

Н.О. Лукавецький
Б.Т. Білинський

Львівський національний
медичний університет
ім. Данила Галицького, Львів,
Україна

ПРОГНОСТИЧНІ ЧИННИКИ ХІРУРГІЧНОГО ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА РАК СТРАВОХІДНО- ШЛУНКОВОГО СПОЛУЧЕННЯ

Ключові слова: рак
стравохідно-шлункового
сполучення, хірургічне лікування,
прогноз, ТФР- β , CD44.

Резюме. Протягом останніх років у Європі та США зафіксовано вповне зростання захворюваності на рак стравохідно-шлункового сполучення (кардії) на фоні зниження частоти раку дистальних відділів шлунка. Такі зміни пов'язують з поширенням передракових захворювань (особливо хвороби Барретта). Хірургічний метод лікування продовжує залишатися основним засобом в арсеналі клініцистів-онкологів. Однак хірургічне лікування пухлин цієї локалізації є тяжким і супроводжується великою кількістю ускладнень. Метою роботи було визначити прогностичну цінність при лікуванні пацієнтів з пухлинами кардії трансформуючого фактора росту бета (ТФР- β) і CD44. Для імуногістохімічного дослідження їх експресії було взято зразки пухлин оперованих пацієнтів. Як контроль досліджували непухлинні біоптати пацієнтів, що проходили профілактичне ендоскопічне обстеження верхніх відділів травного тракту. Показано, що втрата експресії ТФР- β і/або CD44 суттєво погіршує прогноз; за експресію ТФР- β і CD44 пухлини надкардії і чистої кардії є подібними; пухлини надкардії і чистої кардії (що часто розвиваються на фоні хвороби Барретта) разом і поодиноці відрізняються від пухлин субкардії, які мають іншу експресію досліджених чинників і гірший прогноз.

ВСТУП

Дослідження останніх десятиріч засвідчили зростання захворюваності на злоякісні пухлини стравохідно-шлункового сполучення (ЗПСШС). Це особливо помітно на фоні загальної тенденції до зниження захворюваності на рак шлунка і стабільно невисокої захворюваності (в більшості цивілізованих країн) на рак стравоходу [1]. Вважається, що таке зростання зв'язано з гастроєзофагеальним рефлюксом, хворобою Барретта і, як наслідок, розвитком аденокарцином, які реєструються у все більшій кількості людей. Саме тому виокремлено такий анатомічний регіон травного тракту, як стравохідно-шлункове сполучення або кардію [1–3]. Знаходячись на межі грудної і черевної порожнин кардія є дуже проблематичною для хірургічного лікування. Операції є агресивними і часто супроводжуються хірургічними та загальносоматичними ускладненнями [4]. Результати лікування пухлин цієї локалізації залишають бажати кращого — смертність серед усіх пухлин шлунково-кишкового тракту одна з найвищих, 5-річна виживаність низька, післяопераційна смертність висока, немає ефективних схем хіміотерапії чи променевого лікування (як у нео-, так і в ад'ювантному режимі). Операція і надалі залишається єдиним та наразі найефективнішим способом лікування.

Система прогнозу при лікуванні таких пацієнтів традиційно базується на TNM-стадіюванні та рівні радикальності (R0–2) хірургічного втручання.

Решта прогностичних чинників дискусійна, зокрема, такі як морфологічна форма пухлини чи ступінь диференціації. Навіть однорідна група пацієнтів є прогностично гетерогенною. Тобто традиційна клінічна оцінка пацієнтів є непридатна з точки зору онкологічного прогнозу. Тому існує потреба ідентифікації нових чинників прогнозування. Велику надію покладають на інформацію про морфогенез та біомолекулярні механізми канцерогенезу цих пухлин [5, 6], вважають, що біомолекулярні чинники дозволять структурувати цю групу пацієнтів з точки зору їх прогнозу і відповідно скоригувати тактику їх лікування.

