

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ДОНЕЦЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ім. М. ГОРЬКОГО

КОЛЕСНИК ОЛЕКСІЙ ПЕТРОВИЧ

УДК: 616.351-006.6-036.17:616-018.1]-07

КЛІНІКО-МОРФОЛОГІЧНІ КРИТЕРІЇ ПРОГРЕСУВАННЯ РАКУ ПРЯМОЇ КИШКИ

14.01.07 – онкологія

АВТОРЕФЕРАТ  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

Донецьк – 2007

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України.

**Науковий керівник:**

доктор медичних наук, професор Паламарчук Ігор Дмитрович, Запорізький державний медичний університет, професор курсу онкології.

**Офіційні опоненти:**

- доктор медичних наук, професор Вінник Юрій Олексійович, Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України, професор кафедри онкохірургії та онкогінекології;
- доктор медичних наук, доцент Борота Олександр Васильович, Донецький державний медичний університет ім. М. Горького МОЗ України, професор кафедри онкології, променевих методів діагностики і лікування.

**Провідна установа:** Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького, відділ механізмів протипухлинної терапії, НАН України, м. Київ.

Захист відбудеться “ 27 ” \_\_червня\_\_ 2007 р. об 11 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 11.600.01 у Донецькому державному медичному університеті ім.М.Горького за адресою: 83003, Україна, м. Донецьк, пр. Ілліча, 16.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Донецького державного медичного університету ім. М. Горького за адресою: 83003, Україна, м. Донецьк, пр. Ілліча, 16.

Автореферат розісланий “ 24 ” \_\_травня\_\_ 2007 року.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

доктор медичних наук, професор

І.І. Солдак

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Рак прямої кишки (РПК) посідає шосте рангове місце в структурі захворюваності на злоякісні новоутворення населення України. У 25% пацієнтів, при первинному зверненні, діагностують занедбані випадки захворювання РПК. Локальні рецидиви після оперативного втручання виникають у 4-40%, а віддалені метастази – у половини хворих на РПК. Вживання таких пацієнтів незадовільне і складає, в середньому, від 4 до 13 місяців (Федоренко З.П., із співав., 2004, Ferlay J., at al., 2004, Andre T., at al., 2004).

Покращити результати лікування хворих на РПК можливо завдяки впровадженню індивідуального підходу до призначення передопераційної променевої терапії (ППТ) та ад'ювантної хіміотерапії (АХТ). Щоб виділити групи хворих на РПК зі швидким прогресуванням захворювання, необхідно проаналізувати клініко-морфологічні критерії хворого та пухлини (Hoff P.M., at al., 2001, Graziano F., at al., 2003, Cascinu S., at al., 2003). На сучасному рівні розвитку науки, дослідження лише диференціювання пухлини (як маркера агресивності РПК) не задовольняє лікарів-онкологів, тому що, навіть при високому диференціюванні зустрічається швидке прогресування хвороби. Тому потрібне визначення молекулярних маркерів прогресування РПК (Jatzko G.R., at al., 1999, Hasebe T., at al., 2000, He W.J., at al., 2002, Yamac D., at al., 2002, Buchmann P., 2003). Використання імуногістохімічних методів дало змогу широкого застосування великої кількості маркерів, які різнобічно характеризують пухлину (Глузман Д.Ф., із співав., 1999). Але залишається актуальним питання кількісного, об'єктивного аналізу отриманих даних та вірогідного зв'язку цих маркерів з прогресуванням РПК (Schwandner O., at al., 2002, Meterissian S.H., at al., 2001).

У зв'язку з цим, нами проведена робота щодо визначення прогностичного значення додаткових морфологічних критеріїв прогресування РПК (показників проліферативної активності (ПА) та експресії індукованої синтази оксиду азоту (ІСОА)). Проаналізований зв'язок між клінічними (стать, вік, наявність супутньої патології, стадія, локалізація, довжина пухлини, вид проведеного лікування) та морфологічними критеріями прогресування (морфологічне диференціювання пухлини, показники проліферативної активності (ПА) та експресії індукованої синтази оксиду азоту (ІСОА)). Визначення ПА та експресії ІСОА проведено за допомогою непрямого імунофлюоресцентного методу з використанням системи комп'ютерного аналізу зображення. Виділені групи хворих на РПК, яким необхідне призначення ППТ та АХТ. Розроблена лінійна дискримінантна модель класифікації, яка допомагає визначити прогноз у хворих на РПК.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дослідження, результати яких відображено в цій роботі, виконувалися в рамках науково-дослідної роботи курсу онкології Запорізького державного медичного університету “Вивчення шляхів поліпшення якості життя

хворих із занедбаним пухлинним процесом”, № державної реєстрації 0103 U 003928. Автор брав безпосередню участь у визначенні додаткових показників прогресування РПК та дослідженні їх зв'язку з виживанням хворих.

**Мета дослідження.** Підвищити ефективність лікування хворих на рак прямої кишки шляхом індивідуалізації призначення передопераційної променевої терапії та ад'ювантної хіміотерапії за допомогою додаткових критеріїв прогресування.

**Задачі дослідження:**

1. Визначити кількісні значення показників проліферативної активності та експресії індукованої форми синтази оксиду азоту та їх зв'язок із виживанням хворих на рак прямої кишки.
2. Вивчити взаємозв'язок клінічних характеристик та диференціювання пухлини у хворих на рак прямої кишки з показниками проліферативної активності та експресії індукованої форми синтази оксиду азоту.
3. Визначити найбільш значущі прогностичні фактори виживання у хворих на рак прямої кишки та побудувати математичну модель класифікації.
4. Враховуючи кількісні дані проліферативної активності, експресії індукованої форми синтази оксиду азоту та виживання хворих на рак прямої кишки виділити групу пацієнтів, яким необхідне призначення передопераційної променевої терапії.
5. З'ясувати, у хворих з якими показниками проліферативної активності та експресії індукованої форми синтази оксиду азоту в пухлині необхідне призначення ад'ювантної хіміотерапії.

