором прогноза при раке почки.

Ключевые слова: рак почки, анеуплоидия, прогноз

COMPUTER INVESTIGATION OF ANEUPLOIDY IN THE ASSESSMENT OF BIOLOGICAL TUMOR BEHAVIOR AND FORECAST SURVIVAL OF PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA

Tyapkin D.A.¹, Bobrov I.P.¹, Cherdantseva T.M.¹, Klimachev I.V.¹, Dolgатов A.U.¹,
Shultz K.V.¹, Obuchova L.E.¹

¹The Altai state of medical university, Barnaul, Russia, e-mail: drakon@agmu.ru

We have investigated the prognostic value of computer morphometry of DNA content in the nuclei of tumor cells in renal cell carcinoma. Material for the study served as a surgical material 115 patients renal cancer. Renal carcinoma characterized by frequent aneuploidy (63.5%). Revealed correlations in the presence of aneuploidy tumor with cus-cal stage ($r = 0,57$; $p = 0,0001$), the size of the tumor node ($r = 0,57$; $p = 0,0001$), the presence of regional and distant metastases ($r = 0,50$; $p = 0,0001$) and degree of anaplasia tumor Fuhrman ($r = 0,85$; $p = 0,001$). When diploid DNA content in tumors 2000 th day after the operation was 100% of the patients still alive, while aneuploidy in a tumor cell by 2000 were alive 63% of patients (log-rank, $p = 0,00005$). Thus, the presence of aneuploidy in the tumor is an adverse prognostic factor in renal cancer.

Keywords: renal cell carcinoma, aneuploidy, prognosis.

В настоящее время во многих экономически развитых странах прослеживается неуклонный рост заболеваемости и смертности от рака почки. Есть основания полагать, что биологическое и клиническое поведение опухоли в значительной степени зависит от генетических нарушений и интенсивности пролиферации, отражением которых может служить несбалансированность содержания ядерной ДНК (анеуплоидия) опухолевых клеток [1]. Данное утверждение основано на исследовании множества опухолей различных локализаций. В то же время некоторые авторы говорят о том, что анеуплоидия не оказывает влияния на биологическое поведение опухоли [9].

По данным исследований разных авторов, процент анеуплоидных опухолей при раке почки различен и колеблется от 46% до 87%.

По данным Di Carua Sacoto С. и соавт. (2011), при возрастании стадии патологического процесса при раке почки значительно возросло число анеуплоидных опухолей. Взаимосвязь клинической стадии с анеуплоидией была обнаружена и в других исследованиях [8].

При возрастании степени анаплазии по Fuhrman было выявлено возрастание числа анеуплоидных клонов [10].

В некоторых работах имеются данные, что при увеличении размера опухолевого узла при ПКР число анеуплоидных опухолей возрастает [5]. Однако Nenning Н. и соавт. (1997) не нашли корреляции между анеуплоидией и размером опухоли.

По данным некоторых авторов, анеуплоидные карциномы при ПКР сопровождалась развитием метастазов [4]. В то же время по данным Ljungberg В. и соавт. (1988) отдаленные метастазы появились в приблизительно той же самой частоте у пациентов с диплоидными и анеуплоидными опухолями (35 и 29 % соответственно).

Прогностическая ценность исследования анеуплоидии при ПКР показана в ряде работ. Так, по данным Abou-Rebyeh Н. и соавт. (2001) из пациентов с диплоидными опухолями 92 % больных пережили 10 лет, в то время как из больных с анеуплоидными опухолями никто не прожил больше 3 лет.

Таким образом, данные по исследованию значения анеуплоидии при почечно-клеточном раке противоречивы, данный вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

Целью нашего исследования стало изучение анеуплоидии ДНК в клетках рака почки и прогноза выживаемости при сопоставлении с некоторыми клинико-морфологическими параметрами новообразования и его биологическим поведением.

Материал и методы исследования

Изучен операционный материал 115 больных раком почки. Средний возраст пациентов составил $57,8 \pm 0,9$ года. Мужчин было 55 (47,8%), женщин – 60 (52,2%). Пloidометрию ДНК проводили на гистологических срезах, окрашенных по Фельгену, 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. Среднее содержание ДНК (ИНДНК) 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 20–30 исследуемых опухолевых клетках высчитывали содержание генетического материала в единицах ploидности (с). Степень анаплазии опухолевых клеток определяли по Fuhrman A.S. (1985). Статистическая обработка материала производилась с помощью статического пакета Statistica 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты проведенного исследования показали, что среди всех исследуемых больных вне зависимости от пола, возраста, размера опухолевого узла, стадии TNM, наличия метастазов разброс показателей индекса накопления ДНК (ИНДНК) в ядрах составил от 1,9 с до 10,7с. Среднее значение ИНДНК для всей группы больных составило $4,85 \pm 0,05$.

