

Корреляционные связи между клинικοоморфологическими параметрами при раке прямой кишки

У «Гомельский областной клинический онкологический диспансер»

Были изучены корреляционные связи между клинικο-морфологическими и иммуногистохимическими параметрами при раке прямой кишки после предоперационной лучевой терапии и радикальной операции и в группе пациентов после радикальных операций по поводу рака прямой кишки без предоперационной лучевой терапии. В подгруппе с выживаемостью менее 3-х лет после предоперационной лучевой терапии и радикальной операции в тканях рака прямой кишки повышение уровня пролиферативной активности (Ki-67) прямо коррелировало с повышением гистологической степени злокачественности – Grade, а повышение уровня экспрессии циклина D1 с наличием метастазов в регионарных лимфоузлах–N. В подгруппе пациентов с выживаемостью менее 3-х лет, которым была проведена только радикальная операция, повышение уровня экспрессии циклина D1 прямо коррелировало с более глубокой опухолевой инвазией стенки кишки – T, а повышение плотности сосудов микроциркуляторного русла, определяемое по экспрессии CD34 в тканях рака прямой кишки прямо коррелировало с наличием метастазов в регионарных лимфоузлах–N.

Ключевые слова: рак прямой кишки, прогностические параметры, корреляционные связи.

Введение

Рак прямой кишки (РПК) занимает важное место в структуре онкологической заболеваемости. При этом наиболее значительные показатели заболеваемости РПК отмечаются в США, Канаде, странах Западной Европы и в России с частотой 20–37 случаев заболевания на 100000 человек в год [1]. По данным канцер-регистра в Республике Беларусь с 1990 по 2006 годы, заболеваемость раком прямой кишки (РПК) увеличилась в 1,4 раза (с 13,0 до 17,9 на 100 000 населения). Заболеваемость РПК населения в Беларуси в 2007 г. составила 19,1 на 100000 населения [2].

В настоящее время в онкологии большое внимание уделяется изучению перспектив использования молекулярно-генетических маркеров и поиску критериев прогноза клинического течения РПК, а также характеру корреляционных связей между прогностическими маркерами. В некоторых исследованиях подчеркивается значимость одновременного исследования значений Ki-67, p53. У пациентов с одновременной гиперэкспрессией Ki-67, p53 общая продолжительность жизни была меньше по сравнению с пациентами контрольной группы, но для уточнения значимости корреляционных связей с другими прогностическими факторами необходимы дальнейшие исследования [3]. По литературным данным,

повышенное количество CD3+, CD20+, CD68+, S100+ клеток в ткани РПК связаны с хорошим прогнозом [4]. В некоторых работах показана прямая связь между экспрессией bcl-2 и нейроэндокринной дифференцировкой опухоли [5]. Однако до настоящего времени такие исследования часто носят несистематизированный и противоречивый характер.

Целью нашего исследования явилось изучение корреляционных связей между клинико-морфологическими и иммуногистохимическими параметрами при РПК.

Материалы и методы.

