

ОНКОЛОГІЯ

УДК 616-006.6-091.8:616-008.9

*О.В. Лазарук, І.С. Давиденко, О.М. Давиденко**ВДНЗ «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці***ПРОГНОСТИЧНІ ПОКАЗНИКИ МЕТАСТАЗУВАННЯ ПРОТОВОГО РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ НА ПІДСТАВІ ГІСТОХІМІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ОКРЕМИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БІЛКІВ**

Досліджено 162 випадки інвазивної протокової карциноми: 97 з метастазами та 65 без них. Кількісно оцінено вільні NH_2 -групи білків, а також «кислі» та «основні» білки з бромфеноловим синім. Встановлено, що оптична густина забарвлення на вільні NH_2 -групи білків в епітеліальних пухлинних клітинах є суттєво вищою в спостереженнях з метастазами пухлини в порівнянні зі спостереженнями без метастазів пухлини. Оптична густина забарвлення на вільні NH_2 -групи білків у сполучнотканинних волокнах (зона I), навпаки, є нижчою, ніж в спостереженнях з метастазами пухлини в порівнянні зі спостереженнями без метастазів пухлини. Враховуючи отримані дані щодо вільних NH_2 -груп білків, в якості робочого показника застосували паренхіматозно-стромальний коефіцієнт. При дослідженні кислих, основних білків виявлено, що при наявності пухлинних метастазів протокового раку грудної залози величина коефіцієнта R/B у середньому перевищує показники в спостереженнях без метастазів як в пухлинних клітинах, так і в сполучнотканинних волокнах. На підставі отриманих даних були розраховані величина відносного ризику (Risk ratio) та відношення шансів (Odds ratio).

Ключові слова: *грудна залоза, метастазування протокового раку, прогноз.*

Протокова інвазивна карцинома грудної залози лідирує в групі злоякісних пухлин у жінок [1] у всіх країнах світу. На жаль, Україна не є виключенням [2]. Основною проблемою пухлини є метастазування, яке веде до втрати працездатності, а в подальшому – і життя.

Для дослідження процесів, що відбуваються в структурах пухлини, часто визначають процеси обмеженого протеолізу, окиснювальної модифікації білків. Дослідження направлені на визначення активності процесів: чим активніше відбуваються процеси, тим більшою є ймовірність метастазування.

Основними методами дослідження морфологічних особливостей пухлини є гістохімічні та імуногістохімічні методи. Для дослідження прогнозування метастазування зручно використовувати методики розрахунку ризиків [3]. Доцільно враховувати співвідношення параметрів показників при вико-

ристанні методики розрахунку ризиків, що дозволить розробити критерії метастазування на основі відносного ризику та розрахунку шансів [4].

Матеріал і методи. Для досліджень використаний біопсійний та операційний матеріал, розподілений на дві групи: з метастазами (n=97) та без них (n=65). Для чіткого оптичного орієнтування та візуалізації структур пухлини гістологічні препарати забарвлювали за методикою Н.З. Слінченка. В препаратах сполучнотканинних волокон строми – блакитного забарвлення різної інтенсивності, пухлинні епітеліальні клітини мають відтінки фіолетового кольору. Сполучнотканинні волокна (зона I) веретеноподібної форми – це волокна, які безпосередньо оточують скупчення пухлинних ендотеліальних клітин (рис. 1). Вони відрізняються від інших волокон строми морфологічними властивостями. Тому саме

