

І.С.Шпонька
П.О.Гриценко
О.В.Ковтуненко

Дніпропетровська державна
медична академія

УДК 616.22-006.61-036.1-078-091.8

ІМУНОГІСТОХІМІЧНИЙ ПРОФІЛЬ РАКІВ ГОРТАНІ З РІЗНИМ КЛІНІЧНИМ ПЛИНОМ ТА ЕФЕКТОМ НА ПРОВЕДЕНУ ТЕРАПІЮ

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи „Індивідуалізація лікування злоякісних пухлин з урахуванням біологічних показників активності пухлинного процесу та маркерів хіміогормонорезистентності” (№ держреєстрації 0101U001002).

Ключові слова: плоскоклітинний рак гортані, прогностичні маркери, цитокератини, проліферативна активність, p53, bcl-2.

Надійшла: 15.01.2007

Прийнята: 02.03.2007

Резюме. Рак гортані є важливою медичною проблемою у зв'язку з високою поширеністю процесу, високою летальністю й низькою виживаністю. У дослідженні проведено ретроспективний аналіз матеріалу 187 пацієнтів з плоскоклітинним раком гортані III-IV ст. з метою обґрунтування доцільності визначення імуноморфологічного профілю в оцінці біологічних властивостей раку гортані для прогнозування клінічного плину й вибору оптимального варіанту лікування. Проведено рутинне гістологічне дослідження з визначенням форми, ступеня диференціювання й поширеності раку. Імуногістохімічно виявляли молекулярні маркери CK19, CK34βE12, Ki-67, p53, bcl-2. Отримані дані зіставили із клінічним плином пухлини, наявністю регіональних і віддалених метастазів, розвитком рецидивів, річною виживаністю, ефективністю проведеного лікування. Відзначено значні відмінності в експресії маркерів між пухлинами з різним клінічним плином і різною ефективністю проведеної терапії, що свідчить про їх прогностичне значення. Так, несприятливий клінічний плин раку гортані спостерігався у випадках з високою проліферативною активністю, експресією p53 і CK19, та низьким рівнем експресії CK34. У пухлинах чутливих до терапії відзначалася експресія p53 і низький рівень bcl-2, крім того, у пухлинах чутливих до променевої терапії відзначалася висока проліферативна активність клітин. У пухлинах не чутливих до терапії відзначено високу експресію bcl-2, що дозволяє вважати його в раках гортані незалежним фактором резистентності до проведеної терапії. Отримані дані дозволяють індивідуалізувати підходи в лікуванні пацієнтів з раком гортані.

Shponka I.S., Gritsenko P.A., Kovtunencko A.V. Immunohistochemical profile of laryngeal cancers with different clinical course and efficiency of treatment.

Summary. The cancer of larynx is one of the most significant medical problems because of its high prevalence, high mortality and low survival rate. The retrospective analysis of specimens of 187 patients suffering from laryngeal squamous cell carcinoma of stage III-IV was performed. The purpose of our study was to substantiate the appropriateness of assessment of immunomorphological profile in estimation of biological behaviour of laryngeal cancer for prediction its clinical course and choice of optimal treatment. The routine histological examination with determination of type, histopathological grading and extent of tumors was performed. Molecular markers, such as CK19, CK34βE12, Ki-67, p53 and bcl-2 were analyzed by immunohistochemistry. Our findings were compared with the clinical course, presence of regional and distant metastasis, rate of relapses, one-year survival rate, and efficiency of treatment. The significant distinctions in marker expression among tumors with different clinical course and efficiency of treatment were determined which prove these markers prognostic significance. The cancers of the larynx with unfavorable clinical course had high proliferative activity, expression of p53, CK19 and low expression of CK34. The tumors that responded well to the treatment had high expression of p53 and low expression of bcl-2. The radiosensitive tumors also had high proliferative activity. The cancers which did not respond well to treatment had high expression of bcl-2 that allowed us to consider this marker to be independent factor of tumor resistance to treatment. These data give us the possibility to individualize treatment approaches to patients with laryngeal cancer.

Key words: laryngeal squamous cell carcinoma, prognostic markers, cytokeratins, proliferative activity, p53, bcl-2.

Вступ

Рак гортані є однією з найчастіших пухлин голови та шиї (до 67%). Останнім часом розроблені й впроваджені в практику різні підходи в терапії та варіантах хірургічного лікування пухлин даної локалізації, однак загальні результати їх ефективності не повною мірою задовольняють онкологів. Так, загальна 5-річна виживаність залишається на рівні 35-50% при місцеворозповсюджених процесах (Robin P. et al. 1991).

