

DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-67-74



Прогностическая значимость комплексной оценки экспрессии Ki-67, фактора некроза опухоли α , CD20 и CD31 при немелкоклеточном раке легкого

О.В. Ковалева, М.А. Рашидова, П.А. Подлесная, Д.В. Самойлова, В.В. Мочальникова, А.Н. Грачев

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Ольга Владимировна Ковалева ovkovaleva@gmail.com

Введение. Немелкоклеточный рак легкого является распространенной онкологической патологией, характеризующейся неблагоприятным прогнозом. Сегодня проводится большое количество исследований, посвященных пониманию молекулярных механизмов прогрессии данного заболевания. Современные успехи иммунотерапии значительно улучшили прогноз пациентов с немелкоклеточным раком легкого, однако для контроля над его течением этого пока недостаточно.

Цель исследования – изучение опухолевых (Ki-67, фактор некроза опухоли α (TNF- α)) и стромальных (TNF- α , CD20 и CD31) маркеров немелкоклеточного рака легкого и их прогностической значимости.

Материалы и методы. В исследование были включены образцы опухолей, полученные от 100 больных немелкоклеточным раком легкого. С помощью иммуногистохимического метода проведена оценка экспрессии Ki-67, TNF- α , CD20 и CD31. Анализ выживаемости осуществляли путем построения кривых дожития по методу Каплана–Майера. Для оценки ассоциации экспрессии исследуемых маркеров с клинико-морфологическими характеристиками использовали критерий Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Мы провели анализ экспрессии Ki-67, TNF- α , CD20 и CD31 в опухолевых клетках немелкоклеточного рака легкого. Экспрессия Ki-67 обнаруживалась в 99 % исследованных образцов и не наблюдалась в клетках стромы. В опухолевых и стромальных клетках экспрессия TNF- α наблюдалась в 100 % образцов. CD31+клетки были также обнаружены во всех исследованных образцах, а CD20+В-клетки присутствовали в 95 % случаев. Экспрессия TNF- α в опухолевых клетках и строме опухоли не ассоциирована с клинико-морфологическими характеристиками. В случае экспрессии CD20 в строме наблюдалась ассоциация с локализацией опухоли ($p = 0,0435$), со стадией заболевания ($p = 0,0044$), размером опухоли ($p = 0,0017$) и наличием регионарных метастазов ($p = 0,0071$). В случае экспрессии Ki-67 наблюдалась сильная ассоциация с гистологическим типом опухоли ($p < 0,0001$), ее локализацией ($p = 0,0012$) и наличием регионарных метастазов ($p = 0,0020$). Анализ прогностической значимости показал, что экспрессия TNF- α в клетках опухолевой стромы является благоприятным прогностическим фактором (отношение рисков (ОР) 0,5547; $p = 0,0139$), в то время как высокое содержание CD31+клеток – фактором неблагоприятного прогноза (отношение рисков 2,335; $p = 0,0355$). Затем мы провели комплексный анализ прогностической значимости комбинации 2 выявленных маркеров. Оказалось, что сочетание TNF- α /строма (высокая экспрессия)+CD31 (низкая экспрессия) является намного более значимым прогностическим фактором, в отличие от индивидуального анализа (отношение рисков 0,1966; $p = 0,0048$).

Заключение. Проведенное исследование показало, что комплексная, а не индивидуальная оценка прогностической значимости одновременно нескольких маркеров более эффективно отражает их предиктивную способность.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, воспаление, прогноз, фактор некроза опухоли, CD20, CD31

Для цитирования: Ковалева О.В., Рашидова М.А., Подлесная П.А. и др. Прогностическая значимость комплексной оценки экспрессии Ki-67, фактора некроза опухоли α , CD20 и CD31 при немелкоклеточном раке легкого. Успехи молекулярной онкологии. Успехи молекулярной онкологии 2021;8(4):67–74. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-67-74.

Prognostic value of complex assessment of Ki-67, tumor necrosis factor α , CD20 and CD31 expression in non-small cell lung cancer

O.V. Kovaleva, M.A. Rashidova, P.A. Podlesnaya, D.V. Samoilova, V.V. Mochalnikova, A.N. Gratchev

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Contacts: Olga Vladimirovna Kovaleva ovkovaleva@gmail.com

Introduction. Non-small cell lung cancer is a common cancer with a poor prognosis. Modern researchers conduct many studies devoted to understanding the molecular mechanisms of its pathogenesis. Modern advances in immunotherapy have significantly improved the prognosis of patients with this pathology, but this is still not enough to control the course of the disease.

