

УДК 616-006.6-091

ИНДИВИДУАЛЬНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ ПАРЕНХИМАТОЗНО-СТРОМАЛЬНОГО СООТНОШЕНИЯ В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ КАК ФАКТОР ПЯТИЛЕТНЕЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ ПАЦИЕНТОК С ИНВАЗИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В.В. Кометова¹, Р.М. Хайруллин², В.В. Родионов^{1, 2}, В.В. Занкин¹

¹ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», г. Ульяновск,
²Ульяновский государственный университет

В работе рассмотрен новый морфометрический показатель, характеризующий морфологическую гетерогенность инвазивного рака молочной железы, разработанный на основе количественного соотношения эпителиального и стромального компонентов опухолевой ткани. Разработанный индекс дисперсии тканевых структур статистически достоверно коррелирует с уже известными интегральными морфологическими индексами. Показана возможность его использования в качестве индивидуального показателя прогноза заболевания. При значении индекса менее 1,6 можно с 95 % вероятностью прогнозировать пятилетнюю выживаемость пациенток.

Ключевые слова: рак молочной железы, эпителиально-стромальное соотношение, интегральные морфологические индексы, прогноз заболевания.

Введение. Подбор правильного алгоритма терапии при лечении рака молочной железы (РМЖ) остается одной из актуальных задач в онкологии. Данная проблема привлекает внимание не только клиницистов, балансирующих между излишне радикальным лечением и вероятностью выбора неэффективной терапии, но и специалистов смежных специальностей, пытающихся понять биологические механизмы канцерогенеза при РМЖ. Биологическая гетерогенность РМЖ, продемонстрированная в большом количестве молекулярно-генетических исследований, может быть основой для поиска новых подходов в создании эффективных прогностических показателей. В качестве меры биологической гетерогенности можно использовать различные показатели, в т.ч. и морфологические прогностические индексы, отражающие структуру опухоли в количественном выражении. Инвазивный рак молочной железы – это злокачественная опухоль железистой ткани. Однако приоритетное изучение только эпителиального компонента при оценке опухолевой прогрессии не всегда позволяет дать полноценную оценку биологическому пове-

дению опухоли. Злокачественная опухоль является целостным образованием, в котором паренхима и строма находятся в тесном биологическом единстве. Изучение взаимоотношения эпителиальных структур и соединительнотканых элементов имеет важное значение для понимания механизмов межтканевых регуляций и поведения опухоли и давно привлекало внимание ученых.

Стромообразование в опухоли является результатом многообразных взаимодействий опухолевых клеток, сосудистых факторов и гистиогенных клеток соединительной ткани. В ряде исследований показано, что в нормальной ткани и при дисплазии легкой степени в тканях молочной железы паренхиматозно-стромальные взаимоотношения слабые. При РМЖ эти взаимосвязи резко усиливаются [1]. Т. Hasebe и соавт. установили, что наличие в опухоли очагов фиброза сочетается с большей выраженностью апоптоза опухолевых клеток и существенно ассоциировано с более выраженными показателями рецидива [8]. Низкие результаты химиотерапии опухолей могут быть обусловлены не только феноменом множественной лекарственной

устойчивости, но и тем, что химиопрепарат не доходит до клетки в адекватной и активной форме. Главным образом это связано с особенностями взаимоотношений клеток и стромы опухоли, которые меняются по мере роста опухоли и (или) в процессе лечения. Согласно ряду исследований, к неблагоприятным прогностическим признакам относят следующие изменения стромального компонента: высокую степень десмоплазии стромы с ее склерозом и резким преобладанием над паренхимой (скиррозные раки), высокий уровень кровоснабжения, снижение количества плазматических клеток [4, 6].