*Об'єкт дослідження:* хворі на рак прямої кишки.

*Предмет дослідження:* кількісні показники проліферативної активності та експресії індукованої форми синтази оксиду азоту пухлини у хворих на РПК. Зв'язок додаткових критеріїв із клінічними характеристиками хворих, диференціюванням пухлини, ефективністю передопераційної променевої терапії, ад'ювантної хіміотерапії та виживанням хворих на рак прямої кишки.

*Методи дослідження:* при обстеженні хворих на РПК використано клінічний, інструментальний, рентгенологічний методи дослідження, що дозволило оцінити стадію захворювання та обрати план подальшого лікування хворих. Показники морфологічного типу, диференціювання пухлини, її ПА, експресія ІСОА вивчались з використанням гістологічних, імуногістохімічних методів, та кількісного аналізу зображення в автоматичному режимі, що є сучасним методом оцінки морфологічної будови пухлини. Кількісний аналіз результатів дослідження проводився методами біостатистики, для побудови багатовимірних математичних моделей були застосовані методи нейромережевого моделювання.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше проведене кількісне визначення показників ПА та експресії ІСОА у карциномі прямої кишки та оцінений їх зв'язок із виживанням хворих на РПК. Показано відсутність зв'язку між показниками площі ядра проліферуючих клітин, вмісту та концентрації ЯАПК в ядрах, площі цитоплазми ІСОА позитивних клітин, вмісту та концентрації ІСОА та виживанням у хворих на РПК. Встановлено, що існує слабкий кореляційний зв'язок ( $\rho < 0,3$ ) між стадією раку прямої кишки, морфологічними диференціюванням пухлини, кількістю проліферуючих клітин та експресією індукованої синтази оксиду азоту.

Доведено, що найбільш значущими в прогностичному відношенні є локалізація пухлини у прямій кишці, стадія захворювання, індекс проліферації та кількість індукованої форми синтази оксиду азоту у карциномі прямої кишки.

Вперше встановлено зв'язок показників індексу проліферації та експресії індукованої форми синтази оксиду азоту з ефективністю ППТ та АХТ.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблена методика визначення показників ПА та експресії ІСОА у злоякісних пухлинах прямої кишки за допомогою непрямой реакції імунофлюоресценції та системи комп'ютерного аналізу зображення Vidas-386. За допомогою методів дискримінантного аналізу побудована математична модель, що дозволяє прогнозувати виживання хворих на рак прямої кишки. Виділені групи ризику хворих із швидким прогресування раку прямої кишки. Розроблені рекомендації, щодо проведення ППТ середніми фракціями у дозі СОД=20-25 Гр з урахуванням клініко-морфологічних критеріїв прогресування. Розроблені рекомендації, щодо проведення АХТ у хворих на РПК на основі клініко-морфологічних критеріїв прогресування.

Впровадження результатів дослідження здійснено в обласному онкологічному клінічному диспансері м. Запоріжжя, Мелітопольському міжрайонному онкологічному диспансері, онкологічному відділенні Бердянської міської лікарні, у навчальному процесі на курсі онкології Запорізького державного медичного університету (акти впровадження від 04.09.2006, 07.09.2006, 15.09.2006, 28.09.2006, 02.10.2006).

**Особистий внесок здобувача.** Автор брав участь в обстеженні 100% та лікуванні 30% хворих. Самостійно виконано збір, вивчення та аналіз клінічного матеріалу, віддалених результатів лікування, проведена статистична обробка одержаних результатів. Здобувачем визначено показники ПА та експресії ІСОА у злоякісних пухлинах прямої кишки за допомогою імуногістохімічного методу та системи комп'ютерного аналізу зображення Vidas-386. При написанні дисертації не були використані ідеї та розробки співавторів публікацій.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали цієї роботи були представлені на обговорення на науково-практичній конференції з міжнародною участю, "Онкологія-XXI" (Київ, 9-10 жовтня 2003 р.); VI конференції молодих онкологів України „Сучасні проблеми

експериментальної онкології” (Київ, 4-5 грудня 2003 р.); 5-й міжнародній конференції студентів і молодих вчених „Молодь – медицині майбутнього” (Дніпропетровськ, 16-18 вересня 2004 р.); 67-й підсумковій конференції СНТ ім. М.Д. Довгялло „Актуальні проблеми клінічної, експериментальної, профілактичної медицини та стоматології” (Донецьк, 7-9 квітня 2005 р.); Науково-практичній конференції з міжнародною участю, “Від фундаментальних досліджень – до прогресу в медицині” (Харків, 18-20 листопада 2005 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених “Актуальні питання медицини і фармації - 2005” (Запоріжжя, 5 квітня 2005 р.); VII-й конференції молодих онкологів України „Сучасні проблеми експериментальної і клінічної онкології” (Київ, 2-3 лютого 2006 р.); IV-му з’їзді Українського товариства терапевтичних радіологів та радіаційних онкологів (Алушта, 27-29 вересня 2005 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених “Актуальні питання медицини і фармації - 2006” (Запоріжжя, 7 квітня 2006 р.); XI з’їзді онкологів України (Судак, 29 травня - 2 червня 2006 р.).

**Публікації.** Результати дисертації опубліковано у 3 статтях наукових журналів, 3 статтях наукових збірок, 8 тезах конференцій. За матеріалами дисертації отримано 2 деклараційні патенти України на винахід.

