

А.П. Колесник

Запорожский государственный
медицинский университет,
Запорожье, Украина

Ключевые слова:

немелкоклеточный рак легкого,
прогностические маркеры, p53,
выживаемость.

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ P53 У БОЛЬНЫХ С РАННИМИ СТАДИЯМИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

Обоснование и цель: данные о выживаемости больных с одинаковой стадией немелкоклеточного рака легкого (НМКРЛ), получивших идентичное хирургическое лечение, весьма переменчивы, что указывает на необходимость поиска дополнительных прогностических молекулярных маркеров. Цель исследования — изучение прогностической роли экспрессии белка p53. **Объект и методы:** в исследование включено 179 пациентов с НМКРЛ I–II стадии, получивших хирургическое лечение. Экспрессия p53 определена у 137 больных иммуногистохимическим методом. Проведен анализ корреляционной связи экспрессии p53 с клинико-морфологическими характеристиками: возраст и пол пациента; локализация, гистологический тип, степень морфологической дифференциации и размер опухоли; критерии TNM; стадия заболевания. **Результаты:** отмечена корреляция между экспрессией p53 и стадией заболевания, N-статусом, размером опухоли. Между экспрессией и p53, а также остальными проанализированными клинико-морфологическими характеристиками статистически значимой связи не выявлено. Выживаемость пациентов с высоким уровнем экспрессии p53 (≥ 2 баллов, интенсивность окраски ядер опухолевых клеток более ++)^{достоверно ниже, чем у больных с отсутствием или низкой экспрессией данного маркера. При многофакторном анализе выявлено, что наиболее значимыми прогностическими факторами у больных с I–II стадией НМКРЛ являются размер и гистологический тип опухоли, уровень экспрессии p53.} **Вывод:** показано прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями НМКРЛ, что позволит выделять группу пациентов, которым необходима дополнительная терапия после проведения оперативного вмешательства.

ВВЕДЕНИЕ

Рак легкого является основной причиной смерти от злокачественных новообразований во всем мире. Несмотря на успехи в диагностике и лечении немелкоклеточного рака легкого (НМКРЛ), 5-летняя выживаемость остается на уровне 15%. Хирургическое лечение — единственный метод, дающий надежду на выздоровление, однако у 30–60% больных после операции возникают рецидивы заболевания. Данные о выживаемости пациентов с одинаковой стадией НМКРЛ имеют значительную изменчивость. Это указывает на необходимость поиска молекулярных маркеров, которые определяют свойства опухоли, прогноз и могут помочь улучшить выживаемость [2, 4, 6–14, 18, 19].

Одним из важнейших молекулярных маркеров является фосфопротеин p53 — продукт гена-супрессора TP53, который локализуется на коротком плече 17-й хромосомы. p53 выполняет три основные функции: регуляцию клеточного цикла, индукцию апоптоза (в случаях, когда повреждения ДНК клетки не могут быть репарированы), стабилизацию ге-

нома. Нарушение регуляции клеточного цикла, связанное с изменением активности p53, ведет к развитию и прогрессированию рака [4, 5, 17].

Мутация TP53 выявлена при развитии опухолей многих локализаций, в том числе рака легкого [4]. Несмотря на многочисленные исследования, оценка прогностической роли этого белка противоречива и требует дальнейшего изучения [15]. В связи с этим целью нашего исследования было изучение связи уровня экспрессии p53 с клинико-морфологическими характеристиками пациента и опухоли, а также определение прогностической значимости этого маркера у больных с ранними стадиями НМКРЛ.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С июня 2008 по июнь 2011 года в торакальном отделении Запорожского областного клинического онкологического диспансера пролечено 179 пациентов с I–II стадией НМКРЛ. В исследовании приняли участие 119 (66,5%) мужчин и 60 (33,5%) женщин. Пациенты были проинформированы об исследовании и дали согласие на использование операцион-

ного материала в исследовательских целях. Средний возраст пациентов составил $60,3 \pm 7,8$ года (от 39 до 77 лет). Всем пациентам проведено хирургическое лечение НМКРЛ в объеме лобэктомии ($n = 122$; 68,2%) или пульмонэктомии с медиастинальной лимфодиссекцией ($n = 57$; 31,8%) с последующим патогистологическим исследованием микропрепаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, с целью морфологической верификации диагноза. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проведено у 137 пациентов (76,5%).

