

# Значение некоторых иммуноморфологических факторов для определения прогноза аденокарциномы легкого

С.А.Зинькович, Е.М.Непомнящая, С.П.Пыльцин, Т.О.Лаптева, Ю.Н.Лазутин, О.В.Тарнопольская

ФГБУ "Ростовский научно-исследовательский онкологический институт" Минздрава России: 344019, Ростов-на-Дону, 14-я Линия, 63

## Резюме

Проведено гистологическое и иммуногистохимическое исследование с применением набора маркеров аденокарциномы легкого (АЛ): тимидилатсинтаза (ТС), Ki-67, p53, Bcl-2, Bax. Установлено, что ТС и маркер пролиферативной активности Ki-67 обнаружены в 100 % наблюдений, p-53 – в 48 %, Bcl-2 – в 7,9 %, Bax – в 6,3 % общего числа случаев.

Показано, что у больных с высоким уровнем экспрессии ТС отмечена тенденция к снижению 3-летней бессобытийной выживаемости на 14 % ( $p = 0,1007$ ) по сравнению с пациентами, у которых отмечена низкая экспрессия. Установлено, что ТС может являться фактором прогноза течения АЛ.

**Ключевые слова:** аденокарцинома легкого, морфоиммуногистохимическое исследование, прогноз заболевания.

# A significance of some prognostic immunomorphologic factors in adenocarcinoma of the lung

S.A.Zin'kovich, E.M.Nepomnyashchaya, S.P.Pyl'tsin, T.O.Lapteva, Yu.N.Lazutin, O.V.Tarnopol'skaya

Federal State Institution "Rostov Scientific and Research Oncological Institute", Healthcare Ministry of Russia; Rostov-na-Donu, Russia

## Summary

*The aim* of this study was to search tumor expression of thymidylate synthetase and some other immunomorphological markers and to determine their prognostic role for pulmonary adenocarcinoma. *Methods.* Histological and immunohistochemical study of pulmonary adenocarcinoma has been conducted using several markers such as thymidylate synthetase, Ki-67, p53, Bcl-2, Bax. *Results.* Thymidylate synthetase and cellular proliferation activity marker Ki-67 were revealed in 100 % of cases; p-53, Bcl-2 and Bax were revealed in 48 %, 7.9 % and 6.3 %, respectively. *The results* demonstrated a tendency to decrease 3-year event-free survival by 14 % ( $p = 0.1007$ ) in patients with high thymidylate synthetase expression in comparison to patients with low expression. *Conclusion.* Thymidylate synthetase could be used as a prognostic factor of pulmonary adenocarcinoma course.

**Key words:** adenocarcinoma of the lung, immunohistochemical study, prognosis.

В результате многолетнего поиска тканевых маркеров, связанных с прогнозом аденокарциномы легкого (АЛ), разработаны разнообразные методики иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания различных ядерных и цитоплазматических молекулярных внутриклеточных субстратов в т. ч.: раково-эмбрионального антигена (СЕА), p53, p27, циклооксигеназы-2 (СОХ-2), TTF-1 и Ki-67 (индекс MIB-1). Установлено, что только 2 маркера – TTF-1 и Ki-67 по современным представлениям значимо коррелируют с прогнозом при ранних стадиях АЛ, но и их влияние на выбор тактики лечения до настоящего времени остается незначительным [1–3].

Тимидилатсинтаза (ТС) является ключевым ферментом синтеза ДНК, при помощи которого катализируется процесс метилирования монофосфата дезоксиуридина в дезокситимидин монофосфат. Поскольку ТС участвует в синтезе пиримидиновых нуклеотидов, считается, что присутствие данного фермента само по себе играет важную роль и в регуляции злокачественного потенциала раковых клеток. Поэтому в последнее время предполагается, что высокий уровень экспрессии ТС ассоциируются с неблагоприятным прогнозом рака. Это уже нашло

подтверждение при опухолях желудочно-кишечного тракта и молочной железы. Более противоречивые данные получены в отношении немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) [4].

Обсуждаются определенные проблемы с методами измерения уровней внутриопухолевой ТС, а также приводятся разногласия по поводу соотношения между экспрессией фермента в опухолевых клетках и их злокачественным потенциалом.