Порівняльний аналіз літературних даних по-

казує, що пухлини однієї й тієї ж локалізації, стадії та гістологічної будови часто мають різний клінічний плин і відповідно прогноз. Існуюча гетерогенність пухлин вимагає пошуку нових факторів, що визначають їхні біологічні властивості. У зв'язку з цим перспективним, на наш погляд, є дослідження клітинних і молекулярних характеристик раку, що відображають причину або наслідок цих властивостей, а іноді й етапи канцерогенезу (Chiesa F. et al. 1998; Hall S. et al. 1999; Van der Velden L. et al. 1997). Важливість

розширення уявлень про інформативність зазначених характеристик пов'язана не тільки з їх визначальним значенням на плин захворювання, але й на передбачення чутливості пухлинної тканини до різних терапевтичних впливів, що у свою чергу, дозволить прогнозувати можливу відповідь на лікування, істотно індивідуалізувати підходи у виборі найбільш ефективних для кожного пацієнта схем і комбінацій лікувальних заходів.

Мета дослідження – обґрунтування доцільності визначення імунорфологічного профілю в оцінці біологічних властивостей раку гортані для прогнозування клінічного плин у виборі оптимального варіанту лікування.

Матеріали та методи

У дослідженні проведено ретроспективний аналіз матеріалу 187 пацієнтів з плоскоклітинним раком гортані III-IV стадій, що знаходилися на лікуванні в ЛОР-онкологічному відділенні Дніпропетровської обласної клінічної лікарні ім. І.І. Мечникова в період з 2002 по 2006 рік. Для проведення морфологічного дослідження операційний і біопсійний матеріал хворих фіксували в 10% нейтральному формаліні. Після фіксації й проводки за стандартними протоколами матеріал забарвлювали гематоксиліном-еозинном і піддавали рутинному мікроскопічному дослідженню з визначенням форми, ступеня диференціювання й розповсюдженості раку.

Імуногістохімічне дослідження проводили з використанням панелі антитіл до цитокератинів 19 (СК19), цитокератинів плоских епітеліїв (СК34βE12), Ki-67, онкопротеїнів p53 і bcl-2. Отримані дані зіставляли з показниками клінічного плин захворювання включаючи, наявність регіональних і віддалених метастазів, розвитку рецидивів, параметрів річної виживаності, ефективності проведеного лікування.

Для імуногістохімічного дослідження з отриманих парафінових блоків готували зрізи товщиною 4-5 мкм. Перед проведенням імуногістохімічного дослідження зрізи депарафінізували відповідно до прийнятих стандартів з наступним проведенням теплової індукції епітопного (антигенного) повернення (HIER - heat induction of epitope retrieval) шляхом нагрівання на водяній бані у цитратному буфері із рН=6.0 (протягом 30 хвилин після досягнення температури 98°C) або автоклавування (5 хвилин при температурі +121°C) (Петров С.В., Райхлин Н.Т. 2000).

У якості первинних використовували моноклональні антитіла до цитокератину 19 (клон VA17), високомолекулярного цитокератину (клон 34βE12), Ki-67 (клон MIB-1), p53 (клон DO-7), bcl-2 (клон 124) (DakoCytomation). Для кожного маркера проводили контрольні реакції з метою виключення помилково позитивного або помилковонегативного результату. Подальшу обробку проводили з використанням системи візуалізації EnVision (DakoCytomation), після чого проводили реакцію с хромогеном (DAB), оцінюючи якість взаємодії під контролем мікроскопа протягом від 20 секунд до 3 хвилин. Для деталізації структури

тканини зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра протягом 3 хвилин. Дегідратацію й заключення у бальзам проводили відповідно до прийнятих принципів. Отримані результати оцінювали за допомогою світлового мікроскопа Leica DMLS.

Результати та їх обговорення

Цитокератини відносяться до групи проміжних філаментів і є характерними структурами для епітеліальних клітин у тому числі пухлин епітеліального походження. СК19 є моноклональним антитілом до цитокератину, що виявляється в простих епітеліях і в частині випадків у базальному шарі багатшарового плоского епітелію. СК34βE12 є сумішшю різних антитіл до цитокератинів плоских епітеліїв і використовується для виявлення плоскоклітинних раків (Moll R. et al. 1982; Van der Velden L.A. et al. 1997).

При вивченні експресії цитокератинів ми оцінювали специфічну цитоплазматичну реакцію з пухлинними клітинами. Позитивна реакція з СК19 була визначена в 76 (40.6±3.6%) випадках (Рис. 1-В, 2-В). Імуногістохімічне дослідження пухлинної тканини з СК34βE12 виявило позитивну реакцію у всіх випадках, що вивчались, при цьому інтенсивна позитивна реакція - в 115 (61.5±3.6%) випадках, помірна - в 65 (34.8±3.5%), слабка - в 17 (9.1±2.1%) (Рис. 1-С, 2-С, 3-В).

