

**О.П. Колесник¹,
А.І. Шевченко¹,
В.О. Туманський²,
М.А. Шишкін²,
А.В. Евсеєв²**

ЗВ'ЯЗОК РІВНЯ АПОПТОЗУ В ПЕРВИННІЙ ПУХЛИНІ ХВОРИХ НА РАННІХ СТАДІЯХ НЕДРІБНОКЛІТИННОГО РАКУ ЛЕГЕНІВ З ЕФЕКТИВНІСТЮ АД'ЮВАНТНОЇ ПОЛІХІМІОТЕРАПІЇ

Запорізький державний медичний університет
кафедра онкології¹
(зав. – проф., А.І. Шевченко)
кафедра патологічної анатомії²
(зав. – проф., В.О. Туманський)
вул. Культурна, 177А, Запоріжжя, 69040, Україна
Zaporozhye regional clinical oncology center
chair of oncology ZSMU
Kulturnaya str. 17A, Zaporozhye, 69040, Ukraine
e-mail: kap_kan@mail.ru

Ключові слова: апоптоз, ад'ювантна хіміотерапія, недрібноклітинний рак легенів, виживання
Key words: apoptosis, adjuvant chemotherapy, non-small cell lung cancer, survival

Реферат. Связь уровня апоптоза в первичной опухоли больных на ранних стадиях немелкоклеточного рака легких с эффективностью адъювантной полихимиотерапии. Колесник А.П., Шевченко А.И., Туманский В.А., Шишкин М.А., Евсеєв А.В. Лечение больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака лёгкого (НМКРЛ) остается важным вопросом современной онкологии. Одним из методов лечения, позволяющих улучшить прогноз после операции, является адъювантная полихимиотерапия (АПХТ). В современной литературе нет единого мнения относительно того, кому необходимо назначать АПХТ. Однако в последнее время авторы все чаще указывают на необходимость использования молекулярных маркеров для индивидуализации назначения АПХТ. Целью нашего исследования было изучение связи уровня апоптоза в первичной опухоли больных с ранними стадиями НМКРЛ с эффективностью АПХТ. В исследование, которое было проведено в Запорожском областном клиническом онкологическом диспансере с июня 2008 по декабрь 2012 года, включено 254 больных с I-II стадиями НМКРЛ. Экспрессию протеина p53 выражали как процент позитивно окрашенных ядер опухолевых клеток в общей популяции. Высокой считали экспрессию при наличии >25% позитивно окрашенных клеток. Результаты: Определение уровня апоптоза в опухоли лёгкого на основании экспрессии маркера p53 выполнено у 220 пациентов. Не выявлено прогностического значения уровня экспрессии p53 у больных с ранними стадиями НМКРЛ ($p=0,65$). Отмечена значимая связь между возрастом ($p=0,039$), полом ($p=0,009$) и уровнем апоптоза в первичной опухоли у больных с ранними стадиями НМКРЛ. В группе больных с низкой экспрессией p53 в опухоли отмечена худшая выживаемость при проведении АПХТ ($p=0,009$). А у больных с высоким уровнем экспрессии p53 проведение АПХТ значительно улучшило выживаемость ($p<0,001$). Таким образом, проведение АПХТ у больных с I-II стадиями НМКРЛ необходимо при высоком уровне апоптоза ($\geq 25\%$).