ТС является ферментом целевого воздействия противоопухолевого препарата 5-фторурацила, используемого в лечении рака различных локализаций. Взаимодействие ТС с активным метаболитом 5-фторурацила: с помощью 5-фтордезоксиуридин монофосфата посредством сильных ковалентных связей внутренних комплексов образуется 5, 10-метилентетрагидрофолат, при наличии которого впоследствии ингибируется синтез ДНК. Таким образом, определение ТС важно и с точки зрения ее предикторных характеристик.

Целью исследования явилось изучение опухолевой экспрессии ТС и некоторых других иммуноморфологических показателей, определение их значения как факторов прогноза течения АЛ.

## Материалы и методы

ИГХ-исследованию экспрессии ТС, Ki-67, p53, Vcl 2 и Вах были подвергнуты образцы опухолевой ткани, полученные из удаленных препаратов 63 радикально оперированных пациентов с АЛ. Во всех случаях это были образцы первичной опухоли в легком, первоначально окрашенные гематоксилином и эозином. После четкого морфологического заключения о наличии АЛ выполнялось ИГХ-исследование.

Экспрессия ТС и Ki-67 в той или иной степени выявлялась в 100 % опухолей. Экспрессия p-53 была обнаружена в 48,3 %, Vcl-2 в – 7,9 % и Вах – в 6,3 % общего числа исследованных образцов. Показано, что использование ИГХ-опухолевых маркеров p-53, Vcl-2 и Вах нецелесообразно для предсказания течения АЛ после радикального хирургического лечения и определения тактики адьювантной терапии.

Экспрессия ТС оценивалась по интенсивности окрашивания цитоплазмы опухолевых клеток в соответствии с визуальной шкалой по следующим критериям: 1 – низкий, 2 – средний, 3 – высокий уровни.

Для пролиферативной активности Ki-67 раковые клетки считались положительными, когда ядро было отчетливо окрашено. Индекс Ki-67 оценивался на полуколичественной основе в процентном выражении доли раковых клеток, экспрессирующих Ki-67 к числу всех ядер раковых клеток, обнаруженных в поле зрения. Процент положительных клеток опухоли рассчитывался для каждого образца с выделением следующих количественных градаций: низкий (< 20 %), высокий (20–30 %), очень высокий (> 30 %) уровни.

Для установления влияния выраженности экспрессии ТС и Ki-67 на прогноз пациентов с АЛ методом Каплана–Мейера были изучены показатели 3-летней бессобытийной выживаемости (БВ).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы *Statistica 6.0* [5].

## Результаты и обсуждение

По результатам исследования показано, что низкая экспрессия ТС в цитоплазме опухолевых клеток АЛ наблюдалась в 7 (11,1 %) случаях, средняя – в 18 (19 %), высокая – в 44 (69,9 %). ИГХ-окрашивание клеточных ядер опухоли на Ki-67 проявилось в сле-

дующих категориях: низкий индекс Ki-67 обнаружен в 15 (23,8 %), высокий – в 33 (52,4 %), очень высокий – в 15 (23,8 %) наблюдениях. Значения уровней экспрессии ТС и индекса Ki-67 в зависимости от пола и возраста больных представлены в табл. 1.

ИГХ-картина АЛ показана на рис. 1.

Как следует из полученных данных, и у мужчин (73,8 %), и у женщин (61,9 %) наиболее часто выявлялись высокие уровни экспрессии ТС, но у мужчин они наблюдались несколько чаще. Высокие и очень высокие уровни индекса Ki-67 у мужчин отмечались в 54,8 и 28,6 % случаев, а у женщин – в 47,6 и 14,3 % наблюдениях соответственно ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, пролиферативный потенциал АЛ у женщин оказался ниже, чем у мужчин, что подтверждается многочисленными клиническими наблюдениями более благоприятного течения этой гистологической формы НМРЛ у женщин.

При сравнении в группах пациентов 40–59 лет и 60 лет и старше выявлены статистически достоверные различия с низкой и средней экспрессией ТС – 6,5 и 9,6 % vs 15,6 и 28,1 %, но в обеих группах чаще других встречался высокий уровень ТС – 83,9 и 56,2 % соответственно.

