

## ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ CD44 В АДЕНОКАРЦИНОМЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Т. Т. Штабинская (shtabik@list.ru), В. А. Басинский (basinsk@gmail.com)

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

*Введение.* Риск развития колоректального рака составляет 5-6%, т. е. у каждого 20-го человека в течение жизни развивается рак данной локализации. Множество работ посвящено изучению молекулярных маркеров для диагностики и прогнозирования течения опухолей, особенно в молодом возрасте. CD44 является одним из таких маркеров, однако данные о его роли в прогнозе течения колоректального рака противоречивы.

*Цель исследования* – определить прогностическую роль уровня позитивности CD44 в аденокарциноме толстой кишки.

*Материалы и методы.* Проведен клиничко-морфологический анализ 61 случая аденокарциномы толстой кишки. Иммуногистохимическое исследование выполнено с использованием мышиных моноклональных антител к CD 44. Экспрессия маркёров оценивалась количественно при помощи компьютерной программы Aperio Image Scope\_v9.1.19.1567. Статистический анализ проводили с использованием STATISTICA 10.0 (SNAXAR207F394425FA-Q).

*Результаты.* Установлено, что уровень CD44 в опухолевой ткани значимо выше, чем в краях резекции. При этом экспрессия в строме опухоли достоверно выше, чем в опухолевых пролифератах. Статистически значимых различий позитивности CD44 в зависимости от пола, локализации опухоли, степени дифференцировки, глубины инвазии и метастазирования не обнаружено. Определен уровень CD44 для прогнозирования выживаемости пациентов среднего возраста.

*Заключение.* При уровне паренхиматозной позитивности CD44, равном или ниже 0,284 с чувствительностью 100% и специфичностью 80% можно прогнозировать, что скорректированная безрецидивная выживаемость пациентов среднего возраста с аденокарциномой толстой кишки будет более 3-х лет.

**Ключевые слова:** аденокарцинома толстой кишки, CD44, прогноз.

## PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF CD44 EXPRESSION IN COLON ADENOCARCINOMA

T. T. Shtabinskaya, V. A. Basinsky

Educational Institution "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus

*Background.* The risk of developing colorectal cancer is 5-6%, i.e., every 20th person develops cancer of this localization during a lifetime. A lot of works are devoted to the study of molecular markers for diagnosis and prognosis of tumors, especially at a young age. CD44 is one of these markers, but data on its role in predicting the course of colorectal cancer are contradictory.

*Objective* – determine the prognostic role of the CD44 positivity level in colon adenocarcinoma.

*Material and methods.* A clinical and morphological analysis of 61 cases of colon adenocarcinoma was investigated. Immunohistochemical study was performed using mouse monoclonal antibodies to CD44. Marker expression was quantified using the computer program Aperio Image Scope\_v9.1.19.1567. Statistical analysis was performed using STATISTICA 10.0 (SNAXAR207F394425FA-Q).

*Results.* It was found that the level of CD44 in tumor tissue is significantly higher than at the margins of resection. At the same time, expression in the stroma of the tumor is significantly higher than in tumor proliferates. There were no statistically significant differences in the positivity of CD44 depending on sex, tumor location, degree of differentiation, depth of invasion and metastasis. The level of CD44 was determined to predict the survival of middle-aged patients.

*Conclusion.* If the level of parenchymal positivity of CD44 is equal to or below 0.284 with a sensitivity of 100% and a specificity of 80%, it can be predicted that the adjusted disease-free survival of middle-aged patients with colon adenocarcinoma will be more than 3 years.

**Keywords:** colon adenocarcinoma, CD44, prognosis.

### Введение

Многие авторы обращают внимание на тот факт, что значительное влияние на структуру пятилетней выживаемости пациентов с онкологическими заболеваниями имеет возраст, который непосредственно определяет эффективность терапии [1, 2]. Более 90% случаев колоректального рака (КРР) приходится на людей старше 50

лет. Заболеваемость у лиц в возрасте от 60 до 79 лет в 50 раз выше, чем у тех, кто моложе 40 лет [3].

В Республике Беларусь пик заболеваемости раком ободочной кишки приходится на возраст 70-79 лет и за последние 20 лет заболеваемость в данной возрастной группе выросла с 69,8 до 119,5 на 100 тыс. населения [4]. Тем не менее, в последнее время этот показатель стал расти и

среди лиц молодого возраста [5, 6]. В США КРР входит в десятку самых частых диагнозов среди мужчин и женщин в возрасте от 20 до 49 лет [7].