Abstract. Link of apoptosis level in the primary tumor at early stages of non-small cell lung cancer with efficacy of adjuvant polychemotherapy. Kolesnik O.P., Shevchenko A.I., Tumansky V.O., Shyshkin M.A., Yevseyev A.V. One of the important questions in modern oncology is treatment of patients with early stages of non-small cell lung cancer (NSCLC). Adjuvant polychemotherapy (APCT) can help to improve prognosis after operation. In modern literature there is no unified opinion as for patients in need of adjuvant chemotherapy. However, now investigators indicate to necessity to use molecular markers for individualization of APCT. The aim of our study was to assess correlation between apoptos level in primary tumor in patients with early stages of NSCLC with effectiveness of APCT. Study was conducted by the chair of oncology of Zaporozhye state medical university since June 2008 to Dec 2012. 254 patients with I-II stages of non-small cell lung cancer were included in the study. Expression of p53 was evaluated as percent of positively stained nucleus tumor cells in general population. More than 25% of positively stained nucleus tumor cells meant high p53 expression. Results: We performed assessment of apoptosis level with the help of p53 expression in 220 patients. No prognostic significance of p53 level expression in patients with early stages of non-small cell lung cancer ($p=0,65$) was revealed. There was significant correlation between age ($p=0,039$), sex ($p=0,009$) and apoptosis level in primary tumor in patients with early stages of NSCLC. Worse survival was noted in group of patients with low p53 expressions after adjuvant chemotherapy ($p=0,009$). But in patients with high level of p53 expression adjuvant chemotherapy significantly increased survival ($p<0,001$). So, adjuvant chemotherapy in patients with I-II stages of NSCLC is necessary to be carried out in cases of high p53 expression level.

Лікування хворих з ранніми стадіями недрібноклітинного раку легенів (НДКРЛ) залишається важливим питанням сучасної онкології. Це зумовлено тим, що навіть після радикально виконаного хірургічного втручання у 50% хворих настає прогресування захворювання, що стає причиною загибелі пацієнтів. Одним із методів лікування, що дозволяють покращити прогноз після операції, є ад'ювантна поліхіміотерапія (АПХТ). У сучасній літературі не існує єдиної думки відносно того, кому необхідно призначати АПХТ. Однак останнім часом автори все частіше вказують на необхідність використання молекулярних маркерів для індивідуалізації призначення АПХТ [4, 5, 7, 8, 10].

Метою нашого дослідження було вивчення зв'язку рівня апоптозу в первинній пухлині хворих з ранніми стадіями НДКРЛ з ефективністю АПХТ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження, до якого було включено 254 хворих з I-II стадією НДКРЛ, було проведене на кафедрі онкології Запорізького державного медичного університету з червня 2008 по грудень 2012 року. Середній вік пацієнтів становив 60,7 року (95% ВІ, 59,7-61,7). Усім хворим проведено хірургічне лікування в об'ємі лобектомії або пневмонектомії з наступним патоморфологічним дослідженням видаленого препарату. Для імуногістохімічного дослідження препарати фіксували в забуференому 10% формаліні та заливали в парафін. На прецизійному ротаційному мікромомі НМ 3600 (фірми «MICROM Laborgeräte GmbH», Німеччина) виготовляли серійні зрізи товщиною 3 μ , які розміщували на адгезивні предметні скельця «Super Frost Plus» (фірми «Menzel Glaser», Німеччина). Після депарафінації та регідратації зрізів проводили високотемпературне демаскування антигенів шляхом нагрівання на водяній бані в Трис-EDTA буфері (рН=9,0) та інгібуванням ендogenous пероксидази шляхом інкубації протягом 10 хвилин у 3% розчині перекису водню. Після 30-хвилинної інкубації з первинними антитілами проводилась їх візуалізація за допомогою системи детекції EnVision+ FLEX з хромогеном DAB+ (фірми «DAKO», США). Після проявлення результатів імуногістохімічної реакції зрізи дофарбовували гематоксиліном Майєра та заключали в бальзам. Етапи обробки матеріалу, а також протоколи імуногістохімічного дослідження детально викладені у відповідних монографіях [3, 6], особливості проведення імуногістохімічного забарвлення для виявлення тих чи інших антигенів

деталізовані в інструкціях фірми-виробника відповідних антитіл.

Імуногістохімічне дослідження проводили в парафінових зрізах легені з використанням моноклональних антитіл: *Mo a-Hu p53 Protein, Clone DO-7* проти білка *p53*, та системи візуалізації EnVision+ FLEX («DAKO», США) відповідно до рекомендацій цих фірм щодо їх використання.

