

Г.А. Раскин¹, К.М. Пожарисский¹, Р.В. Орлова²

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРЕДСКАЗАТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ

¹ФГБУ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург²Санкт-Петербургский государственный университет

Проведено иммуногистохимическое исследование 15 различных параметров, имеющих отношение к развитию аденокарциномы толстой кишки и ее лечению. Показано, что совместное определение рецептора к хемокину CXCR4 и пролиферативной активности (Ki-67) позволяет определить прогноз развития заболевания с точки зрения безрецидивной выживаемости у больных II стадией после радикального хирургического лечения. Предиктивную значимость показали тимидилат синтаза (TS) и тимидин фосфорилаза (TP). Для косвенного определения микросателлитной нестабильности и первичного скрининга синдрома Линча может быть использовано иммуногистохимическое исследование генов репарации неспаренных нуклеотидов ДНК. Иммуногистохимическое исследование других маркеров, изученных в данной работе: ALDH1, CCR10, ERCC-1, DYPD, PTEN, топоизомеразы-II-альфа, III-класса-бета-тубулина для выбора тактики лечения больных аденокарциномой толстой кишки значения не имеет.

Ключевые слова: CXCR4, Ki-67, TS, TP, рак толстой кишки

В настоящее время известно, что существует несколько альтернативных механизмов канцерогенеза аденокарциномы толстой кишки. Во всех из них накапливается все больше данных о главной роли стволовых раковых клеток. Основная сложность при исследовании данной популяции клеток состоит в том, что она малочисленная и трудно идентифицируемая, а кроме того, вероятно, является нестабильной с возможным переходом в другие популяции клеток и обратно.

Известными прогностическими факторами выживаемости являются стадия заболевания, дифференцировка опухоли, инвазия сосудов, параканкрозное воспаление, микросателлитная нестабильность и др. [3]. В настоящее время накоплен достаточно большой опыт по определению пролиферативной активности при помощи иммуногистохимического исследования белка Ki-67 [6,7], экспрессии генов неспаренных нуклеотидов ДНК (MSH2, MSH6, MLH1, PMS2) [5]. Все больше ра-

бот направлено на выявление стволовых раковых клеток при помощи различных маркеров: CD133, CD24, LGR5, ALDH1 [3]. Однако до сих пор не сделаны выводы о влиянии этих маркеров и их сочетания на показатели выживаемости больных раком толстой кишки. Кроме того, в литературе нет работ, направленных на изучение специфических факторов, определяющих потенциал метастазирования при аденокарциноме толстой кишки, в то время как в других локализациях уже показано значение рецепторов к хемокинам (в частности, к CXCR4).

Многие факторы, которые возможно исследовать иммуногистохимическим способом, рассматривают не только с точки зрения прогностического значения, но и предиктивного (как факторы, предсказывающие эффективность противоопухолевого лечения). К таким маркерам относят: тимидилат синтазу (TS), тимидин фосфорилазу, дигидропиримидин дегидрогеназу (DYPD), ERCC-1, III-класс-бета-тубулина, топоизомеразу-II-альфа, Ki-67. Какие из этих маркеров или их сочетание могут определять эффективность предстоящей стандартной химиотерапии (FOLFOX, FOLFIRI, де Грамонт), остается неясным.

Таким образом, определение предиктивного и прогностического значения имеющихся факторов, их сочетания, а также поиск новых маркеров является актуальной проблемой.

Материал и методика

В соответствии с дизайном исследования, на основании анализа архивной медицинской документации и данных текущего наблюдения за пациентами, находящихся на стационарном обследовании, были отобраны 776 больных аденокарциномой толстой кишки I-IV стадий со средним возрастом 57,6 лет. Из них 105 случаев рака прямой кишки (исследовалась только микросателлитная нестабильность) и 671 больной раком ободочной кишки (изучались все параметры). Для исследования прогностических факторов ретроспективно был отобран архивный материал от операций 38 пациентов I стадии, 205 больных II стадией, 120 случаев III стадии, 273 пациентов IV стадии. На материале данных пациентов при помощи иммуногистохимического исследования изучались рецепторы к хемокинам (CCR10, CXCR4), маркер стволовых клеток (ALDH-1), пролиферативная активность (Ki-67), гены репарации неспаренных нуклеотидов ДНК (MSH6, MSH2, MLH1, PMS2), при помощи ПЦР была изучена микросателлитная нестабильность.