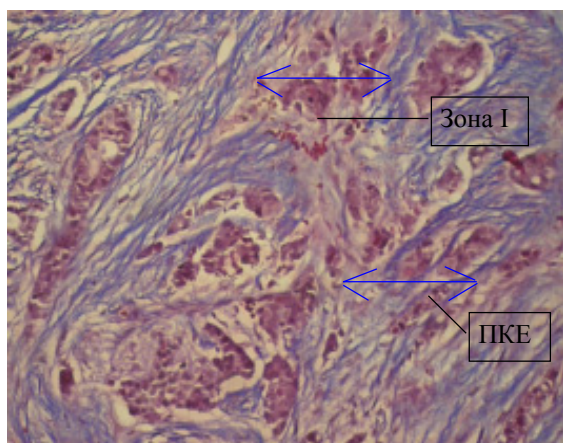


Рис. 1. Мікропрепарат тканини грудної залози, ураженої протоковою карциномою, методика за Слінченком (відтінки фіолетового – пухлинні епітеліальні клітини; блакитного – стромальний компонент). Об. 10^x, Ок.10^x

між цими структурами в наступних дослідженнях буде визначатися різниця результатів.

Проводили нінгідриново-шифрововську реакцію на вільні аміногрупи (NH_2) білків для визначення кількісних характеристик обмеженого протеолізу за А. Yasuma і Т. Ichikava. Далі оцінювали ступінь обмеженого протеолізу. Кількісною одиницею виміру обмеженого протеолізу служила величина оптичної густини в одиницях оптичної густини (від 0 – відсутність забарвлення, абсолютна прозорість, до 1 – максимальне забарвлення, абсолютна непрозорість). Вимірювання проводили на цифрових копіях зображення шляхом комп'ютерної мікроденситометрії з використанням комп'ютерного програмного устаткування ImageJ (1.48v, вільна ліцензія, W. Ras-band, National Institute of Health, USA, 2015) [5].

Наступний метод, гістохімічний, дозволяє оцінити співвідношення між аміногрупами та карбоксильними або гідроксильними групами білків за особливостями їхнього забарвлення. Оцінку здійснювали кількісним методом мікроспектрофотометрії шляхом гістохімічного дослідження на «кислі» та «основні» білки з бромфеноловим синім за Мікел Салво. Результати методу наступні: у відтінки синього забарвлюються протеїни, в яких переважають аміногрупи над карбоксильними й гідроксильними групами (автор методики називає такі білки «основними»), а у відтінки червоного, зеленого та жовтого забарвлюються протеїни, в яких переважають карбоксильні та гідроксильні групи над аміногрупами (автор методики називає такі

білки «кислими»). Оцінка проводиться за допомогою комп'ютерної мікроспектрофотометрії між відтінками червоного та синього кольорів – коефіцієнт R/B (від назви кольорів) [6].

За допомогою мікроскопа Delta Optical Evolution 100 (планахроматичні об'єктиви) та цифрової камери Olympus SP-550UZ отримували цифрові копії зображень. Зображення аналізували в спеціалізованій для гістологічних досліджень комп'ютерній програмі ImageJ. У регіонах інтересу (ROIs) – пухлинних клітинах і сполучнотканинних волокнах у середовищі вказаної програми отримували дві величини спектральної характеристики забарвлення – червоний та синій компоненти в градаціях (256 градацій для кожного кольору).

Для обрахування показників досліджень використовували середні арифметичні та їх похибки, ліміти для груп дослідження. Перевіряли на нормальність розподілу у вибіркових сукупностях методом Shapiro–Wilk. Статистичні обрахунки, розбіжність між вибірковими сукупностями у середніх тенденціях здійснювали за непарним методом Стьюдента та непараметричним критерієм Манна–Уїтні у середовищі комп'ютерної програми PAST v3.1 (вільна ліцензія, O. Hammer, 2016) [6]. Мірою співвідношення між кислими та основними білками служив коефіцієнт R/B.

Отримані дані методик в пухлинних епітеліальних клітинах і сполучнотканинних волокнах (зона I) співставляли між собою, вираховували відношення ризиків (Risk ratio) та відношення шансів (Odds ratio).

Результати та їх обговорення. Узагальнені дані по гістохімічних показниках стану білків в епітеліальних пухлинних клітинах і сполучнотканинних волокнах у первинній пухлині протокового раку грудної залози в аспекті метастатичного процесу наведено в табл. 1. Згідно з результатами оптична густина забарвлення на вільні NH_2 -групи білків в епітеліальних пухлинних клітинах є суттєво вищою в спостереженнях з метастазами пухлини (рис. 2) у порівнянні зі спостереженнями, в яких метастази не спостережені.