В старшей возрастной группе достоверно чаще выявлялся низкий уровень индекса Ki-67 (34,4 vs 12,9 %). Заслуживает внимания факт, что его высокий уровень наблюдался практически с той же частотой, что и у молодых – 46,9 vs 58,1 % соответственно.

ИГХ-экспрессия ТС и Ki-67 в зависимости от стадии заболевания, размеров первичного опухолевого очага, наличия или отсутствия метастазов в регионарные лимфатические узлы показана в табл. 2.

Высокий уровень ТС был отмечен при распространенности первичной опухоли Т2 в 38 (82,6 %) случаях, при наличии метастазов во внутригрудные лимфатические узлы N1–2 – в 19 (76 %), при IIIA стадии заболевания – в 15 (93,8 %) наблюдениях. Очень высокий индекс Ki-67 зарегистрирован у 12 (75 %) больных АЛ IIIA стадии с поражением ипсилатеральных медиастинальных лимфатических узлов, N2 – в 12 (48 %) случаях, размерами первичной опухоли Т3 – в 7 (77,7 %) случаях.

При сопоставлении значений Ki-67 и уровней ТС выявлено совпадение их показателей только при IIIA стадии заболевания – 75 и 93,8 % соответственно. При более ранних стадиях у показателей этих

**Таблица 1**  
**Показатели ИГХ-экспрессии ТС и Ki-67 в зависимости от пола и возраста больных АЛ**

Показатель	ТС, n (%)			Значения Ki-67, n (%)				
	низкий	средний	высокий	< 20 %	20–30 %	> 30 %		
Пол	Мужской	42	4 (9,5)	7 (16,7)	31 (73,8)*	7 (16,7)	23 (54,8)*	12 (28,6)*
	Женский	21	3 (14,3)	5 (23,8)	13 (61,9)	8 (38,1)	10 (47,6)	3 (14,3)
Возраст, годы	40–59	31	2 (6,5)	3 (9,6)	26 (83,9)	4 (12,9)	18 (58,1)	9 (29)
	60 и старше	32	5 (15,6)**	9 (28,1)**	18 (56,2)	11 (34,4)**	15 (46,9)	6 (18,7)
Всего		63	7 (11,1)	12 (19)	44 (69,8)	15 (23,8)	33 (52,4)	15 (23,8)

Примечание: \* – статистически достоверные различия между сравниваемыми показателями в зависимости от пола; \*\* – статистически достоверные различия сравниваемых показателей в зависимости от возраста ( $p < 0,05$ ).

