

**ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ CD44
У ХВОРИХ НА КОЛОРЕКТАЛЬНИЙ РАК
З ПЕРИТОНЕАЛЬНИМИ МЕТАСТАЗАМИ**

¹Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького (м. Львів)

²Державний патологоанатомічний Центр України (м. Хмельницький)

a.revura@gmail.com

Дане дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри онкології та медичної радіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Індивідуалізація лікування та вивчення прогностичних факторів у хворих на місцево-поширений та метастатичний рак: шлунково-кишкового тракту, репродуктивної системи, молочної залози, щитовидної залози, легень та нирки» (2012-2016 рр., № державної реєстрації 0112U000164).

Вступ. Колоректальний рак (КРР) є одним із найпоширеніших онкологічних захворювань в Україні. Розвиток віддалених метастазів після радикального хірургічного чи комбінованого лікування свідчить про відносно несприятливий прогноз. Окрім печінки, яка уражається найчастіше, іншою звичною локалізацією метастазів є очеревина у 19-25% пацієнтів [7, 12].

Останнім часом, в наукових дослідженнях все більше уваги приділяють вивченню особливостей злоякісних пухлин, зокрема і КРР, на молекулярному рівні. Встановлено, що генетична нестабільність призводить до зміни експресії ряду молекул, функціонування яких визначає широкий спектр ефектів. До них відносять агресивність інвазивного росту пухлини, її здатність до метастазування, чутливість до різних видів медикаментного лікування [2, 13].

Важливе значення в розвитку КРР мають молекули адгезії, серед яких CD44 розглядають як потенційно корисний прогностичний фактор. Рівень його експресії в пухлині товстої кишки пов'язаний із глибиною інвазії, ураженням лімфатичних вузлів та метастазуванням в легені [10, 15]. Окрім цього, виявлено достовірний негативний вплив надмірної експресії CD44 на загальне виживання хворих на КРР [14]. Вважають також, що CD44 відповідає за формування контактів між інтраперитонеально дисемінованими злоякісними клітинами та мезотелієм очеревини, однак роль цього маркера клітинної адгезії для розвитку карциноматозу очеревини залишається не цілком з'ясованою [4]. На даний час є небагато наукових даних про клінічне значення CD44 у хворих на КРР з карциноматозом очеревини.

Мета дослідження. Оцінити експресію маркера CD44 в первинній пухлині у хворих на КРР та проана-

лізувати його вплив на ймовірність розвитку карциноматозу очеревини.

Об'єкт і методи дослідження. Для дослідження експресії CD44 відібрано гістологічний матеріал 12 хворих на КРР, яких поділили на дві групи. У першу (дослідну) групу ввійшли 6 пацієнтів, які мали прогресування захворювання у вигляді карциноматозу очеревини після радикального хірургічного чи комбінованого лікування. Другу (контрольну) групу склали 6 хворих на КРР, в яких не було діагностовано карциноматозу очеревини після радикальних хірургічних операцій на протязі диспансерного спостереження тривалістю 23-37 міс.

Рівень експресії CD44 визначали імуногістохімічним методом. Для цього зразки тканини первинної пухлини, фіксованої у формаліні, заливали в парафін. За допомогою роторного мікротому Microm HM 325 (Thermo Scientific, США) із парафінових блоків виготовляли зрізи товщиною 4 мкм. Зрізи тканин наносили на предметні скельця, проводили депарафінування, регідрацію та демаскування антигенів. Для імунної реакції з антигеном використовували первинні моноклональні мишині антитіла до CD44 (клон 1C11H1, Sino Biological Inc, Китай). Візуалізацію реакції виконували за допомогою пероксидазної системи детекції PolyVue з DAB хромогеном (Diagnostic BioSystems, США).

Готові препарати переглядали на світловому мікроскопі Olympus CX31 (OLYMPUS Corp., Японія). Експресію CD44 вважали позитивною при наявності мембранної імуногістохімічної реакції в популяції пухлинних клітин. Рівень експресії маркера характеризували напівкількісно. Враховувалася інтенсивність накопичення хромогену та частка клітин із позитивною реакцією: низький рівень – менше 10% клітин, помірний – 10-50% та високий – більше 50%.