Результати імуногістохімічної реакції оцінювали напівкількісним методом за допомогою мікроскопа Ахіоплан 2 (фірми «Carl Zeiss», Німеччина). Експресію протеїну *p53* виражали як відсоток позитивно забарвлених ядер пухлинних клітин у загальній популяції. Високою вважали експресію при наявності >25% позитивно забарвлених клітин.

АПХТ проведена 80 хворим з I - II стадіями НМКРЛ, котрим проводилось дослідження експресії *p53*. У 140 пацієнтів додаткове лікування не проводилось. АПХТ включала 2-3 курси платиновмісної хіміотерапії (цисплатин 80мг/м² 1 день, етопозид 120 мг/м² з 1-ї по 3-ю добу, інтервал між курсами 21 день). Хіміотерапевтичне лікування починали не пізніше 21 дня після оперативного лікування.

Нами простежено виживання усіх включених до дослідження хворих. Для цього використовували телефонні дзвінки та прямі контакти з хворими, зв'язок з районними онкологами, а також дані Запорізького обласного канцер-реєстру.

Статистичну обробку матеріалу виконували в ліцензованій версії програми Statistica 6,0. Для оцінки зв'язку між різними клініко-морфологічними факторами використовували критерій χ^2 та тест Пірсона. Оцінку виживання проводили за допомогою функції Kaplan-Meier. Різницю виживання окремих груп досліджували за допомогою критерію log-rank. Рівень значущості визначали як $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Визначення рівня апоптозу в пухлинах легені, засновуючись на експресії маркеру *p53*, виконано у 220 хворих. При цьому відсутність забарвлення відзначена у 54 хворих (24,5%), ще в 40 пацієнтів у препаратах виявлено забарвлення до 25% клітин (18,2%). Таким чином, у 94 хворих з ранніми стадіями НДКРЛ (42,7%) відзначена низька експресія *p53* – низький рівень апоптозу. На рисунку 1 представлений мікропрепарат пацієнта з низьким рівнем апоптозу, на рисунку 2 – з високим рівнем.

