

*На правах рукописи*

**КОВТУН**

**Демьян Павлович**

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ  
КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА II СТАДИИ**

14.03.02 – патологическая анатомия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор **Аничков Николай Мильевич**

**Официальные оппоненты:**

**Кветной Игорь Моисеевич** – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», руководитель отдела патоморфологии

**Раскин Григорий Александрович** – доктор медицинских наук ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», кафедра онкологии, профессор. ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» МЗ РФ, заведующий лабораторией иммуногистохимии

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию

Защита диссертации состоится 27 января 2020 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д 215.002.02 ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ. Адрес: 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке и на официальном сайте ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ

Автореферат разослан «          »            2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор

  
**ЧИРСКИЙ Вадим Семёнович**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Проблема борьбы со злокачественными новообразованиями в развитых странах, в сущности, давно превратилась в проблему государственной важности. В современном мире рак ободочной и прямой кишок – колоректальный рак (КРР) – третье по распространенности злокачественное новообразование внутренних органов после рака молочной железы и рака легких. В России он по этому показателю находится на второй позиции после рака молочной железы [Каприн А.Д. и др., 2018]. В структуре смертности населения Российской Федерации от злокачественных новообразований КРР также занимает вторую позицию [Давыдов М.И., Аксель Е.М., 2011]. По данным Петростата, в 2015 г. в Санкт-Петербурге и Ленинградской области удельный вес злокачественных опухолей ободочной и прямой кишок в структуре онкологической смертности достиг суммарно 15,33%, что превысило аналогичный показатель для опухолей бронхо-легочной системы (13,51%) [Мерабишвили В.М., 2017].

В условиях персонализированной медицины значение прижизненной патологоанатомической диагностики в комплексном лечении пациентов с КРР значительно усложнилась. В дополнение к обычному гистологическому описанию/диагнозу специалист-патологоанатом стал отвечать за стадирование заболевания, выявление его прогностических критериев и оценку эффекта неоадьювантной и адьювантной терапии. Он также несет ответственность за точность описания гистологических признаков новообразования, определяющих показания к иммуногистохимическому исследованию или свидетельствующих в пользу микросателлитной нестабильности, выделение тканей для молекулярно-генетического тестирования и толкование результатов прогностических тестов [Федянин М.Ю. и др., 2017; Tang L.H. et al., 2016].

КРР II стадии ( $T_{3-4}N_0M_0$ ) представляет собой группу опухолей с часто непредсказуемым поведением и поливариантным прогнозом. Одним из наиболее обсуждаемых аспектов его послеоперационного лечения остается адьювантная химиотерапия, показания к которой до настоящего времени

окончательно не определены [Mitrovic B. et al., 2012]. К неблагоприятным прогностическим признакам, требующим назначения послеоперационной химиотерапии, относят низкую дифференцировку карцином, инвазию, соответствующую уровню  $pT_4$ , и экстрамуральную венозную инвазию, а также молодой возраст пациентов [Ананьев В.С. и др., 2014].

**Степень разработанности темы исследования.** Проблема послеоперационного лечения КРР II стадии состоит в отсутствии достаточно обоснованных патоморфологических критериев прогноза заболевания и его поведения в послеоперационном периоде, а также показаний и противопоказаний к консервативной терапии [Gray R. et al., 2007]. Причины подобного положения вещей в первую очередь кроются в том, что колоректальные карциномы на этой стадии формируют довольно гетерогенную группу, где опухоли с практически одинаковой морфологией имеют разный прогноз и особенности клинического поведения. Кроме того, в последние годы изменились многие методические подходы к морфологической диагностике доброкачественных и злокачественных опухолей, в том числе и новообразований толстой кишки, что нашло отражение в пересмотре классификации TNM в 2010 и 2017 гг. Появилось множество новых дефиниций КРР, таких как состояние краев резекции, цитокератиновый профиль, признаки микросателлитной нестабильности, опухолевые депозиты, опухолевое почкование и др. [Федянин М.Ю. и др., 2017; Щаева С.Н., 2017; De Smedt L. et al., 2016], что делает данные раковых регистров за прошлые годы недостаточно легитимными и требует их переосмысления [Fleming M. et al., 2012].

Сегодня существует необходимость комплексного анализа морфологии и иммуногистохимии КРР II стадии, выполненного на статистически репрезентативном материале, для стратификации и выделения признаков, определяющих прогноз и особенности течения заболевания.

**Цель исследования:** валидизация прогностических патоморфологических критериев КРР II стадии на основе анализа послеоперационной выживаемости пациентов.

**Основные задачи исследования:**

1. Осуществить пересмотр архивного материала ракового регистра Городского клинического онкологического диспансера Санкт-Петербурга за 2011 г. и ранжировать его в соответствии с 8-й редакцией классификации TNM с выделением особенностей гистологического строения колоректального рака II стадии категорий pT<sub>3</sub> и pT<sub>4</sub>.
2. Определить частоту лимфо-вазкулярной и периневральной инвазии опухоли.
3. Дать характеристику феномена «почкования опухоли» при различных катамнестических вариантах течения заболевания.
4. Сопоставить данные гистологического и иммуногистохимического исследований.
5. Обосновать минимальную стандартную иммуногистохимическую панель при послеоперационном патологоанатомическом исследовании случаев колоректального рака.
6. Обосновать комплекс морфологических (в т.ч. иммуногистохимических) признаков колоректального рака II стадии, позволяющих прогнозировать послеоперационную выживаемости пациентов.
7. Рассмотреть необходимость расширения показаний к адъювантной химиотерапии при II стадии колоректального рака на основе стратификации прогностических критериев.

**Научная новизна исследования.** Впервые на основе комплексного анализа гистоморфологических критериев в соответствии с новой классификацией TNM (2017) проанализированы и ранжированы прогностические признаки КРР II стадии, что позволит уточнить показания и противопоказания к послеоперационному ведению пациентов, в том числе к адъювантной терапии.

Продемонстрирована корреляция между гистологической и иммуногистохимической характеристиками пролиферативной активности КРР и обоснованы критерии ее оценки при рутинных методах обработки материала.

На базе статистического анализа доказана возможность использования в клинике воспроизводимого патолого-анатомического метода оценки почкования опухоли на границе инвазии в гистологическом материале, как одного из основных критериев 5-летней выживаемости пациентов с КРР II стадии.

Обоснованы алгоритмы исследования операционного и биопсийного материала, полученного от пациентов со II стадией КРР, на основе рутинных методов окраски на первом этапе диагностики и на основе иммуногистохимических и молекулярно-генетических методик при оказании специализированной медицинской помощи.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Данные, полученные в процессе настоящего исследования, применимы в практической работе врачей-патологоанатомов и онкопроктологов, а также в педагогическом процессе на кафедрах патологической анатомии и онкологии.

**Методология и методы исследования.** Проведено нерандомизированное (когортное) исследование со сравнительным ретроспективным (в т.ч. корреляционным) анализом комплекса морфологических предикторов колоректального рака и показателей 5-летней выживаемости пациентов. Диссертационная работа построена на основе общенаучных и специальных методов познания. Источником для формулировки цели и задач научной работы, способов и средств ее проведения послужил анализ отечественных и зарубежных литературных источников. Диссертация базируется на использовании широкого спектра традиционных и современных патолого-анатомических методов исследования (органомерического, гистологического, гистохимического и иммуногистохимического) и обработке полученных в результате этого данных с применением статистического анализа.

Исследование одобрено независимым этическим комитетом СЗГМУ имени И.И. Мечникова (протокол № 6 от 05.06.2019 г.).