Статистичний аналіз проводили в програмному забезпеченні GraphPad Prism 6.05. Статистичну вірогідність відмінностей експресії маркера CD44 між порівнюваними групами визначали методом точно-го критерію Фішера.

Результати дослідження та їх обговорення

Проаналізовано результати імуногістохімічного дослідження експресії CD44 в тканині первинної пухлини товстої кишки (рис. 1). У першій групі

хворих на КРР з карциноматозом очеревини спостерігалася позитивна реакція на CD44 у злюкисних клітинах в 5 (83,3%) випадках. Переважав низький рівень експресії маркера (рис. 2). Натомість, в другій групі, у 5 (83,3%) хворих на КРР без розвитку карциноматозу очеревини імуністохімічна реакція на CD44 була негативною в пухлинних клітинах (рис. 3) і лише в одного (16,7%) хворого – позитивною. В жодному із досліджених препаратів не відмітили високого рівня експресії маркера. Позитивну реакцію на маркер у стромі та клітинах запального інфільтрату до уваги не приймали. Таким чином, виявлена відмінність в експресії CD44 у хворих на КРР з карциноматозом очеревини та без нього, яка є статистично вірогідною ($p = 0,04$).

Процес метастазування злюкисних пухлин – це складний багатоступеневий процес, опосередкований багатьма молекулярними чинниками, серед яких важливу роль відіграють молекули клітинної адгезії [1,2]. В нормі молекули адгезії відповідають за утворення щільних міжклітинних зв'язків. У пухлині ці зв'язки є дестабілізовані внаслідок зміни експресії молекул адгезії, а дисеміновані злюкисні клітини таким чином набувають здатності формувати нові контакти у місцях розвитку метастазів [4]. Поверхневий мембранний глікопротеїн CD44 є типовим представником молекул адгезії. Ряд наукових публікацій засвідчують, що експресія CD44 зумовлює великий метастатичний потенціал клітин пухлини товстої кишки та корелює з імовірністю розвитку лімфогенних та гематогенних метастазів [11,14,16].

Результати нашого дослідження показали, що розвиток карциноматозу очеревини також асоційований із функціонуванням даної молекули клітинної

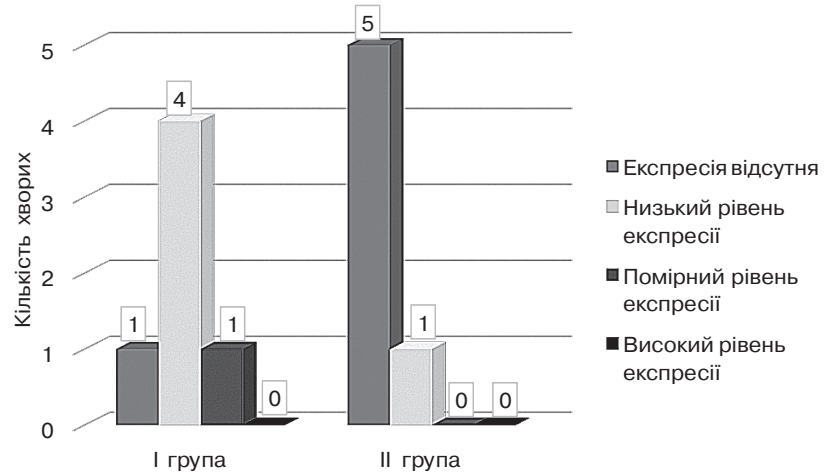


Рис. 1. Розподіл хворих першої та другої груп за рівнем експресії CD44

адгезії, яка, очевидно, відповідає за контакт з мезотелієм очеревини.

Враховуючи останні досягнення у розробці комбінованого лікування на основі циторедуктивних операцій з приводу інтраперитонеальних рецидивів КРР, варто відмітити суттєве покращення показників виживання пацієнтів [3,6,9]. Проте така лікувальна тактика демонструє ефективність при відборі пацієнтів із карциноматозом очеревини на ранніх етапах розвитку, який не має виражених клінічних проявів [5,8]. Визначення молекулярних предикторів карциноматозу очеревини при КРР, зокрема CD44, та формування на їх основі груп високого ризику дає можливість розробити оптимальний індивідуалізований підхід до спостереження пацієнтів після радикального хірургічного лікування з метою ранньої діагностики інтраперитонеальних рецидивів.