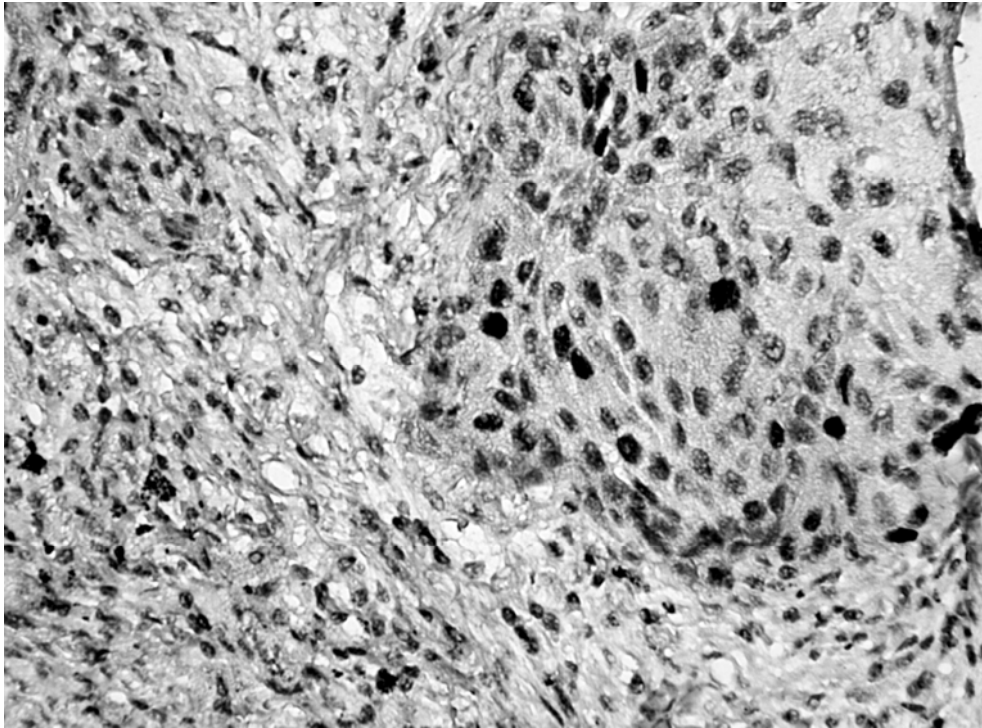


Рис. 1. Низький рівень експресії p53

Як видно з представленої таблиці, відмічається значна відмінність рівня експресії p53 у хворих з різним віком ($p=0,039$). У хворих середнього віку відмічається значна перевага високого індексу. Також констатована наявність зв'язку між рівнем апоптозу в пухлині та статтю хворого. У пацієнтів чоловічої статі частіше ніж

у жінок виявлялась висока експресія p53 ($p=0,009$). Не відзначено зв'язку між локалізацією, гістологічною формою, морфологічним диференціюванням пухлини, критеріями T, N, стадією захворювання та рівнем апоптозу. Також у хворих з АПХТ та без додаткового лікування не відзначено різниці за рівнем експресії p53.