Использовался операционный материал 104 случаев РПК 1-3-й стадии после радикального лечения в ГОКОД с 1996 по 2001 годы. Гистологическая верификация проводилась согласно гистологической классификации ВОЗ. В целях рандомизации в исследование были включены только опухоли, имеющие гистологическое строение аденокарциномы (grade 1-3). Все пациенты находились в возрастном интервале от 40 до 70 лет. Соотношение между мужчинами и женщинами составило М: Ж = 1,3: 1. В группе из 44 пациентов с предоперационной лучевой терапией была выделена подгруппа из 14 пациентов с выживаемостью до 3-х лет и подгруппа из 30 пациентов с выживаемостью более 3-х лет. В группе из 60 пациентов, подвергавшихся радикальной операции без предоперационной лучевой терапии была выделена подгруппа из 16 пациентов с выживаемостью до 3-х лет и подгруппа из 44 пациентов с выживаемостью более 3-х лет. Вырезка кусочков проводилась в день операции. В дальнейшем все кусочки тканей фиксировали в 10% нейтральном формалине и подвергали стандартной проводке с заливкой в парафин. Из данных блоков готовили срезы толщиной 4-5 мкм, окрашивали гематоксилин-эозином и использовали для обзорной микроскопии. Для детализации структур стромы и паренхимы срезы выборочно окрашивали пикрофуксином по ван Гизону, проводилась ШИК- реакция и серебрение по Футу. Для иммуногистохимической характеристики тканей были выбраны следующие маркеры: p53, Ki-67, Cyclin D1, bcl2, Chromogranin A, CD34, CD20, CD68, CD3, S100. Использовались мышинные моноклональные антитела соответственно клоны DO-7, MIB 1, циклин, 124, DAK –A3, QBEnd 10, L26, PG-M1, и поликлональные кроличьи антитела CD3, S100 корпорации «DAKO Citomation». В качестве визуализирующей системы использовали набор LSAB-2 корпорации «DAKO Citomation». Статистический анализ полученных данных проводили с использованием лицензионной программы Statistica 6,0 (Stat Soft, GS-35F-5899H). Взаимосвязь между показателями определялась при помощи непараметрического коэффициента ранговой корреляции τ (Kendall Tau Correlations). За уровень статистической значимости принимался $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Характер корреляций между клинико-морфологическими и иммуногистохимическими показателями в подгруппе пациентов после предоперационной лучевой терапии и последующего хирургического

лечения представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характер корреляционных связей в подгруппе пациентов после предоперационной лучевой терапии с использованием критерия Кендала (τ) (Kendall Tau Correlations)

Показатель	Выживаемость до 3-х лет		Выживаемость более 3-х лет	
	τ	p-level	τ	p-level
CD20 vs T	-0,742	< 0,001	-0,349	0,170
ChromograninA vs bcl2	0,469	0,019	0,231	0,373
Cyclin D1 vs N	0,700	<0,001	0,103	0,695
Ki-67 vs G	0,514	0,010	0,021	0,953
S100 vs T	-0,109	0,588	-0,550	0,022
CD34 vs N	0,061	0,762	0,517	0,034
Cyclin D1 vs CD68	-0,310	0,123	- 0,500	0,041
CD3 vs bcl- 2	0,303	0,131	-0,106	0,687
p53 vs Ki-67	0,165	0,412	0,097	0,661
Cyclin D1 vs T	0,122	0,542	-0,166	0,525

* уровень значимости $p < 0,05$ (достоверность $p \geq 0,95$)

В подгруппе пациентов после предоперационной лучевой терапии и последующего хирургического лечения и выживаемостью менее 3-х лет, определялись три корреляционные связи прямого характера и одна корреляционная связь отрицательного характера. Экспрессия CD20 в лимфоцитах, инфильтрирующих ткань РПК отражает степень напряженности В-клеточного звена местного иммунитета. Корреляционная связь отрицательного характера определялась между экспрессией CD20 и степенью прорастания опухоли стенки кишки –Т ($\tau = -0,742$; $p < 0,001$). Экспрессия Ki-67 в ядрах клеток РПК отражает уровень пролиферативной активности неопластических структур. Нами была выявлена прямая корреляционная связь между экспрессией Ki-67 и степенью злокачественности РПК– G ($\tau = 0,514$; $p = 0,010$). Повышенный уровень циклина D1 в цитоплазме может свидетельствовать как об интенсивном его синтезе, связанном с воздействием ростовых факторов, так и о нарушении его транспорта в ядро. Применительно к опухолевой клетке первый вариант свидетельствует о более высокой злокачественности, второй – о сохраненной функции антионкогенов, продукты которых препятствуют попаданию циклина D1 в ядро, что приводит к остановке клеточного цикла в фазе G1. В нашем исследовании повышенный уровень экспрессии циклина D1 в ткани РПК прямо коррелировал с наличием метастазов в регионарных лимфоузлах –N ($\tau = 0,700$; $p < 0,001$). Известно, что повышенное количество нейроэндокринных клеток в ткани РПК, экспрессирующих хромогранин А, способствует неблагоприятному исходу заболевания. Белок bcl-2 способен предупреждать апоптоз, вызываемый гамма-излучением, цитостатиками, свободными радикалами. В некоторых работах показана прямая связь между экспрессией bcl-2 и нейроэндокринной дифференцировкой опухоли [5]. По данным ряда авторов отмечается увеличение количества нейроэндокринных клеток в тканях РПК под влияние лучевой терапии и химиотерапии [6]. В нашем исследовании в тканях РПК после лучевой терапии была выявлена

