

УДК 616-006.61

KI-67 И ERCC-1 КАК ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ГОЛОВЫ И ШЕИ^{1,2}Кутукова С.И., ^{1,2}Манихас Г.М., ¹Яременко А.И., ²Беляк Н.П.¹ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России», Санкт-Петербург, e-mail: dr.s.kutukova@gmail.com;²СПб ГБУЗ «Городской клинический онкологический диспансер», Санкт-Петербург, e-mail: drnpb@mail.ru

В ретроспективном исследовании были проанализированы истории болезни и образцы опухолевой ткани 39 пациентов с ПРГШ (I – III стадия). Все пациенты в рамках получили стандартный протокол комплексного лечения (индукционная химиотерапия (DCF, PF), резекция первичной опухоли и регионарная лимфодиссекция, послеоперационный курс лучевой терапии). Период наблюдения составил с 2009 по 2014 год. Были изучены клинические (стадия процесса) и иммуногистохимические (Ki-67, ERCC-1) показатели, а также их влияние на ОБ и ВВП. У пациентов с I-III стадиями ПРГШ, имевших средне-высокий уровень экспрессии (50-70%) Ki-67 в сочетании с высокой экспрессией ERCC-1, определен высокий риск развития рецидива заболевания и неэффективность препаратов платины в рамках проводимого лекарственного лечения. Сочетание средне-низкой (20-50%) экспрессии Ki-67 и средней ERCC-1, низкой Ki-67 и любой ERCC-1, средней Ki-67 и низкой ERCC-1 коррелировало с хорошим прогнозом ОБ, а применение препаратов платины было эффективным (даже при среднем уровне экспрессии ERCC-1).

Ключевые слова: плоскоклеточный рак слизистой оболочки полости рта, Ki-67, ERCC-1, предиктивная значимость

KI-67 AND ERCC-1 AS PROGNOSTIC MARKERS IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA^{1,2}Kutukova S.I., ^{1,2}Manikhas G.M., ¹Yaremenko A.I., ²Beliak N.P.¹First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg, Saint-Petersburg, e-mail: dr.s.kutukova@gmail.com;²City clinical oncology dispensary, Saint-Petersburg, e-mail: drnpb@mail.ru

In the retrospective study were analyzed cards and tumor samples of 39 patient with HNSCC (I-III stage). All patient were under standard clinical complex protocol (induction chemotherapy (DCF, PF), resection of primary tumor and regional lymph nodes dissection, and postoperative RT). All patients were under our supervision from 2009 to 2014. We studied clinical stage, level of expression such IGH-markers as Ki-67 and ERCC-1 and their correlation with PFT and treatment protocol. Patients with I-III stage HNSCC with medium-high (50-70%) expression of Ki-67 combined with high expression of ERCC-1 had high risk of recurrence and induction chemotherapy can be excluded from treatment options for this cohort. Combination of medium-low (20-50%) expression Ki-67 + medium ERCC-1, low Ki-67 + any ERCC-1, medium Ki-67 + low ERCC-1 had correlation with good prognosis for OS and in this cohort we can use platinum-based induction chemotherapy (even ERCC-1 level of expression is medium).

Keywords: head and neck squamous cell carcinoma, Ki-67, ERCC-1, predictive value

Актуальность исследования

Злокачественные новообразования слизистой оболочки полости рта составляют до 4,5% в структуре онкологической заболеваемости в России [1], и начиная с 80-х годов прошлого столетия этот показатель неуклонно растет. Если в 2003 году в России было выявлено 4600 случаев первичного рака данной локализации, то в 2013 этот показатель уже составил 9833 человек [2].

В настоящее время планирование лечения пациентов со злокачественными опухолями слизистой оболочки полости рта осуществляется в большинстве случаев эмпирическим путем и в основном базируется на «опыте хирурга или онколога». Расширение возможностей лабораторной диагно-

стики, совершенствование хирургической техники, разработка новых химиотерапевтических препаратов и их комбинаций, возможность проведения сочетанного химиолучевого лечения вызывает необходимость индивидуализации подхода к планированию комплексного и комбинированного лечения.

Прогностическая значимость различных факторов изучалась в достаточном количестве исследований [3, 4], однако на сегодняшний момент, к сожалению не найдено единого показателя или сочетания оных, однозначно позволяющие оценить прогноз течения заболевания и риск развития его рецидива [5], что побудило нас к проведению данного исследования. А выбор оптимальной тактики комбинирован-

ного или комплексного лечения является важной стратегической задачей при выборе метода лечения больного плоскоклеточным раком слизистой оболочки полости рта.