**Структура і обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 134 сторінках комп’ютерного тексту і складається зі вступу, 7 розділів, висновків, списку використаних джерел, який містить 275 джерел вітчизняних та іноземних авторів на 27 сторінках. Робота ілюстрована 27 таблицями на 19 сторінках та 35 рисунками на 28 сторінках.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Встановлено, що тривалість життя хворих на РПК варіює в широких межах, тому виявлення факторів, з якими асоціюється прогноз цього захворювання, є важливою задачею. Ідентифікація факторів, які впливають на тривалість життя, дасть змогу, з певною вірогідністю, прогнозувати виживання конкретного хворого і допоможе у виборі методу лікування.

Відомо, що однією з найважливіших морфологічних характеристик пухлини є її ступінь диференціювання. Виживання погіршувалось із зниженням ступеня диференціювання пухлин (рис. 1). Статистично вірогідно виживання хворих із низькодиференційованими пухлинами нижче, ніж виживання хворих із високодиференційованими пухлинами ( $p=0,04$ ).

Однак, при схожому морфологічному диференціюванні пухлини прогноз у різних хворих може бути зовсім різним. Саме тому проведено дослідження впливу на прогноз показників ПА та експресії ІСОА. ІІІ та концентрація ЯАПК у пухлині вірогідно відрізняються у хворих на РПК, що пережили трьохрічний період спостереження від аналогічних показників у пухлинах хворих на РПК, які загинули від прогресування хвороби впродовж зазначеного терміну ( $p<0,05$ ).

Рис. 1. Вживання хворих на РПК у залежності від морфологічного диференціювання пухлин

Площа ядра та вміст ЯАПК у ядрах проліферуючих клітин РПК вірогідно не відрізнялись у тих, що вижили, та загиблих хворих. Всі хворі на РПК (за допомогою log-rang критерію) були розділені на пацієнтів з ІП пухлини  $\leq 1000 \times 10^3 \text{ мм}^3$  та  $> 1000 \times 10^3 \text{ мм}^3$ . Нами відмічена значна різниця у вживанні хворих на РПК з ІП  $\leq 1000 \times 10^3 \text{ мм}^3$  та хворих, у яких ІП пухлин перевищував  $1000 \times 10^3 \text{ мм}^3$  (рис.2,  $p < 0,05$ ).

Рис. 2. Вживання хворих на рак прямої кишки з різними показниками індексу проліферації

Другий показник ПА, що вивчався, – це площа ядра (ПЯ) проліферуючих клітин. Нами досліджено вплив ПЯ проліферуючих клітин на вживання хворих із РПК. Як і у випадку з ІП, всі хворі за допомогою log-rang критерію були розділені на дві групи. В групі хворих з площею ядра проліферуючих клітин  $\leq 29 \text{ мкм}^2$  25-й процентіль вживання склав 9,6 місяців, медіана вживання не досягнута. У хворих з площею ядра клітин, що діляться  $> 29 \text{ мкм}^2$ , 25-й процентіль вживання також склав 9 місяців. Таким чином, не відмічається залежності між вживанням хворих на РПК та ПЯ проліферуючих клітин ( $p = 0,24$ ).

Окрім кількості проліферуючих клітин та їх ПЯ нами досліджено вміст та концентрацію ЯАПК у ядрах клітин, що діляться. Відмічено, що рівень вмісту та концентрації ЯАПК не впливає на вживання хворих на РПК ( $p = 0,36$ ,  $p = 0,80$ ).

Одним із морфологічних маркерів, що характеризують властивості пухлини, є ІСОА. Висока експресія ІСОА вказує на високий метастатичний потенціал РПК. Однак дані про зв'язок рівня експресії ІСОА в пухлині та вживання хворих на РПК суперечливі. Нами проаналізовано вплив показників експресії ІСОА на прогноз у хворих із РПК.

Проведено порівняння показників експресії ІСОА у пухлинах прямої кишки тих, які вижили, та загиблих хворих, що спостерігалися впродовж 36 місяців. Серед хворих, які вижили ( $n = 118$ ), у 47 (39,8%) (ВІ 31,1%–48,9%) відмічається експресія ІСОА, а у 71 (60,2%) пацієнта експресії ІСОА не відмічено. У хворих, що загинули від прогресування РПК, експресія ІСОА відмічалась у 58 (92,1%) (ВІ 84,0%–97,5%) пацієнтів, у 5 хворих (7,9%) експресії ІСОА не відмічено.

Прогноз також залежить від інтенсивності експресії ІСОА. У хворих на РПК з кількістю клітин пухлини, що експресують, ІСОА більший за  $700 \times 10^3 \text{ мм}^3$ , вживання значно гірше, ніж у хворих на РПК, де експресія ІСОА в пухлині менша за  $700 \times 10^3 \text{ мм}^3$  (рис. 3,  $p < 0,001$ ).

Рис. 3. Виживання хворих на рак прямої кишки у залежності від кількості клітин, що експресують ІСОА

Проаналізовано вплив площі цитоплазми клітин, що експресують ІСОА, вмісту та концентрації ІСОА у клітині на виживання хворих на РПК. Не відмічено впливу вище означених показників на прогноз хворих із РПК ( $p > 0,05$ ).

Проведено дослідження зв'язку між клінічними та морфологічними критеріями прогресування РПК, з метою виділення найбільш важливих маркерів прогнозу та факторів, від яких вони залежать.

Так, із збільшенням довжини пухлини підвищується стадія хвороби, адже пухлина з часом інфільтрує підслизовий, м'язовий, субсерозний, серозний шари та поширюється на сусідні органи ( $p < 0,05$ ). Також, із збільшенням довжини та стадії зменшується морфологічне диференціювання РПК ( $p < 0,05$ ). Збільшення стадії призводило до зменшення кількості радикально пролікованих хворих на РПК та збільшення кількості симптоматичних операцій ( $p < 0,05$ ).