У пациентов со II стадией был прослежен 5-летний период и оценивалась безрецидивная выживаемость в зависимости от изученных прогностических факторов. У больных с IV стадией исследовались как прогностические, так и предиктивные факторы. Последние включали Ki-67, топоизомеразу-II-альфа, III-класса-бета-тубулина, TS, TP, DYPD, PTEN, ERCC1. Исследовалась частота объективного ответа, время до прогрессирования у 104 пациентов с IV стадией аденокарциномы ободочной кишки, получавших 5-фтор-пиримидин содержащую химиотерапию. Полученные показатели сопоставлялись с результатами иммуногистохимического исследования предиктивных маркеров. Кроме того, экспрессия всех изученных маркеров сопоставлялась у больных II и IV стадий с целью оценки прогностического их значения с точки зрения распространенности рака ободочной кишки. У пациентов I и III стадий исследовалась степень выраженности исследованных маркеров без анализа параметров выживаемости. Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась при помощи метода множественной регрессии и хи-квадрат.

Результаты исследования

Для идентификации стволовых клеток мы выбрали альдегиддегидрогеназу 1 (ALDH1), потому что выработка этого фермента является одним из основных свойств стволовой клетки. Для формирования опухоли в экспериментальных условиях требуется минимальное количество ALDH-1 позитивных клеток, относительно всех изученных маркеров [4].

При оценке экспрессии ALDH1 в аденокарциноме толстой кишки была выявлена широкая вариабельность частоты позитивных раковых клеток (от 1% до 80%) с парадоксальным субтотальным окрашиванием некоторых раковых комплексов, интенсивность окраски также варьировала. Кроме того, количество позитивных на ALDH1 клеток было неравномерным в пределах одной опухоли. Так, в некоторых раковых железах процент позитивных клеток мог достигать 50% и более, в то время как в рядом лежащих комплексах выявлялись единичные позитивные клетки.

Для изучения пролиферации стволовых клеток была использована методика двойного иммуногистохимического окрашивания. Вначале была оценена экспрессия в нормальной слизистой оболочке толстой кишки. Было выявлено значительное отличие в пролиферативной активности ALDH1- позитивных и негативных клеток ($p < 0,001$). Нормальные стволовые тканеккоммитированные клетки практически не пролиферировали. При исследовании с использованием аналогичной методики раковых комплексов, все 20 случаев показали значительное различие в пролиферации стволовых раковых клеток (0,1-10%) и общей клеточной популяции (30-90%, $p < 0,001$). В среднем, пролиферация стволовых раковых клеток не превышала 10% всей популяции пролиферирующих клеток [1].

В нашем исследовании мы изучили экспрессию двух основных рецепторов к хемокинам: CCR10 и CXCR4. Экспрессия CXCR4 была выявлена в 77% случаев рака толстой кишки с широкой вариабельностью частоты позитивных клеток (от 10% до 90%). Экспрессия CCR10 не была выявлена ни в одном случае аденокарциномы толстой кишки. В слизистой оболочке толстой кишки коричневое окрашивание CXCR4 (хромоген-диаминобензидин) выявлялось в виде 1-5 гранул, расположенных над нуклеолеммой, обращенной в сторону просвета кишки. Причем, наиболее выраженная экспрессия отмечалась в средних отделах и ослабевала к поверхностной и глубокой частям крипт.

Таким образом, исходя из полученных данных, клеточный состав аденокарциномы толстой кишки условно можно подразделить на 4 популяции: 1) стволовые не-пролиферирующие (ALDH1+, Ki-67-), 2) стволовые пролиферирующие (ALDH1+, Ki-67+), 3) амплифицирующиеся (ALDH1-; Ki-67+), 4) дифференцирующиеся (ALDH1-; Ki-67-). Соотношение данных популяций в аденокарциноме толстой кишки в среднем составляет 9:1:60:30. Преобладающей популяцией являются амплифицирующиеся клетки (медиана 60%), а наименьшей — пролиферирующие стволовые раковые (медиана 1%). Кроме того, мы определили, что часть клеток аденокарциномы толстой кишки имеет экспрессию рецептора хемокина CXCR4, который в литературе при изучении других локализаций показывал связь с развитием метастазов.