Задачи исследования

Наиболее важными свойствами опухолевой клетки являются её пролиферативная активность, скорость деления клетки, влияющая на клиническую картину заболевания, интенсивность роста опухоли, скорость прорастания. Интенсивный рост опухоли определяет её злокачественность.

Прролиферативная активность опухолевой клетки различного генеза является наиболее изучаемым и перспективным свойством для оценки характера опухоли. Определив её закономерность, можно прогнозировать скорость роста опухоли, вероятность наличия субклинической диссеминации, скорость метастазирования, эффективность терапии.

Общепризнанным маркером пролиферативной активности клетки является протеин Ki-67, ген, кодирующий данный белок, локализуется на 10-й хромосоме в положении 10q25ter.

Фермент ERCC-1 относится к группе ферментов, участвующих в эксцизионной репарации ДНК путем удаления нуклеотидов [NER – nucleotide excision repair].

Такие ферменты распознают и удаляют одиночные, ошибочно спаренные нуклеотиды, а также петли длиной в 1-3 нуклеотида. NER человека способна восстанавливать цепи ДНК в случае распознавания поврежденных нуклеотидов.

Эти гены получили название кросс-комплементирующих генов эксцизионной репарации (ERCC – excision repair cross complementing).

Одним из наиболее используемых препаратов в клинической практике при лечении онкологических заболеваний являются препараты платины. Основным механизмом действия препаратов данной группы является прямое повреждение ДНК, точнее, цитостатический эффект цисплатина связан с нарушением функции нитей ДНК и образованием внутри- и межспиральных сшивок, так называемых, аддуктов, в результате чего нарушается структура и подавляется синтез ДНК. В связи с чем, уровень ERCC-1 может являться надежным предиктором ответа опухоли на терапию.

Таким образом, целью нашего исследования стал анализ корреляционной зависимости между уровнем экспрессии маркера пролиферативной активности опухоли и предиктора ответа с эффективностью платиносодержащих схем химиотерапии у па-

циентов с плоскоклеточным раком слизистой оболочки полости рта.

Материалы и методы исследования

В ретроспективном исследовании произведен анализ историй болезни и образцов опухолевой ткани 39 пациентов с плоскоклеточным раком слизистой оболочки полости рта.

У 19 пациентов опухолевый процесс локализовался на слизистой оболочке языка, у 6 – на слизистой оболочке десны, у 3 – на слизистой оболочке щек, у 7 – на слизистой оболочке дна полости рта, у 1 – на слизистой оболочке нижней губы и у 3 – на слизистой оболочке ретро-молярной области. Первичная опухоль у 4 пациента расценивалась как T1, у 5 – T2, у 8 – T3 и у 22 – T4. У 83 пациентов не определялись регионарные метастазы, у 7 пациентов определялись метастазы в 1 регионарный лимфатический узел (N1) и у 32 – в 2 и более лимфатических узла соответственно (N2). Отдаленные метастазы (M) не были зарегистрированы ни у одного пациента, включенного в исследование.

При гистологическом исследовании ткани опухоли у 12 пациентов опухолевый процесс был высокодифференцированный, у 14 – умереннодифференцированный и у 13 – низкодифференцированный.

Всем пациентам в рамках комплексного лечения проводились 2 – 4 цикла предоперационной полихимиотерапии в режиме PF (цисплатин 100 мг/м. кв внутривенно капельно в 1 день + 5-фторурацил 1000 мг/м.кв. внутривенно капельно, 24-часовая инфузия, с 1 по 4 день) с последующим хирургическим удалением опухолевого очага и путей регионарного метастазирования (объем хирургического вмешательства определялся с учетом стадии заболевания и распространенности опухолевого процесса). Завершающим этапом лечения служил послеоперационный курс лучевой терапии до СОД = 60 Гр. После завершения полного курса комплексного лечения пациенты переводились в режим динамического наблюдения с обследованием каждые последующие 3 месяца.

Блоки гистологических препаратов всех пациентов подвергались специализированному исследованию. Помимо стандартного морфологического исследования окрашенных препаратов биоптата, у всех пациентов проводили исследование следующих иммуногистохимических маркеров:

1. Ядерный белковый комплекс Ki-67 – для изучения пролиферативного потенциала опухоли.
2. Перекрестно-комплементирующий фермент эксцизионной репарации ERCC-1 (excision repair cross-complementing) – для изучения потенциала репаративной регенерации поврежденной ДНК.

Иммуногистохимическое исследование во всех случаях проводили на парафиновых срезах толщиной 3-4 микрона с антителами фирмы DAKO в разведении 1:50 для Ki-67 и ERCC-1.

