

Надыров Э. А.

канд. мед наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии
доцент кафедры патологической анатомии (курс клинической цитологии), Гомельский
государственный медицинский университет;
г. Гомель, Республика Беларусь

Ачинович С. Л.

канд. мед наук, заведующий отделением патологической анатомии, Гомельский областной
клинический онкологический диспансер
г. Гомель, Республика Беларусь

Ларионова И. А.

Студентка медико-диагностического факультета,
Гомельский государственный медицинский университет
г. Гомель, Республика Беларусь

Войсаров М. С.

Студент медико-диагностического факультета,
Гомельский государственный медицинский университет
г. Гомель, Республика Беларусь

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ РАКА ПРЯМОЙ КИШКИ У ПАЦИЕНТОВ I-III СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Nadyrov E.A.

PhD, MD, Associate Professor, Department of Histology, Cytology and Embryology Associate Professor,
Department of Pathological Anatomy (course of clinical cytology), Gomel State Medical University
Gomel, Republic of Belarus

Achinovich S.L.

PhD, MD, Head of the Department of Pathological Anatomy,
Gomel Regional Clinical Oncology Center
Gomel, Republic of Belarus

Larionova I.A.

Student of the Faculty of Medical Diagnostics,
Gomel State Medical University

I. Gomel, Republic of Belarus

Voisarov M.S.

Student of the Faculty of Medical Diagnostics,
Gomel State Medical University
Gomel, Republic of Belarus

INTEGRATED APPROACH TO PREDICTION OF CLINICAL COURSE OF DIRECT GUT CANCER IN PATIENTS OF THE I-III STAGE OF THE DISEASE

Аннотация. Проведен анализ клинического течения рака прямой кишки у 90 пациентов. Определена оптимальная панель иммуногистохимических маркеров для определения исходов заболевания. В панель вошли следующие иммуногистохимические маркеры: Ki-67, p53, хромагранин; CD34, CD3, CD20 и S100. Определены пороговые значения показателей, характеризующих неблагоприятный исход заболевания. Результаты исследования позволяют выделять группы риска среди пациентов с раком прямой кишки, требующих более углубленного обследования и диспансерного наблюдения в послеоперационном периоде.

Summary. The clinical course of colorectal cancer in 90 patients was analyzed. The optimal panel of immunohistochemical markers for determining the outcome of the disease was determined. The panel included the following immuno-stochemical markers: Ki-67, p53, chromagranine; CD34, CD3, CD20 and S100. The threshold values of indicators characterizing an unfavorable outcome of the disease are determined. The results of the study make it possible to identify risk groups among patients with colorectal cancer requiring a more in-depth examination and follow-up in the postoperative period.

Ключевые слова: рак прямой кишки, иммуногистохимические маркеры, прогноз заболевания, доказательная медицина, диспансерное наблюдение.

Key words: colorectal cancer, immunohistochemical markers, disease prognosis, evidence-based medicine, clinical follow-up.

Колоректальный рак является не только актуальной проблемой современной онкологии во всем мире, но и одной из главных проблем здравоохранения. При изучении динамики

заболеваемости рака прямой кишки (РПК) за 10 лет (2008-2017 годы) в Республике Беларусь на 100 000 населения составил 15,9%. Стандартизованный показатель заболеваемости вырос с 11,1 до 13,2

(мужчины с 15,4 до 18,2, женщины с 8,6 до 10,3) на 100 000 населения. Широкая распространенность, снижение качества жизни больных, высокая смертность при РПК обуславливают необходимость совершенствования методов диагностики и лечения. Так, частота своевременной диагностики злокачественных новообразований I и II стадии к числу вновь зарегистрированных случаев на 2017 год составила 56,3 %. Стандартизованные показатели смертности населения Республики Беларусь снизились с 6,3 до 5,8 (мужчины с 9,2 до 8,5, женщины с 4,7 до 4,2) на 100 000 населения [1].

В оценке опухолевого потенциала используют как традиционные критерии (возраст пациента, размер опухоли, форма и темп роста, локализация в различных отделах прямой кишки, наличие регионарных и отдаленных метастазов, степень злокачественности), так и молекулярно-генетические маркеры. В связи с этим, одной из актуальных задач современной онкологии является не только поиск дополнительных параметров опухолей, на основе которых можно было бы оценивать прогноз заболевания и определять адекватную тактику лечения, но и разработка на их основе прогностических моделей исходов заболевания [2,3].