Для изучения связи пролиферативной активности аденокарциномы толстой кишки со стадией опухоли мы проанализировали уровень пролиферации, измеренный по индексу Ki-67, в случаях диссеминированной (IV стадии) и локализованной (I-II стадиях) формах аденокарциномы толстой кишки. Для этого мы выделили 4 интервала: Ki-67<30%, 30-50%, 50-70%, >70%.

Для статистической оценки связи пролиферативной активности опухоли с ее распространенностью мы взяли крайние интервалы пролиферативной активности. Как видно из табл. 1, имеется значительное отличие процента случаев с относительно-низким ($\leq 30\%$) и высоким ($> 70\%$) уровнями пролиферации опухоли группы с локализованным раком (I-II стадии). В случаях же диссеминированного рака это отличие было мало выраженным. Таким образом, выявлена статистически значимая обратная корреляция между индексом Ki-67 и распространенностью аденокарциномы толстой кишки ($p = 0,0019$).

При оценке связи пролиферативной активности опухоли с безрецидивной выживаемостью пациентов II стадии после радикального хирургического лечения с последующим выявленным

Таблица 1. Сравнение крайних интервалов пролиферативной активности опухоли при IV и I-II стадиях аденокарциномы толстой кишки (n=104)

Индекс Ki-67	Всего случаев	IV стадия	I-II стадии	Хи-квадрат=10,6883 p= 0,0019
Ki-67≤30%	32	30 (41%)	2 (6%)	
Ki-67>70%	72	43 (59%)	29 (94%)	
Всего случаев	104	73	31	

Таблица 2. Значение CXCR4 при II стадии аденокарциномы толстой кишки в зависимости от развития прогрессирования заболевания в течение 5 лет

Рецептор к хемокину 4	Всего случаев	II стадия без прогрессирования	II стадия, прогрессирование	Хи-квадрат=5,5 p= 0,02
CXCR4 позитив	41	13 (32%)	28 (68%)	
CXCR4 негатив	12	9 (75%)	3 (25%)	
Всего случаев	53	22	31	

прогрессированием заболевания медиана безрецидивной выживаемости с низким индексом Ki-67 (<30%) составила 7±0,35 мес. в сравнении с 11±0,55 мес. при высоком индексе Ki-67 (>70%), однако это различие статистически было недостоверным (p>0,05).

В группе пациентов с диссеминированной формой аденокарциномы (IV стадия) в 28 случаях из 31 (90%) была позитивная реакция на CXCR4. Ее уровень варьировал от 10% до 90%. В аденокарциномах толстой кишки II стадии также преобладала позитивная реакция на CXCR4, но число случаев без экспрессии рецептора к хемокину было значительно выше в сравнении с первой группой (41% и 10% соответственно). Таким образом, негативная реакция на CXCR4 статистически значимо коррелирует с локализованной формой аденокарциномы толстой кишки (p=0,0196).

При изучении экспрессии CXCR4 при II стадии аденокарциномы толстой кишки после радикального хирургического лечения в зависимости от развития прогрессирования заболевания в течение 5 лет оказалось, что в 68% случаев с позитивной реакцией на CXCR4 заболевание прогрессирует, а у 75% пациентов с негативным статусом CXCR4 наблюдается 5-летний безрецидивный период (p=0,02, табл. 2). При оценке влияния экспрессии CXCR4 в группе со II стадией, где произошло прогрессирование заболевания, оказалось, что медиана выживаемости у больных с высоким CXCR4 (>70%) составляет 8±0,4 мес. против 11±0,55 при низком CXCR4 (<30%).

В наших исследованиях мы не выявили корреляции между экспрессией ALDH1 и распространенностью рака толстой кишки, а также с безрецидивной выживаемостью больных со II

стадией. Вероятно, простое увеличение стволовых раковых клеток в аденокарциноме толстой кишки еще не приводит к усилению метастатической активности опухоли, а для этого должен произойти ряд дополнительных событий, таких как увеличение экспрессии рецепторов хемокинов и др.