Важливим фактором прогнозу є ПА РПК. Нами виявлена наявність слабкого кореляційного зв'язку між ІІ та ступенем морфологічного диференціювання РПК, а також довжиною пухлини. Так, із зменшенням диференціювання та збільшенням довжини РПК збільшується ІІ пухлини ( $p < 0,05$ ). Виявлено слабкий кореляційний зв'язок між стадією та показниками ПА. Із збільшенням ІІ збільшується стадія РПК ( $p < 0,001$ ). Окрім того, у хворих з четвертою стадією РПК ІІА клітин, що діляться значно вище, ніж аналогічний показник у хворих із 1-ю стадією РПК ( $p < 0,01$ ). У хворих з четвертою стадією, концентрація ЯАПК значно нижча, а вміст ЯАПК вищий, ніж у хворих з першою стадією захворювання ( $p < 0,05$ ).

Кількість проліферуючих клітин збільшується при підвищенні експресії ЯАПК, який є білком, що бере участь у мітозі. Про це свідчить виявлений слабкий кореляційний зв'язок між ІІ та концентрацією ЯАПК ( $r = 0,34$ ,  $p < 0,001$ ), а також між ІІ та вмістом ЯАПК ( $r = 0,24$ ,  $p < 0,001$ ) в ядрах клітин, що діляться. Із збільшенням ІІ збільшується ІІА, концентрація і вміст ЯАПК у проліферуючих клітинах ( $p < 0,05$ ).

Зростання ПА у пухлині, супроводжується підвищенням експресії ІСОА. Причому більш інтенсивно це відбувається у дистально розташованих пухлинах ( $p < 0,05$ ). З усіх показників експресії ІСОА в карциномах прямої кишки, статистично вірогідно пов'язаний із стадією захворювання показник кількості ІСОА позитивних клітин ( $p < 0,01$ ). У хворих із четвертою стадією РПК показники експресії ІСОА значно вищі, ніж у хворих з іншими стадіями захворювання ( $p < 0,05$ ).

Після визначення прогностичного значення клініко-морфологічних факторів було побудовано лінійну дискримінантну модель класифікації, що може бути виражена системою рівнянь (1).

Виділені чотири найбільш значущі факторні ознаки: локалізація пухлини у прямій кишці (X1), стадія захворювання (X2), індекс проліферації раку прямої кишки (X3), кількість індукованої синтази оксиду азоту у карциномі прямої кишки (X4).

Після побудови моделі класифікації ROC методом, із використанням навчальної та контрольної множини випадків, було визначено оптимальний поріг прийняття рішення ( $Y_{crit}=0,6$ ). При цьому у випадку, коли  $Y$ , розрахований в рамках моделі (1), не перевищує 0,6, прогнозується прожиття хворим один рік і менше, у протилежному випадку прогнозується виживання більше одного року. Результати прогнозування в рамках цієї моделі представлені в табл. 1.

$$\left\{ \begin{array}{ll} Y=1,55 - 0,063CX_2 - 6,4C10^{-7}CX_3 - 2,8C10^{-7}CX_4 & \text{для } X_1=\text{рак ректосигмоїдного} \\ & \text{відділу прямої кишки} \\ Y=1,36 - 0,063CX_2 - 6,4C10^{-7}CX_3 - 2,8C10^{-7}CX_4 & \text{для } X_1=\text{рак} \\ & \text{верхньо-ампулярного відділу} \\ & \text{прямої кишки} \\ Y=1,5 - 0,063CX_2 - 6,4C10^{-7}CX_3 - 2,8C10^{-7}CX_4 & \text{для } X_1=\text{рак} \\ & \text{середньо-ампулярного відділу} \\ & \text{прямої кишки} \\ Y=1,40 - 0,063CX_2 - 6,4C10^{-7}CX_3 - 2,8C10^{-7}CX_4 & \text{для } X_1=\text{рак} \\ & \text{нижньо-ампулярного відділу} \\ & \text{прямої кишки} \\ Y=1,13 - 0,063CX_2 - 6,4C10^{-7}CX_3 - 2,8C10^{-7}CX_4 & \text{для } X_1=\text{рак анального каналу} \end{array} \right. \quad (1)$$

На навчальній множині чутливість побудованої моделі склала 84,2% (ВІ 70,6%–94,2%), специфічність моделі – 86,3% (ВІ 77,4%–93,3%). На тестовій множині чутливість склала 88,9% (ВІ 56,1%–100%), специфічність – 90,5% (ВІ 60,5%–95,1%). Не виявлено статистично значущих відмінностей чутливості та специфічності моделі між навчальною та тестовою множиною випадків ( $p>0,85$ ), що свідчить про адекватність побудованої моделі.

**Результати прогнозування віддалених результатів на підставі 4 найбільш значущих факторних ознак**

Результати прогнозування	Навчальна множина		Тестова множина	
	Y=0	Y=1	Y=0	Y=1
Правильний прогноз	32	63	8	19
Помилковий прогноз	6	10	1	2
Всього випадків	38	73	9	21

Виходячи з прогностичної моделі, можна сказати, що чим більше значення змінних величин (локалізація пухлини у прямій кишці (X1), стадія захворювання (X2), індекс проліферації раку прямої кишки (X3), кількість індукованої синтази оксиду азоту у карциномі прямої кишки (X4)), тим менша вірогідність у хворого пережити один рік спостереження.

Найбільш сприятливим у прогностичному відношенні є локалізація пухлини у ректосигмоїдному відділі прямої кишки (оскільки вільний член системи в цьому випадку має найбільше значення – 1,55). Найменш сприятливим у прогностичному значенні є локалізація пухлини у анальному каналі (вільний член системи в цьому випадку має найменше значення – 1,13).

Після визначення найбільш вагомих клініко-морфологічних критеріїв прогресування РПК, нами проведено дослідження ефективності ППТ та АХТ в залежності від цих факторів.

