



О. П. Колесник, А. І. Шевченко, В. О. Туманський, А. В. Євсєєв, М. А. Шишкін

## ЭКСПРЕСИЯ CD-31/CD-34 У ХВОРИХ НА НЕДРІБНОКЛІТИННИЙ РАК ЛЕГЕНІ І-ІІ СТАДІЙ

Запорізький державний медичний університет

**Ключові слова:** недрібноклітинний рак легені, виживаність, CD31/CD34.

Індивідуалізація лікування хворих на рак легенів залишається одним із найактуальніших питань сучасної онкології. Для індивідуалізації призначення хімотерапевтичного та променевого лікування все частіше використовують молекулярні маркери. Одним з них є CD31/CD34, що вказують на щільність мікросудин у пухлині. Мета роботи полягала в оцінюванні щільності мікросудин у пухлинах хворих на недрібноклітинний рак легенів ранніх стадій і дослідженні кореляції цього показника із клініко-морфологічними факторами та прогнозом. Дослідження виконали на базі кафедри онкології Запорізького державного медичного університету. Визначення щільності мікросудин виконали у 241 хворого на недрібноклітинний рак легенів І-ІІ стадій. Аналіз експресії CD31/CD34 у пухлинах обстежених пацієнтів показав, що немає статистично вірогідного зв'язку між віком, статтю, індексом маси тіла хворого, локалізацією, критеріями Т і N, стадією захворювання, гістологічним типом, морфологічним диференціюванням пухлини, наявністю некрозів, інфільтрації вісцеральної плеври і кількістю мікросудин у пухлині. Однак кількість мікросудин має важливе прогностичне значення, що підтверджено одно- і багатофакторним аналізами. Отже, цей маркер можна використовувати для прогнозування виживаності хворих на недрібноклітинний рак легенів ранніх стадій.

### Экспрессия CD-31/CD-34 у больных немелкоклеточным раком легкого І-ІІ стадий

А. П. Колесник, А. И. Шевченко, В. А. Туманский, А. В. Евсеев, М. А. Шишкин

Индивидуализация лечения больных раком легкого остается одним из самых актуальных вопросов современной онкологии. Для индивидуализации назначения химиотерапевтического и лучевого лечения все чаще используют молекулярные маркеры. Одним из них являются CD31/CD34, с помощью которых возможно измерение плотности микрососудов в опухоли. Цель работы – оценить плотность микрососудов в опухолях больных немелкоклеточным раком легкого ранних стадий, а также исследовать корреляцию данного показателя с клинико-морфологическими факторами и прогнозом у пациентов. Исследование проведено на кафедре онкологии Запорожского государственного медицинского университета. Плотность микрососудов оценивали у 241 больного немелкоклеточным раком легкого І-ІІ стадии. Анализ экспрессии CD31/CD34 в опухолях обследованных пациентов показал, что нет статистически достоверной связи между возрастом, полом, индексом массы тела больного, локализацией, критериями Т и N, стадией заболевания, гистологическим типом, морфологической дифференцировкой опухоли, наличием некрозов, инфильтрацией висцеральной плевы и количеством микрососудов в опухоли. Но количество микрососудов имеет важное прогностическое значение, что подтверждено одно- и многофакторным анализом. Таким образом, этот маркер можно использовать для прогнозирования выживаемости больных немелкоклеточным раком легкого.

**Ключевые слова:** немелкоклеточный рак легкого, выживаемость, CD31/CD34.

### Expression of CD-31/CD-34 in patients with І-ІІ stages non-small cell lung cancer

О. П. Колесник, А. І. Шевченко, В. О. Туманський, А. В. Євсєєв, М. А. Шишкін

Individualization of patients with lung cancer treatment remains one of pressing questions of modern oncology. One of main markers are CD31/CD34 – that can be assessed by microvessel density (MD) in the tumor. The aim of our work was to evaluate MD in the tumor in patients with early stages NSCLC, and assess correlation of this factor with clinico-morphological criteria and prognosis for patients. Analysis of CD31/CD34, and assessment MD in to the tumor patients with early stages NSCLC showed that no statistical correlations between age, sex, BMI, T and N criteria stages of disease, location, histologic type of tumor, presence of necrosis and infiltration of visceral pleura and MD into the tumor, MD is very important prognostic factor for patients with NSCLC.