Мета нашого дослідження — оцінити прогностичну цінність експресії у пухлинах CD44 та трансформуючого фактору росту бета (ТФР- β) у пацієнтів, оперованих з приводу ЗПСШС.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідну групу становили 23 пацієнта, які були оперовані у клініці онкології Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького у 2004–2005 рр. з приводу ЗПСШС. Згідно з класифікацією Siewert у 7 пацієнтів була пухлина 1-го типу, у 8 — 2-го і у 8 — 3-го типу. Серед цих пацієнтів було 21 чоловік та 2 жінки віком від 32 до 75 років. Крім 3 пацієнтів з групи Siewert-1, у яких виявлений плоскоклітинний рак, у решти діагностовано аденокарциному. Контрольну групу становили 13 пацієнтів, які проходили амбулаторне ендоскопічне обстеження верхніх відділів

травного тракту з приводу непухлинних хронічних запальних процесів (11 чоловіків і 2 жінки віком 21–72 роки). Усі пацієнти з пухлинами стравоходу чи кардії шлунка були радикально (R0) оперовані, а після операції перебували під амбулаторним спостереженням. Жоден пацієнт не отримував неоі/або ад'ювантного лікування.

Гістопатологічне дослідження. Стадіювання за TNM визначали за критеріями міжнародного протираккового союзу (UICC), 6-те видання. Тип пухлини класифіковано за критеріями міжнародної організації здоров'я (WHO). Гістологічне дослідження проводили після забарвлення препаратів гематоксиліном-еозином. Тип пухлини за Siewert визначали післяопераційно на основі макроскопічного огляду препарату.

Імуногістохімічне (ІГХ) дослідження. Матеріал для дослідження отримували безпосередньо після операції або під час ендоскопічного огляду. ІГХ-дослідження проводили на базі центру онкології Інституту ім. Марії Складовської-Кюрі (Глівіце, Польща), використовуючи МкАТ до CD44 (phagocytic glycoprotein-1, clone DF1485, «DakoCytomation») та ТФР-β («Chemicon International»). Результат реакції для кожного чинника оцінювався за двома показниками: інтенсивність забарвлення (0 — нема; 1 — злегка коричневе; 2 — коричневе; 3 — майже чорне) та поширеність реакції (0 — нема; 1 — до 30%; 2 — 31–70%; 3 — > 70% клітин).

Статистичний аналіз проводили, використовуючи Cox proportional hazards model та U-тест Манна — Уїтні. Вживаність вираховували за допомогою методу Каплана — Мейєра, достовірність різниці визначали за тестом log rank. Весь статистичний аналіз проводили на персональному комп'ютері за допомогою програми Statistica 6.0 (StatSoft Inc 2001).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За даними ІГХ-дослідження експресія ТФР-β виявлена у 82,2% пацієнтів дослідної групи (рис. 1), експресія CD44 — у 89,3% (рис. 2).

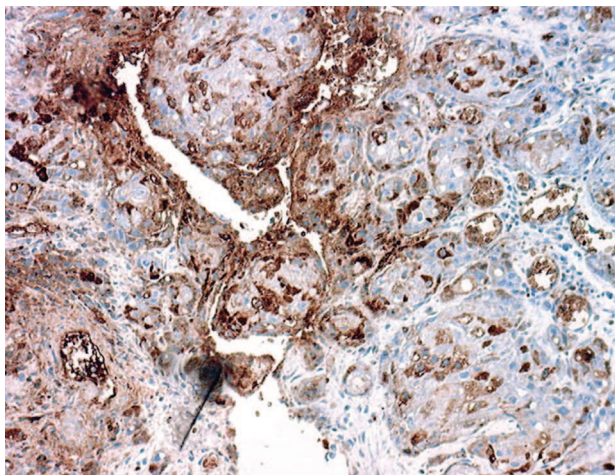


Рис. 1. Експресія ТФР-β у клітинах плоскоклітинного раку (інтенсивність — 2, поширеність — 3).

