

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

ВЛИЯНИЕ ПЛОТНОСТИ МИКРОСОСУДОВ В ОПУХОЛИ НА ПРОГНОЗ У БОЛЬНЫХ С I-II СТАДИЕЙ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЁГКОГО ПОСЛЕ ПРОВЕДЕННОГО ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

Проведено исследование прогностической роли плотности микрососудов в опухолях больных с I–II стадией НМКРЛ с июня 2008 г. по июнь 2011 г. Определение микрососудистой плотности с помощью маркера CD31 было проведено у 114 пациентов. ПМС опухоли значимо коррелировал с размером новообразования: так, при опухоли более 3 см в диаметре содержание микрососудов составило $68,7 \pm 3,1$ (95% ДИ, 62,5–74,9), при меньшем размере опухоли — $48,6 \pm 4,5$ (95% ДИ, 39,1–58,2). Независимыми прогностическими маркерами у больных с I–II стадией НМКРЛ после хирургического лечения являются гистологический тип опухоли ($HR=2,97$, $p=0,003$), размер опухоли ($HR=4,5$, $p<0,001$), и количество микрососудов в опухоли ($HR=3,2$, $p=0,001$).

Ключевые слова: рак легкого, плотность микрососудов опухоли, CD31, CD34, выживаемость, прогноз

J. Folkman и соавт. [5] одними из первых указали, что для роста и развития новообразования необходимо развитие новых, питающих опухоль сосудов. Было высказано предположение, что блокирование факторов, вызывающих неоангиогенез, может приводить к опухолевой регрессии. Таким образом, это явилось началом эры исследования микрососудов опухоли, факторов, вызывающих неоангиогенез и препаратов, способных блокировать эти факторы. Впервые плотность микрососудов (ПМС) в опухоли легких иммуногистохимически определили Macchiarini и соавт. [10] в 1992 г., используя антитела к фактору Виллебранда, CD31, CD34. В последующем было показано, что неоангиогенез начинается при размере опухоли 1–2 мм, это влияет на опухолевый рост и прогрессию [2, 9, 18]. В связи с тем, что необходим поиск маркеров прогноза у больных с немелкоклеточным раком легкого (НМКРЛ), для выявления группы пациентов с высоким риском прогрессирования заболевания, а также группы пациентов, чувствительных к адъювантной химиотерапии, было проведено ряд исследований по изучению прогностической роли ПМС

опухоли. Для подсчета количества микрососудов используются маркеры, связывающиеся с эндотелиальными клетками: фактор VIII, CD31, CD34, CD105 [8]. Наиболее часто используются маркеры CD31, CD34. CD31 — член семейства иммуноглобулинов с молекулярной массой 130 кДа. CD34 — трансмембранный гликопротеид, который находится на поверхности лейкоцитов, эндотелиальных клеток, стволовых клеток. Молекулярная масса CD34 составляет 110 кДа [12, 16, 17]. В связи с тем, что прогностическая ценность ПМС опухоли остается противоречивой, нами проведена работа по изучению прогностической роли уровней развития ангиогенеза в немелкоклеточном раке легкого (НМКРЛ) I–II стадии. Изучение прогностической роли ПМС именно у больных с I–II стадиями НМКРЛ связано с тем, что данная работа является частью исследования, посвященного индивидуализации назначения адъювантной полихимиотерапии у больных с НМКРЛ на основании выделения группы больных с неблагоприятным прогнозом.

Материалы и методика

Исследование проведено с июня 2008 г. по июнь 2011 г. Определение микрососудистой плотности проведено у 114 пациентов. Среди них было 96 мужчин (84,2%) и 18 женщин (15,8%). Средний возраст больных составил 61,0 год (95% ДИ, 59,5–62,5). Всем пациентам выполнено радикальное хирургическое вмешательство с последующим гистологическим и иммуногистохимическим исследованием опухоли. По гистологическому строению опухоли, пациенты распределились следующим образом: у 42 больных выявлены аденокарциномы и у 72 пациентов плоскоклеточный рак легкого.

ПМС определяли иммуногистохимически с использованием маркера CD31, который селективно маркирует эндотелиальные клетки кровеносных сосудов. Для подсчета микрососудов использовали метод Босари [1], каждый срез анализировали под малым увеличением (об. $\times 40$) для определения полей с наибольшей концентрацией микрососудов. Далее выбирали 3 поля с наибольшей концентрацией микрососудов и подсчитывали микрососуды при увеличении $\times 200$ (площадь поля зрения 0,739 мм²). Учитывали среднее значение 3-х полей зрения. Большие сосуды с содержанием эритроцитов исключали из подсчета. Препараты оценивались двумя патоморфологами. Единицей измерения плотности микрососудов считали среднее количество микро-

сосудов в участках их наивысшей плотности в 3-х полях зрения при увеличении $\times 200$.