**Key words:** non-small cell lung cancer; survival, CD31/CD34.

Індивідуалізація лікування хворих на рак легенів залишається одним із найактуальніших питань сучасної онкології. Це пов'язано з тим, що саме рак легені посідає одне з перших місць у структурі захворюваності на злоякісні новоутворення у світі та перше місце у структурі смертності від новоутворень. Оперативне лікування не гарантує одужання пацієнта – у 50–60% хворих після операції виникають рецидиви захворювання, що є причиною загибелі. Для індивідуалізації призначення хімотерапевтичного та променевого лікування все частіше використовують молекулярні маркери. Одним з таких маркерів є CD31/CD34, що вказують на щільність мікросудин (ЩМ) у пухлині.

К. Масчіаріні та співавт. уперше визначили ЩМ у пухлині легені [7]. Згодом учені довели, що неоангіогенез, який розвивається при розмірі пухлини 1–2 мм, прискорює ріст і прогресію пухлини [1,6,12]. Для дослідження ЩМ нині ви-

користують такі маркери: фактор 8, CD31, CD34, CD105 [5]. CD31 – імуноглобулін із молекулярною масою 130 кДа. CD34 – трансмембранний глікопротеїд, що знаходиться на поверхні лейкоцитів, ендотеліальних і стовбурових клітин, має молекулярну масу 110 кДа [9–11].

#### МЕТА РОБОТИ

Оцінювання ЩМ у пухлинах хворих на недрібноклітинний рак легені ранніх стадій, а також дослідити кореляцію цього показника із клініко-морфологічними факторами та прогнозом у пацієнтів.

#### ПАЦІЄНТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження здійснили на кафедрі онкології Запорізького державного медичного університету. Щільність мікросудин виконали у 241 хворого на недрібноклітинний рак легенів (НДКРЛ) І-ІІ стадій (з червня 2008 до грудня 2012 р.). У дослідженні взяли участь 202 чоловіки (83,8%) і 39 жінок (16,2%). Середній вік хворих – 60,9 року (95% ВІ, 59,9–61,9).



Усім пацієнтам призначали радикальні оперативні втручання в обсязі лобектомії або пульмонектомії. Після видалення препарат направляли на планове патоморфологічне дослідження, після цього – на імуногістохімічний аналіз. ЦМ визначали за допомогою маркерів CD31/CD34, які селективно зв'язуються з ендотеліальними клітинами у пухлині. Підрахунок мікросудин виконували за методом Босарі [7]. Кожний зріз аналізували під малим збільшенням ( $\times 40$ – $\times 100$ ) для визначення ділянок із найбільшою концентрацією мікросудин. Після цього обирали три з них і ретельно підраховували при збільшенні  $\times 200$  (площа поля зору –  $0,739 \text{ мм}^2$ ), занотовували середню кількість судин у трьох полях зору. Великі судини із вмістом еритроцитів виключали з аналізу. Препарати оцінювали два незалежні гістологи.

Статистично дані опрацювали у програмі Statistica 6.0. Для оцінювання зв'язку між клініко-морфологічними параметрами використовували тест  $\chi^2$ . Аналіз виживаності виконали за допомогою методу Kaplan-Maier. Вплив чинників на виживаність оцінювали з допомогою Кокс-регресії. Статистично значущим вважали рівень  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Експресію мікросудин визначили у 241 хворого. Середня кількість мікросудин у пухлині пацієнтів становила  $68,7 \pm 2,1$  (95%, ДІ: 64,5–72,9%).

Для зручності прогнозування емпірично виділили дві групи пацієнтів: хворі з великою ( $\geq 63$ ) і з малою кількістю мікросудин ( $< 63$ ) (рис. 1, 2).