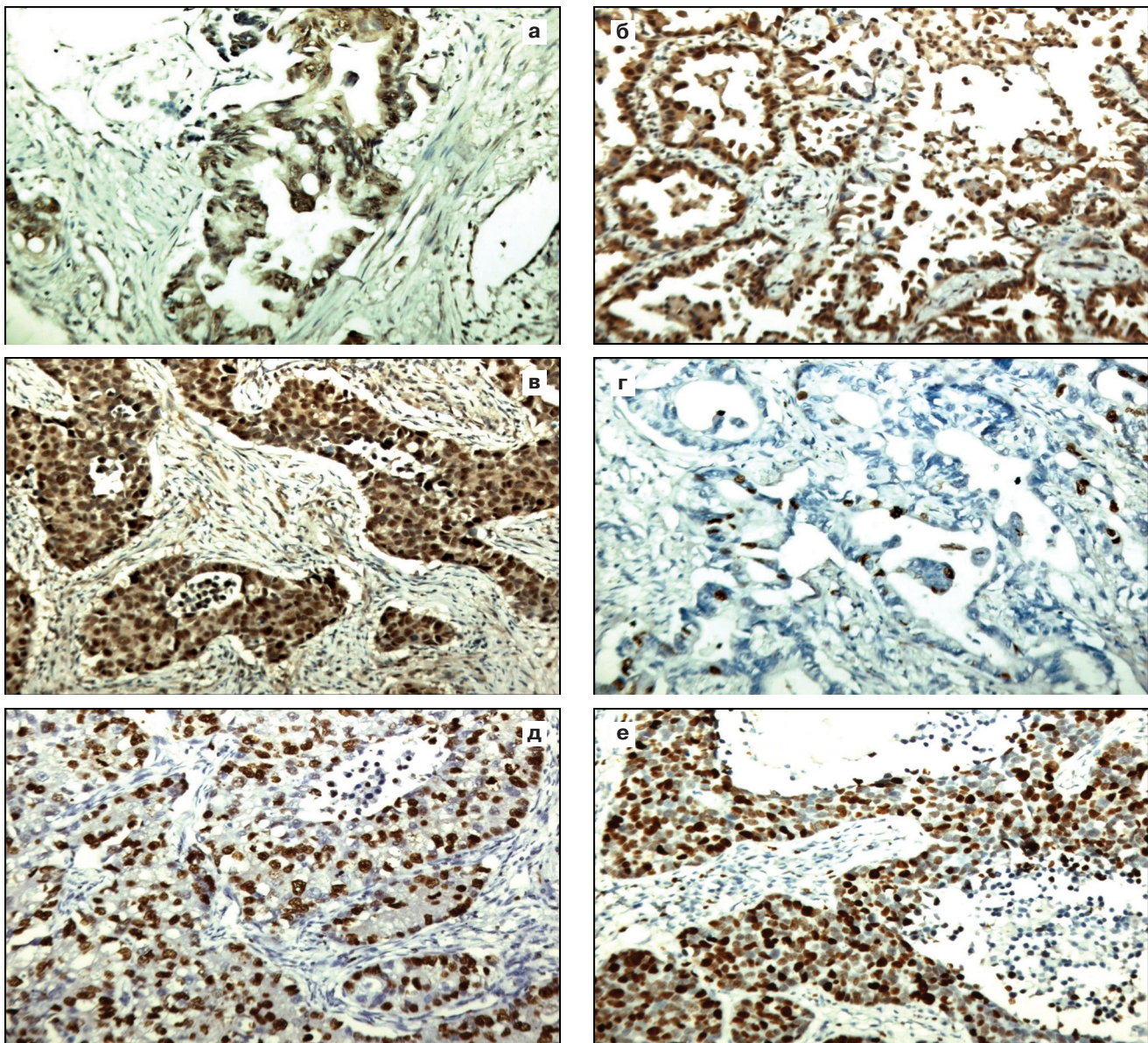


Рис. 1. ИГХ-характеристика уровня экспрессии ТС и Ki-67 в АЛ. Уровни экспрессии ТС: а – низкий; б – средний; в – высокий. Уровни экспрессии Ki-67: г – < 20 %; д – < 20–30 %; е – > 30 %; × 200

Таблица 2  
ИГХ-экспрессия ТС и Ki-67 в зависимости от клинко-морфологических характеристик АЛ

Клинко-морфологические критерии заболевания			Уровень экспрессии ТС, n (%)			Значения Ki-67, n (%)		
			низкий	средний	высокий	< 20 %	20–30 %	> 30 %
Категория Т	T1a–в	8	4 (50)	3 (37,5)	1 (12,5)	6 (75)	2 (25)	–
	T2a–в	46	2 (4,3)	6 (13)	38 (82,6)	8 (17,4)	30 (65,2)	8 (17,4)*
	T3	9	1 (11,1)	3 (33,3)	5 (55,5)	1 (11,1)	1 (11,1)	7 (77,7)
Категория N	N0	38	5 (13)	8 (21)	25 (65,8)	7 (18,4)	27 (71)**	4 (10,5)**
	N1–2	25	2 (8)	4 (16)	19 (76)	10 (40)	3 (12)	12 (48)
Стадия	I	31	5 (16,1)	8 (25,8)	18 (58)	8 (25,8)	21 (67,7)***	2 (6,4)***
	II	16	2 (12,5)	3 (18,8)	11 (68,7)	5 (31,2)	8 (50)***	3 (18,8)***
	IIIА	16	–	1 (6,2)	15 (93,8)	2 (12,5)	2 (12,5)	12 (75)

Примечание: \* – статистически достоверные различия между сравниваемыми показателями в зависимости от размеров первичной опухоли; \*\* – статистически достоверные различия сравниваемых показателей в зависимости от регионарного метастазирования; \*\*\* – статистически достоверные различия сравниваемых показателей в зависимости от стадии заболевания ( $p < 0,05$ ).