Objective – to the study of tumor (Ki-67, tumor necrosis factor α (TNF- α)) and stromal (TNF- α , CD20 and CD31) markers in non-small cell lung cancer and their prognostic significance.

Materials and methods. The study included tumor samples obtained from 100 patients with non-small cell lung cancer. The expression of Ki-67, TNF- α , CD20 and CD31 was assessed by immunohistochemistry. Survival analysis was carried out by constructing survival curves using the Kaplan–Meier method. To analyze the association of the expression of studied markers with clinical and morphological characteristics, the Mann–Whitney test was used. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results. We analyzed the expression of Ki-67, TNF- α , CD20 and CD31 in non-small cell lung cancer tumors. Ki-67 expression was detected in tumor cells in 99 % of the samples studied and was not observed in stromal cells. In tumor and stromal cells, TNF- α expression was detected in 100 % of the samples. CD31 positive cells were also found in all samples studied, and CD20+B cells were present in 95 % of cases. TNF- α expression in tumor cells and tumor stroma is not associated with clinical and morphological characteristics. For the expression of CD20 in the tumor stroma, there was an association with tumor localization ($p = 0.0435$), with the stage of the disease ($p = 0.0044$), tumor size ($p = 0.0017$), and the presence of regional metastases ($p = 0.0071$). For Ki-67, there was a strong association with the histological type of tumor ($p < 0.0001$), its localization ($p = 0.0012$) and the presence of regional metastases ($p = 0.0020$). The analysis of prognostic significance showed that TNF- α expression in tumor stroma cells is a favorable prognostic factor (hazard ratio 0.5547; $p = 0.0139$), while a high content of CD31+ cells is a factor of poor prognosis (hazard ratio 2.335; $p = 0.0355$). Next, we carried out a comprehensive analysis of the prognostic significance of the two identified markers simultaneously. It turned out that their combination of TNF- α /stroma (high expression)+CD31 (low expression) is a much more significant prognostic factor, in contrast to the individual analysis (hazard ratio 0.1966; $p = 0.0048$).

Conclusion. The study showed that a complex rather than an individual assessment of the predictive value of several markers simultaneously more effectively reflects their predictive ability.

Key words: non-small cell lung cancer, inflammation, prognosis, tumor necrosis factor, CD20, CD31

For citation: Kovaleva O.V., Rashidova M.A., Podlesnaya P.A. et al. Prognostic value of complex assessment of Ki-67, tumor necrosis factor α , CD20 and CD31 expression in non-small cell lung cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2021;8(4):67–74. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-67-74.

ВВЕДЕНИЕ

В ряде регионов патологией, занимающей 1-е место по встречаемости и смертности, является немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). Это одно из самых распространенных, неблагоприятно протекающих (основные мишени метастазирования — кости и мозг) и сложно поддающихся лечению онкологических заболеваний. Как и в случае многих других злокачественных новообразований, к основным проблемам НМРЛ относятся ранняя диагностика и эффективное прогнозирование течения заболевания. Многие пациенты умирают в течение 1 года после постановки диагноза, поскольку в большинстве случаев НМРЛ является уже на поздних стадиях.

В процессе развития заболевания низкие антигенность и гетерогенность опухоли приводят к пассивному избавлению от противоопухолевой иммунной защиты. Известно, что злокачественность первичной опухоли, с одной стороны, обеспечивают опухолевые клетки, а с другой — клетки опухолевой стромы. К основным клеточным популяциям, составляющим опухолевое микроокружение, относятся эндотелиальные

и иммунные клетки [1], которые производят различные типы цитокинов и ростовых факторов, влияющих и/или определяющих развитие опухоли. В свою очередь, опухоль также может активно привлекать иммунокомпетентные клетки путем секреции различных хемокинов и цитокинов.

Одним из основных цитокинов, оказывающих влияние на развитие и прогрессию опухоли, является фактор некроза опухоли α (TNF- α). К особенностям данной молекулы относится способность к экспрессии как различными типами иммунных клеток (Т-клеток, В-клеток, макрофагов и НК-клеток (natural killer cell)), так и непосредственно опухолевыми клетками. Несмотря на то, что данный цитокин был описан почти 50 лет назад, анализ его дифференциальной экспрессии в отношении НМРЛ не проводился. Инфильтрация опухоли CD20+-В-клетками является благоприятным прогностическим фактором для изучаемой патологии [2], однако его прогностическая значимость остается противоречивой. Прогностическая значимость CD31 (а для некоторых нозологий и Ki-67) на сегодняшний день также неоднозначна.