На парадиплоидные и диплоидные опухоли пришлось 8,7% новообразований, паратриплоидные и триплоидные опухоли составили 27,83%, а частота новообразований с несбалансированностью содержания ДНК ($> 4,5с$) в опухолевых клетках составила 63,5% от общего количества исследованных опухолей.

Был проанализирован характер изменений ИНДНК в зависимости от пола больных. Среднее значение ИНДНК у мужчин составило $5,25 \pm 0,07$, а у женщин — $4,48 \pm 0,06$.

В то же время у мужчин уровни ИНДНК составили: от 1,5 с до 2,4 с – (10,91%) 6 случаев; от 2,5 с до 3,4 с (18,18%) — 10 случаев; от 3,5 с до 10,4 с – (70,91%) 39 случаев, а у женщин от 1,5 с до 2,4 с – 1 (6,66%) – 4 случая; от 2,5 с до 3,4с (36,66%) — 22 случая; от 3,5 с до 10,4 с – (56,66%) 34 случая (табл. 1).

Таблица 1

Уровень ИНДНК и процентное содержание клонов опухолевых клеток почечно-клеточного рака в зависимости от пола больных

Параметры ДНК	Мужской пол			Женский пол		
	ИНДНК	Абс. число	%	ИНДНК	Абс. число	%
ИНДНК	$5,25 \pm 0,07$		-	$4,48 \pm 0,06$		-
1,5 с – 2,4 с	—	6	10,91	—	4	6,66
2,5 с – 3,4 с	—	10	18,18	—	22	36,66
3,5 с – 10,4 с	—	39	70,91	—	34	56,66
Итого	—	55	100	—	60	100

Таким образом, несмотря на недостоверные различия между ИНДНК ($p=0,30$), у больных мужского пола отмечали тенденцию к увеличению числа полиплоидных и анеуплоидных опухолей ($r=0,09$).

При анализе ИНДНК в зависимости от возраста пациентов показано, что у больных в возрасте 30–39 лет ИНДНК составил $3,86 \pm 0,12$; от 40 до 49 лет — $5,1 \pm 0,16$; от 50 до 59 лет — $5,02 \pm 0,08$; от 60 до 69 лет – $5,1 \pm 0,1$ и от 70 до 79 лет — $4,2 \pm 0,1$ (табл. 2).

Таблица 2

ИНДНК в клетках почечно-клеточного рака в зависимости от возраста больных

Возраст (годы)	ИНДНК (с)	Абсолютное число (n)	Проценты (%)
30–39	$3,86 \pm 0,12$	5	4,4
40–49	$5,1 \pm 0,16$	15	13
50–59	$5,02 \pm 0,08$	45	39,1

60–69	5,1с±0,1	31	27
70–79	4,2с±0,1	19	16,5
Итого	—	115	100

Таким образом, несмотря на недостоверные различия между ИНДНК ($p=0,08$), самые высокие показатели ИНДНК наблюдали в возрастной группе больных от 40 до 49 лет, а самые низкие — в группе от 30 до 39 лет.

Нами проведено исследование плоидности в зависимости от клинической стадии заболевания. У пациентов с I клинической стадией среднее значение ИНДНК составило $3,84с±0,05$, со II стадией – $5,9с±0,1$, с III стадией — $6,35с±0,13$ и с IV стадией – $6,95с±0,17$ (табл. 3). Число анеуплоидных новообразований при I, II, III и IV клинических стадиях составило 32,4%, 33,3%, 80,95% и 100% соответственно.

Таблица 3

ИНДНК в клетках почечно-клеточного рака в зависимости от клинической стадии

Клиническая стадия	ИНДНК (с)	Абсолютное число (n)	Проценты (%)
I	3,84с±0,05	67	58,3
II	5,9с±0,1	18	15,6
III	6,35с±0,13	21	18,3
IV	6,95с±0,17	9	7,8
Итого	—	115	100

Таким образом, в III и IV стадиях отмечали увеличение ИНДНК по сравнению с более ранними стадиями патологического процесса ($p < 0,0001$). Наличие анеуплоидных клонов в неоплазиях коррелировало с возрастанием стадии патологического процесса ($r=0,57$; $p = 0,0001$).

