

На правах рукописи

Виноградов Илья Игоревич

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОГРАНИЧНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКОВ**

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

14.03.02 – патологическая анатомия

Рязань – 2015

Работа выполнена на кафедре патологической анатомии с курсом судебной медицины
ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет имени акад. И.П.
Павлова»

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Андреева Юлия Юрьевна

доктор биологических наук

Завалишина Лариса Эдуардовна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, зав. лабораторией иммуноморфологии ГБУ Ростовской области «Патолого-анатомическое бюро»

Мационис Александр Эдуардович

доктор медицинских наук, профессор, зав. 2-м патологоанатомическим отделением ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России

Щеголев Александр Иванович

Ведущая организация: ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России (11797, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1).

Защита диссертации состоится 25 июня 2015 года в 12 часов на заседании диссертационного совета Д. 001.004.01 при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» (117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д.3).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», а так же на сайте www.morfolhum.ru

Автореферат разослан _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук

Михайлова Лилия Петровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В структуре неоплазий яичников доля пограничных опухолей составляет около 10-15%, показатели заболеваемости варьируют в различных странах от 1,8 до 4,8 ‰. При этом, общая выживаемость пациенток при ранних стадиях опухолевого процесса приближается к 100% (Trope C. et al., 2009; Ewald-Riegler N.L. et al., 2012). В отличие от рака яичников пограничные опухоли значимо чаще выявляются у молодых женщин. Средний возраст больных на момент установления диагноза составляет 40 лет, при этом более чем в 30% наблюдений пограничные опухоли яичников (ПОЯ) обнаруживаются у пациенток в возрастном интервале 15-29 лет (Tinelli R. et al., 2006; Skirnisdottir I. et al., 2008; Sornsukolrat, S., 2012).

По мнению ряда авторов, одним из наиболее значимых факторов риска развития ПОЯ является бесплодие. В то время как беременность и лактация, напротив, оказывают протективный эффект (Riman T. et al., 2001). Таким образом, проблема ПОЯ имеет социальный характер.

Вопросы сохранения фертильности занимают одно из центральных мест в планировании методов терапии данной патологии. В течение довольно долгого периода подход к лечению пациенток почти не отличался от такового при раке яичников – выполнялась экстирпация матки с придатками, субтотальная резекция большого сальника с последующей химиотерапией. В связи с тем, что выживаемость больных с ПОЯ достаточно высока, а чувствительность к применяемым химиопрепаратам крайне низкая, в последние годы в клиническую практику все шире внедряются органосохраняющие методы лечения. Однако число рецидивов пограничной опухоли после применения таких методик возросло (Skirnisdottir I. et al., 2008; Trope C. et al., 2009).

В настоящее время активно обсуждается прогностическая значимость некоторых морфологических особенностей ПОЯ, таких как гистологический вариант, наличие микроинвазии, образование микрососочковых структур и псаммомных телец, поскольку убедительных данных о том, что перечислен-

ные критерии являются независимыми прогностическими факторами, получено не было (Gershenson DM , 2002; Trillschl F. et al., 2010).

Для определения биологической агрессивности ПОЯ используют иммуногистохимические методы с применением широкого спектра антител: белков-регуляторов клеточного цикла, молекул адгезии, индукторов апоптоза, и других (Naylor M.S. et al., 1994; Vassilopoulos I. et al., 2003; Fauvet R. et al., 2005; Kim D.J. et al., 2006; Ozer H. et al., 2012). К сожалению, до сих пор не удалось выявить спектр маркеров, позволяющих прогнозировать риск рецидива заболевания, оценивать целесообразность выполнения органосохраняющих операций, особенно при наличии двустороннего поражения яичников.

В изучении молекулярно-биологических свойств ПОЯ большое внимание уделяется исследованию мутаций регуляторного гена *BRAF*, наличие которых, как считается ассоциировано с прогрессией серозных пограничных опухолей (СПО). *BRAF* является протоонкогеном, кодирующим белок B-Raf, который играет важную роль в регуляции киназного сигнального пути, влияющего на пролиферацию и дифференцировку клеток. Имеются данные о более высокой частоте встречаемости мутации гена *BRAF* при прогрессировании ПОЯ (Singer G. et al., 2003). Тем не менее, значимость этих генетических нарушений для прогноза ПОЯ не установлена (Jones S. et al., 2012).

Высокий удельный вес женщин репродуктивного возраста с одной стороны и возможное развитие рецидива заболевания – с другой, требуют поиска новых и тщательной оценки существующих факторов, влияющих на прогноз ПОЯ.

Цель исследования

Оценка морфологических, иммуногистохимических и генетических факторов прогноза, выявление признаков биологической агрессивности пограничных опухолей яичника.

Задачи исследования

1. Оценить прогностическую значимость морфологических особенностей пограничных опухолей яичника, таких как формирование микрососочковой архитектуры и псаммомных телец;
2. Оценить значение имплантов при серозных пограничных опухолях и выяснить механизм возникновения их инвазивных подтипов;
3. Провести иммунофенотипический анализ пограничных опухолей с рецидивами и без рецидивов;
4. Оценить влияние наличия мутации в 15 экзоне гена *BRAF* на развитие рецидива пограничной опухоли яичника;
5. Выявить иммуногистохимические и молекулярно-генетические различия пограничных опухолей яичника и высококодифференцированных аденокарцином, развивающихся на их фоне.

Научная новизна

На основе анализа результатов проведенного комплексного исследования выявлены прогностические морфологические критерии, наиболее высокой значимостью из которых обладает наличие микрососочковой архитектуры (вероятность развития рецидива – 99,9%), так же, с прогнозом пограничных опухолей яичника значимо связано выявление имплантов (вероятность рецидива – 51,9%) и многочисленных псаммомных телец (вероятность рецидива – 30%).

Впервые установлена высокая диагностическая значимость иммуногистохимических маркеров, (металлопротеиназы MMP-1 и MMP-9, регулятор wnt-пути бета-катенин, индуктор апоптоза Вах, ингибитор металлопротеиназ TIMP-2), обладающих предиктивными возможностями и позволяющая планировать тактику ведения больных.