Важливою обставиною, що характеризує злоякісні властивості пухлинної тканини, є проліферативний потенціал. Проліферативну активність оцінювали за допомогою антитіла до Ki-67, антигену, який експресується в G1, S і G2 фазах клітинного циклу (Acikalin M.F. et al. 2004). Результати імуногістохімічних реакцій оцінювали шляхом визначення відсотка клітин в яких виявлена реакція (позитивне інтрануклеарне забарвлення) на 1000 пухлинних клітин. Проліферативна активність визначалась як низька при показниках до 10%, помірна - від 10 до 30% і висока - 30% і більше. У нашому дослідженні висока проліферативна активність відзначена в 95 (50.8±3.7%) випадків, середнє значення серед всіх пухлин складало 29.5±3.9% (Рис. 1-Ф, 2-Е, 3-Е, 4-Д).

Ген p53 є одним із ключових у механізмах забезпечення стабільності геному клітини, його відновленні, індукції апоптозу. Його мутація відзначається в більшості відомих пухлин, у тому числі й раку гортані (Blons H., Laurent-Puig P., 2003; Hotz M. et al. 1999; Klatka J., 2001). В ході постановки імуногістохімічної реакції ми виявляли експресію мутантного гену p53 у вигляді специфічного ядерного забарвлення. Експресія вважалась позитивною при реакції 10% пухлинних кліток і більше, в інших випадках реакція розцінювалась як негативна. У дослідженні p53-позитивний статус було визначено в 107 (57.2±3.6%) випадках (Рис. 1-Д, 2-Д, 3-С, 4-В).

Bcl-2-онкопротеїн належить до представників численної групи інгібіторів апоптозу. У нормі зустрічається у фракціях клітин з тривалим періодом життя, а також у багатьох видах пухлин

(Hotz M. et al. 1999; Klatka J., 2001). При проведенні імуногістохімічних реакцій ми враховували варіанти тільки інтрануклеарного фарбування пухлинних клітин і розглядали як позитивний статус експресії при виявленні більш ніж у 10%

клітинної популяції. При аналізі зазначених показників у нашому дослідженні позитивний статус було відзначено в 51 (27.3±3.3%) випадку (Рис. 1-Е, 3-Д, 4-С).

