

П.О.Гриценко

Дніпропетровська державна
медична академія

УДК 616.22-006.61-036.1-078-091.8

ПРОГНОЗ ПЕРЕБІГУ ПЛОСКОКЛІТИННИХ РАКІВ ГОРТАНІ НА ПІДСТАВІ ВИЗНАЧЕННЯ ІМУНОГІСТОХІМІЧНОГО ПРОФІЛЮ

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, імуногістохімічні маркери, проліферативна активність, онкобілок p53, онкобілок bcl-2, цитокератини.

Резюме. Робота присвячена вивченню експресії молекулярних маркерів в плоскоклітинних раках гортані для прогнозування подальшого клінічного перебігу захворювання. В дослідженні проведено аналіз експресії цитокератинів CK34βE12 та CK19, онкопротеїнів p53 та bcl-2, проліферативної активності (на основі експресії Ki-67) в пухлинах в залежності від наявності метастазів, виникнення рецидивів, ефективності проведеного хіміопроменевого лікування. Визначено прогностичне й передбачувальне значення кожного маркера біологічних властивостей. Встановлені імунофенотипи раків гортані з високим ризиком метастазування, рецидивування, ймовірною чутливістю до хіміотерапії і променевого лікування. Запропонований комплекс маркерів, що дозволяють прогнозувати ймовірність метастазування та розвитку рецидивів протягом першого року (експресія онкобілків p53 і bcl-2, висока проліферативна активність), передбачати можливу ефективність проведення хіміотерапевтичного (відсутність експресії онкобілку p53) та променевого лікування (відсутність експресії онкобілку bcl-2, висока проліферативна активність). Отриманні дані дозволяють на підставі імуногістохімічного профілю раку гортані прогнозувати його подальший перебіг, ймовірність розвитку метастазів або рецидивів, що дає можливість виділити групи пацієнтів, які потребують більш ретельного клінічного обстеження й спостереження, тривалої й масивної терапії, а також тих хворих, до котрих можуть бути застосовані органозберігаючі методи лікування.

Надійшла: 06.06.2007

Прийнята: 14.08.2007

Gritsenko P.O. Prognosis of clinical course of squamous cell carcinoma of the larynx on the basis of establishing tumor's immunohistochemical profile.

Summary. The work is dedicated to the study of expression of molecular markers in squamous cell carcinomas of the larynx in order to improve the diagnostics and to predict clinical course of the disease. Expression of cytokeratins CK34βE12 and CK19, oncoproteins p53 and bcl-2, proliferation index (basing on Ki-67 expression) were studied in tumors of different grades in patients with presence or absence of metastases, recurrent tumor, and different responses to chemoradiotherapy. Each marker's value in diagnostics and prognosis was studied. Particular immunophenotypes which correspond with tumors of high risk of metastasis development (recurrence, possible sensitivity for chemo- and radiotherapy) were established for each tumor. A panel of markers that can be utilized to predict the possibility of metastases development within the first year after radical treatment (oncoproteins p53 and bcl-2 expression), to predict the response to chemo- (absence of p53) and radiotreatment (absence of bcl-2, high proliferation index) was suggested. Received data allows predicting laryngeal cancer's clinical course, the possibility of metastases development and possibility of tumor's recurrence, according to its immunohistochemical profile. This study enables to form clinical groups of patients which require more thorough clinical examination and supervision, more continuous and massive therapy, and also groups of patients, in which organ-saving methods of treatment may be applied.

Key words: squamous cell carcinoma of the larynx, immunohistochemical markers, proliferation index, oncoprotein p53, oncoprotein bcl-2, cytokeratins.

Вступ

У теперішній час злоякісні пухлини гортані представляють значну медичну проблему внаслідок їх високої поширеності й частой інвалідизації пацієнтів (Заболотний Д.І., 1997; Лукач Є.В.,

2000). Останнім часом відзначається тенденція до збільшення захворюваності раком гортані, причому до 70% раків вперше діагностується на пізніх стадіях захворювання. Загальна 5-річна виживаність залишається на рівні 35-50% (Пачес

А.И., 2000; Абизов Р.А., 2001; Gallo A. et al., 2005).

