

7. Kumagai R., Kaseda Y., Kawakami H. et al. Electrophysiological studies in spinocerebellar ataxia type 6: a statistical approach // Neuroreport. — 2000. — Vol. 11(5). — P. 969—972.
8. Kremlacek J., Valis M., Masopust J. et al. An electrophysiological study of visual processing in spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) // Cerebellum. — 2011. — Vol. 10(1). — P.32—42.
9. Manganelli F., Perretti A., Nolano M. et al. Electrophysiologic characterization in spinocerebellar ataxia 17 // Neurology. — 2006. — Vol.66(6). — P. 932—934.
10. Perretti A., Santoro L., Lanzillo B. et al. Autosomal dominant cerebellar ataxia type 1: multimodal electrophysiological study and comparison between SCA1 and SCA2 patients // J Neurol Sci. — 1996. — Vol. 142(1—2). — P. 45—53.
11. Schols L., Riess O., Schols S. et al. Spinocerebellar ataxia type 1: clinical and neurophysiological characteristics in German kindreds // Acta Neurol Scand. — 1995. — Vol. 92(6). — P. 478—485.
12. Schols L., Linnemann C., Globas C. Electrophysiology in spinocerebellar ataxias: spread of disease and characteristic findings // Cerebellum. — 2008. — Vol. 7 (2). — P. 198—203.
13. Sullivan R., Yau W.Y., O'Connor E. et al. Spinocerebellar ataxia: an update // J Neurol. — 2018. — DOI 10.1007/s00415-018-9076-4.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА КЛИНИЧЕСКИХ ИСХОДОВ РАКА ПРЯМОЙ КИШКИ

Надыров Эльдар Аркадьевич

*канд. мед наук, доц. кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии
доц. кафедры патологической анатомии (курс клинической цитологии)
УО «Гомельский государственный медицинский университет»,
Республика Беларусь, г. Гомель*

Ачинович Сергей Леонидович

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

Войсаров Максим Сергеевич

*студент медико-диагностического факультета
УО «Гомельский государственный медицинский университет»,
Республика Беларусь, г. Гомель*

Ларионова Ирина Александровна
студентка медико-диагностического факультета
УО «Гомельский государственный медицинский университет»,
Республика Беларусь, г. Гомель

Марковский Владимир Олегович
студент лечебного факультета
УО «Гомельский государственный медицинский университет»,
Республика Беларусь, г. Гомель

Введение. Колоректальный рак одна из наиболее распространенных форм злокачественных заболеваний. За 10 лет (2008-2017 годы) в Республике Беларусь прирост заболеваемости раком прямой кишки (РПК) 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). За последние годы достигнуты значительные успехи в диагностике (частота своевременной диагностики злокачественных новообразований I и II стадии к числу вновь зарегистрированных случаев на 2017 год составила 56,3 %) и лечения различных форм рака прямой кишки. 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 помимо традиционных критериев (возраст пациента, размер опухоли, форма и темп роста, локализация в различных отделах прямой кишки, наличие регионарных и отдаленных метастазов, степень злокачественности) используют 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 опухоли к различным видам терапии, но и разработать модели индивидуального прогнозирования течения заболевания.

Цель: Оценить прогностическую значимость ИГХ маркеров при раке прямой кишки I-III стадии для оценки клинического течения заболевания.

Материал и методы

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

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

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.

Оценка экспрессии иммуногистохимических маркеров проводилась в 5-и случайных полях зрения (объектив 40), исходя из 1000 окрашенных клеток.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием лицензионной программы Statistica 12. 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 – критерии Стьюдента. Корреляционный анализ проводился с использованием критерия Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для комплексной оценки влияния анализируемых факторов на прогноз заболевания использовались методы логистической регрессии [7].

Результаты

Экспрессия иммуногистохимических маркеров у пациентов с различной выживаемостью представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Имуногистохимические показатели у пациентов с различными исходами заболевания: $M \pm SD$; $ME [Q1;Q3]$

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
XGA	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 лет экспрессия маркера пролиферации маркера Ki67 определялась в более чем 2 раза выше в сравнении с группой пациентов, прожившей более 3 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 экспрессия

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 опухолю-ассоциированных макрофагов CD68 не имел статистически значимых различий в группе сравнения.

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

На следующем этапе был проведен анализ взаимосвязи исходов заболевания и экспрессии ИГХ маркеров. Исследование показало отсутствие статистически значимых связей экспрессии СусD1 и CD68 ($r_s = 0,013$ и $r_s = 0,187$; $p > 0,05$) соответственно. Для всех остальных ИГХ маркеров коэффициенты корреляции были высокосignificantными (r_s от 0,345 до 0,714; $p < 0,001$)

Таким образом, сравнительный анализ с использованием критерия Манна-Уитни и корреляционный анализ Спирмена показал аналогичные результаты и позволил исключить маркеры СусD1 и CD68 из дальнейшего исследования, как не оказывающие влияние на исход заболевания.

На последнем этапе для классификации исходов заболевания использовался логистический регрессионный анализ. Логистический регрессионный анализ позволяет строить модель для прогнозирования вероятности наступления события. При этом логистическая регрессия применяется для предсказания вероятности возникновения некоторого события по значениям множества признаков. Для этого вводится так называемая зависимая переменная, принимающая лишь одно из двух значений – как правило, это числа 0 (событие не произошло) и 1 (событие произошло), и множество независимых переменных (также называемых признаками, предикторами или регрессорами) – вещественных, на основе значений которых требуется вычислить вероятность принятия того или иного значения зависимой переменной.

Вероятность наступления события рассчитывалась по формуле:

$$y = \frac{f}{1+f}, \text{ где } f = \exp\left(b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i x_i\right)$$

где: b_i – коэффициенты параметров;

x_i – значения параметров, $i = 1, \dots, 4$;

b_0 – свободный член уравнения.

Критерием прогноза с риском развития неблагоприятного исхода заболевания служило пороговое значение у более 0,5, рассчитанного с помощью логистической функции.

Для классификации случаев были использованы ИГХ маркеры, имеющие статистически значимые показатели по итогам сравнительного анализа по Манн-Уитни и корреляционного анализа по Спирмену: к таковым были отнесены: Ki-67 – маркер пролиферации, 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, и S100 – кластер дендритных клеток.

Результаты логистической регрессии (нелинейное оценивание) позволили с высокой точностью классифицировать случаи исходов заболевания ($\chi^2=92,25$; $p<0,001$). Точность прогностической модели рассчитанной для совокупности вышеуказанных маркеров составила 97,77%.

Выводы

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

2. Высокие показатели BCL2, CD3, CD20, IgA и S100 ассоциируется с более высокой выживаемостью при раке прямой кишки ($p<0,01$).

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

Список литературы:

1. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2008-2017) // Оксаноу А.Е., Моисеев П.И., Левин Л.Ф., Евмененко А.А., под ред. Суконок О.Г. // Минск РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, 2018. – 286 с.
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 клиническо-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. Ачинович С.Л., Надыров Э.А., Голубев О.А. Прогностические факторы рака прямой кишки II-III стадии после предоперационной лучевой терапии // 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. – 336 p.
7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ Statistica // М.: МедиаСфера, 2002. – 512 с.