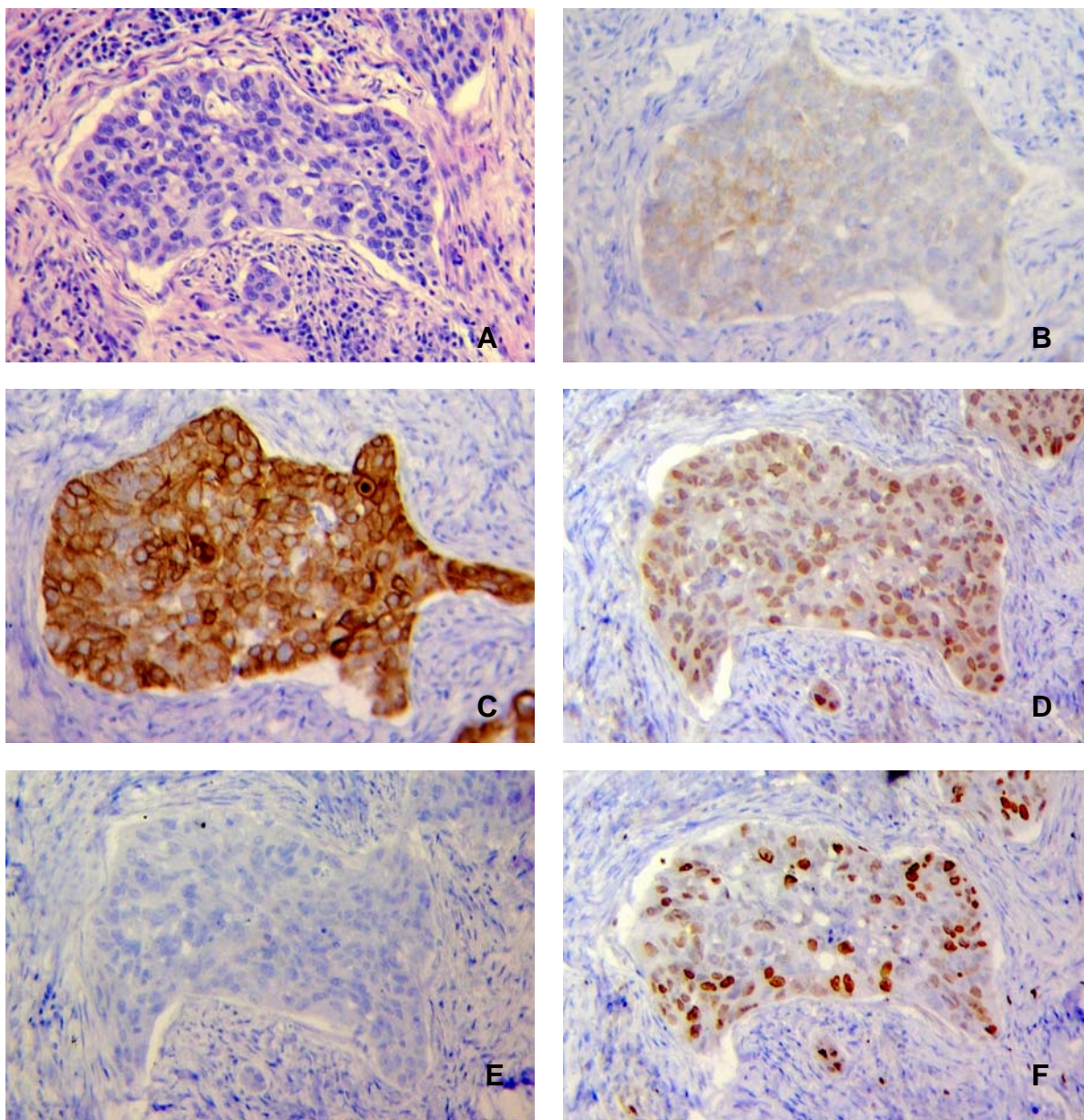


Рис. 1 Плоскоклітинний незроговілий рак гортані. А – забарвлення гематоксиліном та еозином. ×400; В – низький рівень експресії СК19. ×400; С – високий рівень експресії СК34. ×400; D – позитивна реакція з онкопротеїном p53. ×400; E – негативна реакція з онкопротеїном bcl-2. ×400; F – високий рівень експресії Ki-67. ×400.

Для виявлення відмінностей у чутливості маркерів і визначення їх інформативності ми провели зіставлення ступеня їх експресії в пухлинах з різним клінічним плином. Так, в 32 випадках, віднесених до групи з несприятливим клінічним плином (ранні рецидиви, метастазування та летальний результат протягом першого року) позитивний статус по СК19 виявлений в 19 (59.4±3.6%) випадках, висока експресія СК34 - в 12 (37.5±3.5%), p53 - в 23 (71.9±3.3%), bcl-2 - в 10 (31.3±3.4 %), висока проліферативна активність

(по Ki-67) - в 22 (68.8±3.4%). У той же час, в 155 випадках пухлин зі сприятливим клінічним плином і безрецидивним періодом більше 1 року показники позитивного статусу експресії розглянутої панелі антитіл виявили наступні рівні: СК19 - 57 (36.8±3.5%) випадків, СК34 - 103 (66.5±3.5%), p53 - 84 (54.2±3.6%), bcl-2 - 41 (27.5±4.9 %), висока проліферативна активність (по Ki-67) - 73 (47.1±3.7%) (табл. 1).