Впродовж довготривалого часу дискутувалося питання щодо ефективності ППТ. Luna-Perez P. et al. (1999 р.) показали, що проведення ППТ знижує ризик виникнення рецидиву в 2 рази (з 35% до 17%) ( $p=0,002$ ). Деякі дослідники вказали, що після проведення ППТ не тільки знижується кількість рецидивів, а й поліпшується загальне виживання хворих на РПК. Тому, зараз ППТ прийнята за стандарт лікування у хворих на РПК. Однак, у частини хворих після проведеного комбінованого лікування спостерігається прогресування РПК. Тому необхідне подальше вивчення факторів, які впливають на ефективність ППТ та виживання хворих з карциномами прямої кишки.

Нами проаналізовано віддалені результати виживання 58 хворих на рак ампулярного відділу прямої кишки, яким виконані радикальні операції. З них променевою терапією отримали 39 пацієнтів, у 19 хворих ППТ не проводилась з різних обставин. Хворі в обох групах вірогідно не відрізнялись за статтю, стадією РПК, локалізацією та морфологічним диференціюванням пухлини.

Виживання хворих на РПК яким проведено комбіноване та хірургічне лікування, наведене на рис. 4.

Рис. 4. Виживання хворих на рак прямої кишки у залежності від проведення передопераційної променевої терапії

У групі хворих на РПК, що отримали комбіноване лікування, 25-й процентіль та медіана виживання не досягнуті, а у хворих на РПК, яким проведено лише хірургічне лікування, 25-й процентіль виживання склав 7,8 місяців. Різниця у виживанні між двома групами хворих статистично вірогідна ( $p < 0,05$ ).

Однак, деякі хворі, не дивлячись на проведення ППТ, гинули впродовж терміну спостереження від прогресування хвороби. Щоб проаналізувати які з клініко-морфологічних факторів впливають на ефективність ППТ, нами проведено дослідження впливу статі, локалізації, морфологічного диференціювання, ПА та експресії ІСОА на виживання хворих, які отримали комбіноване лікування.

Не відмічено впливу статі хворих, локалізації та морфологічного диференціювання пухлини на ефективність ППТ.

Щоб виявити вплив показників ПА та експресії ІСОА в пухлинах прямої кишки на ефективність ППТ, проведено порівняння виживання хворих з різним рівнем експресії маркерів. Так, проаналізована різниця у виживанні хворих, що отримали комбіноване лікування або тільки хірургічне лікування з високим та низьким ІІ пухлини. Хворі з високим ІІ мали значно краще виживання, так, 25-й процентіль виживання у групі хворих з високим ІІ, котрі отримали ППТ, склав 17 місяців, а в групі пацієнтів з високим ІІ, які не отримали ППТ, лише 3,5 місяців, медіана виживання в обох групах, відповідно, склала 24 місяці та 6 місяців, 75-й процентіль виживання у хворих, що отримали ППТ, не досягнутий, а в групі хворих, що не отримували комбінованого лікування, склав 7,5 місяців ( $p < 0,05$ ).

Також прогноз погіршується у разі відсутності зниження ПА після проведення ППТ. При проведенні аналізу виживання хворих з низьким ІІ, відмічається, що всі хворі, які отримали комбіноване або тільки хірургічне лікування, живі впродовж 36 місяців. Тобто, різниця у виживанні відсутня.

У хворих з відсутністю експресії ІСОА не відмічається різниці у виживанні хворих на РПК, котрі отримували комбіноване лікування або тільки радикальне хірургічне втручання (всі хворі живі впродовж 36 місяців).

При наявності експресії ІСОА виживання хворих, що отримали комбіноване лікування та хворих, які отримали лише хірургічне лікування, значно ( $p < 0,05$ ) відрізнялось (рис. 5). Так, 25-й процентіль виживання хворих, що отримали комбіноване лікування, склав 27 місяців, медіана виживання не досягнута, а у хворих, що отримали тільки хірургічне лікування, 25-й процентіль виживання склав 4,3 місяці, медіана виживання 6,5 місяців, 75-й процентіль виживання – 9 місяців. Тобто лише 25 відсотків хворих, що отримали тільки хірургічне лікування, з наявністю експресії ІСОА, переживуть 9 місяців після встановлення діагнозу ( $p < 0,05$ )

Рис. 5. Виживання хворих із наявністю експресії ІСОА в карциномах прямої кишки у залежності від проведення передопераційної променевої терапії

Критерії призначення АХТ досі дискутуються. У багатьох дослідженнях вказується, що хіміотерапію необхідно проводити тільки хворим із високим ризиком прогресування хвороби. Виділити таку групу хворих можуть допомогти молекулярні маркери, з їх допомогою можливо індивідуалізувати лікування та підвищити його ефективність (Partyka S., et al., 1999, Hoff P.M., et al. 2001, Graziano F., et al., 2003, Cascinu S., et al., 2003).

Нами проаналізовано ефективність АХТ залежно від клініко-морфологічних критеріїв прогресування. АХТ отримали 24 хворих, не отримали АХТ 84 пацієнти. Значна більшість хворих, що не отримали АХТ, мали II стадію РПК. За статтю, локалізацією та морфологічним диференціюванням вказані групи хворих не відрізнялись.

Існує тенденція до погіршення виживання у групі хворих, що не отримали АХТ (рис. 6).

Рис. 6. Виживання хворих на РПК, що отримали комплексне лікування або тільки хірургічне лікування

Нами не відмічено впливу на ефективність АХТ статі хворих, локалізації та морфологічного диференціювання пухлини.

Відмічається значне покращання виживання хворих на РПК з високою ПА пухлини при застосуванні АХТ (рис. 7,  $p < 0,05$ ).

Також, нами проведено дослідження виживання у хворих з низьким ІП, які отримали комплексне та тільки хірургічне лікування. При порівнянні виживання хворих на РПК з низьким ІП, що отримували комплексне лікування, або яким проведено лише радикальне хірургічне втручання, різниці у виживанні не відмічено (в жодній групі 25-й процентіль виживання не досягнутий, тобто більш, ніж 75% хворих пережили означений термін спостереження).