Наведена інформація вже сама по собі має цінність в плані прогнозування метастазів раку грудної залози, але було встановлено, що ще більш високу цінність має інший підхід. Цей підхід полягає в обрахуванні у

Таблиця 1. Деякі гістохімічні показники стану білків в епітеліальних пухлинних клітинах і сполучнотканинних волокнах у первинній пухлині протокового раку грудної залози в аспекті метастатичного процесу

Показник	Спостереження протокового раку	
	з виявленими метастазами (n=97)	без виявлених метастазів (n=65)
Оптична густина забарвлення на вільні NH ₂ -групи білків в епітеліальних пухлинних клітинах, од.	0,184±0,0014	0,102±0,0012 p<0,001
Оптична густина забарвлення на вільні NH ₂ -групи в сполучнотканинних волокнах (зона I), од.	0,144±0,0016	0,169±0,0011 p<0,001
Коефіцієнт R/B в епітеліальних пухлинних клітинах	1,41±0,011	1,22±0,010 p<0,001
Коефіцієнт R/B в сполучнотканинних волокнах (зона I)	1,88±0,014	1,38±0,011 p<0,001

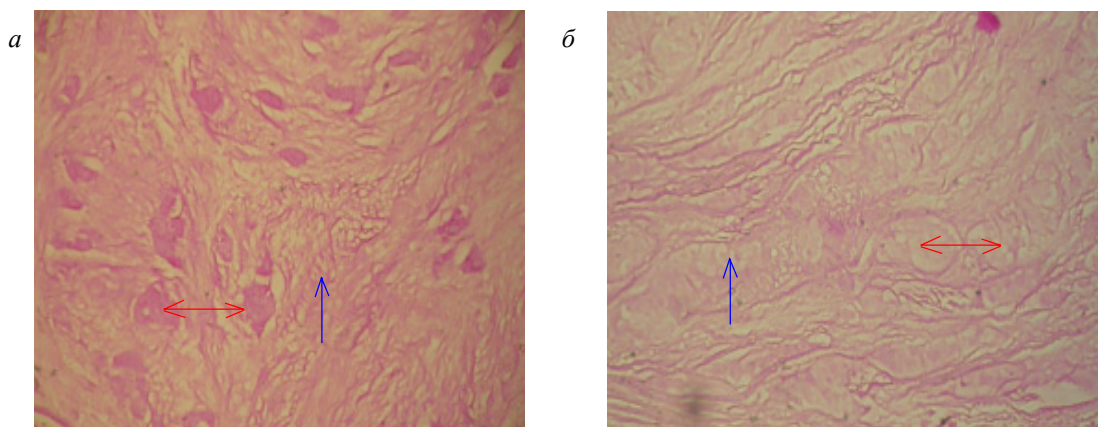


Рис. 2. Мікропрепарати протокової карциноми грудної залози. Нінгідринно-шиффовська реакція на вільні аміногрупи білків за А. Yasuma та Т. Ichikava. Об.10 \times , Ок.10 \times :
а – переважає забарвлення в пухлинних епітеліальних клітинах; б – переважає забарвлення в сполучнотканинних волокнах

кожної окремо взятої пацієнтки коефіцієнта співвідношення між оптичною густиною забарвлення на вільні NH₂-групи білків в епітеліальних пухлинних клітинах і оптичною густиною забарвлення на вільні NH₂-групи білків у сполучнотканинних волокнах (зона I). Для простоти опису результатів нами застосований робочий термін «паренхіматозно-стромальний коефіцієнт» (ПСК) для вільних NH₂-груп білків. Тлумачення величини цього коефіцієнта є простим і, відповідно, зрозумілим. Зокрема, величина ПСК більша одиниці означає, що оптична густина забарвлення на вільні NH₂-групи білків в епітеліальних пухлинних клітинах у конкретної пацієнтки перевищує оптичну густина забарвлення на вільні NH₂-групи білків у сполучнотканинних волокнах. При величині ПСК нижче одиниці тлумачення протилежні. Варто зазначити, що величина ПСК, на відміну від окремо визна-

ченої оптичної густини забарвлення у клітинах чи сполучнотканинних волокнах, практично не залежить від товщини типових гістологічних зрізів, бо технічно визначається на одному і тому ж гістологічному зрізі для окремого спостереження.