Все это заставило нас оценить совокупное влияние экспрессии хемокиновых рецепторов и пролиферативной активности опухоли на безрецидивную выживаемость больных аденокарциномой толстой кишки II стадии после радикального хирургического лечения, у которых наблюдалось прогрессирование заболевания. В целом, повышение экспрессии CXCR4 сопровождалось снижением пролиферативной активности. Несмотря на то, что обратная корреляция между CXCR4 и Ki-67 была статистически недостоверной (p=0,06), в нашем исследовании не было наблюдений с синхронно высокими или низкими CXCR4 и Ki-67 (табл. 3).

Как видно из табл. 3, синхронное снижение экспрессии CXCR4 и увеличение Ki-67 приводит к увеличению безрецидивной выживаемости больных аденокарциномой толстой кишки II стадии после радикального хирургического лечения. Медиана безрецидивной выживаемости с высоким CXCR4 (>70%) и низким Ki-67 (<30%) составила 16,5 мес, а с низким CXCR4 (<30%) и высоким Ki-67 (>70%) 7 мес. При оценке влияния совокупности факторов с использованием метода множественной регрессии, снижение экспрессии CXCR4 вместе с увеличением Ki-67 статистически значимо улучшало безрецидивную выживаемость (p<0,05). Таких закономерностей не было выявлено при изучении маркера стволовых клеток — ALDH1.

Таблица 3. Влияние CXCR4 и Ki-67 на безрецидивную выживаемость больных аденокарциномой толстой кишки со II стадией после радикального хирургического лечения с прогрессированием заболевания в течение 5 лет (n=31)

Значение маркеров	Безрецидивная выживаемость (месяцев)
Высокий CXCR4 (>70%), низкий Ki-67 (<30%)	7±0,35
Средние CXCR4 и Ki-67 (30-70%)	9±0,45
Низкий CXCR4 (<30%), высокий Ki-67 (>70%)	16,5±0,8

Во второй части исследования мы оценили частоту объективного ответа и время до прогрессирования при стандартной химиотерапии (FOLFOX, FOLFRI, де Грамонт) у больных диссеминированным раком толстой кишки с учетом значения экспрессии маркеров (TS, TP, DYPD, ERCC-1, III-класс-бета-тубулина, топоизомеразы-II-альфа, Ki-67). Для этого было проведено исследование 104 больных с IV стадией рака ободочной кишки.

При исследовании влияния экспрессии анализируемых маркеров на время до прогрессирования заболевания была выявлена связь показателей при анализе TS ($p=0,0036$) и TP ($p=0,0058$) (табл. 4).

Таблица 4. Регрессионная модель Кокса. Влияние экспрессии маркеров на время до прогрессирования

n=104	t	p-level
Модель в целом	-2,18811	0,037
ERCC-1	0,69261	0,49
TP	2,98683	0,0058
TS	3,17173	0,0036
DYPD	0,77468	0,3503
III-класс-бета-тубулина	0,76468	0,4509
Ki-67	2,04661	0,0502
Топоизомераза-II-а	-0,77134	0,447

Как видно из табл. 4, уровень пролиферации оказывает влияние на время до прогрессирования, близкое к статистически достоверному ($p=0,0502$), однако данное воздействие не связано с эффективностью химиотерапии, так как при анализе пролиферации и прогрессирования заболевания в течение химиотерапии $p=0,1048$. Более того, при дальнейшем анализе оказалось, что влияние на время до прогрессирования заболевания обратно ожидаемому, то есть высокий уровень пролиферации сопровождался длинным периодом стабилизации процесса (медиана времени до прогрессирования 11,5 месяцев), а низ-

кий — быстрым прогрессированием опухоли (медиана 7 месяцев). При оценке влияния экспрессии маркеров на частоту объективного ответа (полный и частичный регресс), результаты были схожи между собой. Частота объективного ответа при наличии экспрессии TP и отсутствии TS составила 39%, при обратном сочетании (экспрессия TS и отсутствие TP) — 13%, ($p=0,04$).

Таким образом, иммуногистохимическое исследование TS, TP может быть использовано в оценке эффективности химиотерапии пациентов с аденокарциномой толстой кишки, получающих 5-фторпиримидин содержащие препараты.