Иммуногистохимические (ИГХ) методы исследования позволяют оценить пролиферативную активность новообразования по экспрессии маркера пролиферации Ki-67 и фактора, регулирующего клеточный цикл – циклина D1, состояние сосудов микроциркуляторного русла с помощью определения относительной плотности сосудов микроциркуляторного русла по экспрессии маркера эндотелия CD34, наличие эндокринных клеток в паренхиматозном компоненте РПК по экспрессии хромогранина А (ХГА), оценить апоптоз по экспрессии транскрипционного фактора p53 и регулятора апоптоза – протеина BCL2. С помощью ИГХ имеется возможность определить прогностическую значимость иммунных реакций путем изучения клеток, синтезирующих иммуноглобулин А (IgA); Т-лимфоцитов по периферии РПК, определяемых по экспрессии CD3; В-лимфоцитов по периферии РПК, определяемых по экспрессии CD20; опухоль ассоциированных макрофагов, определяемых по экспрессии CD68; дендритных клеток, определяемых по экспрессии S100.

До настоящего времени в медицинской литературе нет единого подхода для выбора оптимальной панели ИГХ маркеров, наиболее полно характеризующих биологические свойства РПК. В то же время использование комплекса значимых прогностических молекулярно-биологических факторов является чрезвычайно важным не только для понимания биологических особенностей канцерогенеза, но и позволит определить особенности индивидуального прогнозирования у пациентов, страдающих РПК. Использование полученных в результате исследования значимых морфологических и ИГХ критериев позволит выбрать достаточный для оценки прогноза РПК и экономически обоснованный

набор маркеров. Следует отметить, что в ранее проведенных исследованиях было проведено определение прогностической значимости указанных маркеров, однако это относилось к пациентам, которым проводилась предоперационная лучевая терапия [4,5]. Использование традиционных молекулярных факторов и корреляции их с клинико-морфологическими показателями с применением современных методов статистического анализа позволит получить достоверные данные не только о чувствительности опухолей к различным видам терапии, но и разработать модели индивидуального прогнозирования течения заболевания.

Цель работы: оценить прогностическую значимость клинических показателей и иммуногистохимических маркеров при раке прямой кишки I-III стадии для оценки клинического течения заболевания.

Материал и методы

В исследование были включены только опухоли, имеющие гистологическое строение аденокарциномы. Клинические данные о каждом случае получены из медицинской документации (истории болезни, амбулаторные карты) Учреждения «Гомельский областной клинический онкологический диспансер» и Белорусского Республиканского канцер-регистра. Распространенность опухолевого процесса оценивалась в соответствии с классификацией TNM 7-го пересмотра 2009 г. [6].

Из исследования исключались пациенты, которым проводилась предоперационная лучевая терапия, а также умершие от послеоперационных осложнений (в течение первого месяца после проведенной операции).

Пациенты находились в возрасте от 40 до 70 лет. Все они были разделены на 2 группы: первая – с выживаемостью до 3-х лет (относительно благоприятный исход заболевания, 31 пациент, среди которых женщин – 17, мужчин – 14), вторая – более 3-х лет (лет (относительно благоприятный исход заболевания, 59 пациентов, среди которых женщин было 33, мужчин – 26).

Кусочки тканей фиксировались в 10% нейтральном формалине и подвергались стандартной гистологической проводке с заливкой в парафин. Далее готовились срезы из парафиновых блоков, толщина которых составляла 4 мкм (окраска гематоксилин и эозин).

Из клинических параметров оценивались: продольный размер опухоли (ПРО), наличие или отсутствие регионарных метастазов, локализация опухоли (верхней, средней, нижней трети прямой кишки).

ИГХ исследование осуществлялось стрептавидин-биотиновым методом. В качестве системы визуализации использовался Universal LSAB2 KIT корпорации «Dako Cytomation» (Дания) с постановкой положительного и отрицательного контролей.

Для проведения ИГХ исследований были использованы Ki-67 – маркер пролиферации, CysD1 – протеин-регулятор клеточного цикла, p53 –

транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл, маркер апоптоза BCL2, CD3 – маркер дифференцировки Т-лимфоцитов, CD20 – кластер дифференцировки В-лимфоцитов, IgA – антитела к секреторному иммуноглобулину А, маркер эндотелиальных клеток – CD34, ХГА – кластер нейроэндокринных клеток, CD68 – маркер дифференцировки макрофагов и S100 – кластер дендритных клеток.