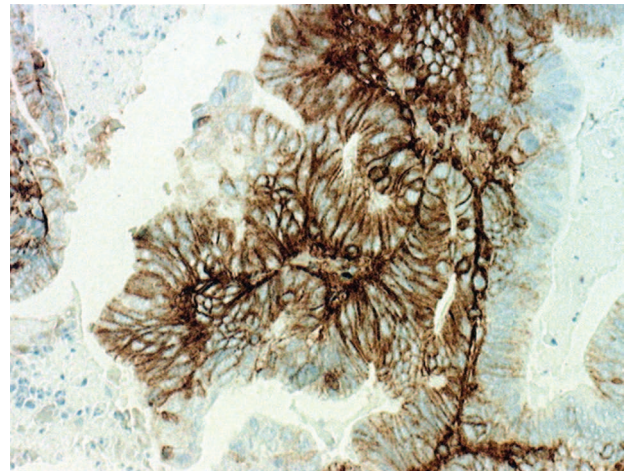


Рис. 2. Експресія CD44 у аденокарциномі (інтенсивність — 3, поширеність — 3)

Порівняння цих результатів із контролем (таблиця) демонструє несуттєву різницю в експресії ТФР-β (інтенсивність і поширеність $p > 0,05$) і статистично достовірну — для показника CD44 (поширеності $p < 0,05$).

Таблиця

Порівняння експресії ТФР-β і CD44 у пацієнтів дослідної і контрольної груп

Показник	Умовний сумарний показник		p	Кількість пацієнтів, n	
	дослід	контроль		дослід	контроль
ТФР-інтенсивність	407,0	259,0	0,54	23	13
ТФР-поширеність	432,5	233,5	0,82	23	13
CD44-інтенсивність	395,0	271,0	0,32	23	13
CD44-поширеність	363,0	303,0	0,04	23	13

Оскільки експресія ТФР-β і CD44 відображає складні біостосунки між пухлиною та організмом і його системами, порівняння різних груп за цим феноменом не завжди є однозначним. Тому ми застосували U-тест Манна — Уїтні з надією, що більш глибокий математичний аналіз дозволить розкрити закономірності, які не виявляються при традиційному статистичному аналізі.

Аналіз у порівнянні з контролем інтенсивності ($p = 0,224708$) і поширеності ($p = 0,11236$) реакції при визначенні експресії ТФР-β не продемонстрував прогностичної цінності. При детальному аналізі в межах дослідної групи виявлено, що у пацієнтів, у яких фактично відсутня експресія ТФР-β (0 — інтенсивність, 0 — поширеність), — 17,8% випадку, медіана виживаності (МВ) становила 7 міс. Наявність хоча б мінімальної експресії ТФР-β суттєво (вдвічі) підвищувала МВ (рис. 3а, б).

Аналіз експресії CD44 несподівано виявив аналогічні до ТФР-β результати: значно вища (в 2,4–3,0 рази) МВ, тобто кращий прогноз при навіть мінімальному ступені експресії CD44 (як за інтенсивністю реакції, так і за поширеністю) (рис. 4а, б).

Порівнюючи експресію ТФР-β та CD44 у пухлинах кардії 2-го і 3-го типу за Siewert, ми виявили, що за інтенсивністю реакції ТФР-β і CD44 вони відрізняються між собою (нижча експресія при 3-му типі, $p < 0,001$). Водночас між 1-м і 2-м типом пухлин за Siewert такої відмінності немає. Показано кращу виживаність пацієнтів з пухлинами Siewert-2 (МВ —

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

20 міс) порівняно з Siewert-1 (18 міс) та Siewert-3 (15,5 міс, $p = 0,047$).