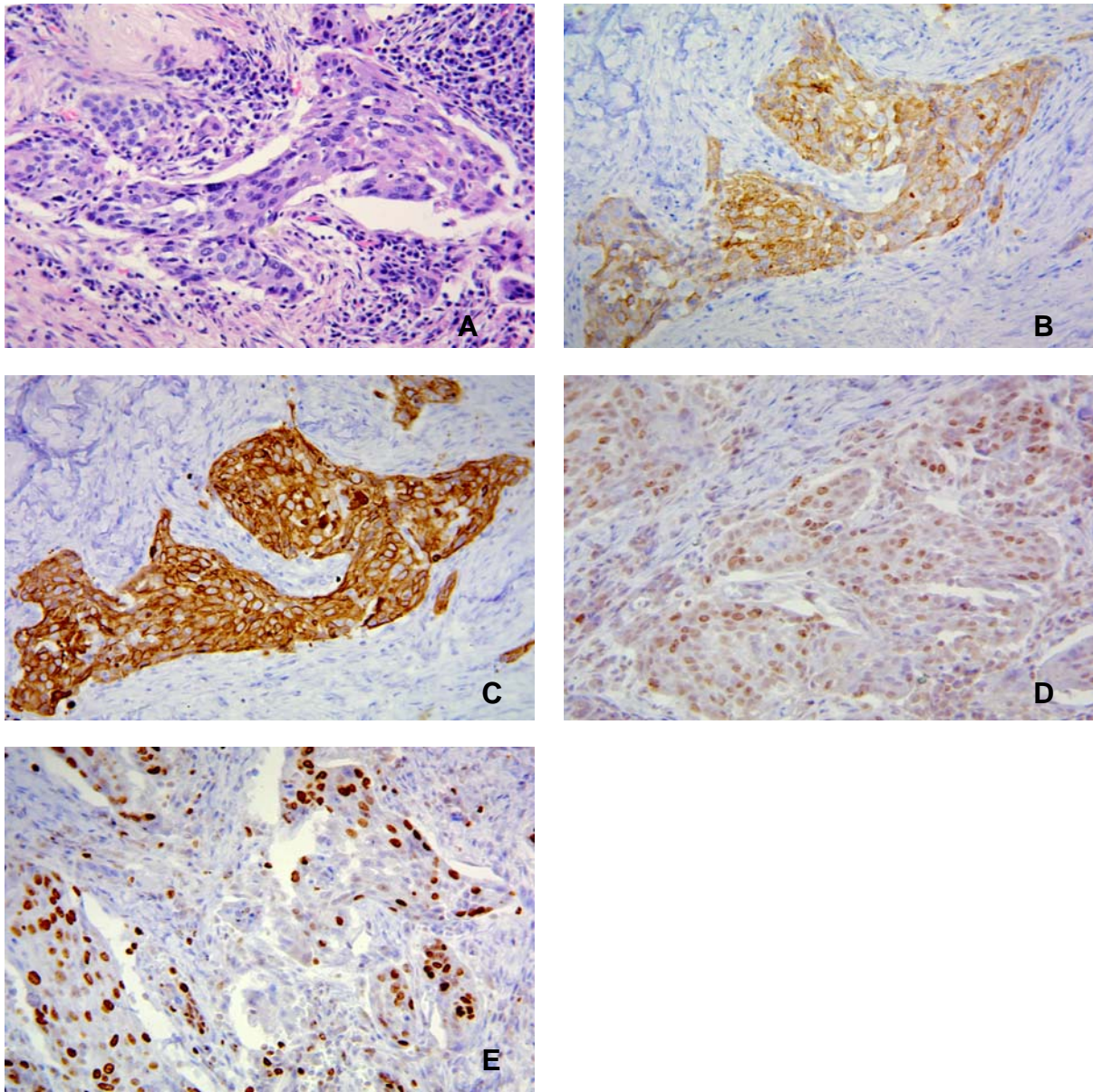


Рис. 2 Плоскоклітинний незроговілий рак гортані. А – забарвлення гематоксилином та еозіном. $\times 400$; В – помірний рівень експресії СК19. $\times 400$; С – високий рівень експресії СК34. $\times 400$; D – позитивна реакція з онкопротеїном р53. $\times 400$; E – високий рівень експресії Ki-67. $\times 400$.

Таблиця 1

Експресія молекулярних маркерів в пухлинах з сприятливим та несприятливим клінічним плином

	n	СК19	СК34	p53	bcl-2	Ki-67
Всі пухлини	187	76 (40.6 \pm 3.6%)	115 (61.5 \pm 3.6%)	107 (57.2 \pm 3.6%)	51 (27.3 \pm 3.3%)	95 (50.8 \pm 3.7%)
Пухлини з НКП	32	19 (59.4 \pm 3.6%)	12 (37.5 \pm 3.5%)	23 (71.9 \pm 3.3%)	10 (31.3 \pm 3.4%)	22 (68.8 \pm 3.4%)
Пухлини з СКП	155	57 (36.8 \pm 3.5%)	103 (66.5 \pm 3.5%)	84 (54.2 \pm 3.6%)	41 (27.5 \pm 4.9%)	73 (47.1 \pm 3.7%)

Таким чином, слід зазначити, що досліджувані показники у випадках пухлин з несприятливим клінічним плином мали порівняно більш високу проліферативну активність, високу експресію р53 і СК19, і низьку експресію СК34. Зазначений імуноморфологічний профіль раків гортані визначає значно гірший прогноз плину й передбачає більш агресивне й тривале їх лікування.

Ще одним завданням нашого дослідження було зіставлення імуногістохімічного профілю

пухлин в залежності від ефекту проведеної терапії. Аналіз клінічного ефекту лікування передбачав порівняння експресії обраної панелі маркерів для пухлин з різною відповіддю на проведену хіміо- і променевою терапію. Отримані результати ІГХ-профілю пухлин із значним ефектом від хіміотерапії, променевої терапії та пухлин, що виявилися нечутливими до хіміо- і променевої терапії представлені в таблиці 2.