Микропрепараты фотографировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse 50i с цифровой фотокамерой DS-F1 с разрешением 1689 на 1415 пикселей в 6 полях зрения, исходя из 1000 окрашенных клеток. Подсчет параметров производили с использованием пакета прикладных программ анализа изображения. Площадь полей зрения составила $600,45 \times 495,12 = 297\,307,55$ мкм². (объектив 20) и $299,11 \times 397,67 = 118\,952,07$ мкм² (объектив 40).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием лицензионной программы Statistica 12,0. Оценка нормальности распределения признаков проводилась с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. В зависимости от характера распределения числовых признаков, данные были представлены в виде значения медианы (Me), 25- и 75-го перцентиля: Me (25%–75%) и среднего значения (M) и его стандартного отклонения (SD) Для сравнительной характеристики признаков использованы непараметрические методы: сравнение двух независимых выборок – U-критерий Манна-Уитни и в случае нормального распределения числовых признаков – критерий Стьюдента. Корреляционный анализ проводился с использованием критерия Спирмена (r_s). Различия считали статистически

значимыми при $p < 0,05$. Для оценки значимости клинических параметров были использованы расчет относительного риска (ОР).

Результаты

Изучение прогностической значимости клинических параметров проводилось путем расчета относительного риска неблагоприятного исхода заболевания. Так, в группе пациентов с низкой выживаемостью преобладали новообразования с ПРО более 4-х см – 96,4%, метастазы в регионарных лимфатических узлах (N1a–2a) были выявлены в 56,4%, чаще выявлялась умеренная степень дифференцировки, соответствующая G2 – 63,6%, G3 – 36,4%. Локализация опухоли в нижней трети ПК наблюдалась в 38,2%, реже всего опухоль локализовалась в верхней трети – в 25,5%.

Расчет ОР показал, что факторами риска неблагоприятного исхода заболевания являются: ПРО более 4-х см (ОР=2,1; 95% ДИ 1,7÷2,6; $p < 0,001$), наличие метастазов в регионарных ЛУ (N1a–2a) (ОР=2,2; 95% ДИ 1,5÷3,4; $p < 0,001$) и G2-G3 (ОР=3,3 ДИ 1,7÷6,3, $p < 0,001$).

Таким образом, проведенное исследование значимости клинико-морфологических параметров РПК для пациентов с различными исходами заболевания показало, что факторами риска развития неблагоприятного исхода заболевания являются: ПРО более 4-х см, прорастание опухоли стенки ПК, соответствующее pT4, наличие метастазов в регионарных ЛУ (N1a–2a), а также наличие степени злокачественности, соответствующей G2–G3.

Показатели, характеризующие уровни ИГХ маркеров у пациентов с различной выживаемостью представлены в таблице 1.

Таблица 1

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ИСХОДАМИ ЗАБОЛЕВАНИЯ: (M ± SD; ME [Q1;Q3])

Показатель	Группа (выживаемость)		p
	До 3-х лет	Более 3-х лет	
Ki67	34,17±17,39	15,70 [8,60;26,90]	<0,001
CycD1	7,80 [3,30;23,80]	6,80 [3,80;15,70]	0,905
p53	40,00±20,69	16,50±16,78	<0,001
bcl2	2,10±1,15	3,80 [2,00;6,80]	<0,001
CD3	51,80 [8,30;65,70]	73,05±35,96	<0,001
CD20	8,39±1,94	20,68±8,27	<0,001
IgA	26,91±10,85	43,69±22,36	<0,001
Cd34	20,3903,75	17,00 [10,90;18,70]	<0,001
ХГА	7,280±4,87	1,80 [1,30;3,50]	<0,001
CD68	153,89±26,83	176,497±63,816	0,063
S100	9,31±2,44	12,50 [11,20;14,60]	<0,001

Как видно из таблицы 1, у пациентов с выживаемостью менее 3-х лет экспрессия маркера пролиферации маркера Ki67 определялась в более чем 2 раза выше в сравнении с группой пациентов, прожившей более 3-х лет ($p < 0,001$). В то же время

экспрессия другого маркера пролиферации CycD1 не имела различий в группах сравнения. Экспрессия мутированного гена апоптоза p53 у пациентов с низкой выживаемостью была более чем в два раза выше в сравнении с пациентами с

относительно благоприятным исходом заболевания. Экспрессия еще одного маркера апоптоза bcl2 была прямо противоположной – статистически значимо выше у пациентов с выживаемостью более 3-х лет ($p < 0,001$).