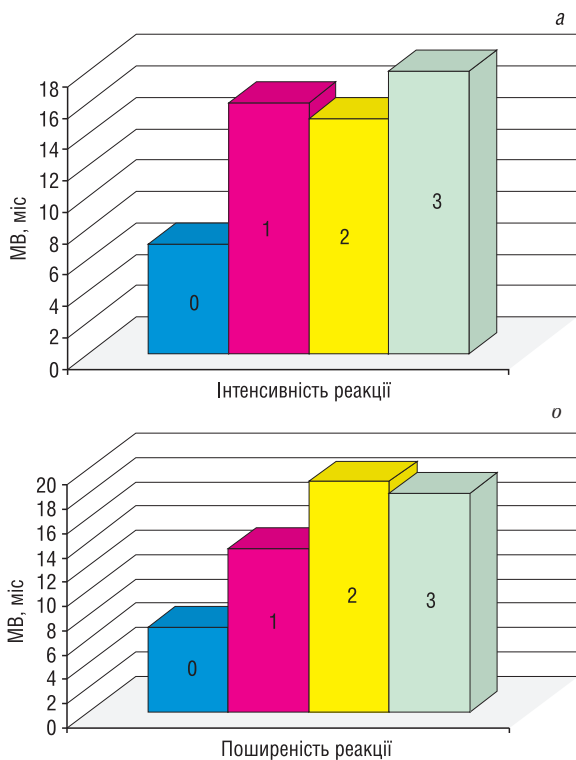


Рис. 3. МВ пацієнтів із ЗПСШС залежно від експресії ТФР-β: розподіл за інтенсивністю (а) і поширеністю (б) реакції

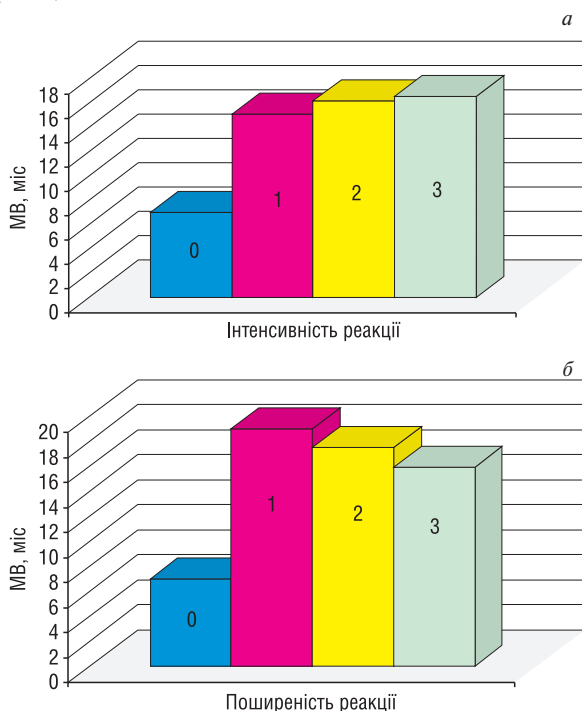


Рис. 4. МВ пацієнтів із ЗПСШС залежно від експресії CD44: розподіл за інтенсивністю (а) і поширеністю (б) реакції

Незважаючи на доволі великий масив інформації про біологію пухлин кардії та особливості їх клінічного протікання система прогнозу результатів лікування залишається недосконалою. Традиційні медико-біологічні чинники не мають прогно-

тичного значення, а пошук нових поки що не приніс результатів [1–3]. Фактично тільки стадіювання за системою TNM є доказаним прогностичним чинником [4]. Таким чином, прогноз при ЗПСШС є дуже загальним і майже не впливає на вибір тактики лікування таких пацієнтів.

Очевидно, що така ситуація не влаштовує клініцистів. Однак пошук нових прогностичних чинників серед клінічних характеристик не приніс бажаних результатів. Тому дослідження спрямували на вивчення молекулярно-біологічних характеристик цих пухлин як можливого джерела нової інформації про фактори прогнозу пацієнтів [7–10]. Увагу дослідників привернув ТФР-β — поліпептидний фактор росту, що регулює проліферацію, диференціацію, міграцію клітин і апоптоз [11–13]. Імуносупресор «від природи» ТФР-β супресує клітинний ріст і запалення, однак він може втрачати цю здатність, що відобразиться клітинною проліферацією, прогресуванням пухлинного росту і глибокою імуносупресією. Зауважимо, що експресія ТФР-β є підвищеною не тільки при пухлинах. Встановлено, що рівень ТФР-β підвищується у пацієнтів з виразкою шлунка, а також і в нормальній тканині [13, 14]. Очевидно, це підтверджує тезу про головну роль ТФР-β як інгібітора проліферації, так званого стримуючого фактора. Проліферація нетрансформованих клітин слизової оболонки шлунка, а також і карциноми шлунка під впливом ТФР-β інгібується. Підвищений рівень експресії ТФР-β закономірно спостерігається в обох випадках і не може свідчити лише про канцерогенез. Отримані нами результати дають підстави висловити припущення, що TGF-β експресується як у нормальних непухлинних тканинах, так і в тканині пухлини; в процесі пухлинної прогресії відбувається зрив експресії ТФР-β і це суттєво погіршує прогноз.