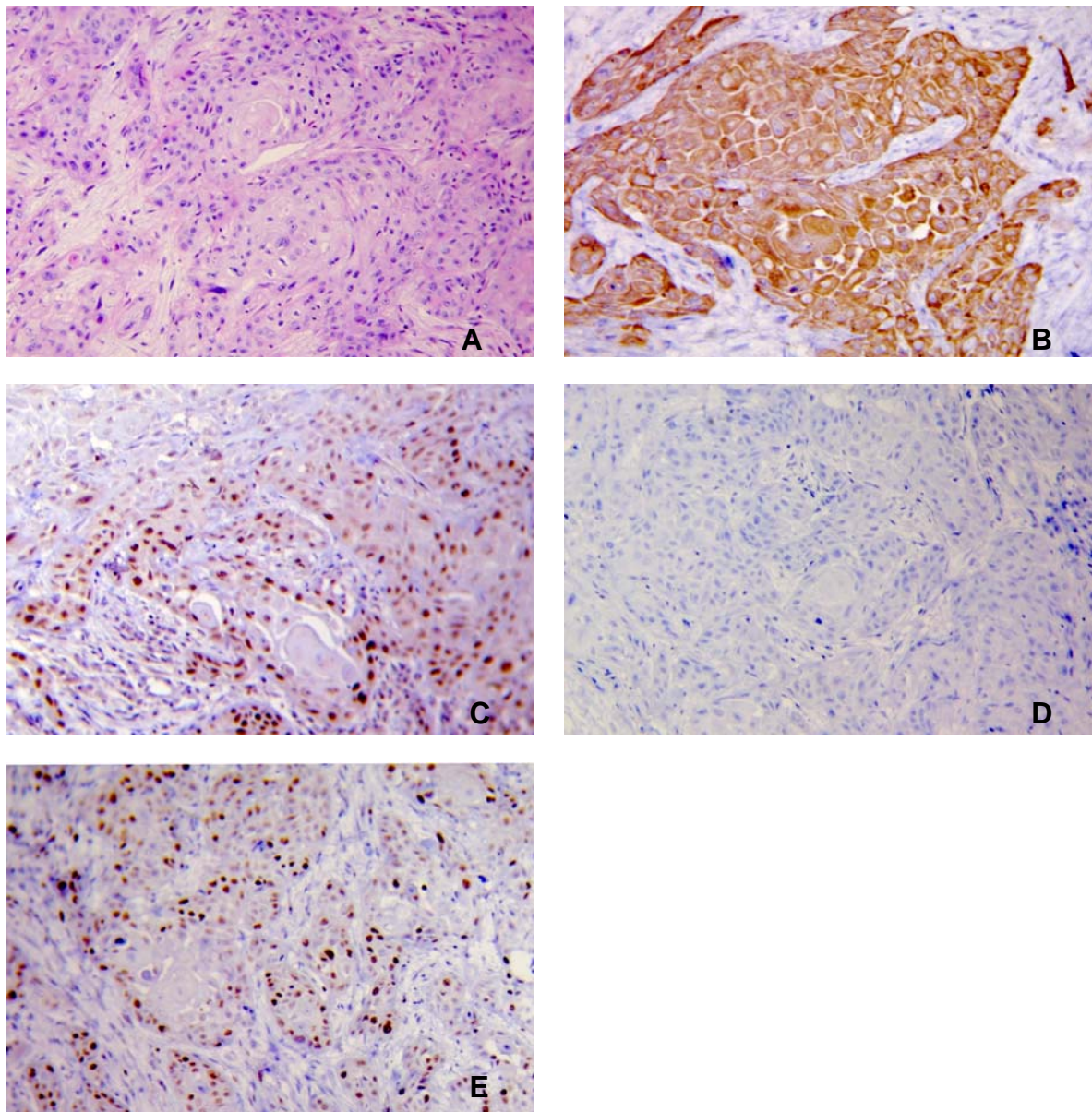


Рис. 3 Плоскоклітинний зрговілий рак гортані. А – забавлення гематоксином та еозином. $\times 400$; В – високий рівень експресії СК34. $\times 400$; С – позитивна реакція з онкопротеїном p53. $\times 400$; D – негативна реакція з онкопротеїном bcl-2. $\times 400$; E – помірний рівень експресії Ki-67. $\times 400$.

Таблиця 2

Експресія молекулярних маркерів в пухлинах з різною чутливістю до лікування

	n	СК19	СК34	p53	bcl-2	Ki-67
Пухлини чутливі до ХТ	83	36 (43.4 \pm 3.6%)	57 (68.7 \pm 3.4%)	55 (66.3 \pm 3.6%)	15 (18.1 \pm 2.8%)	37 (44.6 \pm 3.6%)
Пухлини чутливі до ПТ	65	22 (33.8 \pm 3.5%)	41 (63.1 \pm 3.5%)	42 (64.6 \pm 3.5%)	18 (27.7 \pm 3.3%)	39 (60.0 \pm 3.6%)
Пухлини нечутливі до терапії	39	16 (46.2 \pm 3.6%)	17 (43.6 \pm 3.6%)	15 (38.5 \pm 3.6%)	18 (46.2 \pm 3.6%)	19 (48.7 \pm 3.7%)