Різний перебіг пухлин однієї й тієї ж локалізації та гістологічної форми, у тому числі їх резистентність до терапії, обумовлює необхідність більш глибокого вивчення біологічних властивостей пухлин з метою призначення індивідуального й максимально раціонального комплексу терапії (Monnerat C. et al., 2002; Ушаков В.С., Иванов С.В., 2003; Гасюк А.П. та співавт., 2003; Троян В.И., 2005). Як показує досвід, визначення морфологічних характеристик, таких як ступінь диференціювання й мітотична активність, не завжди є достатніми, тому необхідним є дослідження біологічних властивостей, у тому числі експресії імуногістохімічних маркерів, як більш достовірних показників властивостей пухлинних клітин (Петров С.В., 2004; Smilek P. et al., 2006; Шпонька І.С. та співавт., 2007).

Не дивлячись на велику кількість робіт, присвячених раку гортані, досліджень по вивченню імуногістохімічного статусу пухлин цієї локалізації, а також зв'язку останнього з клінічним перебігом проведено недостатньо.

Мета дослідження - удосконалити прогностичні критерії перебігу плоскоклітинних раків гортані на підставі вивчення показників експресії маркерів біологічних властивостей клітин.

Матеріали та методи

У нашому дослідженні проведено ретроспективний аналіз клініко-анатомічного матеріалу 205 хворих, який отримано під час операцій (тотальна або часткова ларингектомія, лімфаденектомія, операція Крайля) і діагностичних біопсій з приводу раку гортані III - IV стадій з ЛОР-онкологічного відділення Дніпропетровської обласної клінічної лікарні ім. І.І.Мечникова в період з 2000 по 2007р.

За гістологічною будовою всі новоутворення були представлені плоскоклітинними раками: зроговілими - 126 випадків та без зроговіння - 79 випадків. Весь клініко-анатомічний матеріал був розподілений на 3 групи: пацієнти з високодиференційованими плоскоклітинними раками - 49 випадків, пацієнти з помірнодиференційованими раками - 124 випадки та пацієнти з низькодиференційованими плоскоклітинними раками - 32 спостереження. З усіх спостережень в 112 випадках виявлені метастази в регіональні лімфатичні вузли, в 64 випадках розвинулися рецидиви протягом першого року після лікування. В якості передопераційного лікування 131 пацієнт отримав курс хіміотерапії за стандартною схемою, інші 74 пацієнти – курс променевої терапії.

Для проведення морфологічного дослідження використовували парафінові блоки операційного та біопсійного матеріалу у випадках раку гортані та його метастазів у лімфатичні вузли. В якості первинних використовувалися моноклональні антитіла до онкопротеїну p53 (клон DO-7), Ki-67 (клон MIB-1), онкопротеїну bcl-2 (клон 124), цитокератину 19 (клон BA17), високомоле-

кулярного цитокератину (клон 34βE12) з подальшим застосуванням системи візуалізації EnVision (DakoCytomation). Ідентифікація реакції проводилась за допомогою хромогену DAB. Оцінка експресії кожного маркера проводилась індивідуально у відповідності з рекомендаціями інших дослідників (Dabbs D.J., 2006).

Результати та їх обговорення

У нашому дослідженні був проведений аналіз проліферативної активності плоскоклітинних раків гортані (ПРГ) за допомогою моноклонального антитіла Ki-67 та визначення індексу проліферації (ІП). Проліферативна активність оцінювалася як низька при ІП у діапазоні 0-20%, помірна при 21-30% і висока більш ніж в 30%. У ПРГ інтрануклеарну реакцію давали в основному клітини периферійних відділів пухлинних осередків. При порівнянні ІП в більшості випадків відзначена неоднорідність показника в різних зонах пухлини. Так, спостерігалася тенденція до збільшення частки проліферуючих клітин в зонах інвазивного росту в порівнянні з поверхневими відділами пухлини, в окремих випадках ІП в різних зонах пухлини відрізнявся на 15-20%. При порівнянні проліферативної активності первинної пухлини і її метастазів у лімфатичні вузли відзначені відповідні відмінності. Більш високі значення ІП визначені в клітинах метастазів, їх показники відповідали у більшості випадків показникам первинної пухлини у ділянках з вираженим інвазивним ростом. ІП у ПРГ коливався від 6 до 74% і, в середньому, складав $32,7 \pm 2,57\%$. При аналізі ІП в пухлинах з різним клінічним перебігом було визначено істотні розходження. В групі ПРГ з наявністю метастазів проліферативна активність була значно вищою ніж у пухлинах без метастазів (середні показники склали $38,1 \pm 2,52\%$ і $26,3 \pm 2,91\%$) (рис. 1).