**Внедрение результатов исследования в практику.** Результаты диссертационного исследования внедрены в практику лечебно-

диагностического и учебного процессов на кафедре патологической анатомии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова и патологоанатомического отделения Городского клинического онкологического диспансера Санкт-Петербурга.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Основные задачи патоморфологической диагностики колоректальных карцином – определение степени зрелости опухоли, глубины инвазии, наличия сосудистой/периневральной инвазии, оценка состояния краев резекции и наличия «почкования» – должны решаться на основании традиционного патологоанатомического исследования операционного материала.
2. Диагностически значимое опухолевое почкование на границе инвазии при колоректальных карциномах II стадии может считаться показанием к адъювантной химиотерапии в онкологической клинике, согласно общемировым тенденциям.
3. Экономически целесообразно разделить морфологическое исследование колоректальных карцином на традиционное, которое может осуществляться в условиях неспециализированных больниц, и дополнительное (иммуногистохимические, молекулярно-генетические и др.), которое следует выполнять в специализированных медицинских учреждениях.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования.**

Достоверность результатов диссертационной работы основана на обобщающем теоретическом анализе проблемы, выборе адекватных поставленным задачам общенаучных и специальных методов исследования, корректной статистической обработке полученных данных. Материалы диссертации доложены на I гастроэнтерологическом конгрессе с международным участием «Гастроэнтерология России с рождения до старости» (26.04.2018 г.), на заседании Общества патологоанатомов Санкт-Петербурга (05.03.2019 г.) и на проблемной комиссии «Структурно-функциональная организация,

патофизиология и патоморфология человека и животных» СЗГМУ им. И.И. Мечникова (протокол № 22 от 22.06.2019 г.).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ, 3 из которых – в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

**Личный вклад автора в проведенное исследование.** Автор самостоятельно обрабатывал данные литературы, отбирал и систематизировал материал, описывал и анализировал результаты макроскопического, гистологического, гистохимического и иммуногистохимического исследования. Автором лично выполнены статистическая обработка полученных данных и обобщение результатов исследовательской работы.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение), выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Текст иллюстрирован 11 таблицами и 24 рисунками. Библиография работы включает 247 источников, в том числе 39 отечественных и 208 зарубежных публикаций.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материал и методы исследования**

Выполнен ретроспективный анализ 280 случаев KPP II стадии ( $pT_{3-4}N_0M_0$ ) у 165 женщин и 115 мужчин в возрасте от 30 лет до 91 года (медиана – 69 лет), проходивших обследование с последующим оперативным лечением на базе Городского клинического онкологического диспансера (г. Санкт-Петербург) в 2011 г. Было пересмотрено более 2100 гистологических препаратов операционного материала, окрашенных гематоксилином и эозином, альтиановым синим и реактивом Шиффа (PAS-реакция). Определялись морфологическая структура и зрелость новообразования, описывалась перитуморозная и интратуморозная лейкоцитарная инфильтрация, выделялись

наблюдения с сосудистой и периневральной инвазией. Отдельно анализировали почкование (tumor budding) и пролиферативную активность опухоли. Для этого использовались парафиновые блоки операционного материала, хранившиеся в архиве патологоанатомического отделения ГКОД Санкт-Петербурга.

Критериями исключения вследствие малочисленности наблюдений и низкой статистической репрезентативности послужило медуллярное и чисто муцинозное строение аденокарцином.

При анализе опухолевого почкования на границе инвазии применялись критерии, основанные на работах B. Mitrovic et al. [2012], S.-J. Cho, S. Kakar [2018] и рекомендациях международного консенсуса ITBCC [2017]. Опухолевое почкование оценивали в два этапа на основе ускоренного метода по L.M. Wang et al. [2009] без деления по степени дифференцировки из-за отсутствия однозначных критериев ее клинической интерпретации. Сначала на границе инвазии при малом увеличении выделяли косвенные признаки этого феномена (наличие инфильтративного компонента, неровность и размытость границ инвазии), а затем в 10 последовательных полях зрения при 200-кратном увеличении определяли наличие опухолевых почек. Площадь одного такого поля зрения близка к  $1 \text{ мм}^2$  ( $\approx 0,785 \text{ мм}^2$ ) и признана рядом исследователей как минимально достаточная [Grigore A.D. et al., 2016]. Случай классифицировали как «позитивный», если почки находили не менее чем в 50% полей зрения, и как «негативный», если почки встречались менее чем в 50% полей зрения. В соответствии со стандартизированной концепцией, по рекомендациям международного консенсуса [Lugli A. et al., 2017] подсчет выполняли при окраске гематоксилином и эозином. При затруднениях в идентификации опухолевых клеток в отдельных наблюдениях применяли иммуногистохимическую реакцию на панцитокератин (клон AE1/AE3 в разведении 1:50) или другие цитокератины. В частности, для оценки фенотипического профиля новообразования в 30 случайно отобранных наблюдениях выполнено исследование с антителами к цитокератинам 7 и 20 и к ядерному белку CDX-2 (клон AMT28).

Подсчет делящихся клеток осуществлен на «параллельных» (серийных) гистологических препаратах, изготовленных после парафиновой проводки, окрашенных гематоксилином и эозином и обработанных антителами к Ki-67 (клон MIB-1 в разведении 1:100). Подсчет митозов и Ki-67-положительных ядер выполнялся в предварительно выделенных при обзорной микроскопии «горячих точках», на четыре поля зрения при большом увеличении микроскопа ( $40\times$ ,  $\approx 1\text{ мм}^2$ ). В каждом случае оценивались не менее 10 полей зрения. При гистологической окраске учитывались только явные митотические фигуры, «сомнительные» (пикнотичные, апоптотические и др.) ядра исключались.

Иммуногистохимические реакции выполнялись по стандартному протоколу. Депарафинизация срезов осуществлялась путем проводки по ксилолам (по три минуты в двух емкостях) и спиртам (по три минуты в четырех емкостях с 96° этиловым спиртом) с последующей промывкой (три минуты) в дистиллированной воде. Демаскировку антигена для иммуногистохимического исследования осуществляли в цитратном буфере (pH 9) в течение 30 минут в водяной бане при температуре 98°C, затем препараты (после остывания) промывались дистиллированной водой. Срезы обводились парафиновым карандашом. Эндогенную пероксидазу ингибировали 3% раствором перекиси водорода, стекла ополаскивали в промывочном буфере. После этого на срезы наносили первое антитело: экспозиция 60 минут при комнатной температуре во влажной камере. Для визуализации реакции применяли полимерную систему EnVision (Dako), в качестве хромогена использовали диаминобензидин, ядра докрашивали гематоксилином Майера. Затем препараты обезвоживали в 96° спирте (три емкости по три минуты), проводили по трем ксилолам (по три минуты) и заключали под покровные стекла при помощи полистирола.

Клинико-экономический сравнительный анализ гистологических и иммуногистохимических методов исследования препаратов проведен в соответствии с ОСТ 91500.14.0001–2002 «Клинико-экономические исследования. Общие положения».

## **Статистическая обработка результатов исследования**

Полученные результаты были квантифицированы и обработаны методами описательной статистики с вычислением медианы (Me) для количественных переменных и долей в процентах для номинальных переменных с их 95%-ным доверительным интервалом (95% ДИ), рассчитанным по методу Вилсона. 95% доверительный интервал вычислялся для экстраполяции полученных данных на общее число больных за анализируемый период в Санкт-Петербурге [Мирабишвили В.М., 2017]. Определялся интерквартильный размах ( $Q_{25}-Q_{75}$ ). Статистическая значимость различий между сравниваемыми параметрами оценивалась на основе критерия согласия Пирсона ( $\chi^2$ ) или U-критерия Манна–Уитни [Lang T.A., Altman D.G., 2016]. Анализ выживаемости осуществлялся путем построения кривых Каплана–Майера [Ланг Т.А., Сесик М., 2016]. Симметричность квантифицированных массивов оценивали по критерию Шапиро–Уилка (W) и при ассиметричном распределении признаков применяли комплекс непараметрических статистических методов с вычислением коэффициентов корреляции (R) и детерминации ( $R^2$ ). При малом количестве наблюдений использовался точный тест Фишера [Razali N.M. et al., 2011].