Обсуждение

В работе патологоанатомических лабораторий часто приходится сталкиваться с вопросами лечащих врачей о необходимости назначения дополнительного лечения больным аденокарциномой толстой кишки. В нашей практике, к сожалению, часто бывает операционный материал, неадекватно вырезанный, по которому невозможно выставить стадию pTNM. Одной из причин этого является недостаточное количество забранных на исследование лимфоузлов, второй — отсутствие возможности оценки степени инвазии рака. Но даже в случае, когда все необходимые условия для стадирования аденокарциномы толстой кишки выполнены, II стадия остается камнем преткновения у врачей-онкологов. В нашем исследовании мы выделили две противоположные по прогнозу группы пациентов. Так, больным со II стадией аденокарциномы толстой кишки с высоким индексом Ki-67 и низкой экспрессией CXCR4, вероятно, не следует назначать адъювантную химиотерапию, так как в 75% случаев после радикального хирургического лечения безрецидивный период у них превысит 5 лет. В то же время, у пациентов с низким индексом Ki-67 и высокой экспрессией CXCR4 наблюдается низкая безрецидивная выживаемость и им, вероятно, требуется адъювантное лечение (рис. 1). В качестве дополнительного прогностического фактора у данной группы пациентов можно использовать иммуногистохимическое исследование MSH2, MSH6, PMS2, MLH1 для косвенного определения микросателлитной нестабильности [2].

В случае необходимости проведения адъювантной химиотерапии (диссеминированная форма аденокарциномы) для выбора решения об использовании 5-фторпиримидинов может быть выполнено иммуногистохимическое исследование тимидилат синтазы (TS) и тимидин фосфорилоразы (TP). При условии низкой экспрессии TS и высокой TP можно предполагать лучший эф-