Кількість випадків активно проліферуючих пухлин серед ПРГ з метастазами була переважуючою, в порівнянні з пухлинами без метастазів їх було в 1,6 разів більше. Серед пухлин з помірно проліферативною активністю значних розходжень між групами не відзначено. Ймовірність розвитку метастазів в ПРГ з високою проліферативною активністю була в 1,5 рази вищою, ніж у пухлинах з ІП менше 30%, а у порівнянні з низькою та помірно проліферативною активністю ризик розвитку метастазів в цій групі збільшувався в 1,8 та 1,3 рази відповідно.

Було проведено порівняльний аналіз рівня експресії Ki-67 в ПРГ, в яких протягом першого року розвинулися рецидиви, й пухлинах з безрецидивним перебігом. Середні значення ІП у цих групах склали $40,4 \pm 4,23\%$ і $29,2 \pm 2,41\%$ відповідно. Новоутворення з епізодом рецидивування характеризувалися більш високим ІП, більшою часткою пухлин з показниками експресії Ki-67 більше 30%, на 10,2% більше ніж серед усіх пухлин і на 14,8% більше ніж серед раків без рецидивів (рис. 1). Згідно з нашими даними ймовір-

ність виникнення рецидивів серед ПРГ з високою проліферативною активністю була в 1,9 рази ви-

ще ніж серед раків з низькою проліферативною активністю, та в 1,2 рази – ніж з помірною.

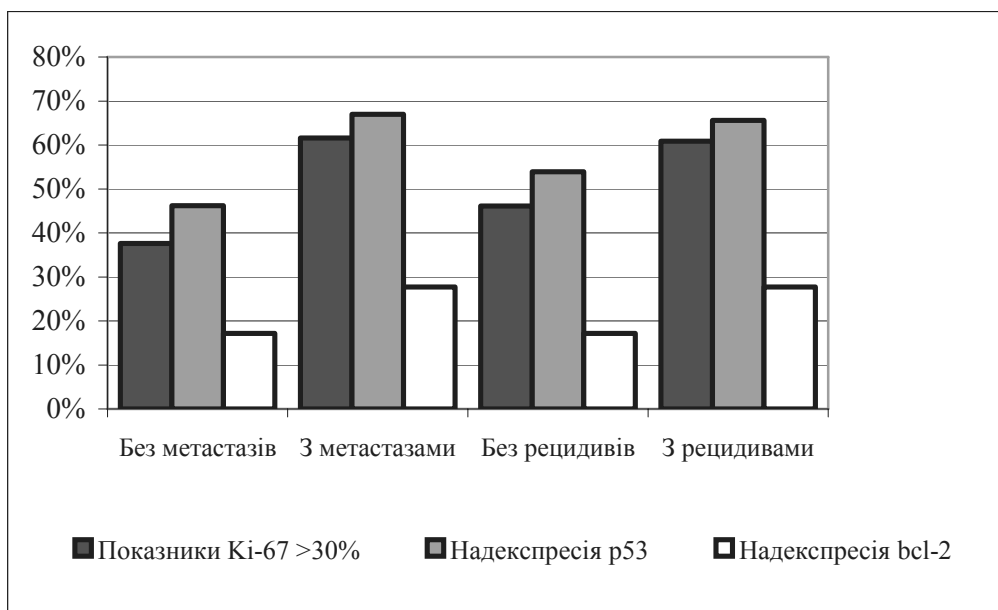


Рис. 1. Розподіл експресії ІГХ маркерів в ПРГ з різним клінічним перебігом.