Пухлини чутливі до хіміотерапії в порівнянні з резистентними до терапії мали високу експресію p53 і негативний статус за онкобілком bcl-2. У пухлинах, що позитивно відповіли на промене-ву терапію при зіставленні відзначалася гіперекспресія p53, висока експресія СК34, висока проліферативна активність і низька експресія bcl-2. Таким чином, випадки рака гортані з експресією гена p53 і негативним статусом по онкобілку bcl-

2, імовірно, будуть мати істотний ефект від проведеної хіміо- або променевої терапії. Крім того, пухлини серед цієї групи з високою проліферативною активністю будуть більш чутливі до променевої терапії. Більшість пухлин з високим рівнем експресії до онкопротеїну bcl-2 з великою ймовірністю будуть резистентні до проведеної терапії не залежно від статусу інших молекулярних маркерів.

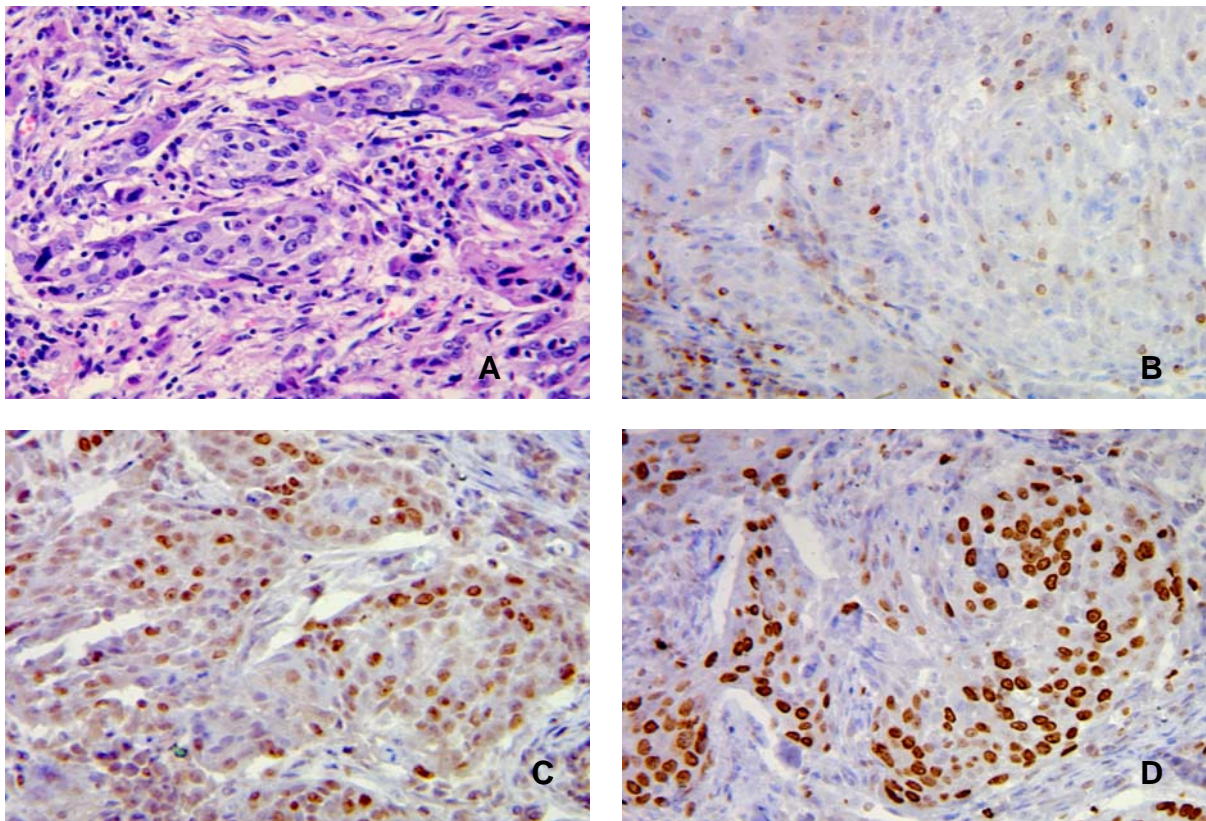


Рис. 4 Плоскоклітинний незроговілий рак гортані. А - забарвлення гематоксиліном та еозіном. $\times 400$; В - позитивна реакція з онкопротеїном p53. $\times 400$; С - позитивна реакція з онкопротеїном bcl-2. $\times 400$; D - високий рівень експресії Ki-67. $\times 400$.

Висновки

Відзначені значні відмінності в експресії молекулярних маркерів між пухлинами з різним клінічним плином і різною ефективністю проведеної терапії, що свідчить про їх прогностичне значення.