Изучена частота встречаемости мутации p.V600E в 15 экзоне гена *BRAF*, ответственного за пролиферацию и дифференцировку клеток в пограничных опухолях яичников и высококодифференцированных серозных карци-

номах. Получены данные о наличии мутации в гене *BRAF*, свидетельствующие об общности патогенеза и последовательности этапов канцерогенеза серьезных новообразований яичников.

Практическая значимость

Разработан протокол гистологического заключения по исследованию операционного материала больных пограничными опухолями яичников, отражающий значимые параметры, необходимые для стадирования заболевания и определения тактики лечения.

Разработанная иммуногистохимическая панель, прогностических маркеров, включающая Ki-67, bcl-2, индуктор апоптоза Вах, циклин D1, ингибитор апоптоза сурвивин и ингибитор металлопротеиназ TIMP-1 дает новые возможности для дифференциальной диагностики пограничных опухолей яичника и высокодифференцированных карцином, развивающихся на их фоне. Выявление при микроскопическом исследовании таких прогностически значимых факторов как наличие микрососочковой архитектуры и псаммомных телец в опухоли, а так же применение иммуногистохимической панели, содержащей металлопротеиназы MMP-1, MMP-9, их ингибитор TIMP-2, бета-катенин и Вах позволяют оптимизировать лечебную тактику с учетом потенциальной биологической агрессивности опухоли, позволяют проводить дальнейшие клинко-морфологические сопоставления для улучшения результатов лечения.

Внедрение в практику

Результаты исследования внедрены в научную и практическую работу Рязанского областного онкологического диспансера, Рязанской областной клинической больницы, Тверского областного онкологического диспансера, кафедры патологической анатомии с курсом судебной медицины РязГМУ им. акад. И.П. Павлова.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены, доложены и обсуждены на VIII всероссийском съезде онкологов (Москва, 2013); конференции молодых ученых патологоанатомов и судебных медиков ЦФО (Москва, 2014); межкафедральном совещании кафедр патологической анатомии с курсом судебной медицины, гистологии и биологии, онкологии с курсом лучевой диагностики ФПДО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России 31 октября 2014г.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, из них – 3 статьи в периодических изданиях, рекомендованных ВАК.

Объем и структура диссертации

Объем рукописи составляет 144 страницы машинописного текста, состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 23 таблицами и 42 рисунками. Библиографический указатель включает 29 отечественных и 194 зарубежных источников

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы

Материалом для исследования послужили парафиновые блоки от 122 пациенток, проходивших лечение или консультированных в МНИОИ им. П.А. Герцена и Рязанском областном клиническом онкологическом диспансере с 2006 по 2012 год. Клинические данные анализировали по амбулаторным картам и историям болезни. Средний возраст пациенток составил 34,5 лет (от 18 до 74 лет).

Исследование включало 101 пограничную опухоль яичника, из которых 79 (78,2%) были представлены ее серозным подтипом, 14 (13,8%) – муцинозным, 5 (5%) опухолей оказались смешанными, (серозно-муцинозными) и 3

(3%) эндометриоидными. Такие редкие формы пограничных опухолей как переходноклеточные и светлоклеточные не встречались.

Пациентки были разделены на две группы:

1 группа – больные без рецидивов ПОЯ (83 человека – 82,2%);

2 группа – больные с рецидивом ПОЯ (18 человек – 17,8%).

В качестве группы сравнения был отобран 21 случай высокодифференцированной серозной аденокарциномы яичника на фоне серозной пограничной опухоли.

Для иммуногистохимического исследования был использован широкий спектр коммерческих моноклональных антител (Dako, TermoFisher): для оценки пролиферативной активности использован маркер Ki-67, который определяется во всех активных фазах клеточного цикла, а так же циклин D1, ответственный за первую контрольную точку клеточного цикла; для анализа апоптотической активности использован маркер bcl-2 и его прямой антагонист Вах, а так же член семейства ингибиторов белков апоптоза (IAP) – сурвивин, действующий опосредованно, через инактивацию проапоптотических белков; в качестве одного из наиболее известных супрессоров опухолевого роста использован маркер p53, а так же активизируемый им белок p21; маркер бета-катенин использован как компонент сигнального wnt-пути, который является активатором транскрипции; для определения инвазивного и миграционного потенциала ПОЯ использованы матриксные металлопротеиназы (ММР-1, ММР-2, ММР-9) их тканевые ингибиторы (ТИМР-1, ТИМР-2).

С отобранных парафиновых блоков были изготовлены срезы толщиной 4 мкм, которые наносили на высокоадгезивные стекла и высушивали при температуре 37⁰С в течение 18 часов.

Восстановление антигенной активности проводили в модуле предобработки для автостейнера при температуре 97⁰С в течение 25 мин. и последующим охлаждением до 65⁰С в течение 20 мин в цитратном буфере рН 6,0 или в трис-ЭДТА буфере рН 9,0.

В качестве детекционной системы применяли систему «EnVision Flex»

(«Dako»), в качестве хромогена – диаминобензидин. Для получения результатов пригодных для количественной обработки реакции проводили с помощью автоматического иммуногистостейнера «Avtosteiner Dako Link 48».

Интенсивность реакций, локализованных в цитоплазме (MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2) и на мембранах клеток (бета-катенин) оценивали полуколичественным способом по балльной шкале от 0 до 3: 0 – отсутствие реакции, 1 – реакция слабая; 2 – умеренная; 3 – сильная.

Оценку экспрессии bcl2, VAX, Ki-67, p21, циклина D1 и сурвивина проводили путем подсчета количества окрашенных клеток на 100 клеток препарата в 3 полях зрения (увеличение x40) и выражали полученные результаты в процентах.

Препараты изучали на световом микроскопе Axioskop «OPTON» со стандартным набором оптики. Микрофотографирование проводили на микроскопе биологическом универсальном Leica DM4000B с цветной цифровой камерой DFC495 при помощи стандартного программного средства Leica Application Suite v. 3.7.0.