Базы данных формировались в электронных таблицах Microsoft Excel пакета Microsoft Office (Microsoft Corporation, США). В этой же программе выполнялся расчет значений, необходимых для описательной статистики. Для обработки результатов исследования использовалась компьютерная система программного обеспечения Statistica 10 (Statsoft Inc., США).

## **Результаты исследования и их обсуждение**

В целом за анализируемый период в Городском клиническом онкологическом диспансере Санкт-Петербурга было пролечено 694 пациента с КРР, среди которых опухоли II стадии составили 40,3%. Статистическая мощность исследования ( $1-\beta$ ), таким образом, равнялась 0,9998, то есть вероятность ошибки второго рода ( $\beta$ ) была менее 0,001.

В большинстве наблюдений диагностированы высоко- и умеренно дифференцированные новообразования (таблица 1). Поражение левых отделов толстой кишки зарегистрированы у 189 (67,5%), правых отделов – у 91 пациента (32,5%). Глубина инвазии уровня T<sub>3</sub> подтверждена при пересмотре препаратов в 219 (78,2%) и уровня T<sub>4</sub> – в 61 (21,8%) случае.

Иммунофенотипирование, выполненное на 30 наблюдениях, показало соответствие профиля новообразований из собственного материала общей статистике KPP [Tuffana M.S.A. et al., 2018]: фенотип CK7<sup>-</sup>CK20<sup>+</sup> определен в 25 случаях (83%; 95% ДИ: 66,4–92,7%), положительная реакция на белок CDX-2 – в 27 случаях (90%; 95% ДИ: 74,4–96,5%).

Таблица 1

Гистологическая характеристика 280 наблюдений колоректального рака II стадии

| Характеристика                |         | Кол-во наблюдений |      |           |
|-------------------------------|---------|-------------------|------|-----------|
|                               |         | абс.              | %    | 95% ДИ    |
| АдК*                          | Grade 1 | 113               | 40,4 | 34,8–46,2 |
|                               | Grade 2 | 110               | 39,3 | 33,8–45,1 |
|                               | Grade 3 | 23                | 8,2  | 5,5–12,0  |
| АдК* с муцинозным компонентом |         | 34                | 12,1 | 8,8–16,5  |

\* АдК – аденокарцинома

Из 280 человек с опухолями II стадии через 5 лет выжили 180. Уровень выживаемости не имел статистически значимой связи ни с полом ( $\chi^2=3,198$ ,  $df=1$ ,  $p=0,086$ ), ни с возрастом больных ( $U=6794,0$ ,  $Z=0,66$ ,  $p=0,509$ ), ни с локализацией новообразования (таблица 2, рисунок 1). На анализируемом материале не зарегистрировано связи 5-летней выживаемости с лево- и правосторонними поражениями толстой кишки:  $\chi^2=1,308$ ,  $df=1$ ,  $p=0,269$  (рисунок 2). Также не было обнаружено зависимости между выживаемостью пациентов и степенью зрелости новообразования (таблица 3).

Таблица 2

Локализация новообразований и 5-летняя выживаемость пациентов  
с колоректальным раком II стадии

| Локализация<br>(код МКБ-О)     | Выжившие в течение 5 лет |      |           | Умершие в течение 5 лет |      |           |
|--------------------------------|--------------------------|------|-----------|-------------------------|------|-----------|
|                                | абс.                     | %    | 95% ДИ    | абс.                    | %    | 95% ДИ    |
| C18.0                          | 20                       | 11,1 | 7,3–16,5  | 11                      | 11,0 | 6,3–18,6  |
| C18.2                          | 23                       | 12,8 | 8,7–18,4  | 9                       | 9,0  | 4,8–16,2  |
| C18.3                          | 8                        | 4,4  | 2,3–8,5   | 7                       | 7,0  | 3,4–13,7  |
| C18.4                          | 12                       | 6,7  | 3,9–11,3  | 1                       | 1,0  | 0,2–5,4   |
| C18.5                          | 4                        | 2,2  | 0,9–5,6   | 3                       | 3,0  | 1,0–8,5   |
| C18.6                          | 8                        | 4,4  | 2,3–8,5   | 4                       | 4,0  | 1,6–9,8   |
| C18.7                          | 49                       | 27,2 | 21,2–34,1 | 28                      | 28,0 | 20,1–37,5 |
| C20                            | 56                       | 31,2 | 24,8–38,2 | 37                      | 37,0 | 28,2–46,8 |
| $\chi^2=6,662$ , df=7, p=0,475 |                          |      |           |                         |      |           |

Таблица 3

Степень зрелости новообразований и 5-летняя выживаемость пациентов  
с колоректальным раком II стадии

| Опухоль*                       | Выжившие в течение 5 лет |      |           | Умершие в течение 5 лет |      |           |
|--------------------------------|--------------------------|------|-----------|-------------------------|------|-----------|
|                                | абс.                     | %    | 95% ДИ    | абс.                    | %    | 95% ДИ    |
| АдК GI                         | 75                       | 41,7 | 34,7–49,0 | 38                      | 38,0 | 29,1–47,8 |
| АдК GII                        | 72                       | 40,0 | 33,1–47,3 | 38                      | 38,0 | 29,1–47,8 |
| АдК GIII                       | 14                       | 7,8  | 4,7–12,6  | 9                       | 9,0  | 4,8–16,2  |
| АдК с МК                       | 19                       | 10,5 | 6,9–15,9  | 15                      | 15,0 | 9,3–23,3  |
| $\chi^2=0,895$ , df=3, p=0,835 |                          |      |           |                         |      |           |

\* АдК – аденокарцинома, G (grade) – степень зрелости, АдК с МК – аденокарцинома с муцинозным компонентом.

При сравнительном анализе 5-летней выживаемости пациентов и косвенных признаков микросателлитной нестабильности (муцинозный компонент, кроноподобная перифокальная реакция, внутриопухолевая лимфоцитарная инфильтрация), наличия лимфососудистой и периневральной инвазии и феномена почкования опухоли фактически статистически значимая связь обнаружена только с почкованием новообразования:  $\chi^2=28,333$ , df=1, p=0,000.