В дослідженні проаналізована проліферативна активність ПРГ залежно від проведеного лікування у вигляді курсу передопераційної терапії й досягнутого їм ефекту (рис. 2). ІП пухлин, які відповіли на хіміотерапію склав $30,4 \pm 3,73\%$, серед резистентних до неї - $34,9 \pm 4,22\%$, ПРГ з високим ефектом від променевого впливу - $44,1 \pm 6,15\%$, радіорезистентних - $26,3 \pm 3,51\%$. Серед пухлин, з приводу яких була проведена хіміотерапія, частка з високою проліферативною активністю, як у групі з високим ефектом на терапію, так і в групі з низьким або неефективним лікуванням незначно відрізнялася від середніх показників. Кількість випадків ПРГ з високою експресією Ki-67 була вище серед пухлин, що не відповіли на хіміотерапію на $7,0\%$, що не показало достовірних відмінностей. У той же час, між групами з різним ефектом від проведеної променевої терапії нами визначені певні відмінності. Відносне число ПРГ з високим ІП було значно більше (в 1,6 рази) серед пухлин чутливих до променевої терапії, ніж серед не чутливих, і на $13,6\%$ більше, ніж серед всіх ПРГ. Згідно з отриманими даними вірогідність достатнього ефекту від променевої терапії в ПРГ з високою проліферативною активністю в 1,8 раз вище ніж серед решти пухлин, в 2,7 та 1,2 рази ніж в раках з низькою та помірною експресією Ki-67.

У клітинах ПРГ експресія p53 виявлялася як специфічне інтрануклеарне фарбування різної інтенсивності, в основному високої і помірної. У нашому дослідженні більшість випадків ПРГ ($57,6\%$) мали p53-позитивний статус. Частота надекспресії p53 у пухлинах з наявними метаста-

зами була на $9,4\%$ вище, ніж серед всіх ПРГ й на $20,8\%$ ніж серед пухлин без метастазів (рис. 1). За нашими даними, ймовірність наявності метастазів у p53-позитивних ПРГ була в 1,5 рази вище, ніж у випадках з негативним статусом.

При порівнянні рівня експресії p53 у первинній пухлині й у метастазах у ряді випадків відзначені незначні відмінності. Так, кількість клітин з реакцією у метастатичній популяції була на $5-15\%$ вище, ніж у материнській пухлині. У той же час, нами не визначено випадків відмінного від первинного вогнища статусу метастазу за онкопротеїном p53, тобто надекспресії в метастазі й відсутності її у первинній пухлині. Був також проведений аналіз експресії p53 в групі ПРГ з рецидивами протягом першого року після проведеного лікування та спостереженнях з безрецидивним перебігом процесу. При аналізі експресії p53 у цих групах визначені достовірні розходження. Серед пухлин з рецидивами кількість p53-позитивних було на $11,7\%$ більше, ніж серед пухлин без рецидивів (рис. 1). При цьому ймовірність розвитку рецидивів протягом першого року серед раків з надекспресією p53 була в 1,4 рази вище ніж в p53-негативних пухлинах.

При порівнянні кількості p53-позитивних пухлин у групах пацієнтів, яких лікували хімотерапевтичними препаратами за стандартною схемою, виявлені значні відмінності (рис. 2). Надекспресія p53 серед пухлин, що мали відсутній або низький ефект від хіміотерапії, зустрічалася на $13,4\%$ частіше ніж серед всіх раків, і в 1,6 разів частіше ніж у пухлинах з високим ефектом від проведеного хімотерапевтичного впливу. При

цьому ймовірність того, що проведена хіміотерапія буде неефективна в p53-позитивних ПРГ в 1,8 разів вища, ніж у негативних за цим показником пухлинах. У групі ПРГ, що зазнали променевого впливу, надекспресія p53 частіше зустрічалася в

пухлинах з низьким ефектом терапії, різниця із середніми показниками склала 3,3%, а з радіочутливими пухлинами 7,3%, однак отримані дані не показали статистично достовірних відмінностей.