Висновки

Експресія маркера CD44 може використовуватись як фактор, який дозволяє прогнозувати розвиток метакронного карциноматозу очеревини після радикальних операцій у хворих на КРР.

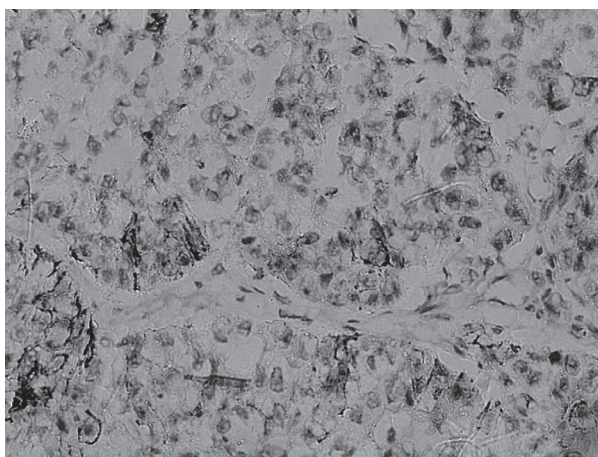


Рис. 2. Позитивна імуністохімічна реакція на CD44 у тканині пухлини сигмоподібної кишки. Низький рівень експресії маркера (оптичне збільшення окуляра 10X і об'єктива 20X).



Рис. 3. Негативна імуністохімічна реакція на CD44 у тканині пухлини верхньоампулярного відділу прямої кишки (оптичне збільшення окуляра 10X і об'єктива 20X).

Вивчення біологічних аспектів розвитку захворювання дозволить поглибити розуміння індивідуальних особливостей клінічного перебігу КРР та розширити можливості лікування хворих.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується проведення досліджень, спрямованих на порівняльний аналіз експресії CD44 в тканині первинної та метастатичних пухлин

та вивчення взаємозв'язків експресії маркера з іншими клініко-патологічними факторами. Результати цих досліджень можуть бути використані для покращення показників виживання хворих на КРР із високим ризиком інтраперитонеального рецидиву, шляхом удосконалення методів лікування та розробки шляхів профілактики розвитку карциноматозу очеревини.