Стромальные клетки в свою очередь влияют на раковые паренхиматозные структуры: их тип, взаиморасположение, характер распространения. В результате исследований было выявлено, что с увеличением размера опухоли возрастает ее морфологическая гетерогенность за счет большего количества разных типов структур инфильтративного компонента. Вероятно, максимальная морфологическая гетерогенность опухолей большей величины отражает разнообразие их биологических потенциалов, в т.ч. и способности к лимфогенному и гематогенному метастазированию [2]. Способность к построению разных пространственных клеточных структур отражает фенотипическое разнообразие инфильтрирующего рака молочной железы и, по-видимому, обусловлена составом и свойствами молекул адгезии, обеспечивающих взаимодействие клеток между собой и с межклеточным матриксом. Изменения такого рода находятся в русле представлений об эпителиально-мезенхимальном переходе, своеобразной «мезенхимации» клеток опухоли в процессе ее опухолевой трансформации и приобретения способности к инвазивному росту и метастазированию. С позиций представлений об эпителиально-мезенхимальном переходе тубулярные структуры следует рассматривать как производное наиболее «полноценных» эпителиальных клеток, а дискретно расположенные клетки – как конечную «мезенхимную» фазу такой трансформации.

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что остается недостаточно изученным значение гетерогенности строения инфильт-

трирующего РМЖ в отношении эпителиально-стромального соотношения опухолевой ткани. Несмотря на большое количество исследований, посвященных вопросу о взаимоотношениях между паренхимой и стромой эпителиальных опухолей, до настоящего времени недостаточно четко определена роль паренхиматозного и стромального компонентов в этих связях, не представлена их количественная характеристика. Мало изучен механизм перестройки стромы при росте опухоли и ее прогрессии, характер распределения раковых структур в опухолевой ткани. Не рассматривается возможность прогнозирования опухолевой прогрессии у больных РМЖ в зависимости от эпителиально-стромального соотношения. В целом, это и определило актуальность выполненного исследования.

Цель исследования. Установить количественное соотношение эпителиального и стромального компонентов опухолевой ткани инвазивного рака молочной железы и определить его прогностическое значение.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили 128 биоптатов опухолевой ткани пациенток с РМЖ в возрасте от 44 до 78 лет ($59,3 \pm 8,8$ года), находившихся на лечении в ГУЗ «Ульяновский областной клинический онкологический диспансер» с 2004 по 2006 г., не получавших предоперационного химиотерапевтического и лучевого лечения, с оперативным вмешательством в объеме радикальной мастэктомии или секторальной резекции молочной железы. Все пациентки были распределены на 2 группы в соответствии с гистологическим вариантом биоптата: инвазивный неспецифический рак и инвазивный дольковый рак (ИДР) (28 случаев, 21,9 %). Первая группа была разделена на две подгруппы: протоковый вариант (ИПР) (69 случаев, 53,9 %) и протоково-дольковый смешанный вариант (ИСП) (31 случай, 24,2 %). В историях болезней пациенток анализировались время жизни после установления диагноза до даты смерти с максимальной продолжительностью наблюдения согласно данным ракового регистра от 6 до 8 лет.

Для проведения морфометрического анализа проводили фотодокументирование микроскопических препаратов с помощью циф-

ровой фотокамеры. В каждом из 128 случаев наблюдения препараты фотографировались в 30 полях зрения с помощью окуляра 10×/0,25, объектива 10×/0,65. Всего получено 3840 фотографий в формате *.JPG. В каждом из 128 случаев по 30 полученным цифровым изображениям производили количественный морфометрический анализ с помощью специализированной компьютерной программы Image Tool 3.0 (США). Определялись количество раковых структур в единичном поле зрения при увеличении ×100, доля площади паренхиматозного и стромального компонентов железы, эпителиально-стромальное соотношение. В историях болезни пациенток анализировались результаты иммуногистохимического исследования опухолевой ткани на наличие рецепторов на эстрогены и прогестерон (полуколичественная оценка уровня их экспрессии в баллах интенсивности по D.C. Allred), а также экспрессия HER-2neu. Кроме перечисленных выше параметров определялись интегральные морфологические индексы: ноттингемский прогностический индекс (НПИ) [5, 7, 9] и суммарный балл злокачественности (СБЗ) [3]. Полученные данные обрабатывались на персональном компьютере PC IBM Pentium IV с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel 2003 и Statistics for Windows 8.0. Достоверность результатов оценивалась при помощи

критериев Стьюдента, Бонферрони, Краскелла–Уолиса, разности долей. Корреляционный анализ проводился с использованием коэффициентов корреляции Пирсона и ранговых корреляций Спирмена.