На основі вказаного підходу всіх пацієнок поділили на групи, в яких ПСК був більше одиниці та менше одиниці. Розподіл спостережень на основі такого підходу наведений в табл. 2.

На основі даних табл. 2 були обраховані деякі прогностичні показники. Зокрема, величина відносного ризику (Risk ratio) за ПСК для вільних NH₂-груп білків при встановленій діагностичній величині «одиниця» становив 7,85, а відношення шансів (Odds ratio) – 109,40. При цьому чутливість вказаного методу становила 0,9175 (або 91,75 %), специфічність – 0,9077 (або 90,77 %).

Таблиця 2. Розподіл спостережень протокового раку грудної залози в групах дослідження за паренхіматозно-стромальним коефіцієнтом для вільних NH₂-груп білків

Умови для паренхіматозно-стромального коефіцієнта	Спостереження протокового раку	
	з виявленими метастазами (n=97)	без виявлених метастазів (n=65)
Коефіцієнт >1	n=89	n=6
Коефіцієнт <1	n=8	n=59

При спробах знайти пояснення встановленій високій прогностичній цінності визначення ПСК для вільних NH₂-груп білків щодо метастазів пухлини була висунута робоча гіпотеза про те, що зміни інтенсивності забарвлення на вільні NH₂-групи білків віддзеркалюють не стільки кількість білка, як часто тлумачать цю методику, скільки відображають підсилення обмеженого протеолізу в пухлинній тканині. На сьогодні немає прямих методів перевірки цієї гіпотези, була застосована непряма її перевірка. Зокрема, був

використаний відомий факт про підсилення обмеженого протеолізу при зростанні окиснювальної модифікації білків.

На рівень окиснювальної модифікації білків вказує коефіцієнт R/B, який обраховується на підставі комп'ютерної мікроспектрофотометрії гістологічних зрізів, забарвлених бромфеноловим синім. Узагальнені дані щодо коефіцієнта R/B в структурах пухлини наведено в табл. 3, рис. 3. При наявності пухлинних метастазів протокового раку грудної залози величина коефіцієнта R/B у середньому пе-

Таблиця 3. Розподіл спостережень протокового раку грудної залози за коефіцієнтом R/B в пухлинних епітеліальних клітинах і сполучнотканинних волокнах зони I

Умови для коефіцієнта R/B	Спостереження протокового раку	
	з виявленими метастазами (n=97)	без виявлених метастазів (n=65)
> 1,34 в ПЕК	n=90	n=4
< 1,34 в ПЕК	n=7	n=61
> 1,64 у сполучнотканинних волокнах зони I	n=89	n=5
< 1,64 у сполучнотканинних волокнах зони I	n=8	n=60