В качестве генетического исследования определяли наличие мутации p.V600E в 15 экзоне гена *BRAF*. Для этого выделяли ДНК из операционного материала, фиксированного в формалине и залитого в парафин, с использованием коммерческого набора «ДНК-Сорб» (ИнтерЛабСервис, РФ). Прямое секвенирование последовательностей экзонов проводили с использованием праймеров, которые применяли для амплификации. Секвенирование выполняли по протоколам ABI Prism 310 Genetic Analyzer Kits (“Applied Biosystems”, США). Компьютерный анализ ДНК проводили с использованием программы Oligo 4.0. и базы данных Blast. Анализ хроматограмм секвенированных последовательностей выполнен с помощью программы Chromas.

Анализ результатов оценивали с помощью программы STATISTICA v.8.0 и MedCalc 12.0, с использованием критерия Колмогорова-Смирнова, определения квартилей, U-критерия Манна-Уитни, критерия Хи-квадрат, расчета коэффициента корреляции. При сравнении частот мутации гена *BRAF* в раз-

ных группах пациентов использовали точный двусторонний критерий Фишера. Уровень значимости (p) принимали равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Морфологические факторы прогноза. Пограничные опухоли яичника без рецидивов были представлены на 74,7% (62 из 83) серозным подтипом, на 21,7% (18 из 83) - муцинозным, на 3,6% (3 из 83) - эндометриоидным. В группе ПОЯ с рецидивом лишь 1 опухоль из 18 (5,6%) оказалась муцинозной, остальные (94,4%) были серозными.

Несмотря на известный факт, что импланты встречаются гораздо чаще при серозном подтипе ПОЯ, что предопределяет более благоприятное течение других пограничных опухолей и сниженный риск рецидивов, при изучении распределения типов ПОЯ в исследуемых группах, статистически значимых различий в исследуемых группах выявлено не было (критерий хи-квадрат, $p > 0,05$). Возможно, данный факт связан с малой статистической выборкой более редко встречающихся гистологических подтипов ПОЯ, поэтому изучение биологического поведения пограничной опухоли в зависимости от ее гистологического типа является актуальной темой для дальнейших исследований.

Импланты были выявлены в 26,7% (27 из 101) случаях ПОЯ. В группе без рецидивов они встречались в 15,7% (13 из 83) случаев, а в группе с рецидивами – в 77,8% (14 из 18). При этом в 1 группе все импланты были неинвазивными, тогда как во 2 группе, в двух случаях (14,3%) отмечены инвазивные импланты, доля неинвазивных имплантов составила 85,7% (12).

При этом нами выявлены статистические значимые различия в частоте встречаемости имплантов в исследуемых группах (критерий хи-квадрат, $p < 0,0001$) (рис. 1). Было установлено увеличение частоты обнаружения имплантов у пациенток с наличием рецидивов ПОЯ. Возможно, это обусловлено тем, что при наличии перитонеальных имплантов в брюшной полости могут оставаться не выявленные при ревизии микроскопические очаги ПОЯ, кото-

рые и являются субстратом развития рецидива. Таким образом, вероятность развития рецидива у пациенток с наличием имплантов составляет 51,9% ($p < 0,0001$ по критерию хи-квадрат).

В литературе имеются данные о том, что при дополнительной вырезке материала ПОЯ с наличием инвазивных имплантов, в первичном очаге, среди структур пограничной опухоли обнаруживаются очаги инвазивной высокодифференцированной аденокарциномы (Burks R.T., Sherman M.E., Kurman R.J., 1996; Seidman J.D., Kurman R.J., 1996, 2000).

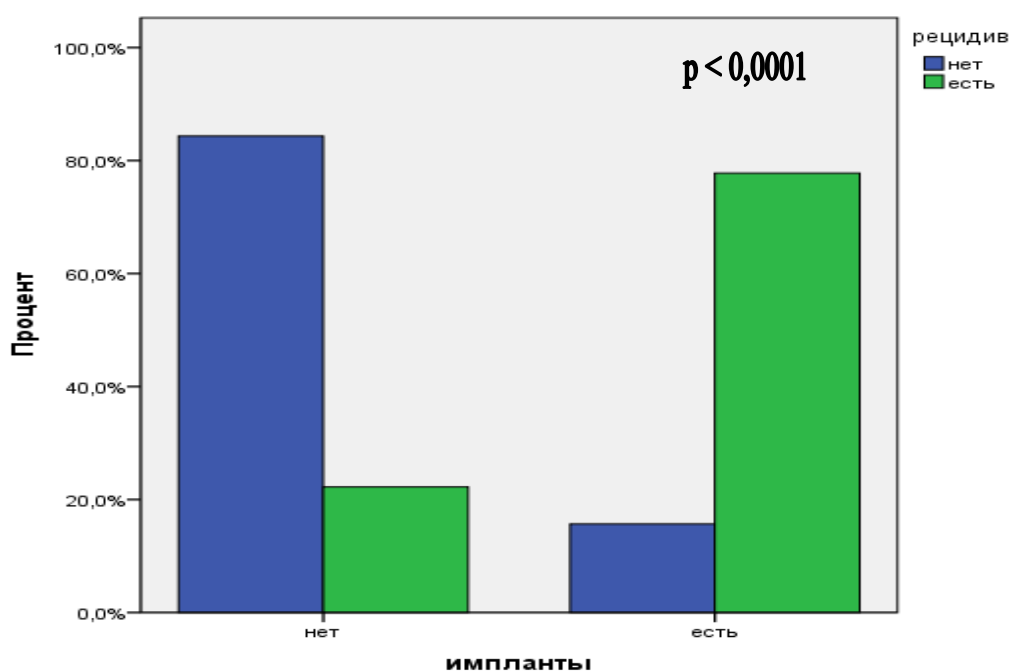


Рис. 1. Частота встречаемости имплантов в исследуемых группах ПОЯ

Инвазивные импланты по морфологической картине были более схожи с высокодифференцированной (low grade) серозной аденокарциномой, тогда как в первичном очаге морфологическая картина соответствовала типичной серозной ПОЯ.