Результаты и обсуждение. Наше исследование показало, что во всех группах случаев инфильтрирующего РМЖ стромальный компонент опухоли составлял $72,50 \pm 0,45\%$, а на паренхиме приходилось $27,50 \pm 0,45\%$ всего объема новообразований. Значения долей паренхиматозного и стромального компонентов варьировали в широких пределах независимо от гистологического варианта РМЖ: от 4,8 до 85,7 и от 14,3 до 95,2 % соответственно (табл. 1). Средние значения долей компонентов ($P \pm \sigma_p$) в разных группах различались, при этом доля паренхиматозного компонента была статистически значимо ниже доли стромального. Строма опухолей большей частью была построена из зрелых коллагеновых волокон, хорошо прокрашивающихся пикрофуксином. В группе случаев ИДР чаще встречались очаги гиалиноза стромы с гомогенизацией соединительной ткани, в группе ИПР чаще отмечались зоны незрелой соединительной ткани. Во всех группах встречались зоны отека стромального компонента, в группе случаев ИПР миксоматоз встречался чаще и был более выраженным.

Таблица 1

Средние и экстремальные значения морфометрических характеристик гистологических вариантов инфильтрирующего РМЖ (долей $P \pm \sigma_p$, абсолютных показателей $M \pm \sigma$)

| Гистологический вариант РМЖ, число наблюдений n, (полей зрения) | Количество раковых структур $M \pm \sigma$ (min÷max), ед./поле зрения | Доля паренхиматозного компонента $P \pm \sigma_p$ (min÷max), % | Доля стромального компонента $P \pm \sigma_p$ (min÷max), % | Паренхиматозно-стромальное соотношение $M \pm \sigma$ (min÷max) | Количество сосудов $M \pm \sigma$ (min÷max), ед./поле зрения |
|---|---|--|--|---|--|
| ИПР n=69 (2070) | $99,4 \pm 78,5^*$ (6÷413) | $30,90 \pm 0,46^*$ (10,0÷85,7) | $69,10 \pm 0,46^*$ (14,3÷90,0) | $0,524 \pm 0,580^*$ (0,111÷6,007) | $3,90 \pm 3,02^*$ (0÷25) |
| ИДР n=28 (840) | $266 \pm 166^*$ (38÷898) | $22,40 \pm 0,41^*$ (5,1÷48,1) | $77,60 \pm 0,41^*$ (47,9÷94,9) | $0,311 \pm 0,180^*$ (0,054÷0,964) | $4,61 \pm 3,47^*$ (0÷19) |
| ИСП n=31 (930) | $193 \pm 131^*$ (41÷901) | $24,60 \pm 0,43^*$ (4,8÷75,4) | $75,40 \pm 0,43^*$ (24,6÷95,2) | $0,415 \pm 0,410^*$ (0,051÷3,063) | $4,38 \pm 3,01$ (0÷20) |

Примечание. * – статистически значимые различия показателей между собой в одном столбце ($p < 0,05$).

Паренхима опухоли была представлена железистыми и солидными структурами, а также изолированными клетками в различном их соотношении. Главным морфологическим признаком, обращающим на себя внимание, была гетерогенность и неупорядоченность расположения раковых комплексов в строме. Их количество варьировало в широких пределах: от 6 до 901 структуры в одном поле зрения площадью 0,152 мм². Были выявлены четкие статистически значимые различия в количестве раковых структур, приходящихся на единицу площади поля зрения, – 99<193<266, т.е. ИПР<ИСП<ИДР, а также в показателе паренхиматозно-стромального соотношения – 0,3<0,4<0,5, т.е. ИДР<ИСП<ИПР.

В процессе исследования гистологических микропрепаратов РМЖ нами были получены данные о значительной неравномерности распределения тканевых структур, составляющих опухолевую ткань, не только в

различных случаях наблюдения, но и в разных полях зрения у одной и той же пациентки. Был произведен поиск показателей, которые могли бы адекватно отражать эту гетерогенность и одновременно быть достаточно информативными. В количественных морфометрических исследованиях таким показателем является показатель варибельности переменных (относительная разность лимитов). Он был назван индексом дисперсии тканевых структур (ИДТС). На основании полученных данных для каждой пациентки были получены показатели ИДТС в виде абсолютной и относительной разности экстремумов раковых структур и долей паренхиматозного компонента (табл. 2, 3). При значении ИДТС менее 1,6 с 95 % вероятностью можно прогнозировать пятилетнюю выживаемость пациентки, а при его значении более 2,3 прогноз пятилетней выживаемости неблагоприятен.