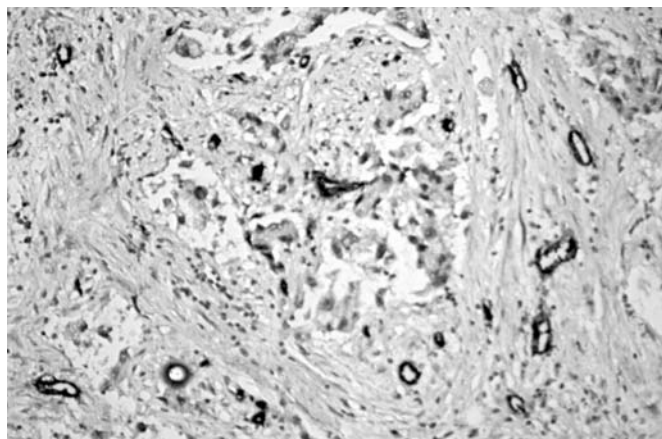


Рис. 1. НДКРЛ із високою кількістю мікросудин ( $\times 20$ ).

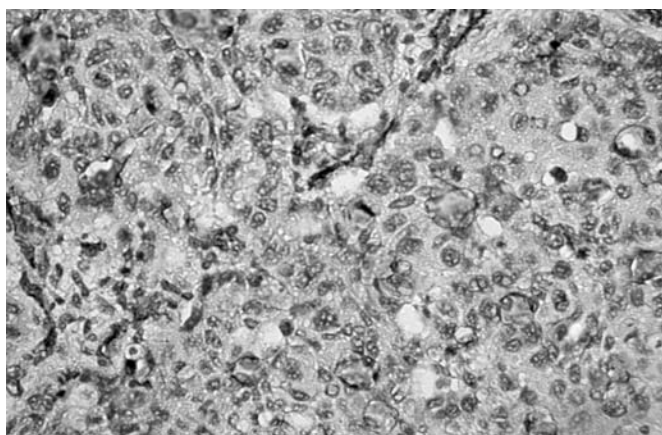


Рис. 2. НДКРЛ із низькою кількістю мікросудин ( $\times 20$ ).

Здійснили оцінку взаємозв'язку між клінічними (табл. 1), морфологічними (табл. 2) факторами і кількістю мікросудин у первинних пухлинах хворих на НДКРЛ I–II стадій.

За даними, що наведені у таблиці 1, не визначили вірогідного зв'язку між віком, статтю, індексом маси тіла (ІМТ) хворого, локалізацією, критеріями T і N, стадією захворювання та кількістю мікросудин у пухлині. Встановили тенденцію до збільшення кількості мікросудин у хворих на НДКРЛ I–II стадій молодшого віку ( $p=0,08$ ), а також у пацієнтів з ІМТ  $< 30 \text{ мг/м}^2$ .

Таблиця 1

### Зв'язок клінічних факторів із кількістю мікросудин у пухлині хворих на НДКРЛ I–II стадій

Характеристика	Кількість хворих (n)	Кількість мікросудин	p
Вік			
<59	109	$67,5 \pm 2,7$	0,08
60–74	127	$70,9 \pm 3,2$	
75–89	5	$38,6 \pm 4,8$	
Стать			
Чоловіки	202	$67,9 \pm 2,2$	0,36
Жінки	39	$73,2 \pm 6,6$	
ІМТ			
$\geq 30 \text{ мг/м}^2$	40	$60,1 \pm 5,5$	0,07
$< 30 \text{ мг/м}^2$	201	$70,5 \pm 2,3$	
Локалізація			
Периферичний рак	147	$68,9 \pm 2,9$	0,88
Центральний рак	94	$68,3 \pm 3,0$	
pT			
T1	31	$70,1 \pm 6,9$	0,97
T2	201	$68,6 \pm 2,3$	
T3	9	$68,0 \pm 7,6$	
pN			
N0	174	$69,5 \pm 2,5$	0,56
N1	67	$66,7 \pm 4,2$	
Стадія			
I стадія	127	$70,4 \pm 3,2$	0,40
II стадія	114	$66,9 \pm 2,7$	
Розмір пухлини			
$\geq 3 \text{ см}$	189	$68,1 \pm 2,2$	0,56