Значительную роль в развитии и прогрессировании КРР играют так называемые стволовые клетки опухоли, которые могут образовываться из мутантных стволовых клеток или путем дедифференцировки эпителиальных клеток крипты и способны инициировать опухолевый рост как в первичном очаге, так и в метастазах [8].

Маркером стволовых клеток некоторых солидных опухолей, в том числе и КРР, считается CD44 [9]. Однако опубликованные результаты в большинстве своем носят противоречивый характер [10, 11]. Так, в работе N. Harada и соавт. снижение экспрессии CD44 коррелирует с уменьшением метастатического потенциала клеток КРР [12], а M. R. Dallas и соавт. отмечают увеличение метастатического и миграционного потенциалов [13]. Несмотря на это, авторы единодушно признали, что сведения о путях управления канцерогенезом, основанные на изучении иммуногистохимического профиля новообразований, помогут раскрыть широкие возможности для изменения взглядов на стратегию лечения злокачественных опухолей.

**Цель исследования** – определить прогностическую роль уровня позитивности CD44 в аденокарциноме толстой кишки.

### Материал и методы

Критерии включения в исследование: опухоли, имеющие гистологическое строение аденокарциномы толстой кишки (АТК) разной степени дифференцировки.

Критерии исключения из исследования: первично-множественные раки и новообразования, имеющие гистологическое строение слизистой, микропапиллярной аденокарциномы, крибриформной комедо-карциномы, перстневидноклеточного, плоскоклеточного и недифференцированного рака.

Структура научной работы состоит из проспективного продольного сравнительного исследования 34 пациентов среднего возраста (от 44 до 60 лет) и 27 пациентов пожилого возраста (от 60 до 75 лет) (группы сравнения). Клинические данные получены из историй болезни, регистра пациентов Гродненского областного онкологического диспансера. Длительность наблюдения составила от 1 до 205 месяцев. Клинико-морфологическая характеристика пациентов обеих групп отображена в таблице 1.

Иммуногистохимическое исследование выполнено на серийных парафиновых срезах ткани опухоли с использованием мышиных моноклональных антител к CD 44 (ab16728, клон 156-3С11). Депарафинизацию и демаскировку антигенов осуществляли по стандартной ме-

Таблица 1. – Клинико-морфологическая характеристика пациентов среднего и пожилого возраста

Клинико-морфологический показатель		Группа 1 (n=34)	Группа 2 (n=27)
Медиана возраста		51,34 (46,26-55,64)	67,14 (63,43-72,09)
Пол	мужской	14 (41,2%)	12 (44,4%)
	женский	20 (59,8%)	15 (55,6%)
Локализация опухоли	проксимальная	4 (11,8%)	6 (22,2%)
	дистальная	30 (88,2%)	21 (77,8%)
Стадия	I	4 (11,8%)	3 (11,2%)
	II	6 (17,6%)	7 (25,9%)
	III	14 (41,2%)	11 (40,7%)
	IV	10 (29,4%)	6 (22,2%)
Лимфогенные метастазы	N0	10 (29,4%)	12 (44,4%)
	N1	19 (55,9%)	12 (44,4%)
	N2	5 (14,7%)	3 (11,2%)
Гематогенные метастазы	M0	44 (70,6%)	21 (77,8%)
	M1	10 (29,4%)	6 (22,2%)
Степень дифференцировки	G1	12 (35,3%)	10 (37,05%)
	G2	12 (35,3%)	10 (37,05%)
	G3	10 (29,4%)	7 (25,9%)
Рецидивы		10 (29,4%)	9 (33,3%)
Медиана времени наступления рецидива (лет)		2,29 (2,19-3,03)	2,39 (1,31-3,90)
Количество умерших пациентов с 2001-2018 гг.		18 (52,9%)	19 (70,4%)
Медиана скорректированной безрецидивной выживаемости (лет)		3,0 (2,20-6,00).	3,1 (1,30-4,350)

тодике. Срезы толщиной 4 мкм инкубировали с первичными антителами на протяжении 30 минут при +37°C. В качестве вторичных антител и пероксидазного комплекса использовали стандартный набор EnVision (фирма «Dako», Дания). Для визуализации реакции применяли раствор диаминобензидина DAB+ (фирма «Dako», Дания). Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера. Контрольный срез оставляли без первой инкубации.