Таблица 2

Средние значения и доверительные интервалы индивидуальных показателей варибельности числа раковых структур, определенных в 30 полях зрения для каждого случая наблюдения

| Наименование параметра варибельности | Прогностическая группа | M±m | 95 % доверительный интервал | Уровень значимости различий |
|--------------------------------------|---------------------------------|-------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Абсолютная разность экстремумов | Выживаемость свыше 5 лет (n=90) | 56,03±4,20 | 64,39–47,68 | p<0,003 |
| | Выживаемость менее 5 лет (n=38) | 93,37±11,98 | 69,09–117,65 | |
| Относительная разность экстремумов | Выживаемость свыше 5 лет (n=90) | 1,87±0,14 | 2,15–1,59 | p<0,003 |
| | Выживаемость менее 5 лет (n=38) | 3,11±0,40 | 2,30–3,92 | |

Таблица 3

Средние значения и доверительные интервалы индивидуальных показателей варибельности доли паренхимы опухолевой ткани, определенной в 30 полях зрения для каждого случая наблюдения

| Наименование параметра варибельности | Прогностическая группа | M±m | 95 % доверительный интервал | Уровень значимости различий |
|--------------------------------------|---------------------------------|------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Абсолютная разность экстремумов | Выживаемость свыше 5 лет (n=90) | 9,01±0,51 | 7,99–10,02 | p<0,003 |
| | Выживаемость менее 5 лет (n=38) | 18,33±1,49 | 15,30–21,36 | |
| Относительная разность экстремумов | Выживаемость свыше 5 лет (n=90) | 0,30±0,02 | 0,27–0,33 | p<0,003 |
| | Выживаемость менее 5 лет (n=38) | 0,61±0,05 | 0,51–0,71 | |

Одной из важнейших задач нашего исследования было установление сопряженности значений интегральных прогностических индексов при различных гистологических вариантах инфильтрирующего РМЖ с пятилетней выживаемостью пациенток. Для этого был произведен статистический анализ средних значений индивидуальных показателей вариабельности интегральных морфологиче-

ских прогностических индексов в двух группах пациенток при каждом гистологическом варианте инфильтрирующего РМЖ. Как видно из табл. 4, различия средних значений индивидуального показателя разницы экстремумов прогностического индекса для пациенток двух групп выживаемости статистически значимы ($p < 0,05$).

Таблица 4

Средние значения ($M \pm m$) разницы абсолютных значений экстремумов интегральных морфологических прогностических индексов для каждой пациентки в зависимости от гистологического варианта РМЖ (случая наблюдения)

| Прогностический индекс | Разница абсолютных значений экстремумов | | | | | |
|------------------------|---|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | ИПР | | ИДР | | ИСП | |
| | Выживаемость свыше 5 лет (n=46) | Выживаемость менее 5 лет (n=23) | Выживаемость свыше 5 лет (n=20) | Выживаемость менее 5 лет (n=8) | Выживаемость свыше 5 лет (n=24) | Выживаемость менее 5 лет (n=7) |
| НПИ | 3,77±0,12 | 4,61±0,22 | 3,44±0,16 | 4,88±0,42 | 3,51±0,16 | 4,39±0,43 |
| СБЗ | 13,90±0,33 | 15,80±0,34 | 13,85±0,49 | 16,88±0,64 | 13,75±0,40 | 15,43±0,48 |