корреляционная связь прямого характера между экспрессией bcl-2 и Chromogranin A ($\tau = 0,469$; $p = 0,019$), что совпадает с данными литературы.

У пациентов после проведения курсов предоперационной лучевой терапии и выживаемостью более 3-х лет, определялись две корреляционные связи прямого характера и одна корреляционная связь отрицательного характера. S100-протеины представляют собой кальций-связывающие протеины, которые участвуют в регуляции клеточного роста, дифференцировки и являются маркером интердигитирующих ретикулярных клеток и дендритных клеток. Дендритные клетки (ДК) – семейство антигенпрезентирующих клеток, которые присутствуют в следовых количествах во всех органах, в том числе и в слизистой кишечника. К ним относятся популяции отростчатых прилипающих клеток, обладающих высокой антигенперерабатывающей способностью, сохраняющих и презентующих антиген. В нашем исследовании была выявлена отрицательная корреляционная связь между экспрессией S100 и степенью прорастания опухоли стенки кишки–Т ($\tau = -0,550$; $p = 0,022$). Изучение корреляционных зависимостей, связанных с регионарным метастазированием (N), выявило одну взаимосвязь прямого характера с CD34 ($\tau = 0,517$; $p = 0,034$). В нашем исследовании была также выявлена отрицательная корреляционная зависимость между экспрессией Cyclin D1 и количеством опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ) в ткани РПК, определяемых по экспрессии CD68 ($\tau = -0,500$; $p = 0,041$).

Характер корреляций между клинико-морфологическими и иммуногистохимическими показателями в подгруппе пациентов после хирургического лечения без предоперационной лучевой терапии представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Характер корреляционных связей в подгруппе пациентов после хирургического лечения без предоперационной лучевой терапии с использованием критерия Кендала(τ) (Kendall Tau Correlations)

Показатель	Выживаемость до 3-х лет		Выживаемость более 3-х лет	
	τ	p-level	τ	p-level
CD20 vs T	0,084	0,648	0,038	0,717
ChromograninA vs bcl2	0,094	0,613	0,014	0,892
Cyclin D1 vs N	0,297	0,109	0,224	0,032
Ki-67 vs G	-0,172	0,353	0,066	0,525
S100 vs T	0,053	0,776	-0,027	0,793
CD34 vs N	0,454	0,014	-0,029	0,784
Cyclin D1 vs CD68	0,367	0,048	0,015	0,886
CD3 vs bcl- 2	0,019	0,521	0,214	0,040
p53 vs Ki-67	-0,092	0,619	-0,166	-0,113
Cyclin D1 vs T	0,419	0,023	-0,245	0,190

* уровень значимости $p < 0,05$ (достоверность $p \geq 0,95$)

В подгруппе пациентов после радикального хирургического лечения без предшествующей лучевой терапии и выживаемостью менее 3-х лет определялись две корреляционные связи прямого характера. При этом повышение уровня экспрессии циклина D1 в ткани РПК прямо