Статистическую обработку данных проводили в системе Statistica 6.0. Для оценки связи между клинико-патологическими параметрами и/или метастазами использовался тест хи-квадрат. Анализ выживаемости проводили, используя метод Каплана-Майера. Влияние факторов на выживаемость оценивали с помощью Кокс-регрессии. Статистически значимым считали уровень различий при индексе $p < 0,05$.

Результаты

В среднем количество микрососудов в опухолях пациентов составило $65,9 \pm 2,8$ (95% ДИ, 60,4–71,5) (рис. 1 и 2).

При оценке связи между различными клинико-морфологическими характеристиками и микрососудистым руслом опухоли не отмечено корреляции количества микрососудов с возрастом, полом пациентов, критериями pT/pN, локализацией, гистологическим типом и дифференцировкой опухоли ($p > 0,05$). Однако отмечается значимая связь размера первичной опухоли и количества микрососудов ($p = 0,007$). При увели-

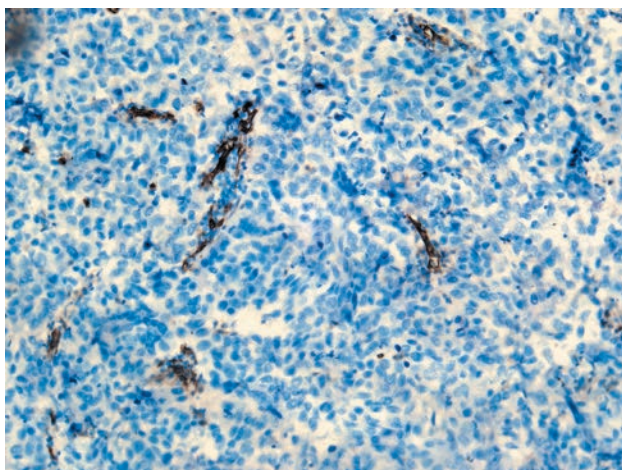


Рис. 1. Низкая экспрессия CD31 в опухоли больных с I–II стадиях НМКРЛ

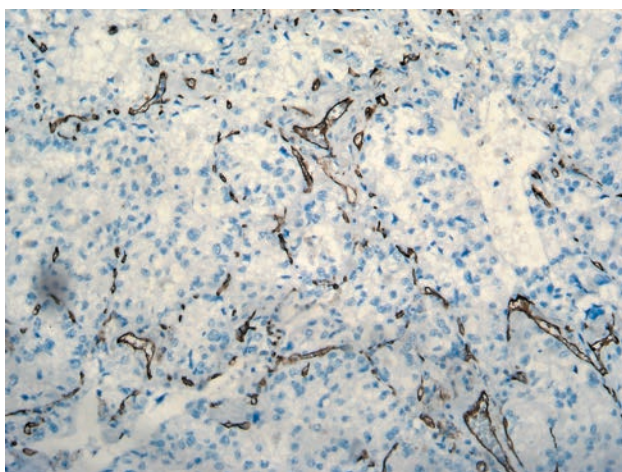


Рис. 2. Высокая экспрессия CD31 в опухоли больных с I–II стадиях НМКРЛ

чении размера опухоли увеличивается количество микрососудов (табл. 1).

Таблица 1

Связь клинико-морфологических факторов с плотностью микрососудов в опухоли

Характеристика	Экспрессия CD31		p
	M±m	ДИ 95%	
Возраст			
39–50 (n=12)	80,8±8,6	61,9–99,7	0,25
51–60 (n=47)	64,4±4,1	56,1–72,6	
61–70 (n=36)	61,9±4,4	52,9–70,9	
71–80 (n=19)	68,1±8,9	49,3–86,9	
Пол			
Мужчины (n=96)	66,5±2,8	60,9–72,1	0,09
Женщины (n=18)	62,8±9,8	42,1–83,6	
Гистология			
аденокарцинома (n=42)	68,9±6,0	56,8–81,1	0,53
плоскоклеточный (n=72)	64,2±2,8	58,7–69,7	
Дифференцировка			
G1 (n=26)	77,9±7,2	63,1–92,6	0,86
G2 (n=65)	62,3±3,0	56,3–68,4	
G3 (n=23)	62,7±7,1	48,1–77,5	
pT			
T1 (n=11)	61,4±10,4	38,2–84,7	0,14
T2 (n=100)	66,3±3,0	60,3–72,2	
T3 (n=3)	72,3±8,4	36,4–108-3	
pN			
N0 (n=85)	62,9±2,7	57,7–68,3	0,34
N1 (n=29)	74,7±7,7	58,9–90,5	
Локализация			
Периферический (n=66)	66,8±4,3	58,2–75,5	0,69
Центральный (n=48)	64,8±3,1	58,5–71,0	
Размер опухоли			
≥3 см	68,7±3,1	62,5–74,9	0,007
<3 см	48,6±4,5	39,1–58,2	