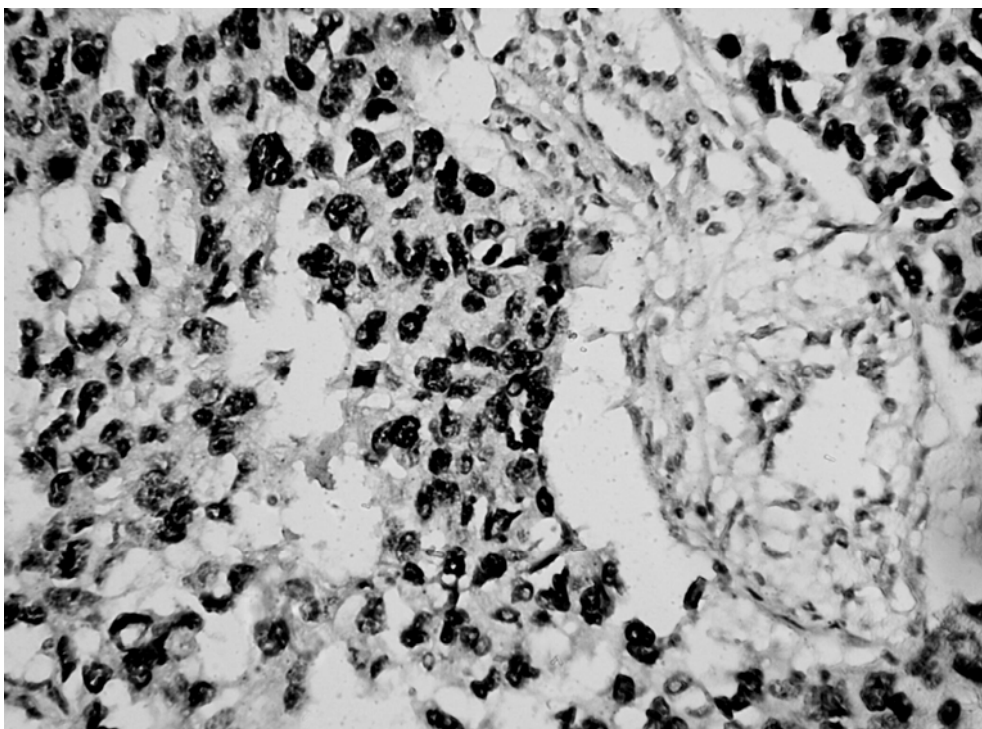


Рис. 2. Високий рівень експресії p53

Порівняльна характеристика пацієнтів залежно від рівня експресії p53

| Характеристика | Експресія p53 | | p |
|---|--------------------------|---------------------------|-------|
| | низька експресія n=94 | висока експресія n=126 | |
| Вік | | | |
| <59 | 34 | 67 | 0,039 |
| 60-74 | 58 | 56 | |
| 75-89 | 2 | 3 | |
| Стать | | | |
| Чоловіки | 70 | 111 | 0,009 |
| Жінки | 24 | 15 | |
| Гістологічний тип пухлини | | | |
| Неплоскоклітинний рак | 42 | 50 | 0,46 |
| Плоскоклітинний рак | 53 | 76 | |
| Морфологічне диференціювання пухлини | | | |
| G1 | 24 | 28 | 0,59 |
| G2 | 45 | 66 | |
| G3-4 | 25 | 31 | |
| pT | | | |
| T1 | 14 | 15 | 0,81 |
| T2 | 78 | 108 | |
| T3 | 2 | 3 | |
| pN | | | |
| N0 | 70 | 92 | 0,81 |
| N1 | 24 | 34 | |
| Стадія | | | |
| I стадія | 68 | 89 | 0,78 |
| II стадія | 26 | 37 | |
| Локалізація пухлини | | | |
| Периферичний рак | 64 | 72 | 0,98 |
| Центральний рак | 30 | 54 | |
| АПХТ | | | |
| З АПХТ | 38 | 42 | 0,28 |
| Без АПХТ | 56 | 84 | |

Основним критерієм ефективності проведеного лікування в онкологічних хворих є виживання. У середньому, період спостереження за хворими в нашому дослідженні становив 25,9 місяця (95% ВІ, 23,9-27,9). Для оцінки виживання хворих використовували метод Kaplan-Meier.

Так, при порівнянні виживання хворих з високою та низькою експресією p53 не відмічено статистично значущої різниці ($p=0,65$). Однак існує тенденція до покращення виживання хворих з низьким рівнем апоптозу (рис. 3).

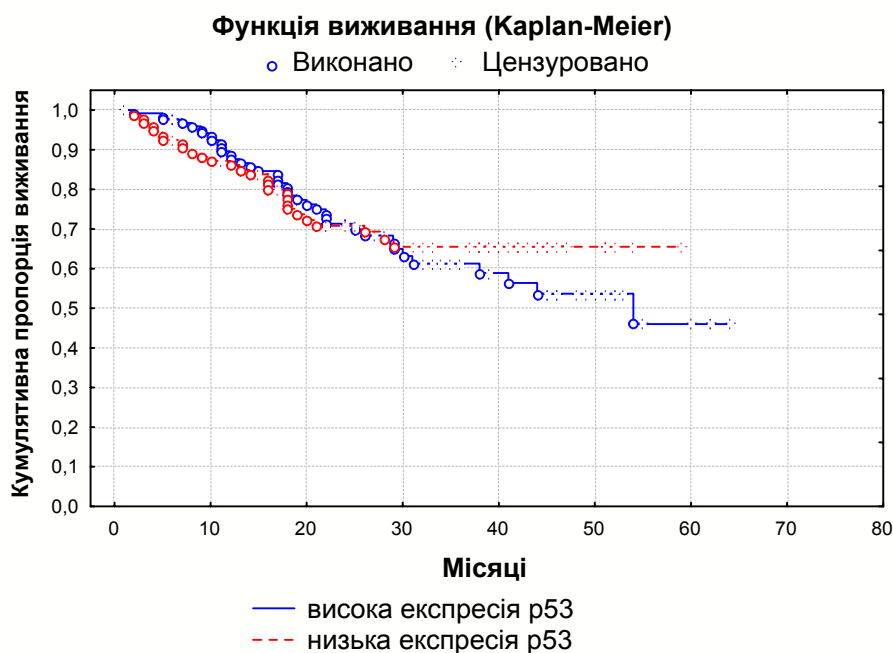


Рис. 3. Виживання хворих залежно від рівня експресії p53

Для дослідження ефективності АПХТ залежно від рівня апоптозу в пухлині нами проведено порівняння виживання хворих з експресією p53 > 25% (висока експресія) і ≤ 25% (низька експресія) (рис. 4, 5).