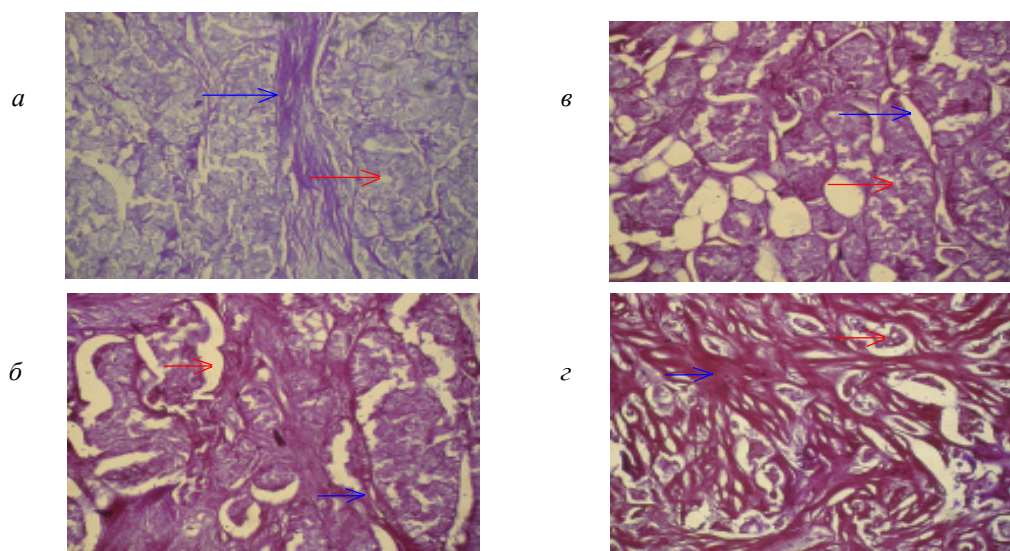


Рис. 3. Мікропрепарат протокової карциноми грудної залози, визначення окиснювальної модифікації білків за Mikel Calvo. Об.10^x, Ок.10^x:

a – відмічається переважання відтінків червоного кольору в епітеліальних пухлинних клітинах, що свідчить про виражену окиснювальну модифікацію білків; *б-в* – приблизно в рівній мірі виражена окиснювальна модифікація білків в стромі та паренхімі; *г* – різко виражена окиснювальна модифікація білків в стромальному компоненті (сполучнотканинних волокнах) пухлини

ревищує показники в спостереженнях без метастазів як в пухлинних клітинах, так і в сполучнотканинних волокнах. Найбільш вдалою прогностичною величиною коефіцієнта R/B методом підбору для пухлинних клітин є величина коефіцієнта 1,34.

На основі даних табл. 3 обраховані прогностичні показники. Величина відносного ризику (Risk ratio) за коефіцієнтом R/B при встановленій діагностичній величині 1,34 становила 9,30, а відношення шансів (Odds ratio) – 196,07. При цьому чутливість вказаного методу становила 0,9278 (або 92,78%), а специфічність – 0,9385 (або 93,85 %).

На підставі пошуку найбільш вдалої прогностичної величини коефіцієнта R/B методом підбору знайдено, що для сполучнотканинних волокон такою величиною коефіцієнта є 1,64. Розподіл спостережень протокового раку грудної залози за коефіцієнтом R/B в сполучнотканинних волокнах зони I строми пухлини наведено в табл. 3.

Обраховані прогностичні показники. Зокрема, величина відносного ризику за коефіцієнтом R/B у сполучнотканинних волокнах при встановленій діагностичній величині 1,64 становила 8,05, а відношення шансів (Odds ratio) – 133,50. При цьому чутливість вказаного мето-

ду становила 0,9231 (або 92,31 %), а специфічність – 0,9468 (або 94,68 %).

Висновки

1. Величина відносного ризику (Risk ratio) за паренхіматозно-стромальним коефіцієнтом для вільних NH₂-груп білків становила 7,85, а відношення шансів (Odds ratio) – 109,40.

2. Величина відносного ризику (Risk ratio) за коефіцієнтом R/B у пухлинних клітинах становила 9,30, а відношення шансів (Odds ratio) – 196,07.

3. Величина відносного ризику (Risk ratio) за коефіцієнтом R/B у сполучнотканинних волокнах становила 8,05, а відношення шансів (Odds ratio) – 133,50.

4. Показники обмеженого протеолізу та процесів окиснювальної модифікації білків у пухлинних клітинах і сполучнотканинних волокнах є цінними прогностичними критеріями щодо метастазів протокового раку грудної залози.