Поэтому была проведена исследование дополнительных срезов с блоков первичной опухоли. В результате, при микроскопическом исследовании обеих рецидивных ПОЯ с наличием инвазивных имплантов, в дополнительных срезах, на фоне пограничной опухоли, в яичнике были выявлены микро-

очаги инвазивной высокодифференцированной серозной аденокарциномы, которые, вероятнее всего и послужили источником метастазирования.

Таким образом, нами были подтверждены данные ряда авторов о том, что в типичных ПОЯ могут обнаруживаться только неинвазивные импланты (Seidman JD, Varallo MR, 2007). При обнаружении инвазивных имплантов в ПОЯ патологоанатому следует предпринять дальнейшее тщательное исследование первичной опухоли (1 блок/1 см³) для поиска невыявленных очагов высокодифференцированной аденокарциномы.

Псаммомные тельца были отмечены в 29,7% случаев (30 из 101) всех ПОЯ. У пациенток с наличием рецидива они были отмечены в 50% случаев (9 из 18), а у пациенток без рецидивов – в 25,3% (21 из 83). При этом были обнаружены статистически значимые различия между исследуемыми группами. Выявлено, что псаммомные тельца чаще встречаются в рецидивирующих опухолях, а вероятность развития рецидива при наличии этого признака составляет 30% (критерий хи-квадрат, $p = 0,049$) (рис. 2). Это может быть связано с тем, что в псаммомных тельцах выявляется повышенное содержание коллагена IV типа, что может послужить причиной активации металлопротеиназ, участвующих в процессах миграции и инвазии опухолевых клеток.

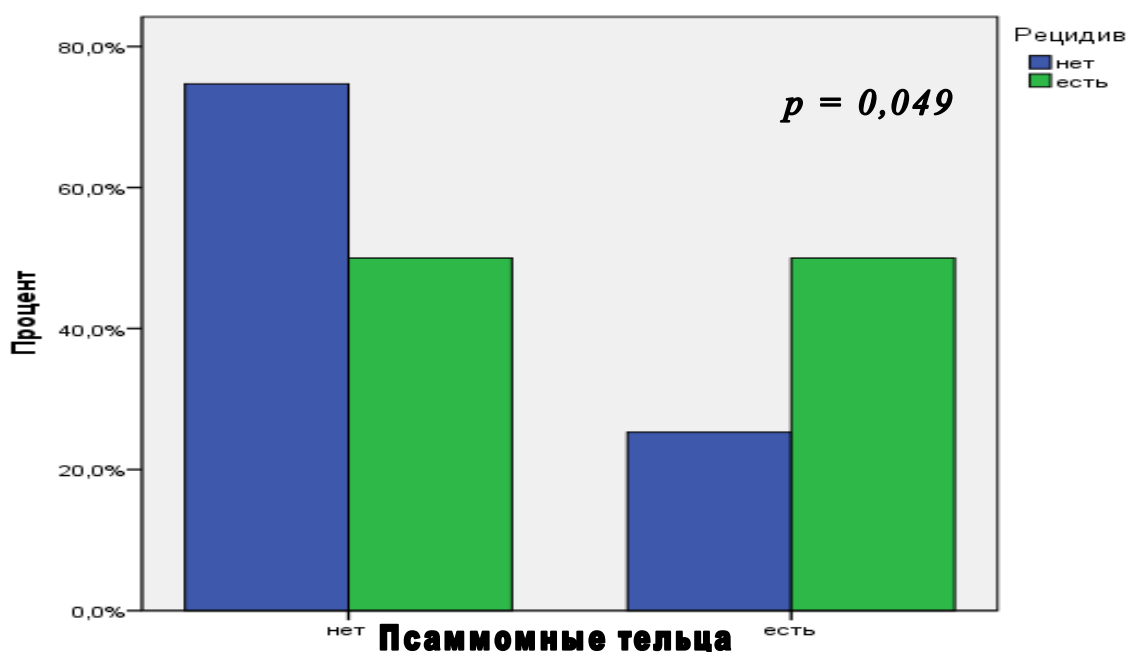


Рис. 2. Частота встречаемости псаммомных телец в исследуемых группах ПОЯ

Микрососочковая гистоархитектура опухоли выявлена в 8 (из 101) случаях (7,9%). При этом все случаи были представлены ПОЯ с рецидивом.

В пограничных опухолях без рецидива микрососочковые структуры не выявлялись.

Установлено, что наличие микропапиллярных структур наиболее характерно для рецидивирующих опухолей. Вероятность развития рецидива у пациенток с микрососочковой СПО составляет 99,9% ($p < 0,0001$) (рис. 3).

Полученные нами результаты подтверждаются данными литературы, включая последнюю классификацию ВОЗ опухолей женской репродуктивной системы, переизданную в 2014 году (WHO classification of tumours of female reproductive organs, 2014).

Согласно этой классификации, для микропапиллярных серозных пограничных опухолей правомочно использование термина «неинвазивная low-grade серозная карцинома», а при морфологическом кодировании после дроби следует указывать цифру 2 (карцинома in situ), что свидетельствует о более высокой биологической агрессивности этих опухолей.

Агрессивность микрососочковых опухолей, вероятно, связана с тем, что при неиерархическом ветвлении сосочков, отсутствии фиброзной стромы, а так же активации протеаз, связанных с клеточной миграцией, снижается адгезия опухолевых клеток, увеличивая риск их имплантации. Это в свою очередь может привести к реализации рецидива.

Молекулярно-биологические факторы прогноза. В результате проведенного исследования, при изучении пролиферативной активности, не было выявлено статистически значимых различий экспрессии Ki-67 в зависимости от отсутствия или наличия рецидива ПОЯ. В то же время, при исследовании группы сравнения, выявлено, что для высокодифференцированных аденокарцином, в отличие от пограничных опухолей, характерна экспрессия Ki-67

более, чем 20% клеток опухоли ($p=0,021$, критерий Манна-Уитни).