Анализ взаимосвязи уровня ИНДНК и степени ядерной атипии позволил установить следующее: с увеличением степени ядерной атипии по Fuhrman обнаруживали увеличение ИНДНК: при GI ИНДНК составил $2,83с±0,02$, при GII — $4,4с±0,05$, при GIII – $6,67с±0,09$ и при GIV – $8,0с±0,11$. (рис. 1). При I, II, III и IV степенях анаплазии по Fuhrman количество анеуплоидных опухолей было 0%, 34,6%, 100% и 100% соответственно. Наличие анеуплоидных клонов в неоплазиях коррелировало с возрастанием степени анаплазии опухолевых клеток ($r = 0,85$; $p = 0,001$).

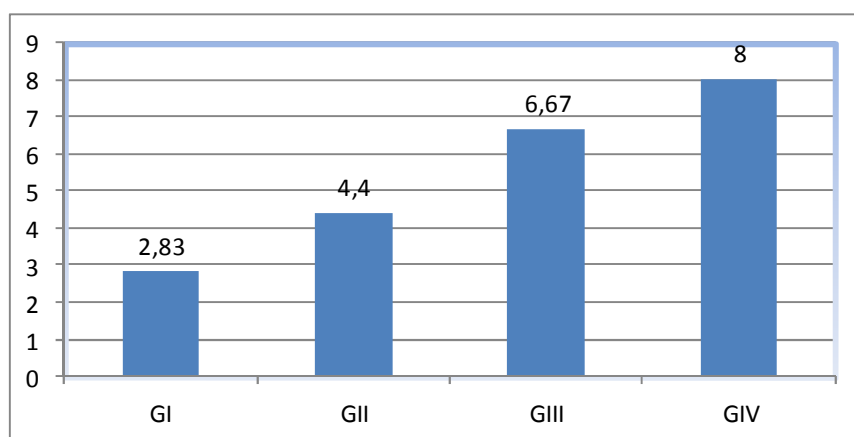


Рис. 1. ИНДНК в зависимости от степени ядерной атипии опухоли. По оси абсцисс – степень ядерной атипии по Fuhrman; по оси ординат – ИНДНК

При изучении ИНДНК в зависимости от размера опухоли обнаружено, что при размере опухолевого узла $< 7,0$ см (именно этот размер был нами избран в качестве контрольной точки отсчета, поскольку это значение составило медиану размера) ИНДНК был $3,91 \pm 0,05$, а при размере $\geq 7,0$ см ИНДНК достоверно увеличивался до $6,35 \pm 0,08$ ($p = 0,000005$) (табл. 4). При этом среди опухолей небольшого размера ($< 7,0$ см) анеуплоидию встречали в 24,3% случаев, а среди опухолей большего размера ($\geq 7,0$ см) — в 82,2% случаев.

Таблица 4

Параметры ИНДНК в зависимости от размера опухолевого узла

Размер опухолевого узла	ИНДНК (с)	Абсолютное число	Проценты (%)
$< 7,0$ см	$3,91 \pm 0,05$	70	60,87
$\geq 7,0$ см	$6,35 \pm 0,08$	45	39,13
Итого	—	115	100

Таким образом, ИНДНК опухолевых клеток при ПКР возрастал при увеличении опухолевого узла. Наличие анеуплоидных клонов в неоплазиях коррелировало с возрастанием размера опухолевого узла ($r = 0,57$; $p = 0,0001$).

Нами был проведен анализ ploидности в первичной опухоли в зависимости от ее метастатического потенциала. У больных без регионарных и отдаленных метастазов уровень ИНДНК составил $4,36 \pm 0,05$, а при наличии метастазов он достоверно возрастал до $7,1 \pm 0,12$ ($p = 0,0000001$) (табл. 5). Опухоли, имеющие регионарные и отдаленные метастазы, имели анеуплоидию в 100% случаев, а в опухолях без метастазов ее обнаруживали в 35,1% случаев.

Таблица 5

Показатели уровня ИНДНК в зависимости от наличия регионарных и отдаленных метастазов

Отдаленные и регионарные метастазы	ИНДНК (с)	Абсолютное число	Проценты (%)
Без метастазов	$4,36 \pm 0,05$	94	81,74
С метастазами	$7,1 \pm 0,12$	21	18,26
Итого	—	115	100

Наличие анеуплоидных клонов в неоплазиях коррелировало с наличием регионарных и отдаленных метастазов ($r = 0,50$; $p = 0,0001$). Таким образом, возрастание ИНДНК в клетках опухоли и наличие анеуплоидии в опухоли можно рассматривать в качестве критерия вероятного возникновения метастазов.

Нами был проведен анализ выживаемости по Каплан—Мейеру больных с диплоидным и анеуплоидным набором опухолевых клеток. При содержании ДНК $< 4,5c$ кумулятивная доля выживших к 2000-му дню после операции составила 1,0. При содержании ДНК $> 4,5c$ кумулятивная доля выживших составила 0,63. Различия данных достоверны (log rank, $p=0,00005$), что позволяет отнести анеуплоидию к прогностическим факторам 5-летней выживаемости у больных с ПКР (рис. 2).