Література

1. Володько Н. А. Експресія глікопротеїну CD44 та його ізоформ в інтрадуктальних та інвазивних раках грудної залози / Н. А. Володько, А. Райнер, М. Рудас // Acta Medica Leopoliensia. – 1996. – Т. II, № 2. – С. 9-13.
2. Грабовий О. М. Колоректальний рак: патогенетична інформативність гістологічного дослідження (огляд літератури) / О. М. Грабовий, С. О. Антонюк, Є. А. Воробей [та ін.] // Клиническая онкология. – 2014. – Т. 4, № 16. – С. 62-69.
3. Ярема Р. Р. Інтраперитонеально дисемінований рак: закінчення ери скептицизму? / Р. Р. Ярема, Т. Г. Фецич, О. Глеен [та ін.] // Онкология. – 2013. – Т. 15, № 2. – С. 88-95.
4. De Cuba E. M. Understanding molecular mechanisms in peritoneal dissemination of colorectal cancer: future possibilities for personalised treatment by use of biomarkers / E. M. de Cuba, R. Kwakman, M. van Egmond [et al.] // Virchows Arch. – 2012. – Vol. 461, № 3. – P. 231-243.
5. Elias D. Peritoneal colorectal carcinomatosis treated with surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy: retrospective analysis of 523 patients from a multicentric French study / D. Elias, F.-N. Gilly, F. Boutitie [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2010. – Vol. 28, № 1. – P. 63-68.
6. Elias D. Complete cytoreductive surgery plus intraperitoneal chemohyperthermia with oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin / D. Elias, J. H. Lefevre, J. Chevalier [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2009. – Vol. 27, № 5. – P. 681-685.
7. Van Gestel Y. R. B. M. Metachronous peritoneal carcinomatosis after curative treatment of colorectal cancer / Y. R. B. M. Van Gestel, I. Thomassen, V. E. P. P. Lemmens [et al.] // Eur. J. Surg. Oncol. – 2014. – Vol. 40, № 8. – P. 963-969.
8. Гойґій D. Extent of Colorectal Peritoneal Carcinomatosis: Attempt to Define a Threshold Above Which HIPEC Does Not Offer Survival Benefit: A Comparative Study / D. Гойґій, A. Souadka, M. Faron [et al.] // Ann. Surg. Oncol. – 2015. – Vol. 22, № 9. – P. 2958-2964.
9. Hompes D. The treatment of peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer with complete cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal peroperative chemotherapy (HIPEC) with oxaliplatin: a Belgian multicentre prospective phase II clinical study / D. Hompes, A. D'Hoore, E. Van Cutsem [et al.] // Ann. Surg. Oncol. – 2012. – Vol. 19, № 7. – P. 2186-2194.
10. Huh J. W. Expression of standard CD44 in human colorectal carcinoma: Association with prognosis / J. W. Huh, H. R. Kim, Y. J. Kim [et al.] // Pathol. Int. – 2009. – Vol. 59, № 4. – P. 241-246.
11. Takeuchi K. Expression of CD44 variant exons 8-10 in colorectal cancer and its relationship to metastasis / K. Takeuchi, A. Yamaguchi, T. Urano [et al.] // Japanese J. Cancer Res. – 1995. – Vol. 86, № 3. – P. 292-297.
12. Verwaal V. J. Long-Term Survival of Peritoneal Carcinomatosis of Colorectal Origin / V. J. Verwaal, S. Van Ruth, A. J. Witkamp [et al.] // Ann. Surg. – 2005. – Vol. 12, № 1. – P. 9-12.
13. Worthley D. L. Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities / D. L. Worthley, B. A. Leggett // Clin. Biochem. Rev. – 2010. – Vol. 31, № 2. – P. 31-38.
14. Wu Q. Evaluation of the correlation of KAI1/CD82, CD44, MMP7 and β -catenin in the prediction of prognosis and metastasis in colorectal carcinoma / Q. Wu, Y. Yang, S. Wu [et al.] // Diagn. Pathol. – 2015. – Vol. 10, № 1. – P. 176-185.
15. Yae T. Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell / T. Yae, K. Tsuchihashi, T. Ishimoto [et al.] // Nat. Commun. – 2012. – Vol. 3. – P. 883-892.
16. Yamaguchi A. Expression of a CD44 variant containing exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients / A. Yamaguchi, T. Urano, T. Goi [et al.] // J. Clin. Oncol. – 1996. – Vol. 14, № 4. – P. 1122-1127.

УДК 616.345-006.6-089.169.1-06:616.381-033.2]-074-078.73

ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ CD44 У ХВОРИХ НА КОЛОРЕКТАЛЬНИЙ РАК З ПЕРИТОНЕАЛЬНИМИ МЕТАСТАЗАМИ

Ревура А. П., Фецич Т. Г., Боднар Л. В., Чуба В. Я.

Резюме. Перитонеальні метастази або карциноматоз очеревини є поширеним типом прогресування захворювання після хірургічного лікування в хворих на колоректальний рак. Останнім часом все більше уваги приділяється імуногістохімічному методу діагностики як доповненню до рутинного гістологічного дослідження видалених пухлин товстої кишки з метою вивчення різних молекулярних маркерів. Відповідно до нашого аналізу, CD44 був експресований в тканині первинної пухлини пацієнтів з перитонеальними метастазами. Експресія CD44 була відсутня в пацієнтів без прогресування хвороби. Отже, цей маркер може використовуватися як предиктивний фактор розвитку метакронного карциноматозу очеревини після радикальних операцій в хворих на колоректальний рак.

Ключові слова: імуногістохімічне дослідження, CD44, колоректальний рак, карциноматоз очеревини, хірургічне лікування.

УДК 616.345-006.6-089.169.1-06:616.381-033.2]-074-078.73

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ CD44 У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ С ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМИ МЕТАСТАЗАМИ

Ревура А. П., Фецич Т. Г., Боднар Л. В., Чуба В. Я.

Резюме. Перитонеальные метастазы или карциноматоз брюшины является распространенным типом прогрессирования заболевания после хирургического лечения у больных колоректальным раком. В по-

следнее время все больше внимания уделяется иммуногистохимическому методу диагностики как дополнению к рутинному гистологическому исследованию удаленных опухолей толстой кишки с целью изучения различных молекулярных маркеров. Согласно нашему анализу, CD44 был экспрессирован в ткани первичной опухоли пациентов с перитонеальными метастазами. Экспрессия CD44 отсутствовала у пациентов без прогрессирования болезни. Следовательно, этот маркер может использоваться как предиктивный фактор развития метастатического карциноматоза брюшины после радикальных операций у больных колоректальным раком.