Парафиновые срезы монтировали на стеклах, покрытых поли-L-лизинном.

Парафиновые срезы подвергали депарафинизации в ксилоте (4 раза по 5 минут) и регидратации в спиртах нисходящей концентрации (100%, 96%, 70%) по 5 минут в каждом.

Для иммуногистохимического исследования блокирование эндогенной пероксидазы проводили охлажденной 3% перекисью водорода в течение 10 минут. С целью восстановления антигенной структуры

клеток фиксированного в формалине и заключенного в парафин материала использовали прогревание гистологических срезов на водяной бане в течение 20 минут в 0,01 % цитратном буферном растворе (pH 6.0) для Ki-67 и ERCC-1. Антигенную структуру восстанавливали с помощью микроволновой обработки мощностью 850 Вт в течение 5 минут трижды.

Инкубацию с первичными антителами проводили при комнатной температуре в течение 60 минут.

Для визуализации продуктов иммунной реакции был использован стрептавидин-биотиновый пероксидазный метод (Dako, LSAB + Kit, HRP), в качестве хромогенного субстрата применяли раствор диаминобензидина (Dako, Liquid DAB+), ядра докрашивали гематоксилином.

В качестве негативного контроля использовали срезы, на которые наносили лишь вторичные антитела без предварительного нанесения первичных антител.

Положительным результатом иммуногистохимической реакции считали наличие специфического окрашивания в коричневый цвет.

Для морфометрических исследований опухоли использовался компьютерный анализатор изображения (система анализа изображений Leica Qwin Pro, цифровой фотоаппарат Leica, микроскоп Leica, системный блок на базе процессора Intel, с оперативной памятью 512 МВ).

Подсчет индекса проводили на компьютерном анализаторе изображения «LeicaQWin» при анализе более 1000 клеток. Индекс маркеров вычисляли как соотношение площади специфически окрашенных ядер к площади всех ядер, выраженное в процентах. Индекс маркеров определяли в произвольно взятых полях зрения.

Результаты исследования и их обсуждение

По показателю времени до прогрессирования и общей выживаемости все пациенты были разделены на 2 группы: у 22 пациентов показатель ВДП составил 4,45 месяцев, ОВ – 47,97 месяцев (группа А); у 17 пациентов (группа Б) прогрессирование заболевания не зарегистрировано на момент оценки (август 2015 года).

Группу А составили 19 мужчин и 3 женщины в возрасте от 44 лет до 71 года (медиана возраста составила 56 лет); группу Б – 11 мужчин и 6 женщин в возрасте от 42 до 74 лет (медиана возраста – 58 лет). Превалирующее число пациентов группы А имело II стадию заболевания (8 человек), у 7 пациентов стадия расценена, как IVa, у 6 – как III и у 1 пациента – как I. В группе Б 6 пациентов имели III стадию заболевания, 5 – IVa, 4 – II и 2 – I. У 10 пациентов группы А первичный опухолевый очаг локализовался на слизистой оболочке языка, причём у 1 пациента был поражён его корень, у 9 пациентов – в области дна полости рта, слизистая оболочка щеки, альвеолярной части нижней челюсти и передней небной дужки были поражены у оставшихся 3 пациентов. В группе Б 7 пациентов страдали поражением слизистой оболочки дна по-

лости рта, 6 – слизистой оболочки боковой поверхности языка, у 2 была поражена слизистая оболочка щеки, 1 пациент страдал поражением альвеолярной части нижней челюсти и 1 – ретромолярной области.

При морфологическом исследовании первичного опухолевого очага высокая дифференцировка опухоли зарегистрирована у 9 пациентов группы А и у 10 пациентов группы Б, умеренная – у 10 и 7 больных соответственно, а низкая – только у 3 пациентов группы А. В опухолевой ткани 14 пациентов из каждой группы выявлены признаки ороговения.

В рамках радикального лечения 16 пациентов группы А получили индукционную платиносодержащую химиотерапию с последующим радикальным хирургическим вмешательством и курсом лучевой терапии, 3 пациента облучены комбинированным методом (лучевая терапия с последующим радикальным хирургическим этапом лечения), 2 пациента получили индукционную химиотерапию и были прооперированы, а 1 пациент получил радикальный курс лучевой терапии после лекарственной индукции. В группе Б комплексное лечение получили 14 пациентов: 11 из них прошли все 3 этапа, включающие индукционную химиотерапию, радикальную операцию и курс лучевой терапии, а 3 пациента – получили индукционную химиотерапию и были прооперированы, оставшиеся 3 пациента были радикально полечены комбинированным методом (курс лучевой терапии с последующим хирургическим вмешательством).