ИГХ исследования проводили в парафиновых срезах операционного материала с использованием моноклональных антител Mo.a-Hu.p53 Protein, Clone DO-7 («Dako Cytomation Corporation») против белка p53 в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя, придерживаясь стандартных методик анализа [1, 3]. Результаты ИГХ реакции оценивали полуколичественным методом с помощью микроскопа Axioplan 2 («Carl Zeiss», Германия). Уровень экспрессии p53 определяли как процент позитивно окрашенных опухолевых клеток (ОК) в популяции и оценивали в баллах следующим образом: 0–5% окрашенных ядер ОК — 0 баллов, 6–25% — 1 балл, 26–50% — 2 балла, 51–75% — 3 балла, 76–100% — 4 балла [8]. Кроме того, определяли степень интенсивности окраски ядер ОК: 0 — отсутствие окраски, 1 (+) — слабая окраска, 2 (++) — умеренная окраска, 3 (+++) — выраженная окраска ядер [4, 5, 9, 16, 17].

Для оценки связи между экспрессией p53 и клинико-морфологическими параметрами использовали критерий χ^2 и тест Пирсона (коэффициент корреляции r). Выживаемость пациентов определяли по методу Каплана — Мейера, разницу в выживаемости отдельных групп анализировали с помощью log-rank теста. Для мультивариантного анализа использовали регрессионную модель Кокса, определяя коэффициент риска (hazard ratio — HR). Критерий статистической значимости определен как $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия p53 в ОК отмечена в 82% случаев НМКРЛ; ее уровень варьировал от 1 до 4 баллов, интенсивность окраски ядер — от 1 (+) до 3 (+++) (рис. 1).

При исследовании корреляционных связей между уровнем экспрессии p53 (в баллах) и клинико-морфологическими характеристиками получены данные, представленные в табл. 1. Как видно, не выявлено связи между экспрессией p53, с одной стороны, а также полом и возрастом пациентов, локализацией, гистологическим типом и степенью морфологической дифференциации опухоли, градацией критерия T, с другой. В то же время отмечена слабая, но статистически значимая корреляция между частотой ОК, экспрессирующих p53, статусом N ($p = 0,0006$), размером опухолевого очага ($p = 0,00008$), а также стадией заболева-

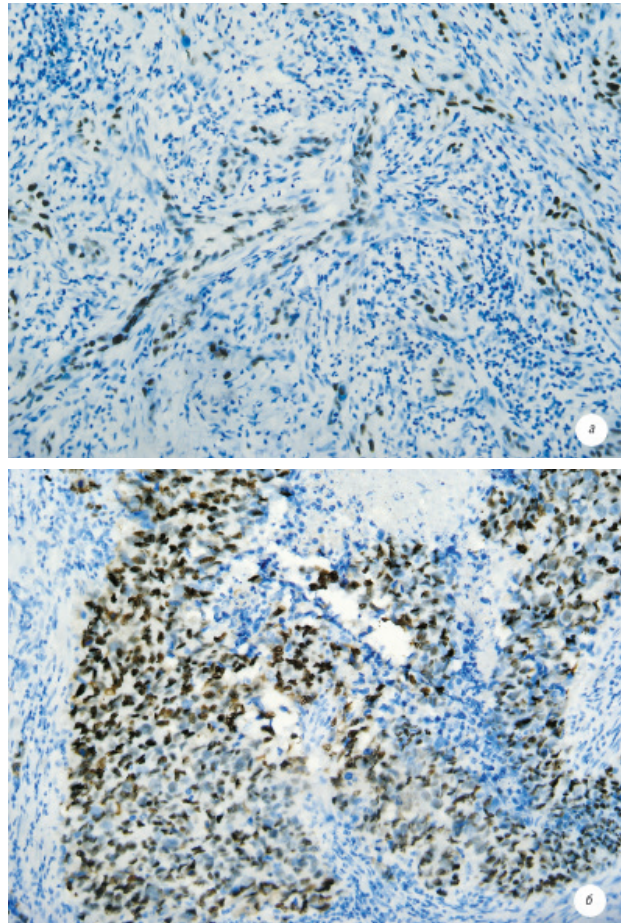


Рис. 1. Экспрессия p53 в ткани НМКРЛ: а) опухоль с низким уровнем экспрессии — 1 балл; б) опухоль с высоким уровнем экспрессии — 3 балла (ув. 200)