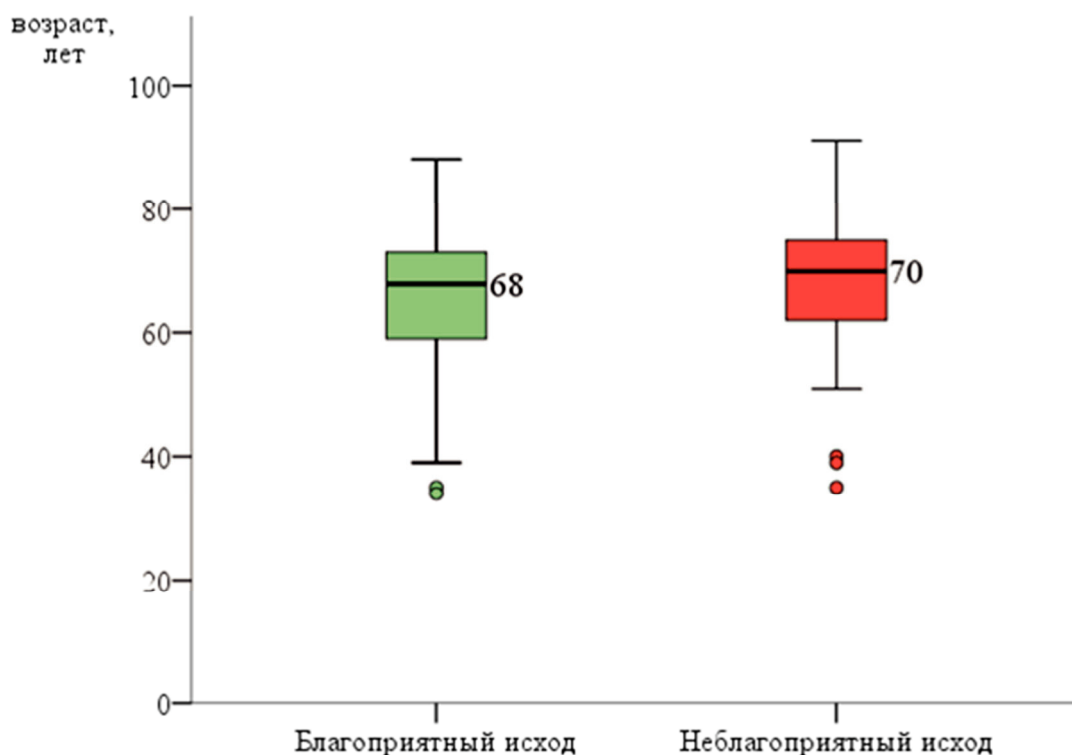


Рисунок 1. Послеоперационная выживаемость при колоректальном раке в зависимости от возраста пациентов.

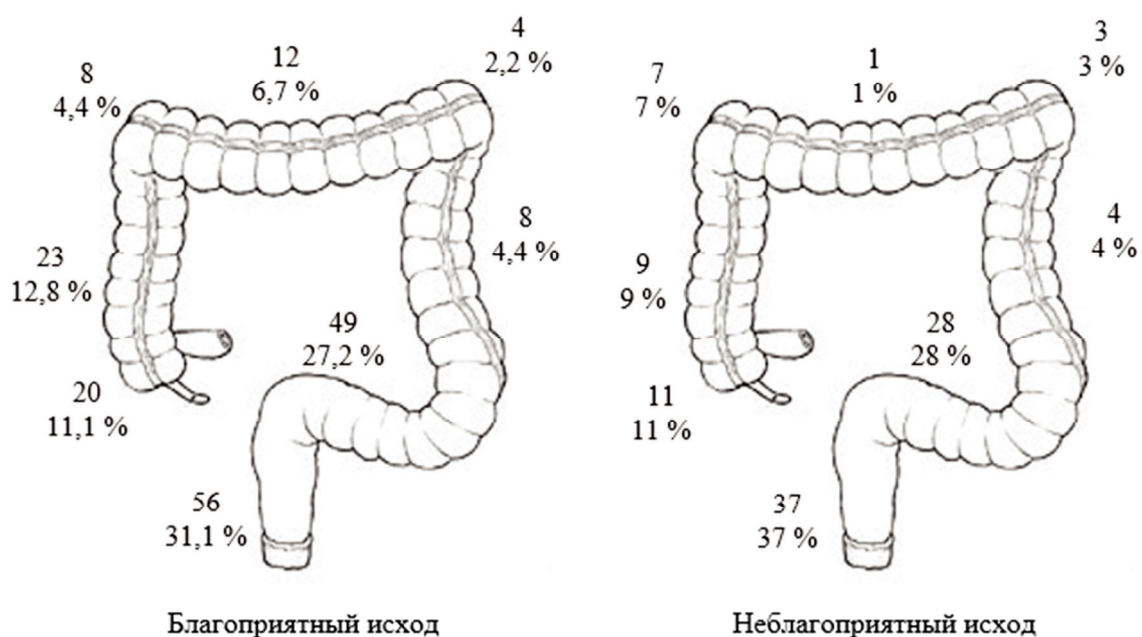


Рисунок 2. Послеоперационная выживаемость в зависимости от локализации КРР.

На собственном материале почкование опухоли диагностировано в 66 случаях (23,6% наблюдений, 95% ДИ: 19–28,9%) и не было связано с возрастом ( $U=6055,5$   $p=0,231$ ) и полом пациентов ( $\chi^2=0,29$ ,  $p=0,668$ ). Послеоперационная

5-летняя общая выживаемость при наличии почкования оказалась практически в два раза ниже (рисунок 3).

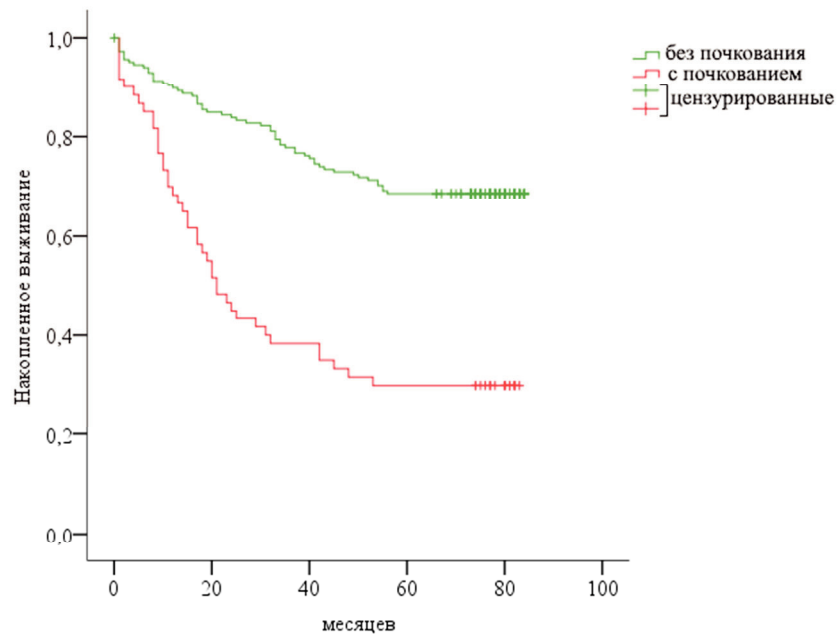


Рисунок 3. Послеоперационная выживаемость в зависимости от статуса почкования КРР.

При высокодифференцированных аденокарциномах феномен почкования зафиксирован в 22,2% наблюдений, при умереннодифференцированных и низкодифференцированных – в 26,4 и 12% наблюдений, соответственно. Если по рекомендации ВОЗ разделить все КРР только на высоко- и низкодифференцированные в зависимости от доли железистых структур [Tang L.H. et al., 2016], то частота почкования в первом случае будет равняться 24,2% – практически каждое четвертое наблюдение. В целом значимой корреляции между степенью зрелости опухоли и почкованием не наблюдалось ( $\chi^2=1,09$ ,  $p=0,58$ ). В то же время наличие муцинозного компонента в опухоли ассоциировалось практически с 4-кратным снижением частоты почкования:  $\chi^2=7,97$  при  $p=0,004$ , отношение шансов – 0,27 (95% ДИ: 0,1–0,71).

Также не зарегистрировано значимых различий в частоте почкования ( $\chi^2=0,66$ ,  $p=0,497$ ) при различной глубине инвазии колоректальных карцином: при раке категории  $T_3$  низкодифференцированные опухолевые клетки и их кластеры размером до четырех единиц обнаружены в 54 случаях (19,7%), при раке категории  $T_4$  – в 12 случаях (24,7%). При многофакторном анализе

исходов заболевания на собственном материале только опухолевое почкование продемонстрировало статистически значимые результаты: вероятность смерти в течение пяти лет после операции в этой группе пациентов превышала 42% ( $p < 0,001$ ), отношение шансов на развитие неблагоприятного исхода составило 4,7 (95% ДИ: 2,6–8,5). Степень зрелости, наличие муцинозного компонента, глубина инвазии, пол и локализация, напротив, не относились к факторам риска снижения 5-летней выживаемости (рисунок 4).