коррелировало с более глубоким прорастанием стенки прямой кишки–Т ($\tau = 0,419$; $p = 0,023$). Известно, что экспрессия CD34 отражает степень васкуляризации опухоли и повышенная плотность сосудов микроциркуляторного русла характерна для опухолей с неблагоприятным прогнозом. В нашем исследовании была выявлена прямая корреляционная связь между регионарным метастазированием (N) и экспрессией CD34 ($\tau = 0,454$; $p = 0,014$). Нами выявлена также позитивная корреляционная связь между экспрессией циклина D1 в тканях РПК и повышением количества ОАМ, определяемых по экспрессии CD68 ($\tau = 0,367$; $p = 0,048$).

В подгруппе пациентов после радикального хирургического лечения без предшествующей лучевой терапии и выживаемостью более 3-х лет определялось две корреляционных связи прямого характера. Характерным антигеном Т-лимфоцитов является CD3. В нашем исследовании была выявлена позитивная корреляционная связь между повышенным количеством Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD3 и уровнем экспрессии bcl-2 в ткани РПК ($\tau = 0,214$; $p = 0,04$), а также между экспрессией циклина D1 в тканях РПК и наличием метастазов в регионарных лимфоузлах (N) ($\tau = 0,224$; $p = 0,032$).

Выводы

1. В подгруппе с плохой выживаемостью (менее 3-х лет) после предоперационной лучевой терапии и радикальной операции в тканях РПК повышение уровня пролиферативной активности (Ki-67) прямо коррелировало с повышением гистологической степени злокачественности – Grade ($\tau = 0,514$; $p = 0,01$), а повышение уровня экспрессии циклина D1 с наличием метастазов в регионарных лимфоузлах –N ($\tau = 0,700$; $p < 0,001$).

2. В подгруппе пациентов с плохой выживаемостью, которым была проведена только радикальная операция, повышение уровня экспрессии циклина D1 прямо коррелировало с более глубокой опухолевой инвазией стенки кишки –Т ($\tau = 0,419$; $p = 0,023$), а повышение плотности сосудов микроциркуляторного русла, определяемое по экспрессии CD34 в тканях РПК прямо коррелировало с наличием метастазов в регионарных лимфоузлах–N ($\tau = 0,454$; $p = 0,014$).

Литература

1. Напалков, Н. П. Демографический процесс и злокачественные новообразования / Н. П. Напалков // III съезд онкологов и радиологов СНГ: материалы съезда, Минск, 25–28 мая 2004 г.: в 2 ч. Минск, 2004. Ч. 1. С. 15–30.
2. Курбыко, Т. И. Эпидемиологический анализ заболеваемости населения Республики Беларусь злокачественными новообразованиями прямой и ободочной кишки / Т. И. Курбыко, Н. Е. Порада // Сахаровские чтения 2008 года: экологические проблемы XXI века: материалы 8-й Междунар. науч. конф., 22–23 мая 2008 г., г. Минск, Республика Беларусь / под ред. С. П. Кундаса, С. Б. Мельнова, С. С. Позняка. Минск: МГЭУ им А.Д. Сахарова, 2008. С. 70–7.
3. Expression of p53 in Colorectal Carcinoma: Correlation with Clinicopathologic Features / M. R. Ghavam – Nasiri [et al.] // Arch. Iran. Med. 2007. V. 10, № 1. P. 38–42.
4. Колоректальный рак: факторы прогноза в онкологии / П. Херманек [и др.]; под ред. В. Е. Кратенка. Минск, 1999. С. 79–99.
5. Bcl-2 expression and its correlation with neuroendocrine differentiation in colon carcinomas / P. Atasov [et al.] // Tumori. 2004. Vol. 90. P. 233–238.
6. Increased endocrine cells in treated rectal adenocarcinomas: a possible reflection of endocrine differentiation in tumor cells induced by chemotherapy and radiotherapy / J. Shia [et al.] // Am.J.Surg.Pathol. 2002. V. 26, № 7. P. 863–72.