ния ($p = 0,01$). При сопоставлении интенсивности окраски ядер ОК (см. табл. 1) и клинико-морфологических характеристик отмечена слабая статистически значимая корреляция со стадией заболевания ($r = 0,20$, $p = 0,01$) и размером опухолевого очага ($r = 0,19$, $p = 0,025$).

Выживаемость пациентов со злокачественными новообразованиями, в том числе и с НМКРЛ, является наиболее важным критерием эффективности лечения, особенно при ранних стадиях заболевания. На основании оценки выживаемости возможно определение прогностической или предиктивной роли того или иного клинико-морфологического фактора. Анализ выживаемости в зависимости от показателей экспрессии p53 включенных в исследование пациентов представлены на рис. 2, 3. Отмечено, что у больных с экспрессией p53 в более чем 25% ОК (уровень экспрессии ≥ 2 баллов) статистически значимая ($p < 0,01$) более низкая выживаемость (см. рис. 2), как и у пациентов с более интенсивно (++, +++) окрашенными ядрами ОК ($p < 0,01$) (см. рис. 3).

Для проведения мультивариантного анализа влияния молекулярных и клинико-морфологических факторов на прогноз у больных с ранними стадиями НМКРЛ использовали модель Кокса (табл. 2).

Таблица 1

Связь экспрессии p53 с клинико-морфологическими характеристиками

Характеристика	n	%	p53						г, р
			Экспрессия более чем в 25% клеток (≥ 2 баллов)			Интенсивность окраски ядер ОК более ++			
			n ₁	n ₂	%	n ₁	n ₂	%	
Возраст, годы									
< 60	67	48,9	38	67	56,7	54	67	80,1	Не значимо
≥ 60	70	51,1	37	70	52,9	59	70	84,3	
Пол									
Мужчины	120	87,6	65	120	54,2	99	120	82,5	Не значимо
Женщины	17	12,4	10	17	58,8	13	17	76,5	
Локализация опухоли									
Правое легкое	63	45,9	31	63	49,2	51	63	80,9	Не значимо
Левое легкое	74	54,1	44	74	59,5	62	74	83,8	
Гистологический тип опухоли									
Неплоскоклеточный рак (аденокарцинома)	50	36,5	29	50	58,0	40	50	80,0	Не значимо
Плоскоклеточный рак	87	63,5	46	87	52,9	73	87	83,9	
Степень морфологической дифференциации (G)									
G1	27	19,7	17	27	62,9	20	27	74,1	Не значимо
G2	81	59,1	42	81	51,9	70	81	86,4	
G3	29	21,2	16	29	55,2	23	29	79,3	
Критерий T									
T1	13	9,5	8	13	61,5	8	13	61,5	Не значимо
T2	120	87,6	63	120	52,5	99	120	82,5	
T3	4	2,9	2	4	50,0	4	4	100,0	
Критерий N									
N-	98	71,5	45	98	45,9	77	98	78,6	r = 0,33
N+	39	28,5	28	39	71,8	34	39	87,2	p = 0,0006
Стадия заболевания									
Ia	13	9,5	7	13	53,8	8	13	61,5	r = 0,2 p = 0,01
Ib	80	58,4	38	80	47,5	66	80	82,5	
IIa	2	1,5	1	2	50,0	2	2	100,0	
IIb	42	30,6	29	42	69,0	37	42	88,1	
Размер опухоли (наибольший диаметр опухолевого узла, см)									
< 3	20	14,6	7	20	35,0	14	20	70,0	r = 0,33
≥ 3	117	85,4	67	117	57,3	98	117	83,8	p = 0,00008

Примечание: n₁ – количество образцов; n₂ – количество пациентов или опухолей.