Метод количественной оценки результатов описан в статье, опубликованной ранее [14]. Статистический анализ проводили с использованием STATISTICA 10.0 (SNAXAR207F394425FA-Q) [15].

### Результаты и обсуждение

Как и в исследованиях некоторых авторов [8], выявлено, что уровень экспрессии CD44 в опухолевой ткани выше, чем в краях резекции – 0,284 (0,147-0,425) и 0,091 (0,046-0,199), соответственно,  $p=0,016$  (рис. 1).

CD44 экспрессируется преимущественно клетками окружающих тканей, мигрирующими макрофагами, лимфоцитами, фибробластами и эндотелием (0,289 (0,188-0,502)) и в меньшей степени клетками опухоли (0,153 (0,071-0,348)) ( $p=0,003$ ).

Статистически значимых различий общей, паренхиматозной и стромальной экспрессии CD44 в зависимости от пола, возраста пациентов и локализации опухоли не выявлено ( $p>0,05$ ).

По данным К. М. Рорропен и соавт., сверхэкспрессия CD44 ассоциирована с низкой дифференцировкой рака толстой кишки (высоким Грейдом) и уменьшением выживаемости у пациентов [16]. В нашем исследовании выявлена тенденция к достоверной отрицательной связи между уровнем CD44 и трехлетней скорректированной безрецидивной выживаемостью (СБВ) ( $p=0,07$ ), а также отсутствие корреляции с Грейдом аде-

нокарциномы, что соответствует результатам некоторых исследований [17].

По мнению J. W. Nuh и соавт., экспрессия CD44 в клетках КРР ассоциирована с глубиной инвазии опухоли и вовлечением лимфатических узлов [18]. Результаты наших исследований не выявили статистически значимых различий уровня позитивности CD44 у пациентов среднего и пожилого возраста в зависимости от местного распространения опухоли, лимфогематогенной ее диссеминации и стадии заболевания.

При оценке влияния группирующих переменных (исход рака через 3 года от момента оперативного вмешательства, оцениваемый по СБВ, и возраст пациента) на уровень CD44 в обоих компонентах опухоли с помощью ANOVA установлено, что вклад сочетания переменных достоверен для паренхиматозной экспрессии CD44 ( $F=8,97$ ;  $p=0,004$ ) (рис. 2). В группе пациентов среднего возраста, не перешагнувших рубеж трехлетней СБВ, уровень экспрессии CD44 достоверно выше (0,453 (0,309-0,539)), чем у проживших более 3-х лет (0,118 (0,0007-0,284)),  $p=0,007$ . В группе пациентов пожилого возраста экспрессия изучаемого маркера в случаях, завершённых в течение 3-х лет, составила 0,11 (0,047-0,347), а в наблюдаемых дольше этого периода – 0,16 (0,093-0,342). Однако выявленные различия не являются достоверными ( $p=0,24$ ).

ROC-анализ позволил определить точку разделения для прогнозирования трехлетней выживаемости у пациентов среднего возраста в зависимости от уровня экспрессии CD44 в опухолевой паренхиме (рис. 3). Площадь под ROC-кривой равняется  $0,87\pm 0,07$  (достоверность различия с площадью под диагональю равна 0,007). Наиболее оптимальное соотношение чувствительности и специфичности на ROC-кривой соответствует уровню экспрессии CD44, равному 0,284 (чувствительность – 100%, специфичность – 80%).

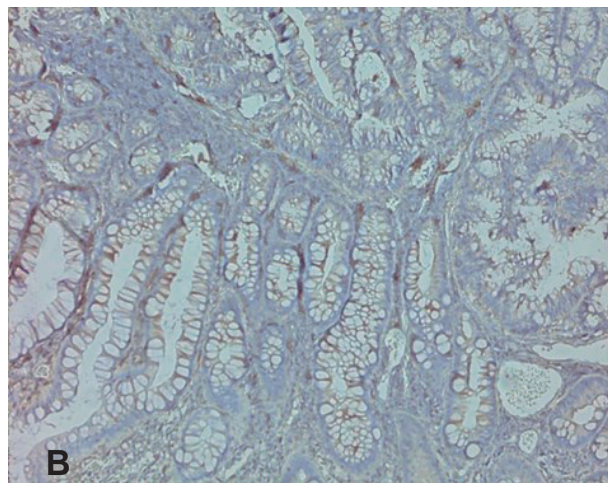
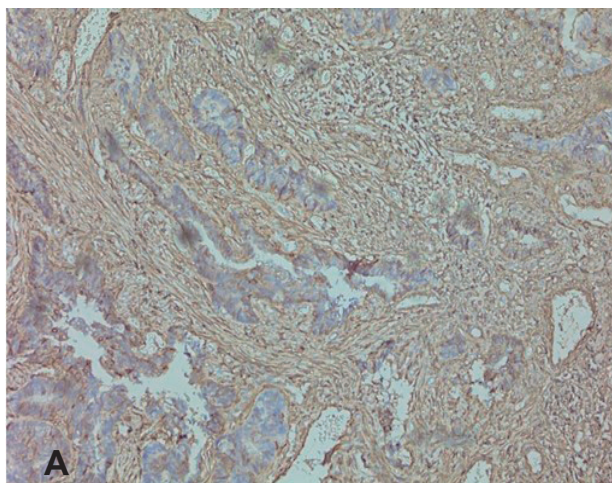