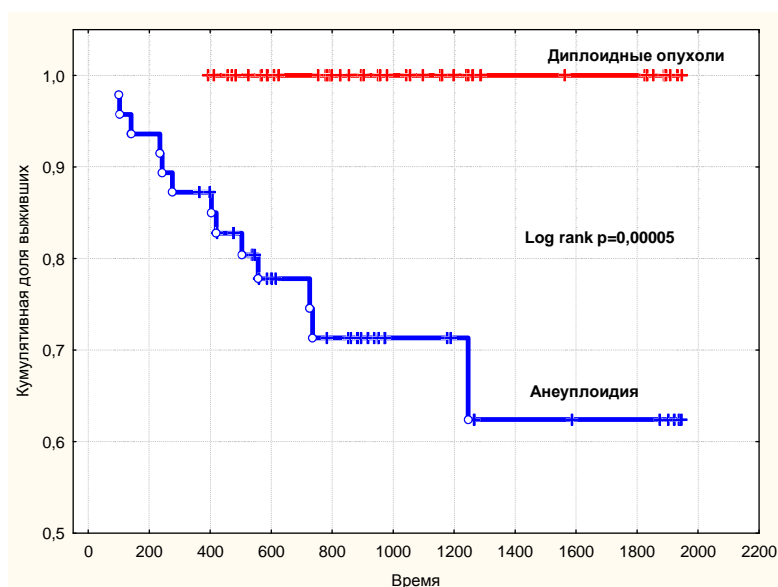


Рис. 2. Кумулятивная пропорция 5-летней выживаемости больных ПКР в зависимости от выраженности анеуплоидии

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что у больных с анеуплоидными опухолями возростала смертность.

Следовательно, несбалансированность содержания ДНК и наличие полиплоидных клонов клеток в карциномах почки ведут к возрастанию агрессивности опухолевого процесса при ПКР. Анеуплоидия опухолевых клеток взаимосвязана с рядом клинико-морфологических факторов при раке почки и выживаемостью больных. Возрастание ИНДНК и наличие анеуплоидии могут быть использованы в качестве дополнительных факторов прогноза при ПКР.

Список литературы

1. Бычкова Н. В., Пожариский К.М. Анеуплоидия и пролиферативная активность рака молочной железы (проточно-цитометрическое исследование) // Вопросы онкологии. — 1997. — Т. 43. № 2. — С. 171–175.
2. 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.
3. Di Capua Sacoto C., Budia Alba A., Alapont Alacreu J.M., Ruiz Cerda J.L., Jimenez Cruz J.F. In vivo aneuploidization during the expansion of renal adenocarcinoma // *Urol. Int.* — 2011. — Vol. 86. — P. 466–469.
4. Feil G., Mittermüller B., Bichler K.H., Wunderer A., Wechsel H.W., Nelde H.J., St Krause F. DNA cytophotometry in renal cell carcinoma: a significant prognostic factor? // *Anticancer Res.* — 1999. — Vol. 19. — P. 1483–1486.
5. 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.
6. Ljungberg B., Stenling R., Roos G. Tumor spread and DNA content in human renal cell carcinoma // *Cancer Res.* — 1988. — Vol.48. — P. 3165–3167.
7. Nenning H., Rassler J., Minh D.H. Heterogeneity of DNA distribution pattern in renal tumours // *Anal. Cell. Pathol.* — 1997. — Vol.14. — P. 9–17.
8. Papadopoulos I., Weichert-Jacobsen K., Sprenger E., Wacker H.H. DNA content and the proliferation marker Ki-67 as prognostic indicators in renal cell carcinoma // *Urol. Int.* — 1994. — Vol.53. — P. 181–185.
9. Ruiz-Cerdá J.L., Hernández M., Sempere A., O'Connor J.E., Kimler B.F., Jiménez-Cruz F. Intratumoral heterogeneity of DNA content in renal cell carcinoma and its prognostic significance // *Cancer*. — 1999. — Vol.86. — P. 664–671.
10. Schafhauser W., Liedl T., Elsässer D., Zörcher T., Schrott K.M. Flow cytometric analysis of DNA-aneuploidy subgroups and proliferation in renal cell carcinoma // *Anticancer Res.* — 1999. — Vol.19. — P. 1471–1475.

Рецензенты:

Бородина Г.Н., д.м.н., доцент, зав. кафедрой нормальной анатомии человека ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет», г. Барнаул;

Лепилов А.В., д.м.н., профессор, профессор кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет», г. Барнаул.