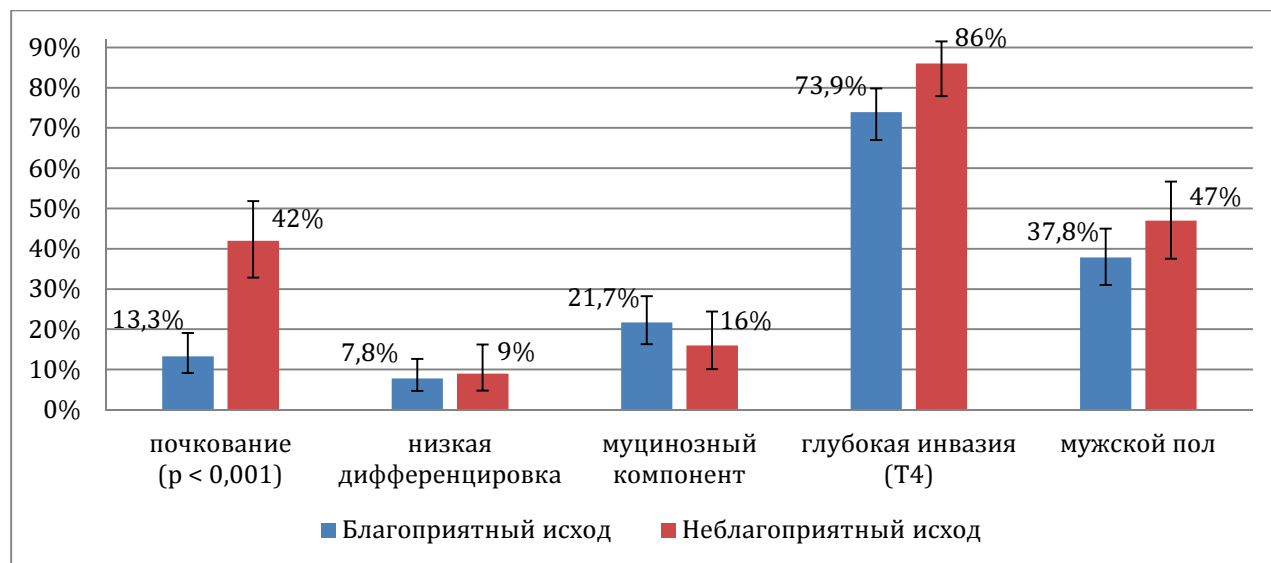


Рисунок 4. Факторы риска неблагоприятного исхода колоректального рака (доли в процентах и значение 95% ДИ)

По данным МНИОИ им. П.А. Герцена, в 2017 г. в Санкт-Петербурге было зарегистрировано 3153 случая КРР (без учтенных посмертно). Из них 1068 случаев (33,9%) пришлось на опухоли II стадии (95% ДИ: 32,2–35,5%) [Каприн А.Д. и др., 2018]. Если, по нашим данным, почкование опухоли у этой категории больных встречается в 23,6% случаев (95% ДИ: 19–28,9%), в масштабах Санкт-Петербурга можно ожидать до 300 подобных наблюдений ежегодно. Учитывая медиану стоимости иммуногистохимического анализа (см. далее), использование предлагаемой оценки пролиферативной активности и почкования опухоли на основе рутинных гистологических методик даст возможность сэкономить до 657 тыс. руб. ежегодно.

Наличие гистологической картины почкования снижает пятилетнюю выживаемость на 36,5% (95% ДИ: 63,6–27,1%). Таким образом, учет

почкования в качестве фактора риска неблагоприятного исхода и назначение адекватной химиотерапии позволят в Санкт-Петербурге повлиять на выживаемость не менее 110 человек, оперированных по поводу КРР II стадии, за один год.

Пролиферативная активность КРР была оценена на материале 30 аденокарцином ободочной и прямой кишок у пациентов в возрасте 55–74 лет (11 мужчин и 19 женщин). Подсчет делящихся клеток осуществлен на «параллельных» (серийных) гистологических препаратах, изготовленных после парафиновой проводки, окрашенных гематоксилином и эозином и обработанных антителами к белку Ki-67, в предварительно выделенных при обзорной микроскопии «горячих точках», на четыре поля зрения при большом увеличении микроскопа ( $40\times$ ,  $\approx 1\text{ мм}^2$ ). В каждом случае оценивались не менее 10 полей зрения. При гистологической оценке учитывались только явные митотические фигуры, «сомнительные» (пикнотичные, апоптотические и др.) ядра исключались. Общий массив полученных данных по критерию Шапиро–Уилка (W) был распределен ассиметрично (рисунок 5), и поэтому для их анализа применен комплекс непараметрических методов.

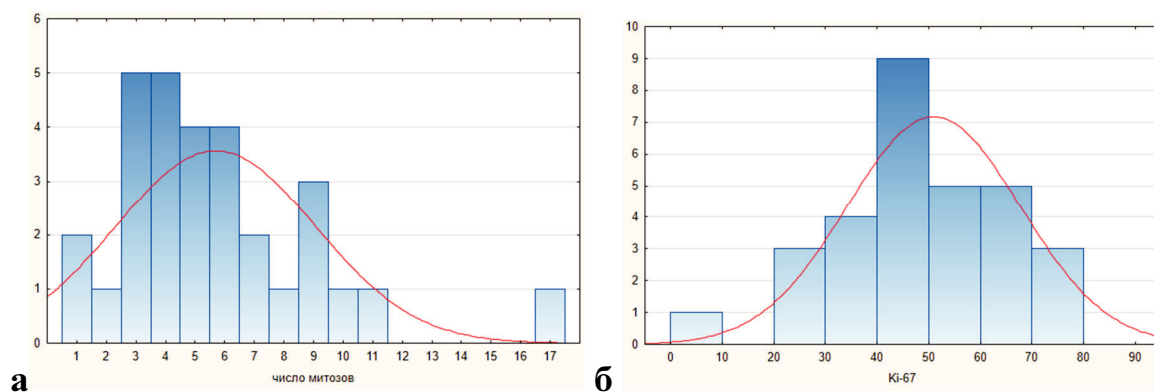


Рисунок 5. Проверка нормальности распределения числа делящихся клеток:  
а – окраска гематоксилином и эозином,  $W=0,89624$ ,  $p=0,00681$  (распределение отличное от нормального); б – реакция на Ki-67,  $W=0,97637$ ,  $p=0,72298$  (распределение отличное от нормального)

Оценка по коэффициенту ранговой корреляции Кендалла продемонстрировала высокую степень прямой связи между числом митозов, подсчитанных при рутинной окраске, и пролиферативной активностью,

оцененной иммуногистохимическим методом ( $\tau=0,708$ ,  $p<0,05$ ). При построении диаграммы рассеяния определен нелинейный характер связи (рисунок 6), что потребовало логарифмического преобразования модели:

$$Ki-67=15,76+51,56 \times \log_{10}(n),$$

где  $n$  – число делящихся клеток.