Рисунок 1. – Экспрессия CD44 в опухоли (А) и краях резекции (Б). Окраска с использованием антител к CD44. Ув.  $\times 100$

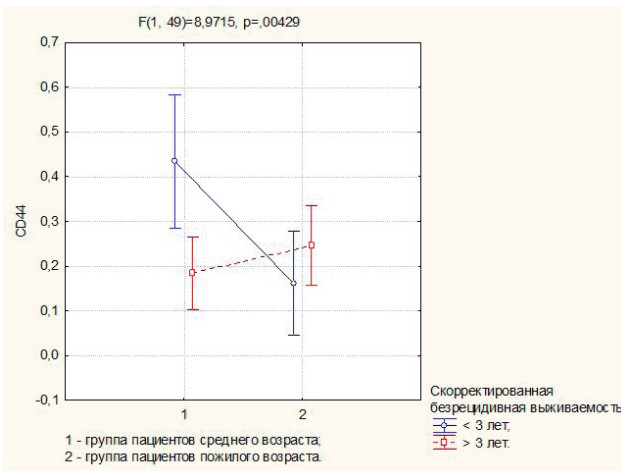


Рисунок 2. – Экспрессия CD44 в опухолевой паренхиме в зависимости от скорректированной безрецидивной трехлетней выживаемости у пациентов среднего и пожилого возраста

При использовании в качестве группирующих переменных информации о пятилетней безрецидивной выживаемости и возрасте пациента установлено, что на дисперсию показателя позитивности CD 44 не влияют ни обе независимые переменные по отдельности ( $F=0,00$ ;  $p=0,9$  и  $F=0,438$ ;  $p=0,5$ , соответственно), ни их композиция ( $F=0,002$ ;  $p=0,966$ ).

### Выводы

1. В аденокарциноме толстой кишки уровень общей позитивности CD44 значимо выше, чем в неопухолевой ткани краев резекции ( $p=0,016$ ). При этом стромальная экспрессия достоверно выше, чем паренхиматозная ( $p=0,003$ ).

2. Статистически значимых различий позитивности CD44 в зависимости от клинико-мор-

### ROC-кривая

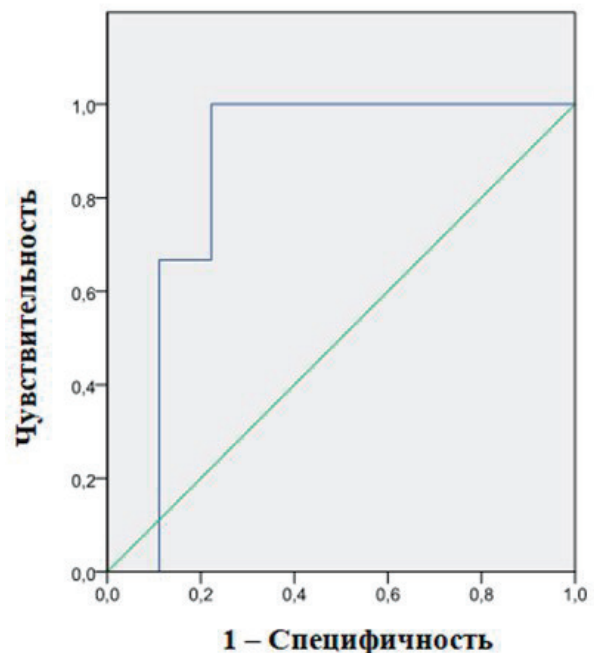


Рисунок 3. – Соотношение чувствительности и специфичности (ROC-кривая) при прогнозировании трехлетней выживаемости в зависимости от уровня экспрессии CD44 в опухолевой паренхиме у пациентов среднего возраста

фологических показателей (пол, возраст, локализация опухоли, степень ее дифференцировки, глубина инвазии и метастазирование) не обнаружено ( $p>0,05$ ).