Таблиця 2

### Зв'язок морфологічних факторів із кількістю мікросудин у пухлині хворих на НДКРЛ I–II стадій

Характеристика	Кількість хворих (n)	Кількість мікросудин	p
Гістологія			
Неплоскоклітинний рак	98	$71,9 \pm 3,8$	0,21
Плоскоклітинний рак	143	$66,5 \pm 2,4$	
Диференціювання			
G1	58	$74,4 \pm 4,8$	0,32
G2	122	$67,0 \pm 2,9$	
G3	61	$66,8 \pm 4,1$	
Некрози у первинній пухлині			
Наявні некрози	107	$69,2 \pm 3,2$	0,84
Відсутні некрози	134	$68,3 \pm 2,8$	
Інвазія вісцеральної плеври пухлиною			
Існує	104	$67,8 \pm 2,7$	0,69
Відсутня	137	$69,4 \pm 3,1$	



У першому випадку це, можливо, пов'язано з тим, що у хворих молодшого віку активніше перебігають процеси розвитку пухлини, неангіогенез. Збільшення кількості мікросудин у пухлинах хворих із ІМТ <30 мг/м<sup>2</sup> може бути пов'язано з компенсаторним прискоренням росту внаслідок зменшення загальної ваги хворого.

Не визначили зв'язок таких морфологічних факторів, як гістологічний тип, морфологічне диференціювання пухлини, наявність некрозів та інфільтрація вісцеральної плеври з кількістю мікросудин у пухлині (табл. 2).

Отже, знаючи клініко-морфологічні характеристики хворого та пухлини, неможливо з вірогідністю прогнозувати кількість мікросудин у первинній пухлині.

Після дослідження кореляцій між клініко-морфологічними характеристиками і кількістю мікросудин виконали аналіз прогностичного значення кількості мікросудин у первинній пухлині хворих на НДКРЛ I–II стадій.

На рис. 3 наведено показники виживаності хворих, які мали високий і низький вміст мікросудин у первинній пухлині. Виживаність хворих із низьким рівнем мікро-

судин у пухлині значно більша, ніж у пацієнтів із високим вмістом. Середня виживаність хворих із низьким рівнем мікросудин становила 52,7±2,8 місяця (95%, ВІ: 47,3–58,2), а пацієнтів із високим рівнем – 35,6±3,2 місяця (95%, ВІ, 29,4–41,8). Медіану виживаності у хворих із низьким рівнем мікросудин не досягнуто, що свідчить про кращі показники виживаності. У пацієнтів із високою кількістю мікросудин медіана виживаності становила 30,0±8,9 місяця. Log-rank аналіз також підтвердив вірогідну різницю показників виживаності пацієнтів обох груп (p=0,00017).

Після однофакторного аналізу дослідили вплив клініко-морфологічних факторів і кількості мікросудин у пухлині на прогноз за допомогою багатофакторного регресивного аналізу (Cox-регресія, табл. 3).

За даними, що наведені у таблиці 3, при такому аналізі факторів встановили значний вплив на прогноз лише кількості мікросудин пухлини (ВР=3,13, p=0,001), тобто у хворих із високим вмістом мікросудин у первинній пухлині ризик смерті у 3,13 рази вищий, ніж у хворих і низьким вмістом мікросудин.

Про важливість ЩМ як маркера, що пов'язаний із ростом, прогресуванням і прогнозом у хворих на рак легенів почали говорити, коли G. Fontanini та співавт. визначили, що рівень мікросудин (визначений за допомогою CD31) збільшується від злоякісної пухлини «in situ» до інвазивної карциноми [3]. Для визначення ЩМ можна використовувати такі маркери, як фактор 8, CD31, CD34, CD105 [5,9]. У доступній науковій літературі не виявили даних щодо наявності різниці у рівні ЩМ, яку оцінювали з використанням різних маркерів (фактор 8, CD31, CD34, CD105). Лише T. Donnem і співавт. указують на відсутність кореляції між рівнем ЩМ та експресією VEGF [2].

Недостатньо вивченим залишається питання оцінювання щільності мікросудин та інтерпретації даних, зокрема, який метод необхідно використовувати у дослідженні. G. Fontanini та співавт. серед пацієнтів із різним рівнем ЩМ у пухлині визначили 5 категорій: 1–10, 11–20, 21–30, 31–40 і більше ніж 41 мікросудина [3]. K. Matsuyama і співавт. відзначають