Майже ідентичні результати отримано нами і для CD44. Однак існуючі знання про біологію CD44 змушують шукати інше пояснення таких клінічних результатів. CD44 — трансмембранні глікопротеїни, що відповідають за адгезію до ендотелію і хомінг лімфоцитів у венах лімфатичних вузлів та функціонують як рецептор до гіалуронату [15–17]. У процесі малігнізації експресія стандартного CD44 (і деяких його ізоформ) знижується або втрачається. А під час інвазії інтерстиційної сполучної тканини експресуються рецептори до гіалуронату (CD44). Також CD44 залучається для формування пухлинних емболів, що циркулюють у крові. Таким чином CD44 визначає метастатичний потенціал злоякісних пухлин [18–20]. Зауважимо, що на сьогодні одностайна думка щодо ролі CD44 відсутня — деякі автори вважають, що експресія цього маркера не відрізняється на різних стадіях, не корелює з кількістю уражених лімфатичних вузлів і радикальністю операції (при аденокарциномах справжньої кардії) [21, 22]. Натомість представлені і протилежні дані — доведено, що CD44 є незалежним прогностичним фактором при

наявності лімфангіозу чи метастазів у лімфатичних вузлах аденокарцином Барретта [23, 24]. Отож ми припускаємо, що в процесі малігнізації зростає кількість CD44 (який є і в нормальній тканині), а в певний момент відбувається зрив його експресії і це є суттєвим погіршенням прогнозу. Зокрема, місцевий ріст пухлини супроводжується зростанням експресії CD44, а генералізація процесу супроводжується втратою його експресії.

ВИСНОВКИ

1. У пацієнтів із ЗПСШ втрата експресії ТФР- β і/або CD44 різко погіршує прогноз.
2. За показниками експресії ТФР- β і CD44 пухлини надкардії і чистої кардії, які часто розвиваються на фоні передраку — хвороби Барретта, є подібними між собою.
3. Пухлини надкардії і чистої кардії відрізняються від пухлин субкардії, які мають іншу палітру експресії досліджених чинників і гірший прогноз.