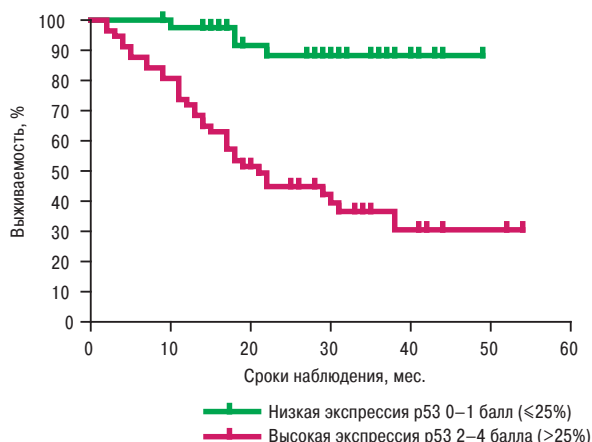


Рис. 2. Выживаемость (оценка по Каплану — Мейеру, log-rank тест) пациентов с НМКРЛ в зависимости от уровня экспрессии p53 (частоты p53 позитивных ОК)

Согласно результатам анализа важными прогностическими факторами являются размер опухоли (p < 0,001), уровень экспрессии p53 (p < 0,001) и гистологический тип злокачественного новообразова-

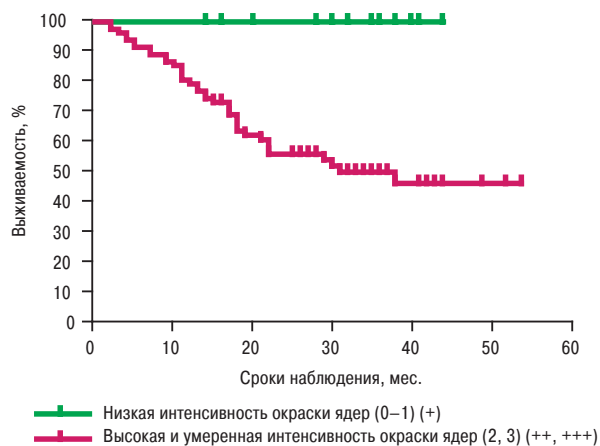


Рис. 3. Выживаемость (оценка по Каплану — Мейеру, log-rank тест) пациентов с НМКРЛ в зависимости от интенсивности окраски ядер ОК

Таблица 2

Влияние молекулярных и клинико-морфологических факторов на выживаемость больных с ранними стадиями НМКРЛ

Фактор	Категория	HR	p
Пол	Мужчины	-1,07	0,28
	Женщины		
Возраст	От 34 до 76 лет	0,19	0,05
Размер опухоли	От 1,5 до 14 см	3,39	<0,001
Локализация опухоли	Правое легкое	0,14	0,88
	Левое легкое		
Стадия заболевания	I–II	0,24	0,71
Гистологический тип опухоли	Плоскоклеточный рак	0,3	0,01
	Неплоскоклеточный рак (аденокарцинома)		
Вид оперативного вмешательства	Верхняя лобэктомия	0,13	0,54
	Средняя лобэктомия		
	Нижняя лобэктомия		
	Верхняя билобэктомия		
	Нижняя билобэктомия		
Пульмонэктомия			
Степень морфологической дифференциации опухоли	I–III	0,21	0,19
Уровень экспрессии p53	1–4 балла	6,28	<0,001
Интенсивность окраски ядер p53 позитивных ОК	«+» – «+++»	1,64	0,1

ния (p = 0,01). Выживаемость пациентов с I–II стадией НМКРЛ достоверно ухудшается с увеличением размера опухолевого узла, повышением уровня экспрессии p53 в опухоли, а также при неплоскоклеточном раке.

ВЫВОД

Проведенное исследование показывает важную прогностическую роль экспрессии p53 у больных с ранними стадиями НМКРЛ, что позволит выделять группу пациентов, которым необходима дополнительная терапия после проведения оперативного лечения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эллиниди ВН. Практическая иммуногистоцитохимия. СПб.: ВЦЭРМ МЧС России, 2002. 36 с.
2. Ahrendt SA, Hu Y, Buta M, et al. p53 Mutations and survival in stage I non-small-cell lung cancer: results of a prospective study. J Natl Cancer Inst 2003; 95: 961–70.

3. **Boenisch T.** Immunohistochemical staining methods: handbook, 3rd ed. Carpinteria: Dako Cytomation Corporation, 2001. 68 p.