Окрім ПА, важливим морфологічним фактором прогнозу є ІСОА. Тому нами проведено вивчення ефективності АХТ в залежності від показників експресії ІСОА. Існує тенденція до покращання виживання хворих на РПК з експресією ІСОА у пухлині, що отримали АХТ, ніж у хворих на РПК без проведення ад'ювантної ПХТ. Однак різниця у виживанні представлених груп статистично не вірогідна ( $p > 0,05$ ). У хворих на РПК з відсутністю експресії ІСОА у пухлині виживання не відрізнялось між хворими, котрі отримали комплексне лікування, та хворими, яким проведено лише радикальне оперативне втручання.

Рис. 7. Вживання хворих на рак прямої кишки із високим індексом проліферації, в залежності від отримання АХТ

Таким чином, нами проведено кількісне дослідження додаткових критеріїв прогресування РПК, зв'язку цих критеріїв з відомими клініко-морфологічними характеристиками хворого та пухлини. Побудована прогностична модель, що дозволило виділити найбільш вагомні прогностичні фактори. Також, проаналізована ефективність ППТ та АХТ в залежності від показників прогресування пухлини. Розроблені рекомендації, щодо індивідуалізованого лікування хворих на РПК.

### ВИСНОВКИ

- 1 Вивчені найбільш важливі клініко-морфологічні критерії прогресування раку прямої кишки, на основі яких розроблено тактику індивідуального призначення передопераційної променевої терапії та ад'ювантної хіміотерапії.
- 2 Індекс проліферації у хворих на РПК, що загинули від прогресування склав  $1129,4 \cdot 10^3 \pm 39,8 \cdot 10^3 / \text{мм}^3$ , у хворих, що вижили індекс проліферації склав  $740,4 \cdot 10^3 \pm 23,1 \cdot 10^3 / \text{мм}^3$  різниця між показниками статистично вірогідна ( $p < 0,001$ ).
- 3 Експресія індукованої синтази оксиду азоту у тих, які вижили, та загиблих від прогресування хворих склала, відповідно,  $191,7 \cdot 10^3 \pm 21,2 \cdot 10^3$  і  $791,9 \cdot 10^3 \pm 71,5 \cdot 10^3$ , різниця між показниками статистично вірогідна ( $p < 0,001$ ).
- 4 Побудовано математичну модель прогнозу віддалених результатів лікування, чутливість моделі – 84,2% (ВІ 70,6%–94,2%), специфічність – 86,3% (ВІ 77,4%–93,3%). До найбільш значущих у прогностичному відношенні ознак належать: локалізація пухлини у прямій кишці, стадія захворювання, індекс проліферації раку прямої кишки, кількість індукованої форми синтази оксиду азоту у карциномі прямої кишки.
- 5 Існує слабкий кореляційний зв'язок ( $\rho < 0,3$ ) між стадією раку прямої кишки, морфологічними диференціюванням пухлини, кількістю проліферуючих клітин та експресією індукованої синтази оксиду азоту.
- 6 Передопераційна променева терапія покращує виживання у тих хворих, які на момент початку лікування мають проліферативну активність пухлини  $> 1000 \cdot 10^3 \text{ мкм}^{-3}$ , що після лікування знижується нижче  $700 \cdot 10^3 \text{ мкм}^{-3}$  ( $p < 0,05$ ).
- 7 Показанням до проведення ад'ювантної хіміотерапії у хворих на рак прямої кишки є високий індекс проліферації (більш ніж  $1000 \cdot 10^3$  клітин у  $\text{мкм}^{-3}$ ) та наявність високої експресії індукованої синтази оксиду азоту (більш ніж  $700 \cdot 10^3$  клітин у  $\text{мкм}^{-3}$ ).
- 8 Імуногістохімічне визначення показників проліферативної активності та експресії індукованої форми синтази оксиду азоту використовується для індивідуалізації призначення

передопераційної променевої терапії та ад'ювантної хіміотерапії у хворих на рак прямої кишки в роботі абдомінальних відділень обласних, районних онкологічних центрів і диспансерів.

### **СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

- 1 Показатели пролиферативной активности в колоректальном раке / И.Д. Паламарчук, Ю.М. Колесник, А.П. Колесник, М.А. Орловський, А.М. Сидоренко // Запорожский медицинский журнал. – 2003. – №5 (20). – С. 49-51. Автором проведено визначення та порівняльний аналіз показників проліферативної активності у карциномах та нормальній слизовій оболонці прямої кишки.
- 2 Якість життя хворих на рак товстої кишки / О.М. Сидоренко, О.П. Колеснік, І.Д. Паламарчук, А.І. Шевченко // Клінічна хірургія. – 2005. – №3. – С. 56-58. Автором викладено сучасний підхід до прогностичного значення якості життя у хворих на рак товстої кишки.
- 3 Колеснік О.П. Зв'язок клініко-морфологічних характеристик хворого на рак прямої кишки з проліферативною активністю пухлини // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. – Запоріжжя, 2005. – С.50-54.
- 4 Колесник А.П., Паламарчук И.Д., Сидоренко А.М. Молекулярные маркеры прогрессирования колоректального рака // Онкология. – 2006. – Т.8, №1. – С. 13-17. Автор освітив проблему визначення молекулярних маркерів прогнозу у хворих на рак прямої кишки.
- 5 Паламарчук І.Д., Колеснік О.П. Вплив показників проліферативної активності та експресії індукованої форми синтази оксиду азоту на прогресування раку прямої кишки // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. – Запоріжжя, 2006. – С. 38-46. Автором проведено визначення зв'язку показників проліферативної активності та експресії індукованої форми синтази оксиду азоту з виживанням хворих на рак прямої кишки.
- 6 Колеснік О.П. Призначення передопераційної променевої терапії у хворих на рак прямої кишки // Актуальні питання медичної науки та практики. – Запоріжжя, 2006. – С. 153-158.
- 7 Пат. 63732 А, МКИ G 01 N 21/00. Спосіб визначення проліферативної активності пухлин / І.Д. Паламарчук, Ю.М. Колесник, А.В. Абрамов, О.М. Сидоренко, М.О. Орловський, О.П. Колеснік; Запорізький державний медичний університет. – №2003065225; Заявл. 06.06.03; Опубл. 15.01.04, Бюл. № 1. – 2 с. Автор брав участь у розробці способу визначення проліферативної активності у хворих на рак прямої кишки, шляхом

використання непрямой реакції імунофлюоресценції та системи комп'ютерного аналізу зображення.