Заключение. Таким образом, гистологические варианты инфильтрирующего РМЖ четко различаются соотношениями тканевых компонентов опухолевой ткани (эпителиального, стромального) и степенью разнообразия раковых структур. Эти патоморфологические различия и их особенности могут быть суммированы в интегральные морфологические индексы. Как показывает настоящее исследование, СБЗ может служить эффективным критерием оценки этих различий. Наиболее информативными и объективными для прогноза пятилетней выживаемости являются индивидуальные показатели вариабельности тканевых компонентов и структур опухолевой ткани, специфичные для каждого гистологического варианта РМЖ. Для индивидуализации прогноза заболевания на основе патоморфологического заключения следует рассчитывать индивидуальные показатели вариабельности паренхиматозно-стромального соотношения и числа раковых структур в единичном поле зрения с учетом гистологического варианта РМЖ. На разработанный морфометрический показатель – ИДТС – был получен патент РФ от 27.10.2013 № 2496425

«Способ прогнозирования пятилетней выживаемости пациенток с инфильтрирующим раком молочной железы путем определения индекса тканевых структур».

1. Баженов С. М. Динамика взаимосвязей морфометрических показателей паренхимы и стромы при дисплазии и раке молочной железы I–II стадии / С. М. Баженов // Архив патологии. – 1990. – № 6. – С. 80.

2. Взаимосвязь морфологической гетерогенности инфильтрирующего протокового рака молочной железы с различными формами опухолевой прогрессии / В. М. Перельмутер [и др.] // Сибирский онкологический журн. – 2007. – № 3. – С. 58–63.

3. Занкин В. В. Гистологическая степень злокачественности эпителиальных опухолей как фактор прогноза их рецидивирования и метастазирования после радикального лечения (взгляд патоморфолога на клинические проблемы) / В. В. Занкин, В. В. Кометова, М. М. Лазаревский // Материалы VI Российской научно-практической конференции «Высокотехнологичные методы диагностики и лечения в онкологии. Модниковские чтения». – Ульяновск, 2009. – С. 48–50.

4. *Петров С. Б.* Десмоплазия стромы и прогноз рака молочной железы / С. Б. Петров // Казанский медицинский журн. – 1989. – Т. 70, № 5. – С. 335–338.

5. *Balslev I.* The Nottingham Prognostic Index applied to 9,149 patients from the studies of the Danish Breast Cancer Cooperative Group (DBCG) / I. Balslev, C. K. Axelsson, K. Zedeler // Breast Cancer Res. and Treat. – 1994. – № 32 – P. 281–290.

6. *Colzani E.* Prognosis of patients with breast cancer: causes of death and effects of time since diagnosis, age, and tumor characteristics / E. Colzani, A. Liljegren, A. L. Johansson // Clin. Oncol. – 2011. – Vol. 29, № 30. – P. 4014–4021.

7. *Galea M. H.* The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer/ M. H. Galea, R. W. Blamey, C. E. Elston // Breast Cancer Res. Treat. – 1992. – № 22. – P. 207–219.

8. *Hasebe T.* Fibrotic Focus in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast: A Histopathological Prognostic Parameter for Tumor Recurrence and Tumor Death within Three Years after the Initial Operation / T. Hasebe, H. Tsuda, Y. Imoto // Japanese J. of Cancer Research. – 1997. – Vol. 88, № 6. – P. 590–599.

9. *Haybittle J. L.* A prognostic index in primary breast cancer / J. L. Haybittle, R. W. Blamey, C. W. Elston // Br. J. Cancer. – 1982. – № 45. – P. 361–366.

THE INDIVIDUAL INDICATOR OF PARENCHYMAL-STROMAL RATIO IN TUMOR'S TISSUE AS A FACTOR OF FIVE-YEAR SURVIVAL IN PATIENTS WITH INVASIVE BREAST CANCER

V.V. Kometova¹, R.M. Khayrullin², V.V. Rodionov^{1,2}, V.V. Zankin¹

¹*Ulyanovsk Regional Clinical Oncological Hospital,*

²*Ulyanovsk State University*

The paper considers new morphometric measure of the morphological heterogeneity of invasive breast cancer developed on the basis of the proportion of epithelial and stromal components of the tumor tissue. Designed dispersion index of structure tissue correlated significantly with the known integral morphological indices. It was shown the possibility of its use as an individual indicator of disease prognosis. When the value is less than 1,6, you can with a 95 % probability to predict the five-year survival rate of patients.

Keywords: breast cancer, epithelial-stromal ratio, integrated morphological indices, prognosis.