Изучение маркеров локального иммунного ответа показало, что экспрессия CD3 и CD20 у пациентов с неблагоприятным исходом заболевания определялась на более высоких уровнях в сравнении с пациентами с хорошей выживаемостью ($p < 0,001$). Аналогичные изменения определялись для маркера IgA ($p < 0,001$). Изучение экспрессии для маркера дендритических клеток S100 показало, что его экспрессия находилась на более низком уровне у пациентов с прогрессией заболевания и проживших менее 3-х лет ($p < 0,001$). В то же время, такой показатель местного иммунного ответа, как маркер опухолюассоциированных макрофагов CD68 не имел статистически значимых различий в группе сравнения.

Медиана нейроэндокринного маркера ХГА у пациентов с относительно неблагоприятным исходом была статистически значима выше в сравнении с пациентами с относительно благоприятным исходом ($p < 0,001$).

Таким образом, сравнительный анализ экспрессии ИГХ маркеров у пациентов с различными исходами заболевания показал, что, за

исключением маркеров опухоль ассоциированных макрофагов CD68 и дендритных клеток и S100, остальные маркеры могут иметь прогностическое значение для определения исходов РПК.

На следующем этапе был проведен анализ взаимосвязи исходов заболевания и экспрессии ИГХ маркеров. Исследование показало отсутствие статистически значимых связей экспрессии CysD1 и CD68 ($r_s = 0,013$ и $r_s = 0,187$; $p > 0,05$) соответственно. Для всех остальных ИГХ маркеров коэффициенты корреляции были высокозначимыми (r_s от 0,345 до 0,714; $p < 0,001$). Указанный анализ позволил подтвердить данные, полученных на предыдущем этапе.

Оценку чувствительности и специфичности ИГХ маркеров для определения исхода заболевания проводили с использованием ROC-анализа. Данный метод позволяет объективно оценить диагностическую и прогностическую значимость тестирования, определить пороговые значения показателей, характеризующие различные исходы заболевания. Принято считать, что коэффициент площади под кривой, находящийся в интервале 0,9–1,0, следует рассматривать как показатель отличной информативности, 0,8–0,9 – очень хорошей, 0,7–0,8 – хорошей, 0,6–0,7 – слабой, 0,5–0,6 – неудовлетворительной [8]. Результаты анализа представлены в таблице 2.

Таблица 2

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕНИЯ ROC-АНАЛИЗА (Пороговое значение для пациентов с выживаемостью более 3-х лет)

Показатель	Пороговое значение	Чувствительность	Специфичность	Поле под ROC-кривой	95% доверительный интервал	p
Ki67pr	≤31,5	84,7	64,5	0,757	0,655 ÷ 0,841	0,0001
p53	≤31,6	89,8	74,2	0,815	0,719 ÷ 0,889	0,0001
bcl2	>3,6	52,5	96,8	0,753	0,651 ÷ 0,838	0,0001
CD3%	>66,3	62,7	83,9	0,794	0,696 ÷ 0,872	0,0001
CD20	>11,6	86,4	96,8	0,924	0,861 ÷ 0,975	0,0001
Cd34	≤19,4	91,5	61,3	0,814	0,718 ÷ 0,888	0,0001
ХГА	≤7,4	100,0	54,8	0,778	0,678 ÷ 0,859	0,0001
S100	>10,2	89,8	71,0	0,885	0,801 ÷ 0,943	0,0001
CysD1	≤22,7	88,1	29,0	0,492	0,385 ÷ 0,600	0,9018
CD68	>156,8	59,3	48,4	0,614	0,505 ÷ 0,715	0,061
IgA	>43,6	57,6	90,3	0,710	0,605 ÷ 0,801	0,0001

Как видно из таблицы 2, наиболее высокие показатели коэффициента площади поля под ROC-кривой определялись для CD20 (0,968%), bcl2 (0,924%), S100 (88,5%), p53 (0,815%). Следует отметить, что для CysD1 площадь под ROC-кривой составила 0,492%, для CD68 – 0,614% ($p = 0,9018$; $p = 0,061$ соответственно). Для других ИГХ маркеров, включая выше перечисленные, площадь

поля над ROC-кривой была несколько ниже (значимость составила $p < 0,001$).