2 маркеров имелись однонаправленные изменения, т. е. нарастали по мере возрастания стадии, но внутридерная высокая экспрессия Ki-67 была стати-

стически достоверно менее выраженной (I стадия –  $p = 0,001$ ; II –  $p = 0,002$ ), чем цитоплазматическая высокая экспрессия ТС.

Таблица 3

ИГХ-экспрессия ТС и Ki-67 в зависимости от степени дифференцировки АЛ

Степень дифференцировки, n (%)	Уровень экспрессии ТС, n (%)			Значения Ki-67, n (%)		
	низкий	средний	высокий	< 20 %	20–30 %	> 30 %
G 1	11 (17,4)	7 (11,1)	3 (4,7)	6 (9,5)	5 (7,9)	–
G 2	40 (63,5)	–	6 (9,5)**	34 (54)*	27 (42,8)	4 (6,3)
G 3	12 (19)	–	3 (4,7)	9 (14,2)	–	11 (17,5)
Всего	63 (100)	7 (11,1)	12 (19)	44 (69,8)	33 (52,4)	15 (23,8)

Примечание: \* – различия, статистически достоверные между высокой экспрессией ТС и очень высоким значением Ki; \*\* – различия, статистически достоверные между средней экспрессией ТС и высоким значением Ki-67.

При рассмотрении в сравнительном аспекте показателей экспрессии маркеров ТС и Ki-67 в зависимости от других прогностических клинко-морфологических характеристик АЛ следует констатировать факт отсутствия существенных различий между ними при местнораспространенном раке. Однако по результатам анализа полученных данных при меньшей распространенности опухолевого процесса (как по категории Т, так и по категории N), при которых степень экспрессии Ki-67 в некоторых подгруппах значимо меньше выраженности экспрессии ТС, такого вывода сделать нельзя.

В связи с этим была исследована иммунореактивность обоих опухолевых маркеров в зависимости от степени дифференцировки АЛ. Результаты исследования экспрессии ТС и Ki-67 в опухолевой ткани всех больных представлены в табл. 3.

В табл. 3 продемонстрировано отсутствие существенных различий между уровнями экспрессии ТС и показателями Ki-67 в подгруппе низкодифференцированных АЛ, где эти критерии высоки в подавляющем большинстве наблюдений. Статистически достоверные различия отмечены при анализе уровней экспрессии ТС и высоких показателей Ki-67 в подгруппе умеренно дифференцированных опухолей. Так, высокий уровень цитоплазматической экспрессии ТС значительно чаще (в 54 % случаев) выявляется по сравнению с очень высоким ядерным показателем Ki-67, отмеченным только в 6,3 % наблюдений ( $p = 0,001$ ).

Получены достоверные различия при сравнении среднего уровня экспрессии ТС с высокими показателями Ki-67 – 9,5 vs 42,8 % соответственно ( $p = 0,002$ ). Следовательно, на основании выявленных результатов можно утверждать, что экспрессия

ТС в опухолевой ткани является независимым предсказательным фактором высокого пролиферативного потенциала АЛ. ТС во времени имеет опережающее предикторное значение по сравнению с очень высокими показателями Ki-67. В основном прослеживается выраженная корреляция среднего уровня экспрессии ТС с высокими показателями Ki-67.

Для установления влияния выраженности экспрессии ТС на показатели БВ, изученные методом Каплана–Мейера, были сформированы 2 группы сравнения. В 1-ю вошли 19 (30,1 %) больных, у которых в первичных опухолях обнаружены низкие и средние уровни экспрессии ТС, во 2-ю – 44 (69,8 %) пациентов, у которых выявлена высокая экспрессия данного маркера (рис. 2).

Из полученных данных следует, что БВ пациентов в группе с высоким уровнем экспрессии ТС ниже на 14 %, чем в группе с низким и средним уровнем экспрессии, и составляет 74 и 88 % соответственно.

Для сравнения проведен аналогичный анализ БВ у пациентов с различным уровнем экспрессии Ki-67, которые были разделены на 2 группы: с уровнем экспрессии > 30 % и < 30 % (рис. 3).