- 8 Пат. 5175, МКИ 7 G 01 N 21/00. Спосіб визначення експресії індукованої форми синтази оксиду азоту (INOS) в клітинах пухлин прямої кишки / Ю.М. Колесник, І.Д. Паламарчук, О.П. Колеснік, М.О. Орловський; Запорізький державний медичний університет. – №20040705890; Заявл. 16.07.04; Опубл. 15.02.05, Бюл. № 2. – 2 с. Автор брав участь у розробці способу визначення експресії індукованої форми синтази оксиду азоту у хворих на рак прямої кишки, шляхом використання непрямой реакції імунофлюоресценції та системи комп'ютерного аналізу зображення.
- 9 Паламарчук І.Д., Сидоренко О.М., Колеснік О.П. Проліферативна активність колоректальних карцином // “Онкологія-XXI”: Науково-практична конференція з міжнародною участю (9-10 жовтня 2003 р.). – Київ, 2003. – С. 179-180.
- 10 Колеснік О.П. Імуногістохімічне визначення проліферативної активності пухлин // “Сучасні проблеми експериментальної онкології”: VI конференція молодих онкологів України (4-5 грудня 2003 р.). – Київ, 2003. – С. 25.
- 11 Колеснік О.П. Оцінка морфологічних властивостей пухлин // “Молодь – медицині майбутнього”: V міжнародна конференція студентів і молодих вчених (16-18 вересня 2004 р.). – Дніпропетровськ, 2004. – С. 161-162.
- 12 Паламарчук І.Д., Колесник А.П. Количественный анализ в иммуногистохимии // “Актуальні проблеми клінічної, експериментальної, профілактичної медицини та стоматології”: 67-а підсумкова конференція СНТ ім. М.Д.Довгялло (7-9 квітня 2005 р.). – Донецьк, 2005. – С. 25.
- 13 Паламарчук І.Д., Колеснік О.П. Використання системи комп'ютерного аналізу зображення для оцінки морфологічних властивостей пухлин // “Від фундаментальних досліджень – до прогресу в медицині”: Науково-практична конференція з міжнародною участю (18-20 листопада 2005 р.). – Харків, 2005. – С. 158.
- 14 Колеснік О.П., Паламарчук І.Д. Вплив показників експресії INOS та проліферативної активності пухлини на ефективність передопераційної променевої терапії у хворих на рак прямої кишки // “Сучасні проблеми експериментальної онкології”: VII міжнародна конференція молодих онкологів України (2-3 лютого 2006 р.). – Київ, 2006. – С. 44.
- 15 Паламарчук І.Д., Колеснік О.П. Вплив клініко-морфологічних характеристик пацієнта на динаміку проліферативної активності раку прямої кишки до і після передопераційної променевої терапії // Український радіологічний журнал. – 2005. – №3. – С. 361-362.
- 16 Колеснік О.П., Паламарчук І.Д., Чешенко Д.В. Зв'язок проліферативної активності пухлини з ефективністю передопераційної променевої терапії у хворих на рак прямої

кишки // XI з'їзд онкологів України: Матеріали з'їзду (29 травня – 2 червня 2006 р.). – Київ, 2006. – С. 143.

Колеснік О.П. Клініко-морфологічні критерії прогресування раку прямої кишки. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.07– онкологія. – Донецький державний медичний університет ім. М. Горького, Донецьк, 2007.

Дисертація присвячена вивченню факторів, пов'язаних із прогресуванням раку прямої кишки та ефективністю передопераційної променевої терапії і ад'ювантної хіміотерапії.

За допомогою клініко-морфологічних критеріїв прогресування побудована математична модель, що дозволяє на діагностичному етапі прогнозувати перебіг захворювання та виживання хворого. Чутливість побудованої моделі склала 84,2% (ВІ 70,6%–94,2%), специфічність моделі – 86,3% (ВІ 77,4%–93,3%). На тестовій множині чутливість моделі склала 88,9% (ВІ 56,1%–100%), специфічність – 90,5% (ВІ 60,5%–95,1%).

Виділені фактори, від яких залежить ефективність передопераційної променевої терапії та ад'ювантної хіміотерапії. У пацієнтів із низьким індексом проліферації та відсутністю експресії індукованої синтази оксиду азоту передопераційна променева терапія не покращує виживання. У хворих із високим індексом проліферації до початку лікування, при незначному зниженні індексу проліферації після передопераційної променевої терапії, необхідне проведення ад'ювантної хіміотерапії. Також, ад'ювантну хіміотерапію необхідно призначати хворим на рак прямої кишки з високим індексом проліферації та високою експресією індукованої синтази оксиду азоту.

Ключові слова: рак прямої кишки, передопераційна променева терапія, ад'ювантна хіміотерапія.

Колесник А.П. Клинико-морфологические критерии прогрессирования рака прямой кишки.

– Рукопись.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.07–онкология. – Донецкий государственный медицинский университет им. М. Горького, Донецк, 2007.

Цель данной работы заключалась в повышении эффективности лечения больных раком прямой кишки путём индивидуализации назначения предоперационной лучевой терапии и адьювантной химиотерапии с помощью дополнительных критериев прогрессирования.