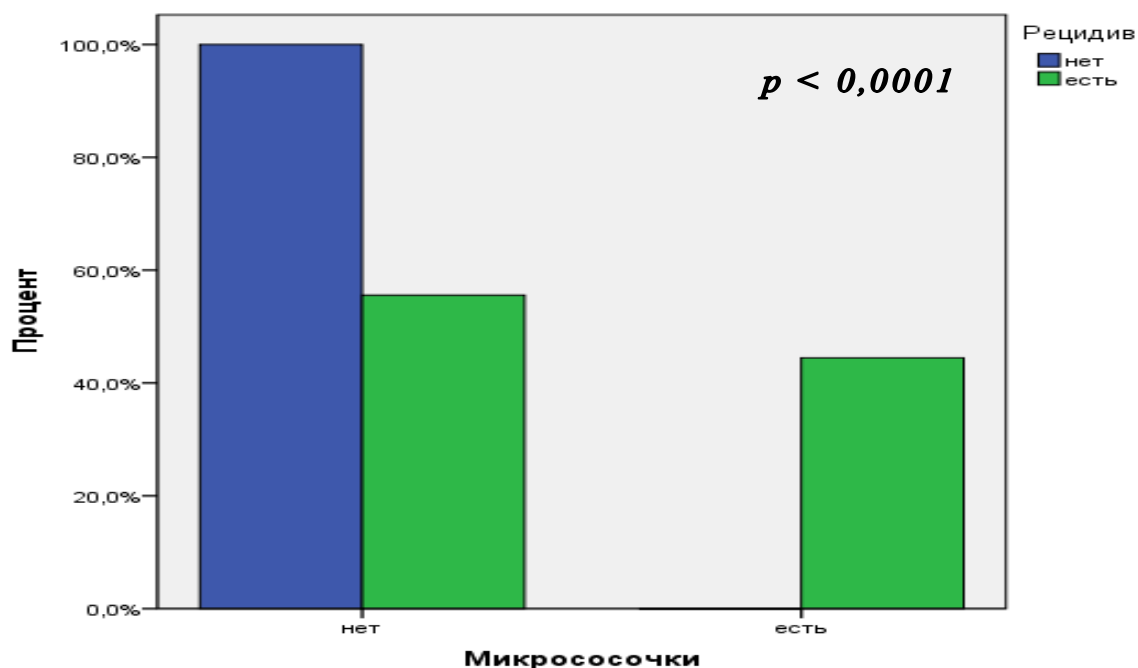


Рис. 3. Частота встречаемости микрососочковых структур в исследуемых группах ПОЯ

Полученные результаты согласуются с данными литературы, в которой имеются указания на тот факт, что степень пролиферативной активности увеличивается от пограничной опухоли яичников к low-grade карциноме (Vassilopoulos I. et al., 2003).

Статистически значимые различия экспрессии циклина D1 в исследуемых группах пограничных опухолей отсутствовали. Однако различия были обнаружены при сравнении ПОЯ с группой аденокарцином. Так в пограничных опухолях реакция циклина была значимо меньше, чем в 30% клеток, в то время как для аденокарцином его экспрессия составила 60% и более ($p=0,014$, критерий Манна-Уитни).

Низкий уровень пролиферативных сигналов и, как следствие, слабая экспрессия циклина D1 может объяснить индолентное поведение ПОЯ. Однако мы не встретили литературных данных, относительно прогностической значимости этого маркера для ПОЯ.

В опубликованных исследованиях обнаружены сведения о наличии гипер-

экспрессии циклина D1 при серозном раке яичников, согласующиеся с полученными нами результатами (Hung W.C. et al., 1996; Worsley S.D., Ponder B., Davis R.R., 1997; Shigemasa K. et al., 1999; Sui L. et al., 1999).

Известно, что белок p21 обладает ингибирующим влиянием на клеточный цикл, и его слабая экспрессия могла быть признаком агрессивного потенциала опухоли или неблагоприятным прогностическим фактором (Vassilopoulos I. et al., 2003). Однако статистически значимых различий его реакции ни в исследуемых группах ПОЯ, ни в группе сравнения выявлено не было ($p > 0,05$; критерий Манна-Уитни).

Экспрессия мутантного белка p53 – важный критерий прогноза злокачественных новообразований разных локализаций и дифференциальной диагностики предопухолевых процессов (Barisik N.O. et al., 2010; Abo-Elwafa, H.A., 2011). При оценке экспрессии этого маркера не было выявлено связи ее выраженности с наличием или отсутствием рецидивов ПОЯ.

При сравнении с группой аденокарцином значимых различий так же выявлено не было ($p > 0,05$; критерий Манна-Уитни). Этот факт, в определенной степени подтверждает, что для пограничных опухолей и высокодифференцированной серозной аденокарциномы характерны мутации *KRAS*, *BRAF* и редко *TP53* (Singer G. et al., 2002, 2003, 2005).

Протеин bcl-2 является ингибитором апоптоза и для разных карцином показана его различная прогностическая ценность, однако в литературе практически отсутствуют данные по изучению этого маркера в ПОЯ.

В исследованном материале не было выявлено зависимости уровня экспрессии bcl-2 от отсутствия или наличия рецидивов пограничной опухоли яичников ($p > 0,05$, критерий Манна-Уитни). Но были выявлены статистически значимые различия при сравнении реакции данного маркера между ПОЯ и высокодифференцированными серозными аденокарциномами. ПОЯ характеризовались экспрессией bcl-2 менее, чем в 3% клеток, в то время как уровень экспрессии в аденокарциномах был значимо выше 15% ($p = 0,004$, критерий Манна-Уитни), что можно объяснить более интенсивным ингибировани-

ем апоптоза и, как следствие, более агрессивным потенциалом аденокарцином.