Так, несприятливий клінічний плин раку гортані спостерігався у випадках з високої проліферативною активністю, експресією p53 і СК19, та низьким рівнем експресії СК34.

У пухлинах чутливих до терапії відзначалася експресія p53 і низький рівень bcl-2, крім того, у пухлинах чутливих до променевої терапії відзначалася висока проліферативна активність клітин.

У пухлинах не чутливих до терапії відзначалася висока експресія bcl-2, що дозволяє вважати його в раках гортані незалежним фактором резистентності до проведеної терапії.

Отримані дані дозволяють індивідуалізувати підходи в лікуванні пацієнтів з раком гортані шляхом вибору тактики й тривалості проведеної терапії на підставі попереднього вивчення молекулярних маркерів.

Перспективи подальших розробок пов'язані з вивченням додаткових факторів які відображають біологічні властивості плоскоклітинних раків гортані .

Літературні джерела

Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека.- Казань, 2000.- 288 с.

Blons H., Laurent-Puig P. TP53 and Head and Neck Neoplasms // Human mutation.- 2003.- Vol.21.- P.252-257.

Cytokeratin and vimentin expression in normal epithelium and squamous cell carcinomas of the larynx / Van der Velden L., Schaafsma H., Manni J. et al. // Eur. Arch. Otorhinolaryngol.- 1997.- Vol.254, №8.- P.376-83.

Prognostic factors in head and neck oncology: a critical appraisal for use in clinical practice / Chiesa F., Tradati N., Mauri S. et al. // Anticancer Res.-

1998.-Vol.18.- P.4769-4776.

Klatka J. Prognostic value of the expression of p53 and bcl-2 in patients with laryngeal carcinoma // Eur. Arch. Otorhinolaryngology.- 2001.- Vol.258.- P.537-541.

Prognostic significance of Ki-67 expression for patients with laryngeal squamous cell carcinoma primarily treated by total laryngectomy / Acikalin M., Öner Ü., Tel N. et al. // Eur. Arch. Otorhinolaryngology.- 2004.- Vol.261, №7.- P.376-380.

Spontaneous Apoptosis and the Expression of p53 and Bcl-2 Family Proteins in Locally Advanced Head and Neck Cancer / Hotz M., Bosq J., Zbaeren

P. et al. // Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.- 1999.- Vol.125, №4.- P.417-422.

The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells / Moll R., Franke W., Schiller D. et al. // Cell.- 1982.- Vol.31, №1.- P.11-24.

The incidence of cancer of the larynx / Robin P.,

Reid A., Powell D. et al. // Clin. Otolaryngol.-1991.- Vol.16.- P.198-201.

Using TNM staging to predict survival in patients with squamous cell carcinoma of head & neck / Hall S., Groome P., Rothwell D. et al. // Head Neck.- 1999.- Vol.21.- P.30-38.

Шпонька И.С., Гриценко П.А., Ковтуненко А.В. Иммуногистохимический профиль раков гортани с различным клиническим течением и эффектом на проведенную терапию.

Резюме. Рак гортани является значимой медицинской проблемой в связи с высокой распространенностью процесса, высокой летальностью и низкой выживаемостью. В исследовании проведен ретроспективный анализ материала 187 пациентов с плоскоклеточным раком гортани III-IV ст. с целью обоснования целесообразности определения иммуноморфологического профиля в оценке биологических свойств рака гортани для прогнозирования клинического течения и выбора оптимального варианта лечения. Проведено рутинное гистологическое исследование с определением формы, степени дифференцировки и распространенности рака. Иммуногистохимически выявляли молекулярные маркеры СК19, СК34 β E12, Ki-67, p53, bcl-2. Полученные данные сопоставили с клиническим течением опухоли, наличием региональных и отдаленных метастазов, развитием рецидивов, годовой выживаемостью, эффективностью проведенного лечения. Отмечены значительные отличия в экспрессии маркеров между опухолями с разным клиническим течением и различной эффективностью проведенной терапии, что свидетельствует об их прогностическом значении. Так, неблагоприятное клиническое течение рака гортани наблюдалось в случаях с высокой пролиферативной активностью, экспрессией p53 и СК19, и низким уровнем экспрессии СК34. В опухолях чувствительных к терапии отмечалась экспрессия p53 и низкий уровень bcl-2, кроме того, в опухолях чувствительных к лучевой терапии отмечалась высокая пролиферативная активность клеток. В опухолях не чувствительных к терапии отмечена высокая экспрессия bcl-2, что позволяет считать его в раках гортани независимым фактором резистентности к проведенной терапии. Полученные данные позволяют индивидуализировать подходы в лечении пациентов с раком гортани.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак гортани, прогностические маркеры, цитокератины, пролиферативная активність, p53, bcl-2.