Нами были проанализированы уровень экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67 и фермента эксцизионой репарации ДНК – ERCC-1, а также их корреляция с клинико-морфологическими характеристиками пациентов и выбранным протоколом лечения.

Экспрессия Ki-67 обнаружена во всех случаях.

При количественном анализе в первой группе, в первичном материале минимальное значение Ki-67 позитивных клеток в группе Б составило 5%, максимальное – 80%, среднее значение с 95%-ми ДИ составило ${}_{30}^{40}{}_{60}^{60}$ %, в группе А – в первичном материале минимальное значение Ki-67 позитивных клеток 15%, максимальное 60% среднее значение с 95%-ми ДИ, ${}_{25}^{30}{}_{45}^{45}$ %.

Экспрессия ERCC-1 обнаружена также во всех случаях. При количественном анализе при исследовании первичных материалов минимальное значение ERCC-1 позитивных клеток составило 10%, максимальное значение – 90%, среднее значение составило ${}_{40}^{60}{}_{65}^{65}$ %.

В группе А в 77,27% случаев зарегистрирован средне-низкий (20-50%) уровень экспрессии Ki-67, в 18,18% – низкий (менее 20%) и только в 4,55% образцах – высокую экспрессию Ki-67; экспрессия ERCC-1 в 81,82% была высокой (0-33%), 18,18% – средней (34-66%), низкая экспрессия не определена ни у одного обследованного. В группе Б 82,35% пациентов имели средне-высокий уровень экспрессии Ki-67, 11,76% – низкий, и только в 5,88% – высокий ее уровень. Экспрессия ERCC-1 в 70,59 была средней, в 23,53% – низкой и в 5,88% – высокой. Изучение корреляционных взаимоотношений позволило выявить следующие закономерности: 64,71% пациентов группы Б имели сочетание средне-низкой экспрессии Ki-67 и средней экспрессии ERCC-1. 11,76% – средне-низкий показатель Ki-67 и высокий ERCC-1, и только у 3 пациентов выявлена соответственно низкая экспрессия Ki-67 и высокая ERCC-1, средне-низкая экспрессия Ki-67 и низкая ERCC-1, и сочетаний высокий уровень обоих маркеров. В группе А (с зарегистрированной прогрессией заболевания) 59,9% пациентов имели средне-высокий уровень Ki-67 в сочетании с высоким уровнем ERCC-1, 18,18% – низкий Ki-67 и высокий ERCC-1, 13,64% – средне-высокий показатель Ki-67 и средний экспрессию ERCC-1, и по 1 пациенту с высоким уровне Ki-67 в сочетании с высокой или средней экспрессией ERCC-1.

Заключение

Пациенты с I – III стадией плоскоклеточного рака слизистой оболочки полости

рта, имеющие средне-высокую экспрессию маркера клеточной пролиферация Ki-67 в сочетании с высокой экспрессией фермента репарации ДНК ERCC-1 имеют высокий риск прогрессирования заболевания и являются нечувствительными к компонентам индукционной ПХТ, что может служить показанием для исключения лекарственного лечения в рамках I этапа терапии, а начинать целесообразно с хирургического лечения. Комбинация же средне-низкой экспрессии Ki-67 и средней экспрессии ERCC-1, низкой экспрессии Ki-67 и любым уровнем ERCC-1а также средний показатель Ki-67 и низкий – ERCC-1 коррелируют с хорошим прогнозом течения заболевания и у пациентов данной когорты целесообразно проведение индукционной платиносодержащей ПХТ.

Список литературы

1. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2005 г. / Под ред. Давыдова М.И., Аксель Е.М. – 2007.
2. Состояние онкологической помощи населению в 2013 году // под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. – М., 2014.
3. Горбань Н.А., Кудайбергенова А.Г., Панкратов В.А. Прогностическое значение маркеров пролиферативной активности и регуляции апоптоза при плоскоклеточном раке гортани // Архив патологии. – 2013. – № 1. – С. 3–9.
4. Яковлева Л.П., Кропотов М.А., Матякин Е.Г. и др. Анализ прогностических факторов и выбор тактики лечения при раке слизистой оболочки полости рта // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – № 3 (39). – С. 83–85.
5. Дибиров Р.К., Яременко А.И., Кутукова С.И. и др. Молекулярно-генетические факторы прогноза выживаемости пациентов, страдающих раком слизистой оболочки полости рта // Институт стоматологии. – 2013. – № 2 (59). – С. 46–49.