У групі хворих з низькою експресією p53 у пухлині, котрим проведено АПХТ, 75-й перцентиль виживання становив 16 місяців, медіана ви-

живання 24,8 місяця. У хворих без додаткового лікування 75-й перцентиль та медіана виживання не досягнені. Різниця у виживанні двох груп хворих статистично вірогідна (достовірна) (p=0,009). Таким чином, проведення післяопераційної хіміотерапії у хворих з I-II стадіями НДКРЛ з низьким рівнем експресії p53 є недоцільним.



Рис. 4. Виживання хворих з I-II стадіями НДКРЛ з низьким рівнем апоптозу залежно від проведення АПХТ

На рисунку 3 представлено виживання хворих з високим рівнем експресії p53 без АПХТ та з додатковим хіміотерапевтичним лікуванням. Так, у хворих, які не отримували АПХТ, 75-й перцентиль виживання становив 17 місяців, медіана – 30,8 місяця. У хворих після АПХТ 75-й

перцентиль виживання та медіана не досягнені. Різниця виживання двох груп статистично вірогідна ($p < 0,001$). Таким чином, проведення АПХТ у хворих з I-II стадіями НДКРЛ з високим рівнем експресії p53 значно покращує виживання.

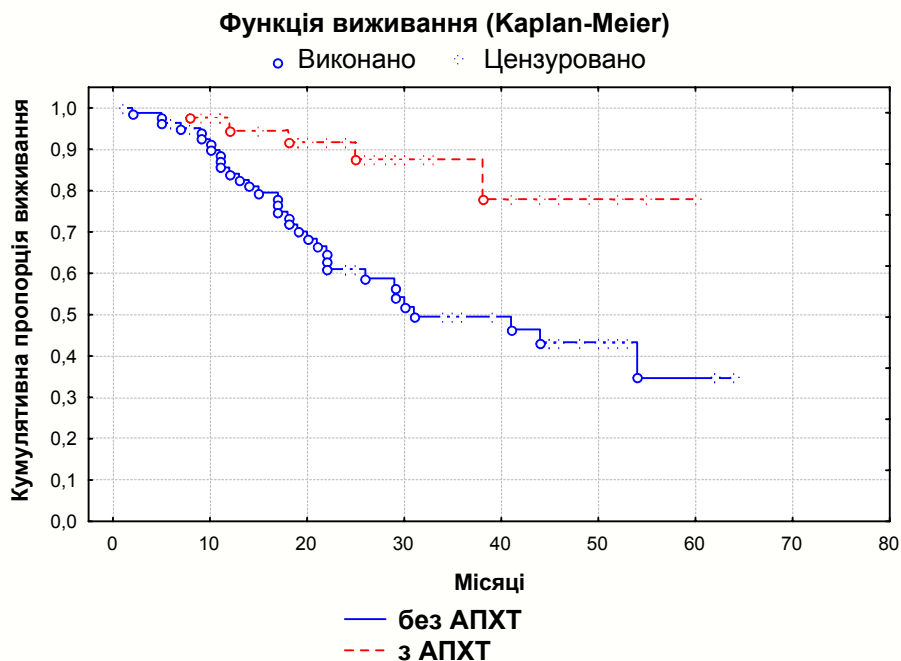


Рис. 5. Виживання хворих з I-II стадіями НДКРЛ з високим рівнем апоптозу залежно від проведення АПХТ

Проведення АПХТ у хворих з ранніми стадіями НДКРЛ є дискусійним питанням сучасної онкології [1, 4, 8]. Деякі автори вважають, що для отримання більшої вигоди від АПХТ необхідно відокремити групу хворих, у якій цей вид лікування буде максимально ефективним. Для індивідуалізації призначення АПХТ можливо використання молекулярних маркерів. У дослідженій літературі відмічаються поодинокі праці, що стосуються визначення предиктивної ролі різних молекулярних та генетичних маркерів у хворих з різними стадіями НДКРЛ, однак вказується на необхідність продовження проведення досліджень у цьому напрямку [5, 7, 10].