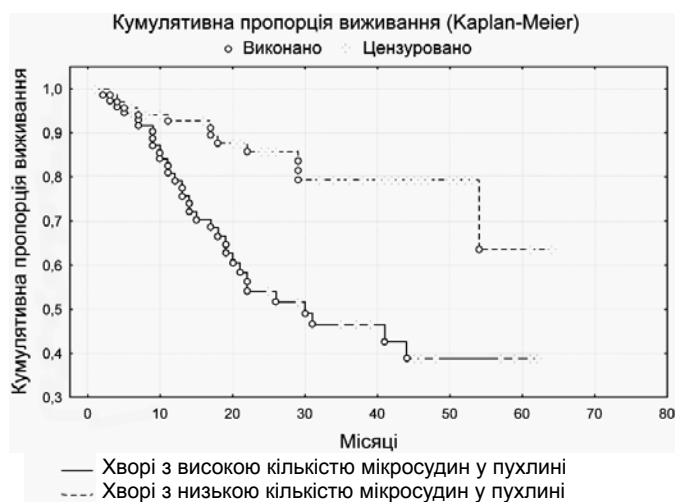


Рис. 3. Виживаність хворих на НДКРЛ I–II стадій залежно від кількості мікросудин у первинній пухлині.

Таблиця 3

**Прогностичне значення клініко-морфологічних характеристик пацієнтів**

Фактор	Категорія	Відносний ризик	Значення p
Вік	<59 років vs 60–74 роки vs 75–89 років	0,87	0,67
Стать	чоловіча vs жіноча	1,56	0,39
ІМТ	≥30 мг/м <sup>2</sup> vs <30 мг/м <sup>2</sup>	0,56	0,29
Локалізація	центральний vs периферичний	0,83	0,64
T	T1 vs T2 vs T3	2,23	0,17
N	N0 vs N1	1,57	0,29
Стадія	I стадія vs II стадія	1,82	0,15
Розмір пухлини	до 3 см vs більше ніж 3 см	1,04	0,93
Гістологія	плоскоклітинний рак vs неплоскоклітинний рак	0,54	0,13
G	G1 vs G2 vs G3	1,14	0,59
Некрози у первинній пухлині	наявність некрозів vs відсутність некрозів	0,92	0,79
Інвазія вісцеральної плеври пухлиною	наявність інвазії vs відсутність інвазії	0,56	0,56
CD31/CD34	≥63 мікросудини vs <63 мікросудин	3,13	0,001

Примітка: \*vs – проти.



прогностичну значущість рівня мікросудин у пухлині, що становить  $71 \pm 47$  ( $M \pm m$ ). Так, у хворих із рівнем мікросудин до 71 визначають сприятливий прогноз, а при рівні  $\geq 71$  мікросудин у пухлині – несприятливий [7]. У виконаному дослідженні середня кількість мікросудин у пухлинах пацієнтів становила  $68,7 \pm 2,1$  (95%, ВІ: 64,5–72,9%), що відповідає даним інших авторів.

Г. Сох і співавт. не встановили зв'язку між ЩМ у пухлині та віком, морфологічним диференціюванням і гістологічним типом пухлини [1]. У нашому дослідженні також не визначили статистично вірогідного зв'язку між віком, статтю, індексом маси тіла хворого, критеріями T і N, стадією захворювання, гістологічним типом, локалізацією, морфологічним диференціюванням пухлини, наявністю некрозів та інфільтрації вісцеральної плеври ( $p > 0,05$ ).

Прогностичне значення мікросудинної щільності залишається суперечливим питанням. А. Giatromanolaki і співавт. уперше дослідили і показали значущий зв'язок між рівнем мікросудин пухлини, що визначений за допомогою маркера CD31, і виживаністю хворих на НДКРЛ. Схожі дані отримали інші дослідники [1,3,5,7,9,12]. Але І. Мілас і співавт. не встановили прогностичного значення імуногістохімічного визначення ЩМ за допомогою CD34 у хворих на НДКРЛ [8].

## ВИСНОВКИ

Аналіз експресії CD31/CD34 і визначення завдяки цьому ЩМ у пухлинах хворих на НДКРЛ ранніх стадій дали змогу встановити, що немає статистично вірогідного зв'язку між віком, статтю, ІМТ хворого, локалізацією, критеріями T і N, стадією захворювання, гістологічним типом, морфологічним диференціюванням пухлини, наявністю некрозів і інфільтрації вісцеральної плеври та кількістю мікросудин у пухлині.