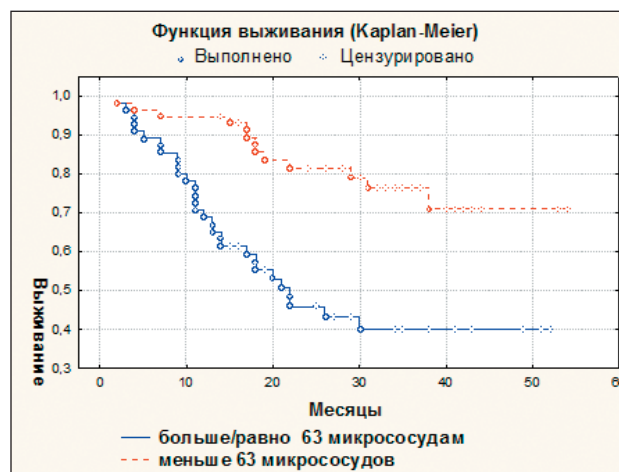


Рис. 3. Выживаемость больных с ≥ 63 и < 63 микрососудов в опухоли

Важнейшим критерием прогностического значения маркера является связь с выживаемостью пациентов. При анализе выживаемости нами отмечено, что наибольшая разница в выживаемости больных отмечается между пациентами с содержанием микрососудов в опухоли ≥ 63 и < 63 (Log-rank=0,0001) (рис. 3).

Как видно из представленного графика, 25-й процентиль выживания для пациентов с большим количеством микрососудов в опухоли (≥ 63 микрососудам) составил 11 мес., медиана выживаемости 21,3 мес. У пациентов с низким содержанием микрососудов в опухоли (менее 63 микрососудов) 25-й процентиль выживания составил 32,7 мес., медиана выживаемости не достигнута.

Для многофакторного анализа прогностической значимости клинико-морфологических факторов использовали модель Кокс-регрессии (данные представлены в табл. 2). Как видно из таблицы, независимыми прогностическими маркерами у больных с I-II стадией НМКРЛ после хирургического лечения являются гистологический тип опухоли (HR=2,97, $p=0,003$), размер опухоли (HR=4,5, $p<0,001$) и количество микрососудов (HR=3,2, $p=0,001$).

Таблица 2

Прогностическое значение клинико-морфологических характеристик пациентов

Фактор	Категория	Hazard ratio	Значение p
Возраст	от 42 до 77 лет	0,18	0,86
Пол	м vs ж	0,63	0,53
Гистология	плоскоклеточный рак vs неплоскоклеточный рак	2,97	0,003
G	G1 vs G2	0,03	0,96
T	T1 vs T2-3	0,49	0,62
N	N0 vs N1	1,03	0,29
Локализация	центральный vs периферический	0,34	0,73
Размер опухоли	от 1,5 до 14 см	4,5	0,000005
CD31	от 14 до 156 микрососудов	3,2	0,001

*vs — против

Таким образом, повышенный риск прогрессирования заболевания отмечается у больных с плоскоклеточным раком, размером опухоли более 3 см и содержанием более 63 микрососудов в опухоли.

Обсуждение:

Первые данные о корреляции уровня микрососудов в опухоли и прогрессирования НМКРЛ были получены Macchiarini и соавт. [10].

Giatromanolaki и соавт. [7] впервые исследовали и показали значимую связь между уровнем микрососудов опухоли, определенную с помощью маркера CD31, и выживаемостью больных с НМКРЛ. Fontanini и соавт. [6] показали, что уровень микрососудов в опухоли, определенный с помощью CD31, повышается от злокачественной опухоли «in situ» до инвазивной карциномы.

Для определения микрососудов опухоли возможно использование таких маркеров как: фактор VIII, CD31, CD34, CD105 [8, 13]. В изученной нами литературе нет данных о различии уровня плотности микрососудов в опухоли, определенных с помощью различных маркеров (фактор VIII, CD31, CD34, CD105). Лишь в работе T. Donnem и соавт. [3] указано на отсутствие корреляции между уровнем микрососудов и экспрессией VEGF.