Нами проведено дослідження ефективності АПХТ залежно від рівня експресії p53 у первинній пухлині – маркера апоптозу. Незважаючи на численні дослідження, прогностична роль експресії p53 залишається суперечливою [12]. У декількох роботах показано, що експресія p53 виявляється у 39,4%-60,5% хворих на рак легенів [9, 11, 12, 13, 14]. У нашому дослідженні висока

експресія p53 визначена у 57,3% хворих з ранніми стадіями НДКРЛ. Як і в інших дослідженнях, нами не виявлено зв'язку між експресією p53 та гістологічною формою, морфологічним диференціюванням, критеріями T та N, стадією захворювання [9, 12, 13].

У той же час, за даними нашого дослідження відзначається, що експресія p53 корелювала з ефективністю АПХТ. Хворі з високою експресією p53 у пухлині мали значний ефект від проведеного лікування. Подібні дані отримані Tsao зі співавторами та Суховершою зі співавторами у хворих з III стадією НДКРЛ [2, 11].

ПІДСУМОК

Таким чином, проведення АПХТ у хворих з ранніми стадіями НДКРЛ є доцільним при високому рівні апоптозу пухлини. Необхідне подальше дослідження прогностичної та предиктивної ролі p53, що дозволить покращити лікування у хворих з ранніми стадіями НДКРЛ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Левченко Е.В. Адьювантная терапия рака лёгкого / Е.В.Левченко // Практическая онкология. – 2007. – Т8, №3. – С 135-139.
2. Суховерша О.А. Патоморфологічні фактори прогнозу як основа оптимізації лікування IIIA стадії недрібноклітинного раку легень / О.А.Суховерша // Морфологія. – 2007. – Т. 1, № 4. – С. 100-107.
3. Эллингиди В.Н. Практическая иммуногистоцитохимия / В.Н. Эллингиди, Н.В. Аникиева, Н.А. Максимова – СПб. : ВЦЭРМ МЧС России, 2002. – 36 с.
4. A randomized trial of postoperative adjuvant therapy in patients with completely resected stage II or IIIa non-small-cell lung cancer / S.M. Keller, S. Adak, H. Wagner [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2000. – Vol. 343. – P. 1217-22.
5. Biologic risk model for recurrence in resected early-stage non-small cell lungcancer (ES NSCLC). / K.A. Gold, J.J. Lee, Y. Ping [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2011. – Vol. 29, N 15. – P. 7053.
6. Boenisch T. Immunohistochemical staining methods : handbook / T. Boenisch, A.J. Farmilo, R.H. Stead – 3rd ed. – Carpinteria: Dako Cytomation Corporation, 2001. – 68 p.
7. Cell Cycle Regulators and Outcome of Adjuvant Cisplatin-Based Chemotherapy in Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer: The International Adjuvant Lung Cancer Trial Biologic Program / M. Filipits, R. Pirker, A. Dunant [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2007. – N 25. – P. 2735-2740.
8. Chemotherapy for patients with non-small cell lung cancer: the surgical setting of the Big Lung Trial / D. Waller, M.D. Peake, R.J. Stephens [et al.] // Eur. J. Cardiothorac Surg. – 2004. – Vol. 26. – P. 173-182.
9. Expression of the p53 Family in Lung Cancer / H. Uramoto, K. Sugio, T. Oyama [et al.] // Anticancer Research. – 2006. – Vol. 26. – P. 1785-1790.
10. Individualized adjuvant chemotherapy for surgically resected lung cancer and the roles of biomarkers / N. Ikeda, S. Nagase, T. Ohiro [et al.] // Ann. Thorac Cardiovasc. Surg. – 2009. – Vol. 15, N 3. – P. 144-149.
11. Prognostic and Predictive Importance of p53 and RAS for Adjuvant Chemotherapy in Non-Small-Cell Lung Cancer / M.S. Tsao, S. Aviel-Ronen, K. Ding [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2007. – Vol. 25. – P. 5240-5247.
12. Prognostic Evaluation of the Expression of p53 and bcl-2 Oncoproteins in Patients with Surgically Resected Non-small Cell Lung Cancer / R.Sh. Lai, J.S. Wang, H.K. Hsu [et al.] // Japan J. Clin. Oncol. – 2002. – Vol. 32, N 10. – P. 393-397.
13. Prognostic factors in patients with resected pathologic (p-) T1-2N1M0 non-small cell lung cancer (NSCLC) / F. Tanaka, K. Yanagihara, Y. Otake [et al.] // Eur. J. Cardiothorac. Surg. 2001. – Vol. 19. –P. 555-561.
14. Prognostic Significance of p53 and Ki-67 Antigen Expression in Surgically Treated Non-Small Cell Lung Cancer / C. Maddau, M. Confortini, S. Bisanzi [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. – 2006. – Vol. 125. – P. 425-431.