Перспектива подальших досліджень пов'язана з проведенням кореляційного аналізу щодо процесів обмеженого протеолізу та окиснювальної модифікації білків у різних структурах пухлини протокового раку грудної залози.

Список літератури

1. Lazaruk A., Davydenko I. Using of binominal method for the purpose of determination of confidence intervals for prediction of invasive ductal breast metastases // EUREKA: Health Sciences. 2016. № 2. P. 24–29.
2. Федоренко З.П., Гулак Л.О., Рыжов А.Ю. и др. Риск развития рака молочной железы у женщин младших возрастных категорий в Украине // Environment & health. 2016. № 1. С. 36–41.
3. Sgroi D.C., Chapman J-A.W., Badovinac-Crnjevic T. et al. Assessment of the prognostic and predictive utility of the Breast Cancer Index (BCI): an NCIC CTG MA.14 study // Breast Cancer Research. 2016. Vol. 18 (1). P. 1–7.
4. Keller E.T., Mao Y., Garfield D.H. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer // Cancer and Metastasis Reviews. 2013. Vol. 32. P. 303–315.
5. Давиденко І.С. Заходи стандартизації гістохімічної методики на окиснювальну модифікацію білків // Український медичний альманах. 2013. № 3 (додаток). С. 180–181.
6. Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological Statistics. Reference Manual // Oslo: University of Oslo. 2012. P. 284.

А.В. Лазарук, І.С. Давиденко, О.М. Давиденко

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ ПРОТОКОВОГО РАКА ГРУДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ОСНОВАНИИ ГИСТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ БЕЛКОВ

Исследовано 62 случая инвазивной протоковой карциномы: 97 с метастазами и 65 без них. Установлено, что оптическая плотность окрашивания на свободные NH₂-группы белков в эпителиальных опухолевых клетках существенно выше в наблюдениях с метастазами опухоли по сравнению с наблюдениями без метастазов опухоли. Оптическая плотность окраски на свободные NH₂-группы белков в соединительнотканых волокнах (зона I), наоборот, ниже, чем в наблюдениях с метастазами опухоли по сравнению с наблюдениями без метастазов опухоли. Учитывая

полученные данные относительно свободных NH₂-групп белков, в качестве рабочего показателя применяли паренхиматозно-стромальный коэффициент. При исследовании кислых и основных белков обнаружено, что при наличии опухолевых метастазов протокового рака грудной железы величина коэффициента R/B в среднем превышает показатели в наблюдениях без метастазов как в опухолевых клетках, так и в соединительнотканых волокнах. На основании полученных данных были рассчитаны величина относительного риска (Risk ratio) и отношение шансов (Odds ratio).

Ключевые слова: грудная железа, метастазирование протокового рака, прогноз.

O.V. Lazaruk, I.S. Davidenko, O.M. Davidenko

PROGNOSTIC INDICATORS OF METASTASIS DUCTAL BREAST CANCER BY USING HISTOCHEMICAL STUDY OF CERTAIN PROPERTIES OF PROTEINS

It was investigated 162 observations of invasive ductal breast carcinoma, including cases with metastases (97) and without them (65). Quantified free NH₂-groups of proteins, acidic and basic proteins with a bromphenol blue. It was found that the optical density of color on the free NH₂-groups of proteins in epithelial tumour cells is significantly higher in observations of tumour metastasis compared with observations without metastases. The value of optical density of color on the free NH₂-groups of proteins in connective tissue fibers (zone I) is lower than in observations with metastatic tumours compared with observations without metastases. Considering the data available on NH₂-groups of proteins, as a working figure was applied parenchymatous-stromal coefficient. During the research of acidic and basic proteins was revealed that the presence of ductal breast cancer tumour metastasis increase the value of R/B and it's higher than in the observations without metastasis both in tumour cells and in the connective tissue fibers. Based on these data we calculated the risk ratio and the odds ratio.

Keywords: breast cancer, metastatic ductal breast cancer, prognosis.

Поступила 04.05.17