Установлено, что БВ в группе с уровнем экспрессии < 30 % составила 78 vs 76 % в группе > 30 % ( $p = 0,39382$ ), что свидетельствует об отсутствии зависимости БВ от уровня экспрессии Ki-67 [6, 7].

Высокие уровни экспрессии ТС характеризуются большой частотой обнаружения при АЛ как у мужчин, так и у женщин. Установлено, что лица старшего возраста нуждаются в надежном контроле резидуальной болезни после радикального оперативного лечения не меньше, чем пациенты более молодого возраста.

Показано, что цитоплазматическая экспрессия ТС возрастает с увеличением стадии процесса, уменьше-

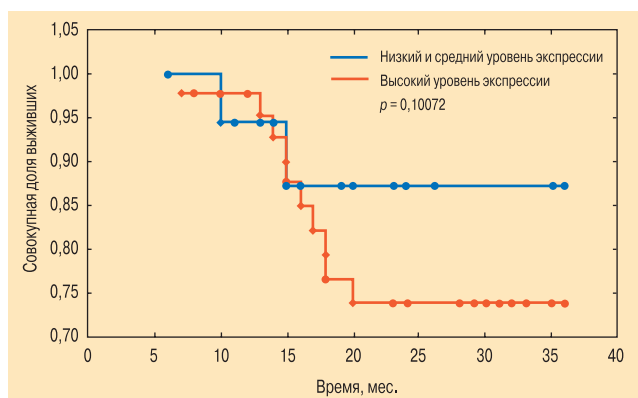


Рис. 2. БВ больных с различной экспрессией ТС

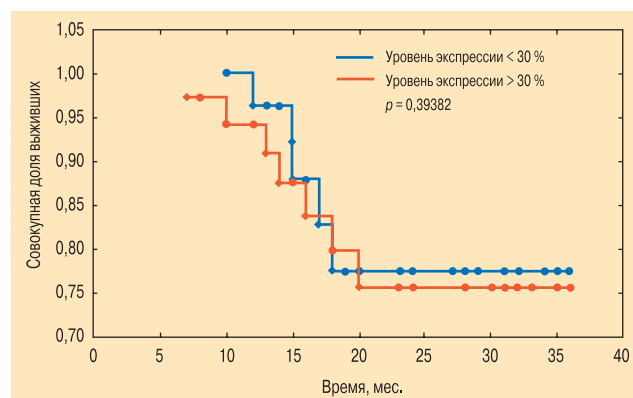


Рис. 3. БВ пациентов с различным уровнем экспрессии Ki-67

нием степени дифференцировки АЛ и коррелирует с показателями Ki-67.

В проведенном исследовании установлено, что показатели 3-летней БВ при АЛ зависят от уровня экспрессии ТС. Отсутствие таковой зависимости от экспрессии Ki-67 может объясняться субъективностью как объединения в одну группу пациентов с низкими и высокими показателями, а не с высокими и очень высокими, а также самого отнесения этого показателя к высокому (20–30 %) или очень высокому уровням (> 30 %). Если учесть, что среди наибольшей по числу пациентов группы с высоким уровнем экспрессии Ki-67 – 33 (52,3 %), некоторая часть (с показателями 27–29 %) потенциально могла быть отнесена к группе с очень высоким уровнем, то корреляция с показателями ТС была бы еще более выраженной.

### Заключение

В исследовании показано, что ТС является независимым прогностическим фактором неблагоприятного течения АЛ. Последнее обстоятельство диктует необходимость проведения соответствующего ИГХ-исследования для определения индивидуальной тактики адъювантной терапии у пациентов с АЛ после радикального оперативного лечения.