3. При уровне паренхиматозной позитивности CD44, равном или ниже 0,284 с чувствительностью 100% и специфичностью 80% можно прогнозировать, что скорректированная безрецидивная выживаемость пациентов среднего возраста с аденокарциномой толстой кишки будет более трех лет.

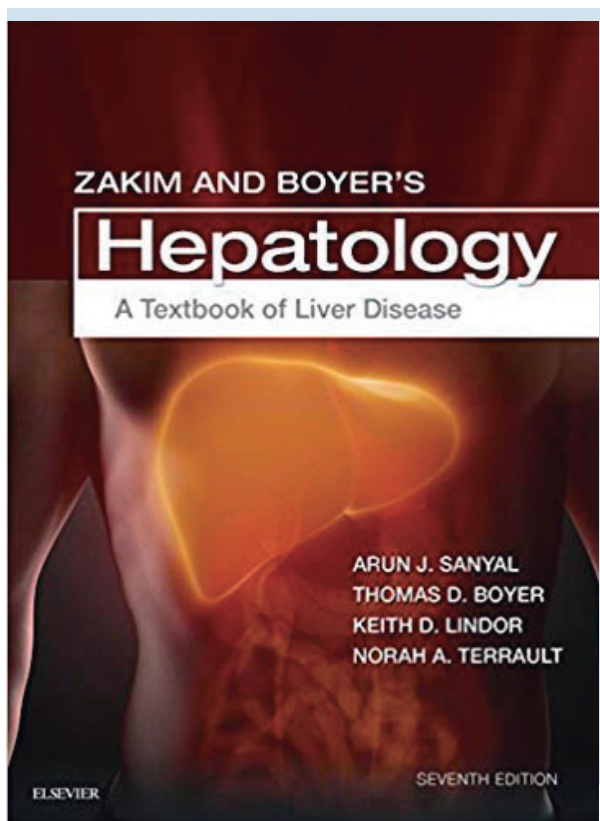
### References

- Vojciehovska U, Didkovska J, Zatonski W. Pięcioletnie przeżycia u chorych na nowotwory złośliwe w Polsce [Five-year survival in patients with malignant tumors in Poland]. *Nowotwory [Cancers]*. 2010;60:122-128. (Polish).
- Zatonski W, Didkovska J, Vojciehovska U. Epidemiologia chorób nowotworowych w Europie Środkowej i Wschodniej w porównaniu z Europą Zachodnią i Polską [Epidemiology of neoplastic diseases in Central and Eastern Europe in comparison with Western Europe and Poland]. *Polski Przegląd Chirurgiczny [Polish Surgical Review]*. 2009;8110:808-837. (Polish).
- SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013. Available from: [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2013/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/).
- Kohnjuk VT. Rak obodochnoy kishki v Respublike Belarus: rasprostranennost, diagnostika i rezultaty lechenija [Colon cancer in the Republic of Belarus: prevalence, diagnosis and treatment outcomes]. *Onkologicheskij zhurnal [Oncological journal]*. 2013;27(3):21-26. (Russian).
- O'Connell JB, Maggard MA, Liu JH, Etzioni DA, Livingston EH, Ko CY. Rates of colon and rectal cancers are increasing in young adults. *American Surgeon*. 2003;69(10):866-872.
- O'Connell JB, Maggard MA, Livingston EH, Yo CK. Colorectal cancer in the young. *American Journal of Surgery*. 2004;187(3):343-348. doi: 10.1016/j.amjsurg.2003.12.020.
- Fairley TL, Cardinez CJ, Martin J, Alley L, Friedman C, Edwards B, Jamison P. Colorectal cancer in U.S. adults younger than 50 years of age, 1998-2001. *Cancer*. 2006;107(5):1153-1161. doi: 10.1002/cncr.22012.
- Nefedova NA, Malkov PG. Rol stvolovykh kletok v kancerogeneze tolstoj kishki [The role of stem cells in carcinogenesis of the colon]. *Onkologicheskaja koloproktologija [Oncological coloproctology]*. 2015;5:15-24. doi: 10.17650/2220-3478-2015-5-3-15-24. (Russian).
- Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF. Cancer stem cells from colorectal cancer derived cell lines. *PNAS*. 2010;107(8):3722-3729. doi: 10.1073/pnas.0915135107.
- Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, Jin H, Cahuzac N, Mehrpour M, Lu Y, Chen Q. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(21):6751-6760. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1034.
- Nagano O, Saya H. Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Science*. 2004;95(12):930-935. doi: 10.1111/j.1349-7006.2004.tb03179.