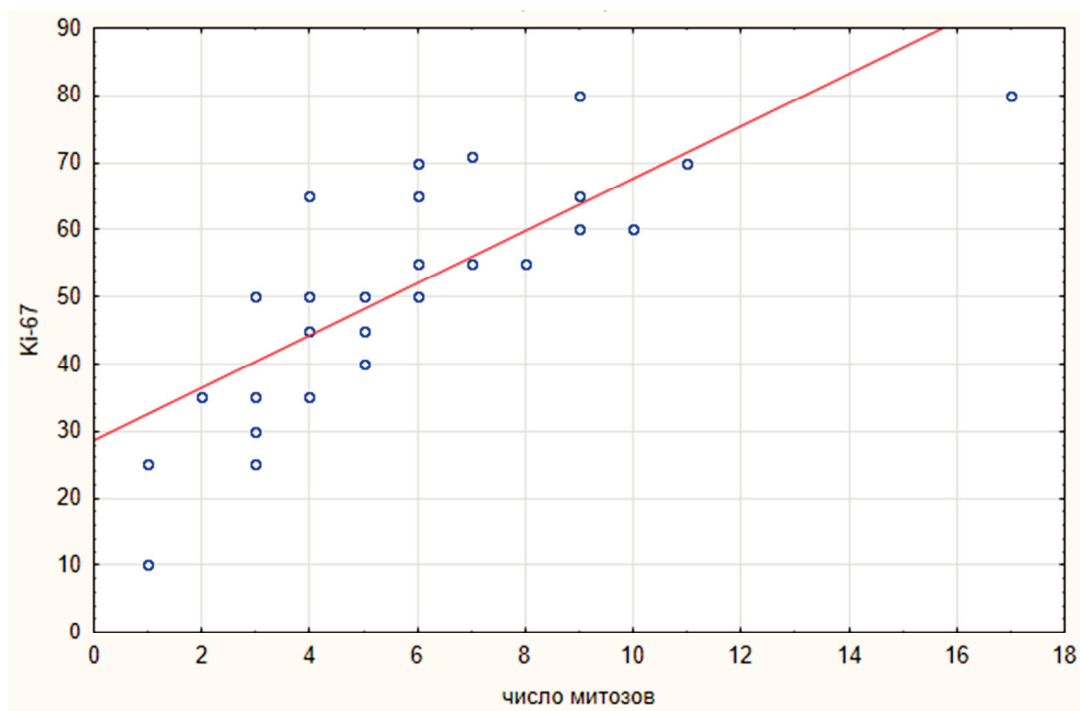


Рисунок 6. Диаграмма рассеяния до логарифмического преобразования модели: имеется очевидная прямая связь, но она носит нелинейный характер

Таблица 5

Итоговые показатели предсказательной способности модели

| Показатель                | Значение |
|---------------------------|----------|
| Множественный R           | 0,85     |
| Множественный $R^2$       | 0,73     |
| Скорректированный $R^2$   | 0,72     |
| F (1,28)                  | 74,7     |
| p                         | <0,001   |
| Стандартная ошибка оценки | 8,87     |

Таблица 6

Характеристика коэффициентов модели

| Показатель          | Коэффициент | s        | t (df=28) | p      |
|---------------------|-------------|----------|-----------|--------|
| Свободный член      | 15,75597    | 4,354018 | 3,62      | 0,001  |
| Log (числа митозов) | 51,55690    | 5,963526 | 8,65      | <0,001 |

Коэффициенты корреляции ( $R$ ) и детерминации ( $R^2$ ) свидетельствовали в пользу высокой предсказательной способности логарифмической модели – способности оценивать реакцию на Ki-67 по числу митозов, определенному при окраске гематоксилином и эозином (таблицы 5, 6).

Для облегчения интерпретации результатов исследования и практического использования предлагаемой модели все наблюдения на диаграмме рассеяния удалось разделить на три кластера-«облака» с близкими значениями по Ki-67 при практически одинаковом числе митозов. Так, 1–2 митоза на  $1 \text{ мм}^2$  соответствовали менее чем 30%-ному пролиферативному индексу, определенному на основе иммуногистохимической реакции; 3–5 митозов на  $1 \text{ мм}^2$  – 30–50%-ному; 6 и более митозов на  $1 \text{ мм}^2$  – более 50%-ного (рисунок 7). Текст Краскела–Уоллиса подтвердил значимость различий между описанными кластерами пролиферативной активности (рисунок 8).

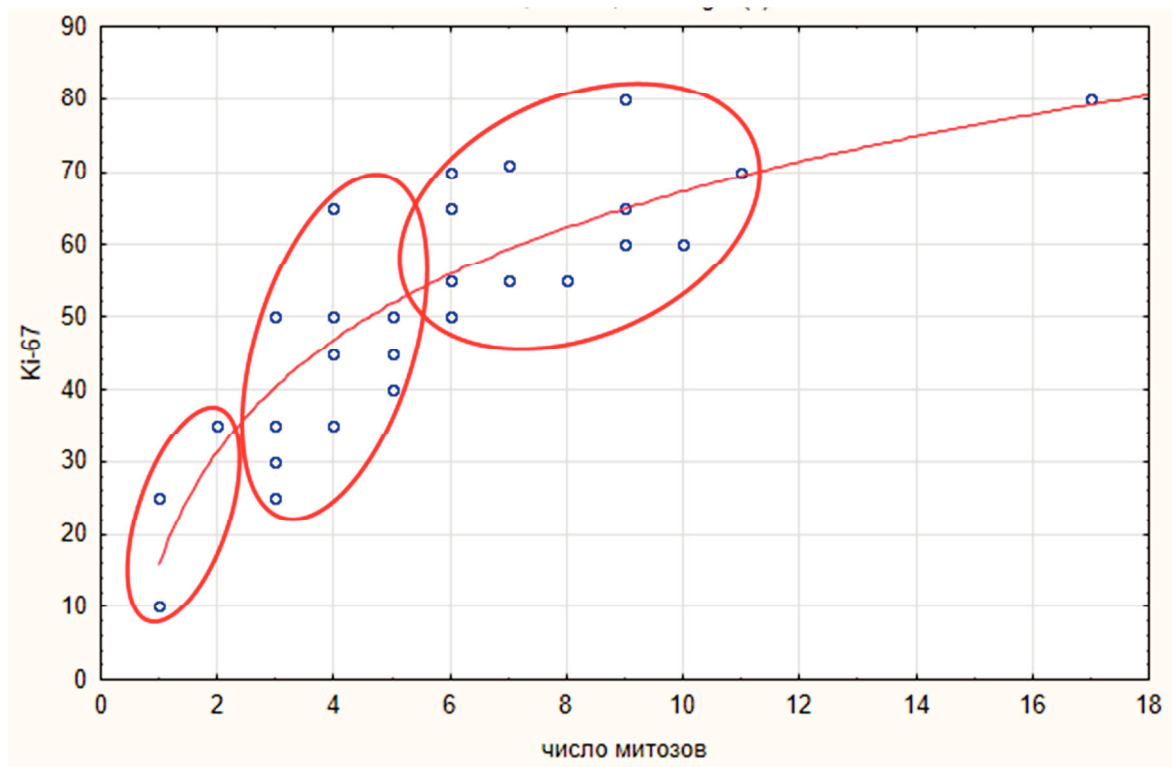


Рисунок 7. Диаграмма рассеяния после логарифмического преобразования модели с тремя «облаками» близких значений пролиферативного индекса, рассчитанного по реакции на Ki-67, при практически одинаковом числе митозов