### Литература

1. Barlesi F., Pinot D., Legoffic A. et al. Positive thyroid transcription factor 1 staining strongly correlates with survival of patients with adenocarcinoma of the lung. *Cancer*. 2005; 93 (4): 450–452.
2. Myong N.H. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) expression in human lung carcinomas: its prognostic implication and relationship with expressions of p53 and Ki-67 proteins. *J. Korean Med. Sci.* 2003; 18 (4): 494–500.
3. Anagnostou V.K., Bepler G., Syrigos K.N. et al. High expression of mammalian target of rapamycin is associated with better outcome for patients with early stage lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15 (12): 4157–4164.
4. Nakagawa T., Tanaka F., Otake Y. et al. Prognostic value of thymidylate synthase expression in patients with p-stage I adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer*. 2002; 35: 165–170.
5. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013.
6. Лазутин Ю.Н., Пыльцин С.П., Лаптева Т.О. и др. Изучение значения иммуногистохимической экспрессии тимидилатсинтазы и Ki-67 при аденокарциноме легкого для индивидуализации комплексной терапии. В кн.: *Онкология XXI века: от научных исследований в клиническую практику: Материалы VIII Всероссийского съезда онкологов. СПб; 2013; т. 1: 380.*
7. Зинькович С.А., Непомнящая Е.М., Лаптева Т.О. и др. Некоторые иммуногистохимические факторы в определении прогноза течения аденокарциномы легкого.

В кн.: *Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии: Материалы Международной научной конференции. М.: 2014: 112–114.*

Поступила 09.09.14  
УДК УДК 616.24-006.65-037

### References

1. Barlesi F., Pinot D., Legoffic A. et al. Positive thyroid transcription factor 1 staining strongly correlates with survival of patients with adenocarcinoma of the lung. *J. Cancer*. 2005; 93 (4): 450–452.
2. Myong N.H. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) expression in human lung carcinomas: its prognostic implication and relationship with expressions of p53 and Ki-67 proteins. *J. Korean Med. Sci.* 2003; 18 (4): 494–500.
3. Anagnostou V.K., Bepler G., Syrigos K.N. et al. High expression of mammalian target of rapamycin is associated with better outcome for patients with early stage lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15 (12): 4157–4164.
4. Nakagawa T., Tanaka F., Otake Y. et al. Prognostic value of thymidylate synthase expression in patients with p-stage I adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer*. 2002; 35: 165–170.
5. Trukhacheva N.V. Mathematic Statistics in Medico-Biological Studies Using Statistica Software. Moscow: GEOTAR-Media; 2013: 379 (in Russian).
6. Lazutin Yu.N., Pyl'tsin S.P., Lapteva T.O. et al. A significance of immunohistochemical assessment of thymidylate synthetase and Ki-67 expression for individualized therapy of pulmonary adenocarcinoma. In: *Oncology of the 21<sup>st</sup> Century: Implementation of Scientific Research Results in Clinical Practice. Proceedings of the VIII Russian Meeting of Oncologists. St. Petersburg; 2013; 1: 380* (in Russian).
7. Zin'kovich S.A., Nepomnyashchaya E.M., Lapteva T.O. et al. Some immunohistochemical factors predicting the course of pulmonary adenocarcinoma. In: *Actual Issues of Morphogenesis in Healthy and Disease: Proceedings of an International Scientific Conference. Moscow, 2014: 112–114* (in Russian).

Received September 09, 2014  
UDC 616.24-006.65-037

### Информация об авторах

*Зинькович Сергей Анатольевич* – д. м. н., профессор, руководитель отдела клинической онкологии ФГБУ "РНИОИ" Минздрава России; тел.: (863) 200-32-45; e-mail: s.zinkovich@mail.ru  
*Непомнящая Евгения Марковна* – д. м. н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунофенотипирования опухолей ФГБУ "РНИОИ" Минздрава России; тел.: (863) 291-48-11; e-mail: rnioid-patology@yandex.ru  
*Пыльцин Сергей Петрович* – к. м. н., научный сотрудник торакального отделения ФГБУ "РНИОИ" Минздрава России; тел.: (863) 291-48-11; e-mail: rnioid-list.ru  
*Лаптева Татьяна Олеговна* – врач патологоанатомического отделения ФГБУ "РНИОИ" Минздрава России; тел.: (863) 291-48-11; e-mail: rnioid-patology@yandex.ru  
*Лазутин Юрий Николаевич* – к. м. н., доцент, ст. научный сотрудник торакального отделения ФГБУ "РНИОИ" Минздрава России; тел.: (863) 291-47-29; e-mail: rnioid-list.ru  
*Тарнопольская Ольга Владимировна* – к. ф.-м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ "РНИОИ" Минздрава России; тел.: (863) 253-87-80; e-mail: rnioid-biochem@gmail.com