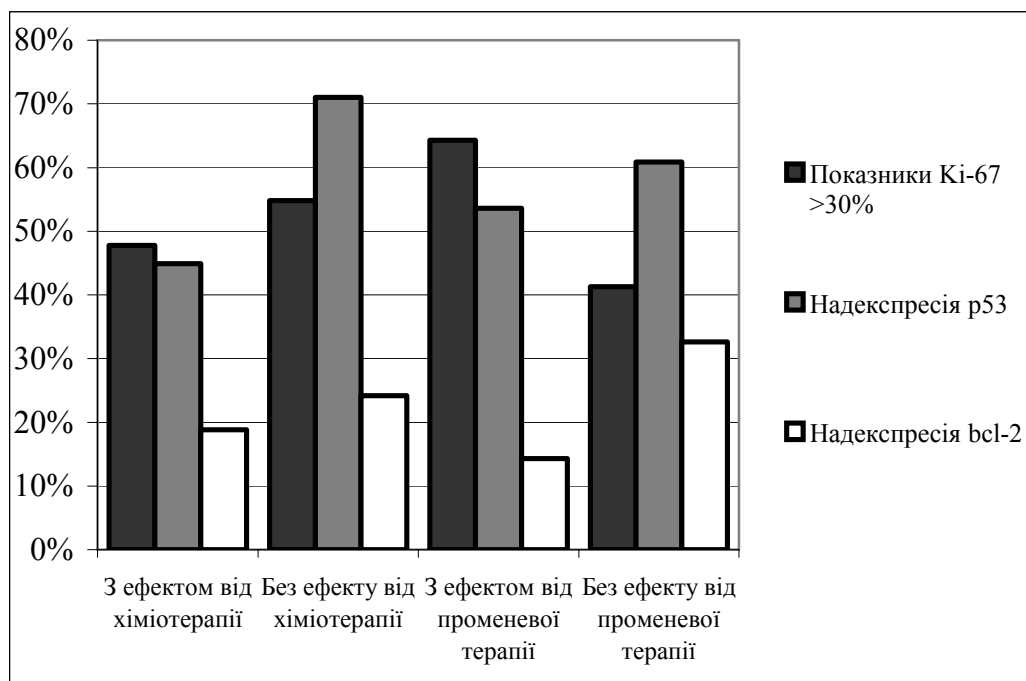


Рис. 2. Розподіл експресії ІГХ маркерів в ПРГ з різним ефектом від проведеної терапії.

При дослідженні експресії bcl-2 позитивний статус спостерігався в 22,9% випадків ПРГ. При цьому в більшості спостережень відзначалося слабе або помірної інтенсивності фарбування з дифузним розподілом клітин з реакцією у пухлинній паренхімі. При порівнянні рівня експресії bcl-2 у різних зонах пухлини значимих відмінностей не знайдено, кількість і інтенсивність реакції у всій пухлині були однаковими. Експресія bcl-2 у ПРГ з наявністю метастазів і без таких мала значні розходження. Так, серед метастатичних пухлин кількість bcl-2-позитивних була в 1,6 рази більше, ніж серед новоутворень без метастазів (рис. 1). При цьому ймовірність наявності метастазів у пухлинах з експресією bcl-2 в 1,3 рази вище, ніж у раках з негативною реакцією. Серед раків з рецидивами кількість bcl-2-позитивних було в 1,9 рази більше, ніж серед безрецидивних новоутворень, і на 11,5% більше ніж у середньому у вибірці (рис. 1). За даними отриманими у ході нашого дослідження ймовірність розвитку рецидивів серед ПРГ з високою експресією bcl-2 в 1,8 рази вища ніж серед пухлин без експресії.

Серед пухлин з низьким ефектом від проведеної хіміотерапії кількість bcl-2 - позитивних було на 5,4% більше ніж серед раків з вираженою відповіддю на терапію, що, однак, не склало статистично достовірної різниці. У той же час серед ПРГ нечутливих до променевої терапії реакція з

bcl-2 відзначена в 2,3 рази частіше ніж серед пухлин з високим ефектом від проведеної радіотерапії. При цьому, виходячи з отриманих нами даних, ймовірність відсутності ефекту від проведеної променевої терапії в пухлинах з надекспресією bcl-2 в 1,4 рази вища ніж в bcl-2 - негативних раках (рис. 2).