Остается неполностью изученным вопрос о методе оценки плотности микрососудов и интерпретации этих данных. Fontanini и соавт. [6] разделили пациентов с различным уровнем плотности микрососудов в опухоли на 5 категорий: 1–10 микрососудов, 11–20 микрососудов, 21–30 микрососудов, 31–40 микрососудов, более 41 микрососудов. Matsuyama и соавт. [11] указывают на прогностическую значимость уровня микрососудов в опухоли, равную 71 ± 47 ($M \pm m$). Так, у больных с уровнем микрососудов до 71 отмечается благоприятный прогноз, а при уровне больше или равном 71 микрососудам опухоли — прогноз не благоприятный. В нашем исследовании среднее количество микрососудов в опухолях пациентов составило $65,9 \pm 2,8$ (95% ДИ, 60,4–71,5), что согласуется с данными предыдущих работ.

Не отмечено связи количества микрососудов в опухоли с возрастом, дифференцировкой, гистологическим типом опухоли [2]. В нашей работе также не выявлено корреляции количества микрососудов в опухоли с возрастом, полом пациентов, критериями pT/pN, локализацией, гистологическим типом и дифференцировкой опухоли ($p>0,05$). Однако отмечается значимая связь размера первичной опухоли и количества микрососудов ($p=0,007$).

Прогностическое значение ПМС остается противоречивым. Так, I. Milas и соавт. [12] не отметили прогностической значимости иммуногистохимического определения ПМС с помощью CD34 у больных с НМКРЛ и связи данного показателя с риском развития метастазов в головной мозг [12]. Другие исследователи указывают на независимую прогностическую значимость ПМС опухоли. Так, J.F. Guo и соавт. [8] отмечают, что определение ПМС в опухоли с использованием CD31 коррелирует с возрастом пациентов, полом, гистологической формой

новообразования. Пациенты с низким значением ПМС опухоли имели худший прогноз в сравнении с больными, у которых отмечено высокое значение ПМС [8]. К. Matsuyama и соавт. [11] также отмечает прогностическую значимость ПМС в опухоли, причем количество микрососудов коррелирует с развитием отдаленных, но не регионарных метастазов. Y. Ohta и соавт. [15] указывают на важную прогностическую роль уровня микрососудов в опухоли, особенно для больных с I стадией НМКРЛ после оперативного лечения. Независимыми прогностическими маркерами у больных с I–II стадиями НМКРЛ после хирургического лечения, по данным нашего исследования, являются гистологический тип опухоли (HR=2,97, p=0,003), размер опухоли (HR=4,5, p<0,001) и количество микрососудов в опухоли (HR=3,2, p=0,001), что согласуется с данными I.G. Duarte и соавт. [4], которые указывают, что опухолевый ангиогенез может быть маркером риска рецидива после хирургического лечения. Другие исследователи указывают, что количество микрососудов значимо влияет на выживаемость; худшая выживаемость отмечается у больных с высоким уровнем микрососудов в опухоли в сравнении с больными, у которых определяется низкое количество микрососудов (5-летняя выживаемость 72,2% против 86,4%) [2, 6, 13, 18]. На современном этапе развития онкологии необходима разработка биологической классификации рака лёгкого [14] и маркеры плотности микрососудов могут быть включены в панель факторов, определяющих прогноз у больных с НМКРЛ.

Выводы:

ПМС опухоли значимо коррелирует с размером новообразования. Так, при опухоли более 3 см в диаметре содержание микрососудов составило $68,7 \pm 3,1$ (95% ДИ 62,5–74,9), при меньшем размере опухоли — $48,6 \pm 4,5$ (95% ДИ 39,1–58,2). Независимыми прогностическими маркерами у больных с I–II стадией НМКРЛ после хирургического лечения являются гистологический тип опухоли (HR=2,97, p=0,003), размер опухоли (HR=4,5, p<0,001) и ПМС новообразования (HR=3,2, p=0,001).