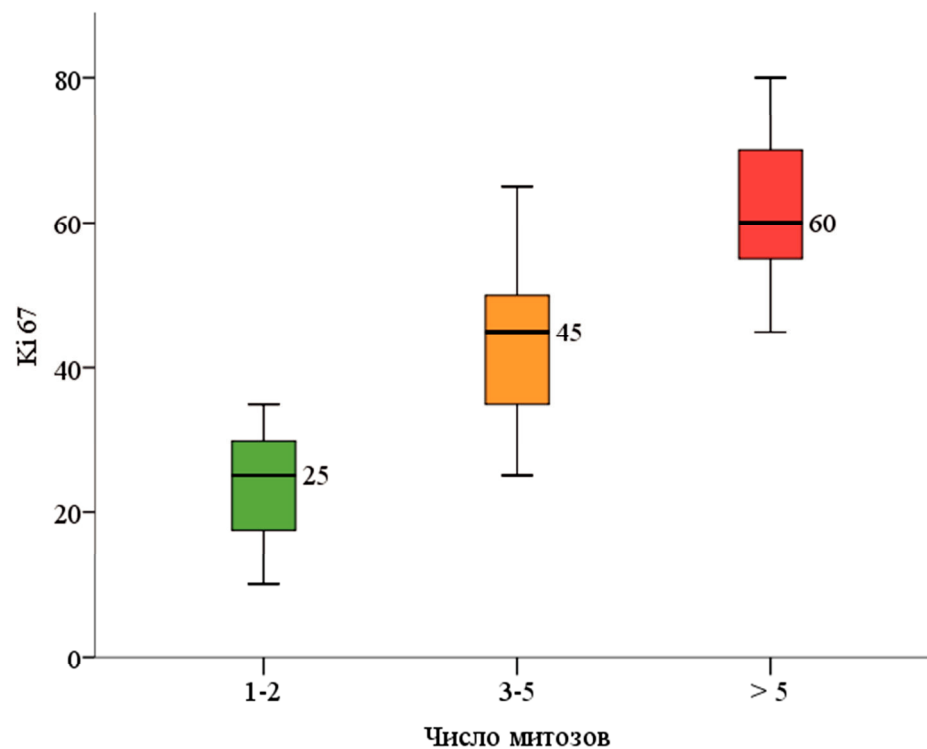


Рисунок 8. Зависимость числа митозов от принадлежности к группам опухолей с различной пролиферативной активностью по Ki-67 (тест Краскела–Уоллеса:  $N=20$ ,  $df=2$ ,  $p<0,001$ )

Для оценки финансовой составляющей патоморфологической части диагностического процесса был выполнен клинико-экономический сравнительный анализ гистологических и иммуногистохимических методов исследования. В исследование вошли 17 медорганизаций различной формы собственности, оказывающие высокотехнологичную и иную специализированную медицинскую помощь по профилю «онкология» на территории Санкт-Петербурга в соответствии с решением № 18 заседания Комиссии по разработке территориальной программы обязательного медицинского страхования в Санкт-Петербурге от 25.12.2017 г. Из этих медицинских учреждений иммуногистохимические исследования онкологического материала на момент написания данной работы выполнялись в 12 (71%). Стоимость одного случая в ценах 2018 г. при использовании только рутинных методик в среднем (Me) равнялась 1000 рублей ( $Q_{25}$ – $Q_{75}$ : 860–1500 рублей), а стоимость иммуногистохимического исследования – 2190 рублей ( $Q_{25}$ – $Q_{75}$ : 1900–2925 рублей). Различия по стоимости статистически значимы:  $U=25,5$ ;  $Z=-3,39$ ;  $p<0,001$  (рисунок 9).

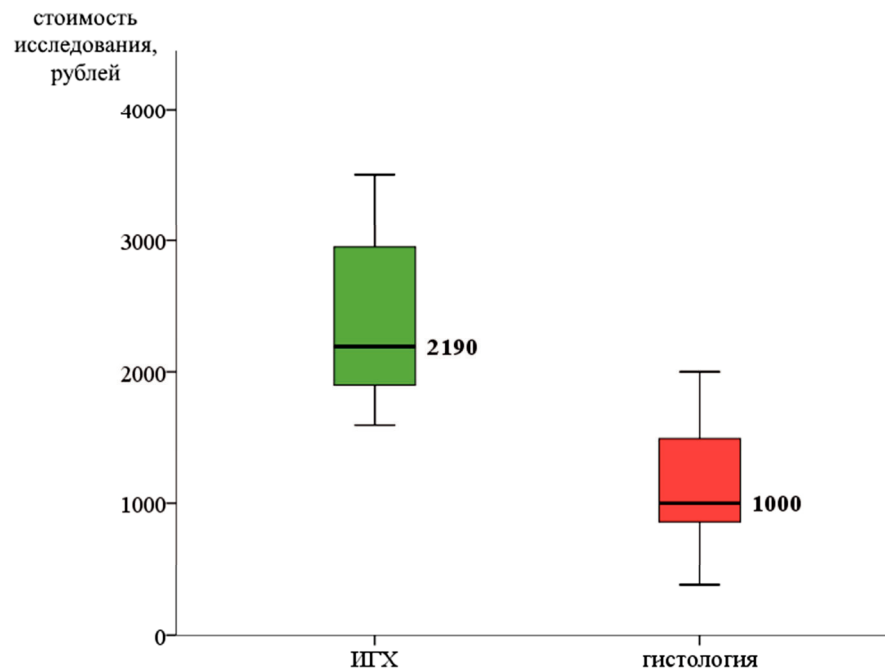


Рисунок 9. Стоимость выполнения различных видов морфологического исследования по профилю «онкология» в Санкт-Петербурге в 2018 г.

Однако, если результаты рутинных гистологических исследований демонстрируют практически 100%-ную воспроизводимость (без учета субъективного фактора), то результаты иммуногистохимического анализа зачастую зависят и от оснащённости лаборатории, и от набора доступных диагностических тестов, и от квалификации персонала. Так, по данным D. Planchard et al. [2015], при сравнении диагностики Her2-статуса в центральной и локальных лабораториях частота несоответствия доходила до 26,6%. Нельзя не учитывать и внутриопухолевую генетическую гетерогенность – дискордантность. Эта гетерогенность создает дополнительные диагностические трудности, когда возникает различия в генетическом статусе между опухолью и ее метастазами и даже между разными участками первичной опухоли. Кроме того, неоадьювантная и адьювантная терапия может ускорять и изменять процессы опухолевой эволюции. Известно, например, что применение антител против эпидермального фактора роста у пациентов с КРР и диким типом генов *RAS* приводит к появлению мутированных клонов (*mutRAS*) у 44% больных [Coleman R.L., 2017; Rossini D. et al., 2017].

Не меньшую проблему в наших реалиях представляют и нарушения протокола обработки биопсийного и операционного материала, особенно в случаях, когда традиционное гистологическое и иммуногистохимическое исследования разобщены во времени и месте выполнения. Если в условиях крупных онкологических центров врач-патологоанатом может быть уверен в соблюдении протокола обработки материала, то парафиновые блоки, поступающие из сторонних учреждений, часто представляют собой «черный ящик» с непредсказуемыми свойствами. Как правило, осуществляя консультации по архивному материалу, специалист онкоцентра не знает о времени так называемой «холодовой ишемии», о длительности фиксации, не может быть уверен в использовании забуференного формалина и правильной вырезке операционного материала. Все это ведет к непредсказуемым результатам иммуногистохимического исследования, и зачастую фенотипирование онкологического процесса по одному и тому же материалу в разных медицинских учреждениях обуславливает различные выводы.

Фактически рекомендациями (а не показаниями) к адьювантной химиотерапии при КРР II стадии сегодня считаются так называемые факторы негативного прогноза: низкая степень дифференцировки, наличие лимфоваскулярной/периневральной инвазии, позитивные края резекции и некоторые особенности оперативного пособия (вмешательство в условиях кишечной непроходимости/перитонита, неадекватная лимфодиссекция). Подтвержденная микросателлитная нестабильность опухолей II стадии данной локализации – свидетельство хорошего прогноза и противопоказание к адьювантной терапии [Ананьев В.С. и др., 2014].