4. **Chenga YL, Lee SCh, Harn HJ, et al.** Prognostic prediction of the immunohistochemical expression of p53 and p16 in resected non-small cell lung cancer. *Eur J Cardio-thor Surg* 2003; **23**: 221–8.

5. **Haga Y, Hiroshima K, Iyoda A, et al.** Ki-67 expression and prognosis for smokers with resected stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2003; **75**: 1727–33.

6. **Han H, Landreneau RJ, Santucci TS, et al.** Prognostic value of immunohistochemical expressions of p53, HER-2/neu, and bcl-2 in stage I non-small-cell lung cancer. *Hum Pathol* 2002; **33**: 105–10.

7. **Junker K.** Prognostic factors in stage I/II non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001; **33** (Suppl. 1): S17–S24.

8. **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.

9. **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.

10. **Niklinski J, Niklinska W, Laudanski J, et al.** Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001; **34** (Suppl. 2): S53–S8.

11. **Oliveira Carvalho PE, Antonāngelo L, Del Carlo Bernardi F, et al.** Useful prognostic panel markers to express the biological tumor status in resected lung adenocarcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 2000; **30** (11): 478–86.

12. **Osaki T, Oyama T, Inoue M, et al.** Molecular biological markers and micrometastasis in resected non-small-cell lung cancer. Prognostic implications. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; **49**: 545–51.

13. **Schneider PM, Praeuer HW, Stoeltzing O, et al.** Multiple molecular marker testing (p53, C-Ki-ras, c-erbB-2) improves estimation of prognosis in potentially curative resected non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2000; **83**: 473–9.

14. **Sozzi G.** Molecular biology of lung cancer. *Eur J Cancer* 2001; **37** (Suppl. 7): S63–S73.

15. **Steels E, Paesmans M, Berghmans T, et al.** Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Eur Respir J* 2001; **18**: 705–19.

16. **Tanaka F, Yanagihara K, Otake Y, et al.** Prognostic factors in patients with resected pathologic (p-) T1–2N1M0 non-small cell lung cancer (NSCLC). *Eur J Cardio-thor Surg* 2001; **19**: 555–61.

17. **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.

18. **Uramoto H, Sugio K, Oyama T, et al.** Expression of the p53 family in lung cancer. *Anticancer Res* 2006; **26**: 1785–90.

19. **Vogt U, Zaczek A, Klinke F, et al.** p53 Gene status in relation to *ex vivo* chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; **128**: 141–7.

PROGNOSTIC VALUE OF P53 EXPRESSION IN PATIENTS WITH EARLY-STAGE NON-SMALL CELL LUNG CANCER

A.P. Kolesnik

Summary. Background and Aim: data on the survival of patients with the same stage of non-small cell lung cancer (NSCLC) received an identical surgical treatment are quite variable, which points to the need to search for additional prognostic molecular markers. The purpose of research is the study of the prognostic role of expression of p53. **Object and Methods:** the study included 179 patients with NSCLC stage I–II who received surgical treatment. Expression of p53 was detected in 137 patients by immunohistochemical method. The analysis of the correlation of p53 expression with clinical and morphological characteristics: age and sex of the patient, localization, histological type, degree of morphological differentiation and tumor size, criteria TNM; disease stage was conducted. **Results:** a correlation between the expression of p53 and stage of disease, N status, tumor size was revealed. Between the expression of p53 and the other analyzed clinical and morphological characteristics of a statistically significant association was not detected. Survival of patients with high levels of p53 expression (≥ 2 points, the intensity of color of the nucleus of tumor cells more ++) was significantly lower than in patients with no or low expression of this marker. In multivariate analysis it was revealed that the most important prognostic factors in patients with stage I–II NSCLC are the size and histological type of tumor, the level of p53 expression. **Conclusion:** it was shown prognostic value of p53 expression in patients with early-stage NSCLC, which will allocate a group of patients who require additional therapy after surgery intervention.

Key words: non-small cell lung cancer, prognostic markers, p53, survival.

Адрес для переписки:

Колесник А.П.

69091, Запорожье,

ул. Нижнеднепровская, 4, кв. 238

E-mail: kap_kan@mail.ru