Протеин Вах является антагонистом bcl-2 и, следовательно, индуктором апоптоза. В литературе имеются сообщения о том, что высокая экспрессия Вах характерна для пограничных и злокачественных опухолей яичника по сравнению с доброкачественными (Ozer H. et al., 2012), однако исследования, посвященные изучению связи этого маркера с биологическим поведением именно пограничных опухолей яичника, в настоящее время отсутствуют.

Наше исследование показало усиление экспрессии Вах в группе с рецидивами ПОЯ выше 80% и снижение менее 50% в группе ПОЯ без рецидивов. Таким образом, для опухолей без рецидивов диагностически значимым является уровень экспрессии Вах менее 50%, тогда как в группе с рецидивами – он выше 80% (критерий Манна-Уитни, $p = 0,043$).

Аналогичные данные получены при сравнении реакции данного маркера в зависимости от стадии ПОЯ. Так в опухолях I стадии экспрессия Вах была статистически значимо ниже 50%, при II стадии – выше 80% ($p=0,05$; критерий Манна-Уитни). Полученные результаты характеризуют Вах как маркер агрессивности ПОЯ. При сравнении пограничных и злокачественных опухолей выявлено, что для аденокарцином характерен уровень экспрессии Вах 90% опухолевых клеток и выше, тогда как интенсивность этого маркера для ПОЯ была значимо ниже 90% ($p=0,004$).

Обнаруженная нами усиленная экспрессия белка Вах в аденокарциномах не является прямым показателем усиления апоптотической активности в опухолевых клетках при раке, т.к. важен не собственно уровень проапоптотических и антиапоптотических белков, а их соотношение, в частности соотношение Bcl2/Вах.

Вероятно, для опухолей яичников повышение уровня экспрессии Bcl 2 превышает усиление экспрессии Вах, что ведет к уменьшению числа опухолевых клеток, которые вступают в процесс запрограммированной клеточной гибели. Кроме того, важно отметить выявленный высокий уровень экспрес-

сии внутриклеточного белка сурвивина, который также ингибирует апоптоз и участвует в митотическом делении клеток. Поэтому ни один из этих маркеров не может является единственным показателем апототической активности опухолевых клеток и требуется изучение их количественного соотношения (Пальцев М.А., 2010).

Сурвивин – это эндогенный белок из семейства ингибиторов апоптоза (IAP), принимающий участие в регуляции клеточного деления и апоптоза. Считается, что его выраженная экспрессия для многих опухолей ассоциирована с плохим прогнозом и низкой выживаемостью (Waligyrska-Stachura J. et al., 2012). Однако исследования о прогностической значимости этого протеина для ПОЯ в настоящее время в литературе отсутствуют.

В ходе нашего исследования прогностической значимости экспрессии сурвивина для ПОЯ не было получено ($p > 0.05$, критерий Манна-Уитни). Однако при исследовании группы сравнения нами было выявлено, что для аденокарцином характерна экспрессия сурвивина в более чем 70% клеток. В то время как в пограничных опухолях реакция этого маркера была значимо менее 70% ($p = 0,002$; критерий Манна-Уитни). Полученные результаты в целом согласуются с данными литературы, указывающими на гиперэкспрессию сурвивина при раке различных локализаций (Вольпина О.М. с соавт., 2011; Waligyrska-Stachura J. et al., 2012).

Бета-катенин – белок, участвующий в активации транскрипции в сигнальном Wnt пути, тем самым, влияя на пролиферацию клеток. Wnts – секретруемые гликопротеиды, которые играют важную роль в регуляции пролиферации клеток, так как влияют непосредственно на формирование митотического веретена.

В литературе имеются данные о том, что экспрессия бета-катенина становится более интенсивной, начиная от нормального эпителия кист-включений, к цистаденомам и пограничным опухолям, достигая наибольшей выраженности в карциномах яичника (Zhai Y. et al., 2002). При этом, в высокодифференцированных опухолях наблюдается более выраженная экспрессия, по

сравнению с низкодифференцированными раками. Этот факт можно объяснить повышением накопления белка бета-катенина вследствие мутации гена *CTNNB1*.

В нашем исследовании в ПОЯ без рецидива преобладала слабая и умеренная реакция данного маркера (31,6% и 35,5%, соответственно), в то время как в большинстве рецидивных опухолей выявлена выраженная экспрессия бета-катенина (75,0%). При этом, различия были статистически значимыми ($p=0,0001$, критерий Манна-Уитни).

Таким образом, для ПОЯ, склонных к рецидивам характерна выраженная экспрессия бета-катенина, что можно объяснить увеличением мутаций гена *CTNNB1*, и как следствие, более агрессивный биологический потенциал таких образований. Так же нами были выявлены статистически значимые различия экспрессии бета-катенина для разных стадий ПОЯ ($p=0,041$, критерий Манна-Уитни). При I стадии чаще выявлялась слабая и умеренная экспрессия маркера (29,0% и 39,1%, соответственно); в опухолях II стадии преобладала выраженная экспрессия (68,8); при III стадии имела место примерно одинаковая частота всех уровней реакции.

Подобный характер экспрессии маркера отражает важный этап прогрессирования ПОЯ, когда уровень экспрессии бета-катенина статистически значительно повышается при переходе от первой стадии заболевания ко второй и сопровождается экстраовариальное распространение опухоли, постепенно снижаясь при дальнейшем прогрессировании. Этот факт имеет большое клиническое значение и требует дальнейшего изучения в тесной взаимосвязи с клиницистами.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) – класс ферментов из группы эндопротеаз. Эти мембранные белки разрушают компоненты внеклеточного матрикса, в частности, ММП-1, ММП-2 и ММП-9 играют ключевую роль в деградации коллагена IV типа, основного компонента базальных мембран, чем способствуют инвазии и метастазированию опухолей.

Результаты исследования ММП-1 показали значимое усиление ее экспрес-

сии в рецидивирующих ПОЯ (метод Манна-Уитни, $p < 0,05$), что, скорее всего, связано с повышением инвазивного и миграционного потенциала опухоли, так как по данным литературы, повышенная экспрессия MMP-1 связана с инвазией и миграцией клеток рака яичника (Young T.N. et al., 1996; Nagase H., Woessne J.F., 1999; Kanwar J.R., Kamalapuram S.K., Kanwar R.K., 2013).