Исходя из вышеприведенной аргументации, при микроскопической диагностике КРР преимущество должно принадлежать традиционному гистологическому и гистохимическому анализу. Эти исследования позволяет не только оценить степень дифференцировки, глубину распространения опухоли и наличие сосудистой и периневральной инвазии, но и с высокой долей вероятности описать признаки микросателлитной нестабильности, уровень

пролиферативной активности и, главное, – наличие клинически значимого почкования на границе инвазии. Далее в соответствии с предполагаемым протоколом адьювантного лечения материал может быть направлен на молекулярно-генетическое исследование.

## ВЫВОДЫ

1. Ретроспективный анализ 280 случаев КРР II стадии у 165 женщин и 115 мужчин в возрасте от 30 лет до 91 года (медиана – 69 лет), проходивших обследование и лечение (колэктомия с лимфодиссекцией) на базе Городского клинического онкологического диспансера (г. Санкт-Петербург) в 2011 г., показал, что в его структуре преобладали высоко- (40,4%) и умеренно-дифференцированные аденокарциномы (39,3%), низкодифференцированные аденокарциномы и аденокарциномы с муцинозным компонентом встречались в 8,2 и 12,1% соответственно. При этом были не только подтверждены диагнозы, но и выделены предикторы выживаемости пациентов.

2. Пятилетняя выживаемость пациентов с колоректальными аденокарциномами II стадии статистически значимо ( $p < 0,001$ ) связана с наличием почкования опухоли на границе инвазии и не зависит от пола и возраста пациентов, локализации и степени гистологической дифференцировки новообразования. Вместе с тем наличие муцинозного компонента в колоректальном раке сопряжено с 4-кратным снижением частоты почкования в аденокарциномах II стадии ( $p = 0,004$ ).

3. Почкование колоректальных аденокарцином II стадии встречалось в каждом четвертом случае при высокодифференцированных опухолях и не было связано с возрастом пациентов и глубиной инвазии опухоли. Вероятность смерти в течении 5 лет после операции при наличии почкования опухоли превышала 42% ( $p < 0,001$ ); вероятность развития неблагоприятного исхода составила 4,7 (95% ДИ: 2,6–8,5). Поэтому можно считать, что своевременное выявление феномена почкования имеет положительное прогностическое значение как

минимум для 0,00002% пациентов с КРР II стадии. В Санкт-Петербурге это составляет не менее 110 человек в год.

4. Традиционное морфологическое исследование биопсийного и операционного материала – основа диагностической оценки колоректальных аденокарцином II стадии. Все дополнительные исследования (иммуногистохимические, молекулярно-генетические и др.) следует выполнять в условиях специализированных (сертифицированных) онкологических центров, где будут проводиться хирургические вмешательства и/или адъювантная терапия.

5. Иммуногистохимическое исследование при аденокарциномах ободочной и прямой кишки (реакции на CK7, CK20, CDX-2, CD56, Ki-67) следует проводить только при низкой степени дифференцировки опухоли для исключения нейроэндокринного компонента и установления признаков микросателлитной нестабильности, а в затруднительных случаях (наличие некроза и выраженной воспалительной инфильтрации) для идентификации опухолевых «почек» достаточно использовать реакцию на панцитокератин.

6. Оценка митотической активности колоректальных аденокарцином, выполненная на основе традиционного гистологического исследования, достоверно ( $p < 0,001$ ) коррелирует с иммуногистохимической оценкой пролиферативной активности по белку Ki-67, отличаясь от последней высокой степенью воспроизводимости и малой зависимостью от условий обработки операционного материала.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. В качестве показания к адъювантной терапии при отсутствии гистологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических признаков микросателлитной нестабильности целесообразно рекомендовать почкование на границе инвазии колоректальных аденокарцином II стадии, отражающее резкую активизацию их инвазивного потенциала.

2. Диагностика клинически значимого опухолевого почкования должна основываться на однозначных морфологических критериях без деления на

разновидности высокой и низкой степени злокачественности, не имеющие точной интерпретации; для этого больше подходят полуколичественные методы оценки операционного материала на основе традиционного гистологического исследования, достоверность которых подтверждается статистическими данными.

3. При колоректальных аденокарциномах II стадии основные прогностические предикторы (степень зрелости и глубина инвазии, пролиферативная активность, лимфососудистая и периневральная инвазии, состояние краев резекции, клинически значимое почкование на границе опухоли) следует оценивать на основании традиционного морфологического исследования.

4. При диагностике злокачественных новообразований ободочной и прямой кишок рационально применять следующий алгоритм, который позволит избежать дублирования диагностических процедур, повысить качество верификации новообразований и снизить общую стоимость диагностического процесса практически в три раза только за счет одного иммуногистохимического анализа ( $p < 0,001$ ):

- на первом этапе опухоль выявляется в поликлинических отделениях и общесоматических стационарах в до- или послеоперационном периоде;
- на втором этапе, после предварительной верификации диагноза, пациенты должны направляться в специализированные (сертифицированные) онкологические центры;
- на третьем этапе, в специализированном онкологическом центре, устанавливается диагноз по системе TNM с выделением прогностических предикторов, для чего, при необходимости, используются иммуногистохимические реакции и молекулярно-генетический анализ с решением вопроса о тактике лечения пациента.

### **Список работ, опубликованных автором по теме диссертации**

1. Ковтун, Д.П. Особенности патологоанатомической диагностики колоректального рака в онкохирургической клинике / Д.П. Ковтун,

- Н.М. Аничков, О.Г. Полушин, Е.В. Пономарева, Г.Н. Хрыков // Поволжский онкологический вестник. – 2018. – № 1. – С. 59–67.
2. Ковтун, Д.П. Почкование опухоли как предиктор выживаемости при колоректальном раке II стадии / Д.П. Ковтун, О.Г. Полушин, Г.Н. Хрыков // Альманах Института хирургии им. А.В. Вишневского. – 2018. – № 1. – С. 341–342.
  3. Ковтун, Д.П. Опухолевое почкование на II стадии колоректального рака – показание к химиотерапии? / Д.П. Ковтун, Н.М. Аничков, О.Г. Полушин, Е.В. Пономарева, Г.Н. Хрыков, А.И. Любимов, Е.Ю. Калинина // Поволжский онкологический вестник. – 2018. – Т. 10, № 4. – С. 31–36.
  4. Ковтун, Д.П. Проллиферативная активность колоректальных аденокарцином: объективизация критериев морфологической оценки / Д.П. Ковтун, Н.М. Аничков, О.Г. Полушин, Е.В. Пономарева, А.И. Любимов, Е.Ю. Калинина // Медицинский академический журнал. – 2018. – Т. 18, № 3. – С. 52–56.
  5. Ковтун Д.П. Оценка пролиферативной активности колоректальных аденокарцином: иммуногистохимия и традиционный подход / Д.П. Ковтун, Н.М. Аничков, О.Г. Полушин // Сборник научных трудов Всероссийской конференции, посвященной 160-летию кафедры патологической анатомии ВМедА им. С.М. Кирова. – 2019. – С. 70 – 73.

### **Список сокращений**

АдК – аденокарцинома

ГКОД – Городской клинический онкологический диспансер

ДИ – доверительный интервал

КРР – колоректальный рак

МК – муцинозный компонент

МНИОИ – Московский научно-исследовательский онкологический институт

ITBCC – International Tumor Budding Consensus Conference

Me (от лат. – mediana) – медиана

Q (от англ. – quartile) – квартиль

R – коэффициент корреляции

R<sup>2</sup> – коэффициент детерминации