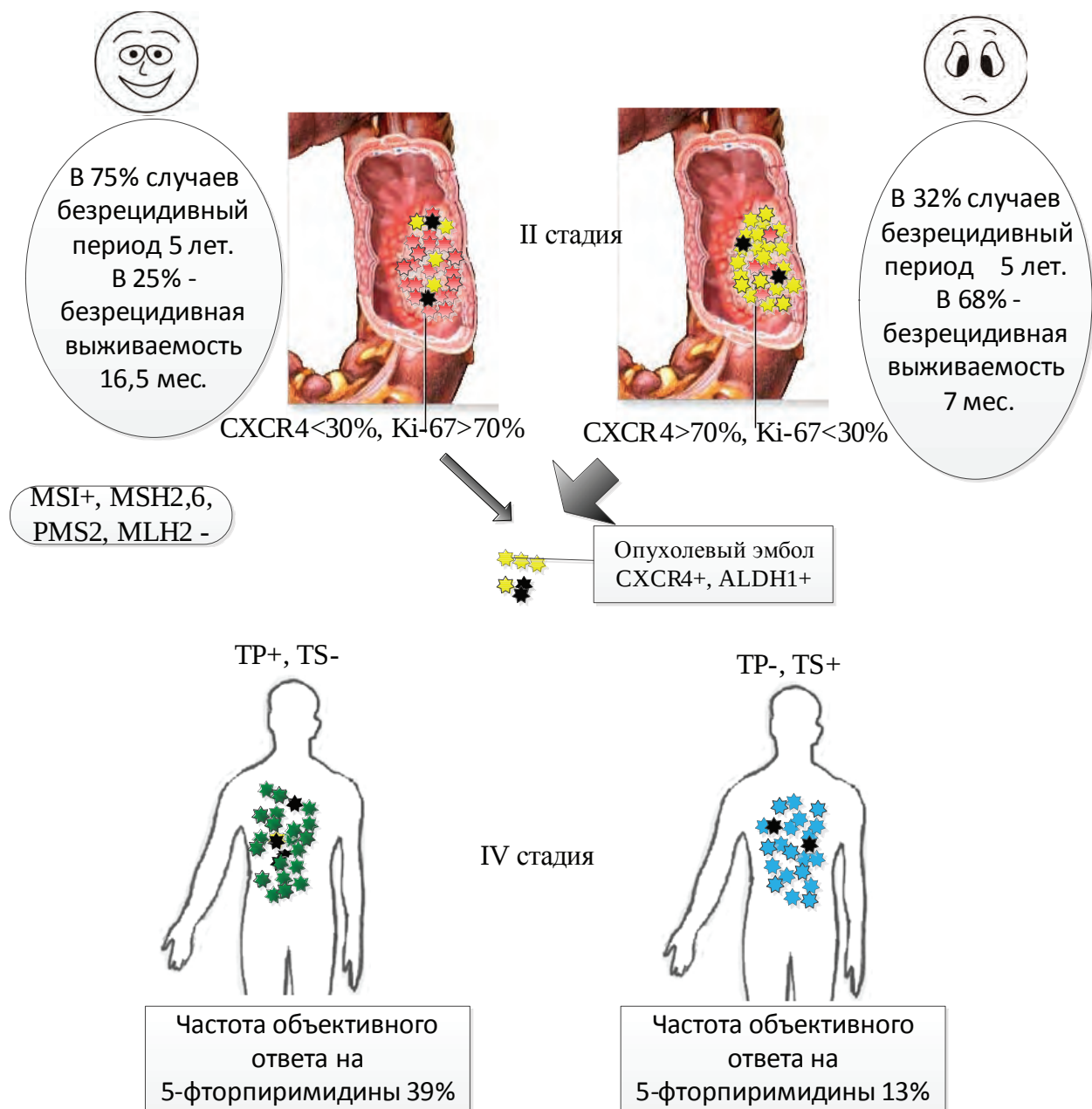


Рис. 1. Схема результатов исследования аденокарциномы толстой кишки. Звездочками изображены опухолевые клетки: красные — экспрессия Ki-67, желтые — CXCR4, черные — ALDH1, зеленые — TP, синие — TS.

фekt от лечения данной группой химиопрепаратов (рис. 1).

Иммуногистохимическое исследование других маркеров, изученных в данной работе: ALDH1, CCR10, ERCC-1, DYPD, PTEN, топоизомеразы-II-альфа, III-класса-бета-тубулина для выбора тактики лечения больных аденокарциномой толстой кишки значения не имеет.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Раскин Г.А., Орлова Р.В., Петров С.В. и др. Пролiferация стволовых раковых клеток аденокарциномы толстой кишки // Вопр. онкол. — 2014. — Т. 60. — № 1. — С. 47-51.

2. Раскин Г.А., Янус Г.А., Пожарисский К.М. и др. Иммуногистохимическое исследование MSH2, PMS2, MLH1, MSH6 в сопоставлении с анализом микросателлитной нестабильности в аденокарциноме толстой кишки // Вопр. онкол. — 2014. — Т. 60. — № 2. — С. 47-50.

3. Bosman F.T., Carneiro F., Hruban R.H., Theise N.D. WHO classification of tumors the digestive system. IARC: Lyon 2010. — 417 p.

4. Ginestier C., Hur M.H., Charafe-Jauffret E. et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome // Cell Stem Cell — 2007. — Vol. 1. — P. 555-567.

5. Lindor N.M., Burgart L.J., Leontovich O. et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors // J. Clin. Oncol.—2002.—Vol. 20.—P. 1043–1048.
6. Saiwaki T., Kotera I., Sasaki M. et al. In vivo dynamics and kinetics of pKi-67: transition from a mobile to an immobile form at the onset of anaphase // Exp Cell Res.—2005.—Vol. 308.—P. 123–134.
7. Starborg M., Gell K., Brundell E., Hoog C. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression // J. Cell Sci.—1996.—Vol. 109.—P. 143–153.

Поступила в редакцию 08.09.2014 г.

G.A. Raskin¹, K.M. Pozharisski¹, R.V. Orlova²

Morphological evaluation of predictive factors in adenocarcinoma of the colon

¹Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies

²State University, St. Petersburg

Immunohistochemical investigation of 15 different markers in colon adenocarcinoma was carried out. Prognostic significance showed chemokine receptor CXCR4 and Ki-67. Predictive significance was revealed for thymidylate synthase (TS) and thymidine phosphorylase (TP).

Key words: CXCR4, Ki-67, TS, TP, colon cancer