REFERENCES

1. Levchenko EV. Ad'yuvantnaya terapiya raka legkogo. Prakticheskaya onkologiya. 2007;8(3):135-9.
2. Sukhoversha OA. Patomorfologichni faktori prognuzu yak osnova optimizatsii likuvannya IIIA stadii nedribnoklitinnogo raku legen'. Morfologiya. 2007;1(4):100-7.
3. Ellinidi VN, Anikeeva NV, Maksimova NA. Prakticheskaya immunogistotsitokhimiya. SPb.: VTsERM MChS Rossii, 2002;36.
4. Keller SM, Adak S, Wagner H. A randomized trial of postoperative adjuvant therapy in patients with completely resected stage II or IIIa non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 2000;343:1217-22.
5. Gold KA, Lee JJ, Ping Y. Biologic risk model for recurrence in resected early-stage non-small cell lungcancer (ES NSCLC). Journal of Clinical Oncology. 2011;29(15):7053.
6. Boenisch T, Farmilo AJ, Stead RH. Immunohistochemical staining methods: handbook 3rd ed. Carpinteria: Dako Cytomation Corporation, 2001;68.
7. Filipits M, Pirker R, Dunant A. Cell Cycle Regulators and Outcome of Adjuvant Cisplatin-Based Chemotherapy in Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer: The International Adjuvant Lung Cancer Trial Biologic Program J. Clin. Oncol. 2007;25:2735-40.
8. Waller D, Peake MD, Stephens RJ. et al. Chemotherapy for patients with non-small cell lung cancer: the surgical setting of the Big Lung Trial. Eur J Cardiothorac Surg. 2004;26:173-82.
9. Uramoto H, Sugio K, Oyama T. et al. Expression of the p53 Family in Lung Cancer. Anticancer research. 2006;26:1785-90.
10. Ikeda N, Nagase S, Ohiro T. Individualized adjuvant chemotherapy for surgically resected lung cancer and the roles of biomarkers. Ann thorac cardiovasc surg. 2009;15(3):144-9.
11. Tsao MS, Aviel-Ronen S, Ding K. et al. Prognostic and Predictive Importance of p53 and RAS for Adjuvant Chemotherapy in Non-Small-Cell Lung Cancer. J Clin Oncol. 2007;25:5240-7.
12. Lai RSh, Wang JS, Hsu HK et al. Prognostic Evaluation of the Expression of p53 and bcl-2 Oncoproteins in Patients with Surgically Resected Non-small Cell Lung Cancer. Jpn J Clin Oncol. 2002;32(10):393-7.
13. Tanaka F, Yanagihara K, Otake Y. et al. Prognostic factors in patients with resected pathologic (p-) T1-2N1M0 non-small cell lung cancer (NSCLC). European Journal of Cardio-thoracic Surgery. 2001;19:555-61.
14. Maddau C, Confortini M, Bisanzi S. et al. Prognostic Significance of p53 and Ki-67 Antigen Expression in Surgically Treated Non-Small Cell Lung Cancer. Am J Clin Pathol. 2006;125:425-31.