Експресія високомолекулярних цитокератинів (СК34βE12) виявлена у всіх випадках ПРГ та в тканині метастазів раку у лімфатичні вузли. У більшості випадків (59%) відзначалося виражене фарбування практично всіх клітин раку. Крім того була вивчена експресія цитокератинів в раках гортані в залежності від ступеня диференціювання. Співвідношення слабкої, помірної та вираженої реакції з СК34βE12 в високодиференційованих раках склало 1:2,5:8,8, в помірнодиференційованих - 1:2,5:4,8, і в низькодиференційованих - 1:2,0:2,3. Визначений прямий кореляційний зв'язок між рівнем експресії СК34βE12 та ступенем гістологічного диференціювання ($r=+0,63$). Позитивний статус за СК19 спостерігався в 41,5% всіх пухлин, при цьому в більшості з них (23,4%) реакція була слабкої інтенсивності. Серед високодиференційованих пухлин реакція визначена в 24,5% спостережень, помірнодиференційованих - в 42,7%, низькодиференційованих - в 62,5%. Нами визначено зворотний кореляційний зв'язок між експресією СК19 та ступенем

гістологічного диференціювання ($r=-0,78$).

Висновки

1. Експресія білка Ki-67 в раках гортані мала середній показник $32,7 \pm 2,57\%$. Проліферативна активність раків гортані мала прогностичне значення щодо подальшого перебігу захворювання. Виявлений прямий кореляційний зв'язок рівня експресії Ki-67 з наявністю метастазів ($r=+0,59$), а також прямий кореляційний зв'язок між проліферативною активністю та раннім розвитком рецидивів ($r=+0,38$). Проліферативна активність в плоскоклітинних раках гортані мала передбачувальне значення щодо можливої ефективності променевої терапії. Виявлений прямий кореляційний зв'язок проліферативної активності з чутливістю раків гортані до променевої терапії ($r=+0,56$).

2. Експресія онкопротеїну p53 спостерігалася в 57,6% випадків плоскоклітинних раків гортані. Експресія онкопротеїну p53 мала прогностичне значення щодо перебігу раків гортані. Визначений прямий кореляційний зв'язок експресії p53 з наявністю метастазів в раках гортані ($r=+0,52$) та прямий кореляційний зв'язок експресії p53 з раннім розвитком рецидивів ($r=+0,31$). Статус пухлини за p53 мав передбачувальне значення щодо можливої ефективності хіміотерапії. Знайдений зворотний зв'язок між експресією p53 та ефективністю проведеної хіміотерапії ($r=-0,65$).

3. Реакція з онкобілком bcl-2 в плоскоклітинних раках гортані визначена в 22,9% випадків. Експресія білку bcl-2 мала прогностичне значення щодо подальшого перебігу процесу. Виявлений прямий кореляційний зв'язок експресії bcl-2 з наявністю метастазів ($r=+0,34$) та прямий коре-

ляційний зв'язок між експресією bcl-2 та раннім розвитком рецидивів ($r=+0,46$). Статус пухлини за bcl-2 мав передбачувальне значення щодо можливої ефективності променевої терапії. Виявлений зворотний кореляційний зв'язок експресії bcl-2 з ефектом проведеної променевої терапії ($r=-0,51$).

4. У всіх випадках плоскоклітинних раків гортані та в тканині їх метастазів у лімфатичні вузли виявлена експресія високомолекулярного цитокератину CK34βE12. Експресія цитокератину 19 спостерігалася в 41,5% випадків. Експресія цитокератинів в плоскоклітинних раках гортані залежала від ступеня диференціювання пухлини. Виявлений прямий кореляційний зв'язок між рівнем експресії високомолекулярних цитокератинів та ступенем гістологічного диференціювання ($r=+0,63$) та зворотний кореляційний зв'язок між експресією CK19 та ступенем гістологічного диференціювання ($r=-0,78$).

5. Отримані дані дозволяють на підставі імуногістохімічного профілю раку гортані уточнювати ступінь диференціювання, прогнозувати його подальший перебіг, ймовірність розвитку метастазів або рецидивів. Це дає можливість виділити групи пацієнтів, які потребують більш ретельного клінічного обстеження й спостереження, більш тривалої й масивної терапії, а також тих хворих, до котрих можуть бути застосовані органозберігаючі методи лікування.