ЛІТЕРАТУРА

1. Peitz U, Malfertheiner P. Barrett carcinoma — diagnosis, screening, surveillance, endoscopic treatment, prevention. *Z Gastroent* 2007; **45** (12): 1264–72.
2. Omluo JM, et al. Extended transthoracic resection compared with limited transhiatal resection for adenocarcinoma of the mid/distal esophagus: five-year survival of a randomized clinical trial. *Ann Surg* 2007; **246** (6): 992–1000.
3. Hamilton SR, et al. World health organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumor of the digestive system. Lyon: IARC Press, 2000. 856 p.
4. Ганул ВЛ, Киркилевский СИ. Рак пищевода: Руководство для онкологов и хирургов. Киев: Книга Плюс, 2003. 125 с.
5. Koppert L, et al. The molecular biology of esophageal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2005; **92** (4): 169–90.
6. Місюна П та ін. Рефлюксна хвороба стравоходу. Львів: Галицька видавничя спілка, 2004. 176 с.
7. Kim MA, et al. Clinicopathologic and protein expression differences between cardia carcinoma and noncardia carcinoma of the stomach. *Cancer* 2005; **103** (5): 1439–46.
8. Driessen A, et al. Are carcinomas of the cardia oesophageal or gastric adenocarcinomas? *Eur J Cancer* 2003; **39** (5): 2487–94.
9. Ichikura T, et al. Is adenocarcinoma of the gastric cardia a distinct entity independent of subcardial carcinoma? *World J Surg* 2003; **27** (5): 334–8.
10. Ikeguchi M, et al. Gene expression levels of cytokines in peritoneal washings from patients with gastric cancer. *Tumor Biol* 2004; **25** (4): 117–21.
11. Blobe GC, et al. Role of transforming growth factor- β in human disease. *N Engl J Med* 2000; **342** (4): 1350–8.
12. Souchelnytskyi S. Transforming growth factor- β signaling and its role in cancer. *Exp Oncol* 2002; **24** (3): 3–12.
13. Фильченков АА и др. Трансформирующие факторы роста. Киев: Наукова думка, 1994. 292 с.
14. Miyazono K, et al. Regulation of TGF- β signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci* 2003; **94** (9): 230–4.
15. Goodison S, et al. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* 1999; **52** (2): 189–96.
16. Aruffo A, et al. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; **61** (6): 1303–13.
17. Jankowski JA, et al. Molecular evolution of the metaplasia — dysplasia — adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Pathol* 1999; **154** (8): 965–73.

18. Heider KH, et al. Differential expression of CD44 splice variants in intestinal- and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res* 1993; **53** (7): 4197–203.

19. Joensuu H, et al. Lymphocyte homing receptor (CD44) expression is associated with poor prognosis in gastrointestinal lymphoma. *Br J Cancer* 1993; **68** (6): 428–32.

20. Matsumura Y, Tarin D. Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 1992; **340** (8): 1053–8.

21. Gotoda T, et al. Expression of CD44 variants and prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Gut* 2000; **46** (6): 14–9.

22. Lagorce-Pages C, et al. Expression of CD44 in premalignant and malignant Barrett's oesophagus. *Histopathology* 1998; **32** (5): 7–14.

23. Bottger TC, et al. Expression of CD44 variant proteins in adenocarcinoma of Barrett's esophagus and its relation to prognosis. *Cancer* 1998; **83** (7): 1074–80.

24. Castella E, et al. Expression of CD44H and CD44v3 in normal oesophagus, Barrett mucosa and oesophageal carcinoma. *J Clin Pathol* 1996; **49** (3): 489–92.

PROGNOSTIC FACTORS IN SURGICAL TREATMENT OF PATIENTS WITH CARCINOMA OF ESOPHAGOGASTRIC JUNCTION

N.O. Lukavetsky, B.T. Bilynsky

Summary. *In recent years, Europe and US have demonstrated consistent increases in the frequency of carcinoma of esophagogastric junction (cardia) and a reduction of the frequency of carcinoma in the distal stomach. These changes are attributed to the increased occurrence of pre-cancer diseases (especially, Barrett's disease). Surgical treatment continues to be the main approach applied by clinicians. However, surgical treatment of tumors of this localization is difficult and is followed by numerous complications. The goal of this paper was to determine the prognostic value of transforming growth factor-beta TGF- β and CD44 in the treatment of patients with cardia tumors. Their expression was assessed by way of immunohistochemical assay of tumor samples of operated patients. Non-tumor biopsies of patients who were subjected to prophylactic upper gastrointestinal endoscopy were used as control. It was found that diminished expression of TGF- β and/or CD44 is a factor of unfavorable prognosis; tumors of epicardia and cardia per se are similar in terms of TGF- β and CD44 expression; tumors of epicardia and cardia per se (which frequently follow Barrett's disease) differ from tumors of subcardia, which feature a different expression pattern of the investigated factors and more unfavorable prognosis.*

Key Words: carcinoma of esophagogastric junction, surgical treatment, prognosis, TGF- β , CD44.

Адреса для листування:

Лукавєцький Н.О.
79014, Львів, вул. Переможна, 7
E-mail: nazar_1@yahoo.com
lukavetsky@ukr.net