12. Harada N, Mizoi T, Kinouchi M, Hoshi K, Ishii S, Shiiba K, Sasaki I, Matsuno S. Introduction of antisense CD44S CDNA down-regulates expression of overall CD44 isoforms and inhibits tumor growth and metastasis in highly metastatic colon carcinoma. *International Journal of Cancer*. 2001;91(1):67-75. doi: 10.1002/1097-0215(20010101)91.
13. Dallas MR, Liu G, Chen WC, Thomas SN, Wirtz D, Huso DL, Konstantopoulos K. Divergent roles of CD44 and carcinoembryonic antigen in colon cancer metastasis. *The FASEB Journal*. 2012;26(6):2648-2656. doi: 10.1096/fj.12-203786.
14. Shtabinskaya TT, Bodnar M, Lialikov SA, Basinskiy VA, Marshalek A. Prognosticheskoe znachenie urovnja jekspressii faktora rosta jendotelija sosudov v kolorektalnom rake [Assessment of prognostic significance of expression level of vascular endothelial growth factor in colorectal cancer]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of the Grodno State Medical University]. 2015;51(3):64-69. (Russian).
15. Shtabinskaya TT, Bodnar M, Lialikov SA, Basinskiy VA, Marshalek A. Znachenie urovnja pozitivnosti CD105 v rake tolstoj kishki dlja prognoza jeffektivnosti himioterapii [The value of the CD105 positivity in colon cancer for the prognosis of the chemotherapy effectiveness]. *Evrazijskij onkologicheskij zhurnal* [Eurasian oncology journal]. 2015;4(07):35-42. (Russian).
16. Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM. Expression of CD44 and variant proteins in human colorectal cancer and its relevance for prognosis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1998;33(3):301-309. doi: 10.1080/00365529850170900.
17. Grabovoj AN, Savchin TM, Antonjuk SA, Tarasova TA. Jekspressija CD44 v adenokarcinomah tolstoj kishki [Expression of CD44 in colon adenocarcinomas]. *Jeksperimentalnye issledovanija, onkomorfologija, onkoimmunologija* [Experimental research, oncomorphology, oncoimmunology]. 2016;23(3):10-14. (Russian).
18. Huh JW, Kim HR, Kim YJ, Lee JH, Park YS, Cho SH, Joo JK. Expression of standard CD44 in human colorectal carcinoma: association with prognosis. *Pathology International*. 2009;59(4):241-247. doi: 10.1111/j.1440-1827.2009.02357.

Поступила: 02.10.2018

Принята к печати: 05.11.2018



Zakim and Boyer's Hepatology: A Textbook of Liver Disease / A. J. Sanyal [et al.]. – 7th ed. – Philadelphia : Elsevier, 2018. – 1052 p. – ISBN 978-0323375917.

*Get the authoritative, up-to-date information you need on liver disease from the 7th Edition of the most trusted reference worldwide. Covering both basic science and recent clinical developments, this revised edition by Drs. Arun J. Sanyal, Thomas D. Boyer, Norah A. Terrault, and Keith D. Lindor, provides an in-depth, comprehensive look at the pathophysiology, diagnostic, and treatment information related to the liver. More than 1,100 figures and tables, many new and in full color, highlight completely updated content throughout.*

*Expert, international authorship and comprehensive, easy-to-access information makes this edition the gold standard in the field of hepatology. Includes new information on the rapid changes in treatment paradigms for acute liver failure, the latest treatments for primary biliary cholangitis, full coverage of the gut microbiome and its role in liver disease, the newest developments in drug-induced liver injury, and changes in hepatitis C virus treatment and hot-button concerns about access to care. New summary boxes at the end of each chapter and a newly streamlined table of contents make it easier to find and understand the information you're looking for. Hundreds of brand-new illustrations clearly present key aspects of liver disease.*