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

Літературні джерела

Абизов Р.А. Онкоотоларингологія. Лекції.- К.: Книга плюс, 2001.- 272 с.

Гасюк А.П., Сидоренко И.И., Проскурня С.А. Особенности митотического режима при плоскоклеточном раке легкого по данным биопсийного материала // Галицкий лікарський вісник.- 2003.- Т.10, №4.- С.121.

Заболотний Д.І. Новоутворення гортані: клініка, діагностика, лікування (аналітично-синтетичний огляд авторефератів дисертацій) // Журнал вушних, носових и горлових хвороб.- 1997.- №5.- С.1-24.

Лукач Е.В. Проблемы ЛОР-онкологии в Украине // Тези доп. IX з'їзду оториноларингологів України.- Київ, 2000. С.272-273.

Пачес А.И. Опухоли головы и шеи. -М.: Медицина, 2000.- 467 с.

Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека.- Казань, 2004.- 452 с.

Троян В.И. Современные аспекты лучевого патоморфоза рака гортани // Журнал вушних,

носових и горлових хвороб.- 2005.- №2.- С.58-66.

Ушаков В.С., Иванов С.В. Рак гортани: современные возможности и перспективы // Практическая онкология.- 2003.- Т.4, №1.- С.56-60.

Шпонька І.С., Гриценко П.О., Ковтуненко О.В. Імуногістохімічний профіль раків гортані з різним клінічним плином та ефектом на проведеної терапії // Морфологія.- 2007.- Т.І, №2.- С.95-101.

Correlation of expression of Ki-67, EGFR, c-erbB-2, MMP-9, p53, bcl-2, CD34 and cell cycle analysis with survival in head and neck squamous cell cancer / Smilek P., Dusek L., Vesely K. et al. // J. Exp. Clin. Cancer Res.- 2006.- Vol.25, №4.- P.549-555.

Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry.- Churchill Livingstone, 2006.- 828 p.

End points for new agents in induction chemotherapy for locally advanced head and neck cancers / Monnerat C., Faivre S., Temam S. et al. // Annals of Oncology.- 2002.- Vol.13.- P.995-1006.

Supracricoid Partial Laryngectomy in the

Гриценко П.А. Прогноз течения плоскоклеточных раков гортани на основании определения иммуногистохимического профиля.

Резюме. Работа посвящена изучению экспрессии молекулярных маркеров в плоскоклеточных раках гортани для прогнозирования дальнейшего клинического течения заболевания. В исследовании проведен анализ экспрессии цитокератинов СК34βЕ12 и СК19, онкобелков p53 и bcl-2, пролиферативной активности (на основе экспрессии Ki-67) в опухолях в зависимости от наличия метастазов, возникновения рецидивов, эффективности проведенного химиолучевого лечения. Определено прогностическое и предсказательное значение каждого маркера биологических свойств. Установлены иммунофенотипы раков гортани с высоким риском метастазирования, рецидивирования, вероятной чувствительностью к химиотерапии и лучевому лечению. Предложен комплекс маркеров, которые позволяют прогнозировать вероятность метастазирования и развития рецидивов на протяжении первого года (экспрессия онкобелков p53 и bcl-2, высокая пролиферативная активность), предсказывать возможную эффективность проведения химиотерапевтического (отсутствие экспрессии онкобелка p53) и лучевого лечения (отсутствие экспрессии онкобелка bcl-2, высокая пролиферативная активность). Полученные данные позволяют на основании иммуногистохимического профиля рака гортани прогнозировать его дальнейшее течение, вероятность развития метастазов или рецидивов. Это дает возможность выделить группы пациентов, которые нуждаются в более тщательном клиническом обследовании и наблюдении, более продолжительной и массивной терапии, а также тех больных, к которым могут быть применены органосохраняющие методы лечения.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак гортани, иммуногистохимические маркеры, пролиферативная активность, онкобелок p53, онкобелок bcl-2, цитокератины.