Объектом исследования был 181 пациент с раком прямой кишки, который проходил обследование и лечение в Запорожском областном клиническом онкологическом диспансере с 2002 по 2004 год.

В качестве дополнительных маркеров прогрессирования рака прямой кишки были выбраны маркеры пролиферации и экспрессии индуцируемой формы синтазы оксида азота.

С целью определения показателей пролиферативной активности и экспрессии индуцированной формы синтазы оксида азота использовали непрямой метод иммуофлюоресценции с первичными антителами к ядерному антигену пролиферирующих клеток и к индуцированной форме синтазы оксида азота и вторичными антителами к мышиным IgG (FITC conjugate), производства Sigma chemical (USA).

Изображение, полученное на флюоресцентном микроскопе Axioskop, объектив 40x, с помощью высокочувствительной видеокамеры вводили в систему анализа изображения. Для оценки пролиферативной активности и экспрессии индуцированной формы синтазы оксида азота рассчитывали количество иммунопозитивных клеток в  $1 \text{ мм}^3$  (тыс./ $\text{мм}^3$ ), площадь ядра, или цитоплазмы иммунопозитивных клеток ( $\text{мкм}^2$ ), содержание и концентрацию иммунореактивного материала в иммунореактивных клетках.

Статистическая обработка материалов исследования проводилась согласно современных международных стандартов практики проведения клинических исследований.

После определения прогностической значимости клинко-морфологических факторов была построена математическая модель прогнозирования отдаленных результатов лечения.

Выделены четыре наиболее значимые факторные признаки: локализация опухоли в прямой кишке, стадия заболевания, индекс пролиферации, количество индуцируемой синтазы оксида азота в опухоли прямой кишки.

На учебном множестве чувствительность построенной модели составила 84,2% (ДИ 70,6%–94,2%), специфичность модели – 86,3% (ДИ 77,4%–93,3%). На тестовом множестве чувствительность модели составила 88,9% (ДИ 56,1%–100%), специфичность – 90,5% (ДИ 60,5%–95,1%). Не выявлено статистически значимых отличий чувствительности и специфичности модели между учебным и тестовым множеством ( $p > 0,85$ ), что свидетельствует об адекватности построенной модели.

Исходя из анализа математической модели, можно сделать вывод о том, что чем больше значение изменяющихся величин (стадия заболевания, индекс пролиферации рака прямой кишки, количество индуцируемой синтазы оксида азота в опухоли), тем меньше вероятность у больного пережить один год наблюдения.

Наиболее благоприятным в прогностическом отношении является локализация опухоли в ректосигмоидном отделе прямой кишки (поскольку свободный член при этом имеет наибольшее значение – 1,55). Наименее благоприятной в прогностическом значении является локализация опухоли в анальном канале (свободный член при этом имеет наименьшее значение – 1,13).

Оценено влияние прогностических факторов на эффективность предоперационной лучевой терапии и адъювантной химиотерапии. Наиболее значительное влияние на эффективность предоперационной лучевой терапии имеет пролиферативная активность и уровень экспрессии индуцированной формы синтазы оксида азота. Так, у больных с индексом пролиферации более  $1000 \cdot 10^3$  клеток в  $\text{мкм}^{-3}$  до начала лечения необходимо обязательно оценивать пролиферативную активность после лечения. При незначительном снижении индекса пролиферации после предоперационной лучевой терапии необходимо дополнительное назначение адъювантной химиотерапии. У пациентов с индексом пролиферации ниже  $1000 \cdot 10^3$  клеток в  $\text{мкм}^{-3}$  и отсутствием экспрессии индуцированной формы синтазы оксида азота возможно не проводить предоперационную лучевую терапию. Адъювантную химиотерапию необходимо проводить всем пациентам с раком прямой кишки при высоком индексе пролиферации ( $>1000 \cdot 10^3 \text{ мкм}^{-3}$ ) и наличием высокой экспрессии индуцированной формы синтазы оксида азота ( $>700 \cdot 10^3 \text{ мкм}^{-3}$ ).

Ключевые слова: рак прямой кишки, предоперационная лучевая терапия, адъювантная химиотерапия.

Kolesnik A.P. Clinico-morphological criteria of progression cancer of rectum. – A manuscript.

Dissertation for the candidate of medical science degree in speciality 14.01.07 – Oncology. – Donetsk State Medical University named after M.Gorky, Donetsk, 2007.

Dissertation is devoted to study factors which related with progression rectal cancer and efficacy preoperative radiotherapy and adjuvant chemotherapy.

Linear discriminant classification model was builded with help clinico-morphological criteria. It help making prognosis for patient with rectal cancer on diagnostic phase. Sensitivity of model was 84.2% (CI 70.6%–94.2%), specificity of model – 86.3% (CI 77.4%–93.3%). In test multitude sensitivity of model was 88.9% (CI 56.1%–100%), specificity of model – 90.5% (CI 60.5%–95.1%).

Patient, who has low proliferating index and absence induced form nitrogen oxide sintase, has't effect from preoperative radiotherapy. Patient, who has high proliferating index before treatment, required to assessment proliferation after preoperative radiotherapy. If after treatment index proliferation was high and not decreased, patient to has need adjuvant chemotherapy.

Furthermore, patient with high proliferation and high expression inducible form nitrogen oxide sintase required adjuvant chemotherapy too.

Key words: rectal cancer, preoperative radiotherapy, adjuvant chemotherapy.

Здано до набору 21.05.2007 р. Підписано до друку 21.05.2007 р.

Формат 60x90 1/16. Папір друкарський. Друк офсетний.

Ум.друк.арк. 0,9. Тираж 120 примірників. Замовлення – 153.

Видавництво ТОВ НВС „Карат”

М. Запоріжжя, вул. Гастело, 46.