При анализе показателей чувствительности и специфичности показано, что для всех ИГХ маркеров, за исключением CysD1 и CD68, результаты прогностической значимости были статистически значимы. При этом установлено, что максимальный показатель чувствительности

определялся для ХГА и составил 100,0 %, однако его специфичность составила 54,8%. Для экспрессии маркера p53 чувствительность составила 89,8% при специфичности – 74,2%. Наиболее высокие показатели чувствительности и специфичности имел маркер CD20 (чувствительность – 86,4%, специфичность – 96,8%) и маркер CD3 (чувствительность – 62,7%, специфичность – 83,9%).

Следует отметить, что для маркера IgA, не смотря на наличие статистической значимости ($p < 0,001$), показатель чувствительности (57,6%) являлся невысоким, при этом специфичность составила 90,3%. Аналогичные показатели чувствительности имел маркер bcl2 (чувствительность – 52,5%, специфичность – 96,8%).

Как было указано выше, для CysD1 статистическая значимость установлена не была, не смотря на высокую чувствительность (88,1%), но при этом отмечался крайне низкий показатель специфичности (29,0%). Прогностическое значение CD68 определялось на крайне низких показателях (чувствительность – 59,3%, специфичность – 48,4%).

Полученные результаты позволили в виду низкой чувствительности исключить из ИГХ панели кроме CysD1 и CD68 маркеры IgA и bcl2. Кроме вышеперечисленных показателей были определены пороговые значения показателей, позволяющие в послеоперационном периоде выделять пациентов с высоким риском прогрессирования РПК.

Выводы

Клинико-морфологическими факторами риска развития неблагоприятного исхода РПК являются: ПРО более 4-х см, проращение опухолью стенки ПК, соответствующее pT4, наличие метастазов в регионарных ЛУ (N1a–2a), а также наличие степени злокачественности, соответствующей G2–G3.

Факторами риска низкой выживаемости у пациентов с раком прямой кишки являются более высокая экспрессия Ki-67, p53, ХГА, CD34 ($p < 0,01$).

Высокие показатели CD3, CD20 и S100 ассоциируется с более высокой выживаемостью при раке прямой кишки ($p < 0,01$).

Определены оптимальные ИГХ маркеры и их пороговые значения, позволяющие с высокой точностью прогнозировать исход РПК.

Полученные результаты позволяют выделять группы риска среди пациентов с РПК, требующих более углубленного обследования и диспансерного наблюдения в послеоперационном периоде.

Литература

1. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2008-2017) // А.Е.Океанов, П.И. Моисеев, Л.Ф. Левин, А.А. Евмененко, под ред. Суконко О.Г. // Минск РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, 2018. – С.286.
2. Клинические рекомендации. Онкология // под ред. Чиссова В.И., Дарьяловой С.Л. – М.: ГЭОТАР, – Медиа, 2006. – С. 352–374.
3. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 / J. Ferlay [et al.] // Int. J. Cancer. – 2010. – Vol. 127. – P. 2893–2917.
4. Ачинович С.Л., Надыров Э.А. Оценка прогностической значимости клинико-морфологических и иммуногистохимических параметров у пациентов после радикального лечения рака прямой кишки I–III стадии // Проблемы патоморфологической диагностики современных инфекций и других заболеваний: сборник научных статей II съезда патологоанатомов Республики Беларусь, Гомель, 26-27 мая 2011 г. / РНПЦ радиационной медицины и экологии человека. – Гомель, 2011. – С.13-16.
5. Прогностические факторы рака прямой кишки II–III стадии после предоперационной лучевой терапии // С.Л. Ачинович., Э.А. Надыров, О.А. Голубев. – Проблемы здоровья и экологии. – 2007. – № 3 (13). – С.49–54.
6. TNM Classification of Malignant Tumours (7th Edition) / Ed. L.H. Sobin [et al.] // Wiley-Blackwell, New York. – 2009. – С. 336.
7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ Statistica // М.: МедиаСфера, 2002. – С. 512.
8. Fawcett T. An introduction to ROC analysis, Pattern Recognition Letters – 2006. – №27. – P.861–874.