Ключевые слова: иммуногистохимическое исследование, CD44, колоректальный рак, карциноматоз брюшины, хирургическое лечение.

UDC 616.345-006.6-089.169.1-06:616.381-033.2]-074-078.73

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF CD44 EXPRESSION IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER AND PERITONEAL CARCINOMATOSIS

Revura A., Fetsych T., Bodnar L., Chuba V.

Abstract. Background. Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignancies in Ukraine. The development of distant metastases after radical surgery or combined treatment indicates a relatively poor prognosis. Apart from the liver, which is affected most often, peritoneum is another typical site of metastases in 19-25% of patients. Recently, growing number of studies focus their attention on investigating the characteristics of malignant tumors, including CRC, at the molecular level. Adhesion molecules were shown to be important ones in the development of CRC, among which CD44 is treated as potentially useful prognostic factor. The level of its expression in colon tumors is associated with depth of invasion, lymph node and lung metastasis. Besides, CD44 overexpression was found to have a negative impact on overall survival of patients with CRC. CD44 is responsible for the formation of contacts between intraperitoneally disseminated malignant cells and peritoneal mesothelium. However, the role of this cell adhesion molecule for the development of peritoneal carcinomatosis remains unclear. Data on the clinical significance of CD44 in patients with CRC and peritoneal carcinomatosis are scarce. Recently, immunohistochemical method in addition to routine histology has gained increased attention aiming at evaluation of different molecular markers. The aim of this study was to examine the expression of CD44 marker in primary tumor tissue of patients with colorectal cancer with immunohistochemical analysis, and to analyze potential prognostic significance of CD44 for the development of peritoneal carcinomatosis.

Methods. To investigate the expression of CD44, tissue samples from 12 patients who had had surgery for CRC were enrolled in this study. The cohort was divided into two groups. The first (experimental) group included six patients who had peritoneal carcinomatosis as disease progression after radical surgery or combined treatment. The second (control) group consisted of 6 patients with CRC, who were not diagnosed with peritoneal carcinomatosis after radical surgery during the follow-up period (range 23 – 37 months). The level of CD44 expression was determined by immunohistochemical method. Formalin-fixed, paraffin-embedded blocks of tumor tissues were sliced into 4 μm -thick sections using a microtome. For the detection of CD44 mouse monoclonal antibody to human CD44 (clone ID 1C11H1, Sino Biological Inc) was used as the primary antibody. The immune reaction was visualized with PolyVue detection system and DAB chromogen (Diagnostic BioSystems). The level of CD44 immunoreactivity was assessed based on staining intensity and number of cells with positive staining. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.05 software. We used Fisher's exact test to determine the significance of the differences between proportions.

Results. In the first group of patients with CRC who developed peritoneal carcinomatosis there was a positive immunohistochemical staining for CD44 in malignant cells in 5 (83.3%) cases. Low level expression of the marker prevailed. Instead, in the second group, in 5 (83.3%) patients without peritoneal carcinomatosis there was negative immunohistochemical reaction for CD44 in tumor cells and only one (16.7%) patient had positive reaction. A high level expression of the marker was not noted in any of the investigated tumor tissue samples. Positive staining for the marker in cells of stroma and inflammatory infiltrate did not take into account. Thus, the statistically significant ($p = 0.04$) difference was found in the expression of CD44 in patients with and without peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. Molecular predictors of peritoneal carcinomatosis such as CD44 could greatly facilitate identifying patients at high risk and contribute to tailoring more accurate follow-up schemes, and more adequate individualized treatment.

Conclusions. According to our research, expression of CD44 marker have emerged as have emerged as a useful predictor of metachronous peritoneal carcinomatosis after curative surgery for colorectal cancer. Further research on the biological aspects of the disease will enhance understanding of the individual features of natural history of colorectal cancer and expand opportunities for treatment of patients.

Keywords: immunohistochemical analysis, CD44, colorectal cancer, peritoneal carcinomatosis, surgical treatment.

Рецензент – проф. Бойко Н. І.
Стаття надійшла 25.10.2015 року