В нашем исследовании не выявлено статистически значимых различий экспрессии MMP-2 в группах ПОЯ и в группе сравнения ($p > 0,05$; критерий Манна-Уитни). При изучении данных литературы отмечено, что работы, посвященные экспрессии MMP-2 в пограничных опухолях яичника свидетельствуют об усилении реакции в микроинвазивных ПОЯ. В тоже время литературные данные, касающиеся изучения MMP-2 в серозной карциноме яичника весьма противоречивы: одни исследования, говорят о том, что экспрессия MMP-2 в опухолевых клетках является индикатором благоприятного прогноза при раке яичников, другие – о том, что экспрессия MMP-2 связана с низкой выживаемостью (Garzetti G. et al., 1995; Sillanpaa S. et al., 2007).

Отсутствие значимых показателей реакции MMP-2 в ПОЯ предположительно объясняется склонностью этого маркера экспрессироваться в более агрессивных опухолях с неблагоприятным прогнозом. Для пограничных же опухолей, наоборот, характерно индолентное течение с высокими показателями общей выживаемости. Представляется, что в ПОЯ механизмы миграции опухолевых клеток, опосредованы не через MMP-2, а через другие металлопротеиназы.

Изучение экспрессии MMP-9 в ПОЯ показало ее значимое усиление в опухолях без рецидивов и снижение в опухолях с рецидивами ($p = 0,003$, критерий Манна-Уитни), хотя по данным литературы для агрессивного фенотипа должно быть характерно усиление реакции этого маркера (Sillanpaa S. et al., 2007).

Возможно, в нашей серии наблюдений синтез MMP-9 в определенной степени регулировался действием ингибиторов матриксных протеиназ, что подтверждается результатами изучения экспрессии TIMP-2.

Члены семейства тканевых ингибиторов металлопротеиназ (TIMP), как считается, ассоциированы с прогрессией рака яичников. Так, по данным литературы экспрессия TIMP-1 коррелирует с неблагоприятным прогнозом и агрессивным течением серозного рака яичников (Rauvala M., Puistola U., Turpeenniemi-Hujanen T., 2005; Maata M. et al., 2007).

В ПОЯ наиболее часто встречалось отсутствие либо слабая экспрессия TIMP-1 (36,6% и 40,7%, соответственно), при этом в аденокарциномах чаще выявлялось умеренное и выраженное окрашивание (42,9% и 19,1% наблюдений, соответственно). Различия оказались статистически значимыми ($p < 0,0001$, критерий Манна-Уитни). Этот факт, вероятнее всего, связан с низким злокачественным потенциалом ПОЯ и, в определенной степени подтверждает данные литературы о неблагоприятном прогностическом значении этого ингибитора.

Экспрессия TIMP-1 значимо не различалась в зависимости от отсутствия или наличия рецидива ПОЯ ($p > 0,05$; критерий Манна-Уитни).

Имеются сообщения о том, что экспрессия TIMP-2 значительно выше в карциномах яичника по сравнению с доброкачественными и пограничными опухолями (Maata M. et al., 2007). При анализе реакции TIMP-2 мы обнаружили отсутствие экспрессии данного маркера в ПОЯ без рецидивов, а так же слабое и умеренное окрашивание в опухолях с рецидивом. Возможно, это обусловлено тем, что в рецидивирующих пограничных опухолях увеличивается агрессивный потенциал, за который, отчасти, отвечают ингибиторы матриксных протеиназ.

BRAF – это протоонкоген, который играет важную роль в регуляции MAP kinase/ ERKs сигнального пути, влияющего на пролиферацию и дифференцировку клеток. Известно, что *BRAF* мутации являются характерными для СПОЯ и чаще встречаются при их прогрессии (Singer G. et al., 2003; Shih I., Kurman R., 2005).

Однако, в нашем исследовании не выявлено связи между наличием мутации p.V600E в 15 экзоне гена *BRAF* и развитием рецидивов ПОЯ. Так же не

выявлено различий между наличием данной генетической аномалии в ПОЯ и высокодифференцированных серозных аденокарциномах.

Отсутствие различий во встречаемости мутации гена *BRAF* во всех исследуемых группах подтверждает теорию о двойственном пути канцерогенеза рака яичников, согласно которой у пограничных опухолей яичника и low-grade карцином имеются общие генетические аномалии, а именно мутации в генах *KRAS* и *BRAF*, в то время как для high-grade карцином характерными являются мутации гена *TP53* (Singer G. et al., 2002, 2005).

В связи с этим, мы считаем нецелесообразным определение мутации гена *BRAF* для прогнозирования рецидивов ПОЯ.

Таким образом, в результате проведенного многофакторного анализа нами выявлены факторы благоприятного и неблагоприятного прогноза пограничных опухолей (табл. 1).

Таблица 1.

Факторы прогноза ПОЯ

	ПОЯ без рецидива	ПОЯ с рецидивом
Морфологические факторы прогноза	Отсутствие микрососочковой архитектуры	Наличие микрососочковой архитектуры
	Отсутствие имплантов	Наличие имплантов
	Отсутствие псаммомных телец	Наличие псаммомных телец
Молекулярно-биологические факторы прогноза	Экспрессия Вах менее 50%	Экспрессия Вах более 80%
	Экспрессия MMP-9 +++	Отсутствие экспрессии MMP-9
		Экспрессия MMP-1 +++
		Экспрессия бета-катенина +++
		Экспрессия TIMP-2 + и ++

Ki-67, bcl-2, cyclin D1, сурвивин и TIMP-1 не имеют прогностического значения для планирования рецидива пограничной опухоли, однако могут

оказать значительную помощь в дифференциальной диагностике между ПОЯ и высокодифференцированной серозной аденокарциномой на ее фоне (табл. 2).

Таблица 2.