ПМС может использоваться для выделения прогностически неблагоприятной группы больных, которым возможно проведение дополнительного адъювантного лечения для улучшения выживаемости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bosari S., Lee A.K., DeLellis R.A. et al. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma // *Hum. Pathol.* — 1992. — Vol. 23. — P. 755–761.
2. Cox G., Jones J. L., Andi A. et al. A biological staging model for operable non-small cell lung cancer // *Thorax.* — 2001. — Vol. 56. — P. 561–566.
3. Donnem T., Al-Saad S., Al-Shibli K. et al. Inverse prognostic impact of angiogenic marker expression in tumor cells versus stromal cells in non-small cell lung cancer // *Clin Cancer Res.* — 2007. — Vol. 13. — P. 6649–6657.
4. Duarte I.G., Bufkin B.L., Pennington M.F. et al. Angiogenesis as a predictor of survival after surgical resection for stage I non-small-cell lung cancer // *J Thorac Cardiovasc Surg.* — 1998. — Vol. 115. — P. 652–659.
5. Folkman J., Merler E., Abernathy C., Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis // *J Exp Med.* 1971. — Vol. 133. — P. 275–288.
6. Fontanini G., Lucchi M., Vignati S. et al. Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small-cell lung carcinoma: a prospective study // *J Nat Cancer Inst.* — 1997. — Vol. 89. — P. 881–886.
7. Giatromanolaki A., Koukourakis M.I., Theodossiou D., et al. Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIII and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer // *Clin Cancer Res.* — 1997. — Vol. 3. — P. 2485–2492.
8. Guo J.F., Higashi K., Ueda Y. et al. Microvessel density: correlation with 18F-FDG uptake and prognostic impact in lung adenocarcinomas // *J Nucl Med.* — 2006. — Vol. 47. — P. 419–425.
9. Kakolyris S., Giatromanolaki A., Koukourakis M. et al. Assessment of vascular maturation in non-small cell lung cancer using a novel basement membrane component, LH39: correlation with p53 and angiogenic factor expression // *Cancer Res.* — 1999. — Vol. 59. — P. 5602–5607.
10. Macchiarini P., Fontanini G., Hardin M.J. et al. Relation of neovascularization to metastasis of non-small-cell lung cancer // *Lancet* 1992. — Vol. 340. — P. 145–146.
11. Matsuyama K., Chiba Y., Sasaki M. et al. Tumor angiogenesis as a prognostic marker in operable non-small cell lung cancer // *Ann Thorac Surg.* — 1998. — Vol. 65. — P. 1405–1409.
12. Milas L., Komaki R., Hachiya T., et al. Association of VEGF, CD-34, E-cadherin and MMP-9 expression of the primary non-small cell lung cancer lesion with brain metastatic lesion // *Proc Amer Assoc Cancer Res.* — 2004. — Vol. 45. — Abst. #1919.
13. Mineo T.C., Ambrogio V., Baldi A. et al. Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB–IIA non-small cell lung cancer // *J Clin Pathol.* — 2004. — Vol. 57. — P. 591–597.
14. Nia P.S., Marck E.V., Weyler J., Schil P.V. Prognostic value of a biologic classification of non-small-cell lung cancer into the growth patterns along with other clinical, pathological and immunohistochemical factors // *Europ. J Cardio-thoracic Surgery.* — 2010. — Vol. 38. — P. 628–636.
15. Ohta Y., Tomita Y., Oda M. et al. Tumor angiogenesis and recurrence in stage I non-small cell lung cancer // *Ann Thorac Surg.* — 1999. — Vol. 68. — P. 1034–1038.
16. Pusztaszeri M.P., Seelentag W., Bosman F.T. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues // *J Histochem Cytochem.* — 2006. — Vol. 54. — P. 385.
17. Singhal S., Vachani A., Antin-Ozerkis D. et al. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis

biomarkers in non-small cell lung cancer: A Review // Clin Cancer Res. — 2005. — Vol. 11. — P. 3974–3986.

18. Tanaka F., Otake Y., Yanagihara K. et al. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between Anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody // Clin Cancer Res. — 2001. — Vol.7. — P. 3410–3415.

*A.P.Kolesnik, A.I.Shevchenko, V.A.Tumansky,
A.V.Evseev, M.A.Shishkin*

**THE INFLUENCE OF MICROVESSEL DENSITY
IN THE TUMOR ON THE PROGNOSIS IN
PATIENTS WITH STAGE I-II NON-SMALL
CELL LUNG CANCER AFTER SURGICAL
TREATMENT**

State Medical University, Chair of Oncology
Zaporozhye, Ukraine

A study of the prognostic role of microvessel density in tumors of patients with stage I-II non-small cell lung cancer (NSCLC) was performed from June 2008 to June 2011. Determination of microvessel density using the marker CD31 was conducted in 114 patients. Microvessel density was significantly correlated with tumor size: so at greater than 3 cm in diameter, the content of microvessels was $68,7 \pm 3,1$, with a smaller tumor size — $48,6 \pm 4,5$. Independent prognostic markers in patients with stage I-II NSCLC after surgery are histological type (HR = 2,97), tumor size (HR = 4,5), and the number of microvessels in tumor (HR = 3,2).

Поступила в редакцию 07.03.2013