Кількість мікросудин має важливе прогностичне значення, що підтверджено одно- і багатофакторним аналізами. Це дає змогу використовувати маркер як прогностичний у хворих на НДКРЛ ранніх стадій.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Cox G. A biological staging model for operable non-small cell lung cancer / G. Cox, J.L. Jones, A. Andi et al. // *Thorax*. – 2001. – № 56. – P. 561–566.
2. Donnem T. Inverse Prognostic Impact of Angiogenic Marker Expression in Tumor Cells versus Stromal Cells in Non-Small Cell Lung Cancer / T. Donnem, S. Al-Saad, K. Al-Shibli et al. // *Clin Cancer Res*. – 2007. – № 13. – P. 6649–6657.
3. Fontanini G. Angiogenesis as a Prognostic Indicator of Survival in Non-Small-Cell Lung Carcinoma: a Prospective Study / G. Fontanini, M. Lucchi, S. Vignati et al. // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1997. – Vol. 89. – № 12. – P. 881–886.
4. Giatromanolaki A. Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIII and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer / A. Giatromanolaki, M.I. Koukourakis, D. Theodossiou et al. // *Clin Cancer Res*. – 1997. – № 3. – P. 2485–2492.
5. Guo J.F. Microvessel Density: Correlation with 18F-FDG Uptake and Prognostic Impact in Lung Adenocarcinomas / J.F. Guo, K. Higashi, Y. Ueda et al. // *J Nucl Med*. – 2006. – № 47. – P. 419–425.
6. Kakolyris S. Assessment of Vascular Maturation in Non-Small Cell Lung Cancer Using a Novel Basement Membrane Component, LH39: Correlation with p53 and Angiogenic Factor Expression / S. Kakolyris, A. Giatromanolaki, M. Koukourakis et al. // *Cancer Res*. – 1999. – № 59. – P. 5602–5607.
7. Matsuyama K. Tumor Angiogenesis as a Prognostic Marker in Operable Non-Small Cell Lung Cancer / K. Matsuyama, Y. Chiba, M. Sasaki et al. // *Ann Thorac Surg*. – 1998. – № 65. – P. 1405–1409.
8. Milas I. Association of VEGF, CD-34, E-cadherin and MMP-9 expression of the primary non-small cell lung cancer lesion with brain metastatic lesion / I. Milas, R. Komaki, T. Hachiya et al. // *Proc Amer Assoc Cancer Res*. – 2004. – Vol. 45. – Abstract #1919.
9. Mineo T.C. Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB–IIA non-small cell lung cancer / T.C. Mineo, V. Ambrogio, A. Baldi et al // *J Clin Pathol*. – 2004. – № 57. – P. 591–597.
10. Puztaszeri M.P. Immunohistochemical Expression of Endothelial Markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in Normal Human Tissues / M.P. Puztaszeri, W. Seelentag and F.T. Bosman // *J Histochem Cytochem*. – 2006. – № 54. – P. 385.
11. Singhal S. Prognostic Implications of Cell Cycle, Apoptosis, and Angiogenesis Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer: A Review / S. Singhal, A. Vachani, D. Antin-Ozerkis et al. // *Clin Cancer Res*. – 2005. – № 11. – P. 3974–3986.
12. Tanaka F. Evaluation of Angiogenesis in Non-small Cell Lung Cancer: Comparison between Anti-CD34 Antibody and Anti-CD105 Antibody / F. Tanaka, Y. Otake, K. Yanagihara et al // *Clin Cancer Res*. – 2001. – № 7. – P. 3410–3415.

## Відомості про авторів:

Колеснік О.П., к. мед. н., доцент каф. онкології ЗДМУ.

Шевченко А.І., д. мед. н., професор, зав. каф. онкології ЗДМУ.

Туманський В.О., д. мед. н., професор, зав. каф. патологічної анатомії і судової медицини з основами права ЗДМУ, директор Інституту клінічної патології людини.

Євсєєв А.В., к. мед. н., асистент каф. патологічної анатомії і судової медицини з основами права ЗДМУ.

Шишкін М.А., к. мед. н., асистент каф. патологічної анатомії і судової медицини з основами права ЗДМУ.

Поступила в редакцію 25.06.2013 г.