Дифференциальная диагностика СПО и высокодифференцированной серозной аденокарциномы

Маркер	СПО	Аденокарцинома
Ki-67	-	Более 20%
Циклин D1	Менее 30%	Более 60%
bcl-2	Менее 3%	Более 15%
Вах	Менее 90%	90% и более
Сурвивин	Менее 70%	Более 70%
ТІМР-1	0/+	++/+++

Матриксная металлопротеиназа MMP-2 а так же супрессоры опухолевого роста p53 и p21 не имеют прогностического значения при планировании рецидива ПОЯ, что, вероятно, связано с другими механизмами ответственными за апоптотический и инвазивный потенциал этих опухолей.

Мутация p.V600E 15 экзона гена *BRAF* не является фактором риска рецидива ПОЯ.

Выводы

1. Наличие микрососочковой архитектуры в пограничной опухоли яичника свидетельствует о ее повышенной биологической агрессивности (риск развития рецидива – 99,9%).

Выявление множественных псаммомных телец в серозной пограничной опухоли связано с неблагоприятным прогнозом (риск развития рецидива – 30%).

2. Наличие неинвазивных имплантов значительно повышает риск ре-

цидива пограничной опухоли яичника (до 51,9%).

3. Инвазивные импланты при серозной пограничной опухоли характеризуются морфологическими признаками высокодифференцированной аденокарциномы (клеточная атипия, повышения ядерной градации), и вероятнее всего, свидетельствует о невыявленных микроочагах аденокарциномы в первичной опухоли.

4. Гиперэкспрессия индуктора апоптоза Вах, регулятора wnt-пути бета-катенина и металлопротеиназы MMP-1 в сочетании со слабой и умеренной экспрессией ингибитора металлопротеиназ TIMP-2 коррелирует с рецидивирующим течением пограничных опухолей яичников.

Выраженная экспрессия металлопротеиназы MMP-9 связана с безрецидивным течением пограничных опухолей яичников.

При переходе от I к II клинической стадии пограничных опухолей яичников отмечается усиление экспрессии Вах и бета-катенина, что следует учитывать в клинической практике.

5. Высокодифференцированные серозные аденокарциномы отличаются от серозных пограничных опухолей экспрессией маркеров пролиферации Ki-67 и cyclin D1 более 20% и 60% клеток, соответственно; ингибиторов апоптоза bcl-2 и сурвивина – более 15% и 70%, соответственно; индуктора апоптоза Вах – 90% и более, а так же умеренной и выраженной реакцией ингибитора металлопротеиназ TIMP-1.

6. Наличие мутации p.V600E в 15 экзоне гена *BRAF* не является фактором риска рецидива пограничных опухолей яичников. Вместе с тем, сходный характер мутаций p.V600E в 15 экзоне гена *BRAF* в пограничных опухолях яичников и аденокарциномах может служить свидетельством многоступенчатого развития опухоли.

Практические рекомендации

Морфологическое заключение при пограничной опухоли яичника должно содержать:

- Гистологический вариант опухоли;
- Наличие микрососочковой архитектуры;
- Наличие псаммомных телец;
- Наличие имплантов и их подтип;

При обнаружении микрососочковой архитектуры правомерно употребление термина «неинвазивная low-grade серозная карцинома», а при морфологическом кодировании (ICD-O) после дроби необходимо указать цифру 2 (карцинома in situ).

При обнаружении инвазивных имплантов в типичной СПО следует предпринять дорезку блоков и архивного материала с целью тщательного исследования первичной опухоли (1 блок/1см³) для поиска невыявленных очагов высококодифференцированной аденокарциномы.

- Иммуногистохимическая панель для определения биологического потенциала ПОЯ должна включать: *Vax*, *бета-катенин*, *ММР-1*, *ММР-9*, *ТИМР-2*.
- Для дифференциальной диагностики СПО и высококодифференцированной серозной аденокарциномы: *Ki-67*, *bcl-2*, *Vax*, *циклин D1*, *сурвивин*, *ТИМР-1*.
- Усиленная коэкспрессия *Vax* и бета-катенина требует дополнительного обследования пациентки для уточнения стадии процесса.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Значение маркеров пролиферации и апоптоза для пограничных опухолей яичника / **Виноградов И.И.** [и др.] // **Росс. мед.-биол. вестник.** - 2013. - №3. - С.130-135. (соавт.: Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Ахидова Е.В., Вольпина О.М., Волкова Т.Д., Короев Д.О).

2. Клинико-морфологические факторы прогноза при пограничных опухолях яичника / **Виноградов И.И.** [и др.] // **Онкология. Журнал им. П.А. Герцена.** - 2014. - №3. – С.22-25. (соавт.: Андреева Ю.Ю., Новикова Е.Г., Шевчук А.С., Завалишина Л.Э., Франк Г.А.).
3. Роль диспластических изменений эпителия маточной трубы в гистогенезе рака яичников / Данилова Н.В. [и др.] // **Архив патологии.** – 2014. - №4. – С.9-14. (соавт.: Андреева Ю.Ю., Королев А.В., **Виноградов И.И.**, Завалишина Л.Э.).
4. Анализ мутаций гена *BRAF* при пограничных опухолях и аденокарциномах яичника / Завалишина Л.Э. [и др.] // Мат. VIII всеросс. съезда онкологов. – 2013.- Т.2. - С.722. (соавт.: Кекеева Т.В., Андреева Ю.Ю., **Виноградов И.И.**, Воронина О.В.).
5. **Виноградов И.И.** Значение маркеров пролиферации и апоптоза для пограничных опухолей яичника / Виноградов И.И., Андреева Ю.Ю., Завалишина Л.Э. Межрегион. Сборник науч. Трудов. – Рязань. – 2013. – С.48.
6. **Виноградов И.И.** Значение маркеров пролиферации и апоптоза для пограничных опухолей яичника / Виноградов И.И., Андреева Ю.Ю., Завалишина Л.Э. Современные методы лабораторной и инструментальной диагностики травм и заболеваний. Сборник мат. Науч.-практ. Конф. Мол. Ученых суд.мед. и патанат. ЦФО. – Москва. – 2014. – С.12-16.