Цель исследования — анализ экспрессии Ki-67, TNF- α , CD20 и CD31 и оценка их прогностической и клинической значимости в опухолях НМРЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены образцы тканей 100 пациентов с НМРЛ, которым в Научно-исследовательском институте клинической онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» была выполнена резекция опухоли легкого. Все процедуры, выполненные в ходе исследования, соответствовали стандартам этического комитета организации и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Образцы представлены 2 основными гистологическими типами: аденокарциномой и плоскоклеточным раком легкого (больные с мелкоклеточным раком легкого, саркомой и карциноидными новообразованиями были исключены). Для 80 пациентов были собраны данные по выживаемости. Среднее время наблюдения составило 39,0 мес. Весь материал прошел гистологическую верификацию в отделе патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» и был оценен в соответствии с классификацией Tumors, Nodus and Metastasis (TNM) 8-го пересмотра. Детальное описание выборки представлено в табл. 1.

Иммуногистохимия. Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) выполнено по стандартной методике на срезах опухолевой ткани. Для демаскировки антигена использовали Tris-EDTA буфер pH 9.0 («Прайм-БиоМед», Москва). Первичные антитела к Ki-67 (клон GM010; «ПраймБиоМед», Москва), CD20 (клон RBM-12F1; «ПраймБиоМед», Москва), CD31 (клон GM006; «ПраймБиоМед», Москва) и TNF- α (клон M1-C4, Sigma, USA) инкубировали в течение 30 мин. Использовали систему детекции UltraVision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo Fisher Scientific, USA) согласно инструкциям производителя.

Полученные препараты оценивали с помощью микроскопа Olympus BX53 ($\times 400$). Результаты анализа общей экспрессии TNF- α , CD31 и CD20 в строме опухоли и Ki-67 в опухолевых клетках выражали в баллах с учетом количества антигенпозитивных клеток (0 баллов — $<1\%$; 1 балл — $<25\%$; 2 балла — $25\text{--}50\%$; 3 балла — $>50\%$). Для дальнейшего анализа формировали группы с низкой (0—1 балл) и высокой (2—3 балла) экспрессией.

Во всех исследованных образцах в опухолевых клетках наблюдалась экспрессия TNF- α , поэтому количественный анализ положительно окрашенных клеток провести не представлялось возможным. Для анализа экспрессии TNF- α в опухолевых клетках оценивали интенсивность окрашивания по шкале от 1 (слабое окрашивание) до 2 (сильное окрашивание) баллов. Примеры окрашивания представлены на рис. 1.

Таблица 1. Клинико-морфологические характеристики пациентов с немелкоклеточным раком легкого

Table 1. Clinical and morphological characteristics of patients with non-small cell lung cancer

Показатель Parameter	Число случаев, абс. (%) Number of cases, abs. (%)
Гистология: Histology:	
аденокарцинома adenocarcinoma	51 (51)
плоскоклеточный рак squamous cell cancer	49 (49)
Стадия Stage	
I–II	49 (49)
III–IV	51 (51)
Локализация: Localization:	
центральная central	61 (61)
периферическая peripheral	39 (39)
Размер опухоли: Tumor size:	
T1–2	55 (55)
T3–4	45 (45)
Наличие регионарных метастазов Nodal status	
N0	35 (35)
N+	65 (65)
Степень дифференцировки Grade	
G1–2	60 (60)
G3	40 (40)

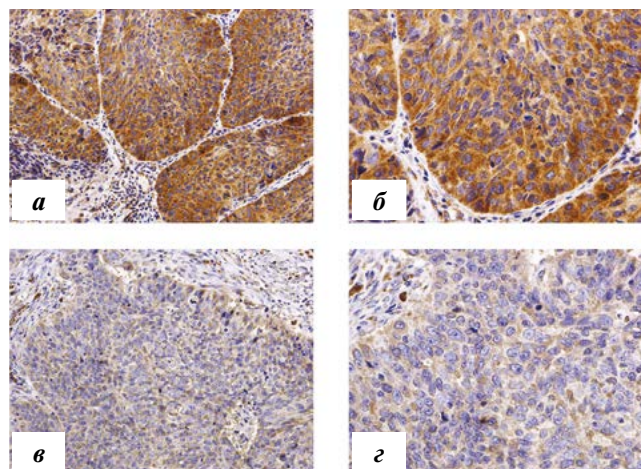
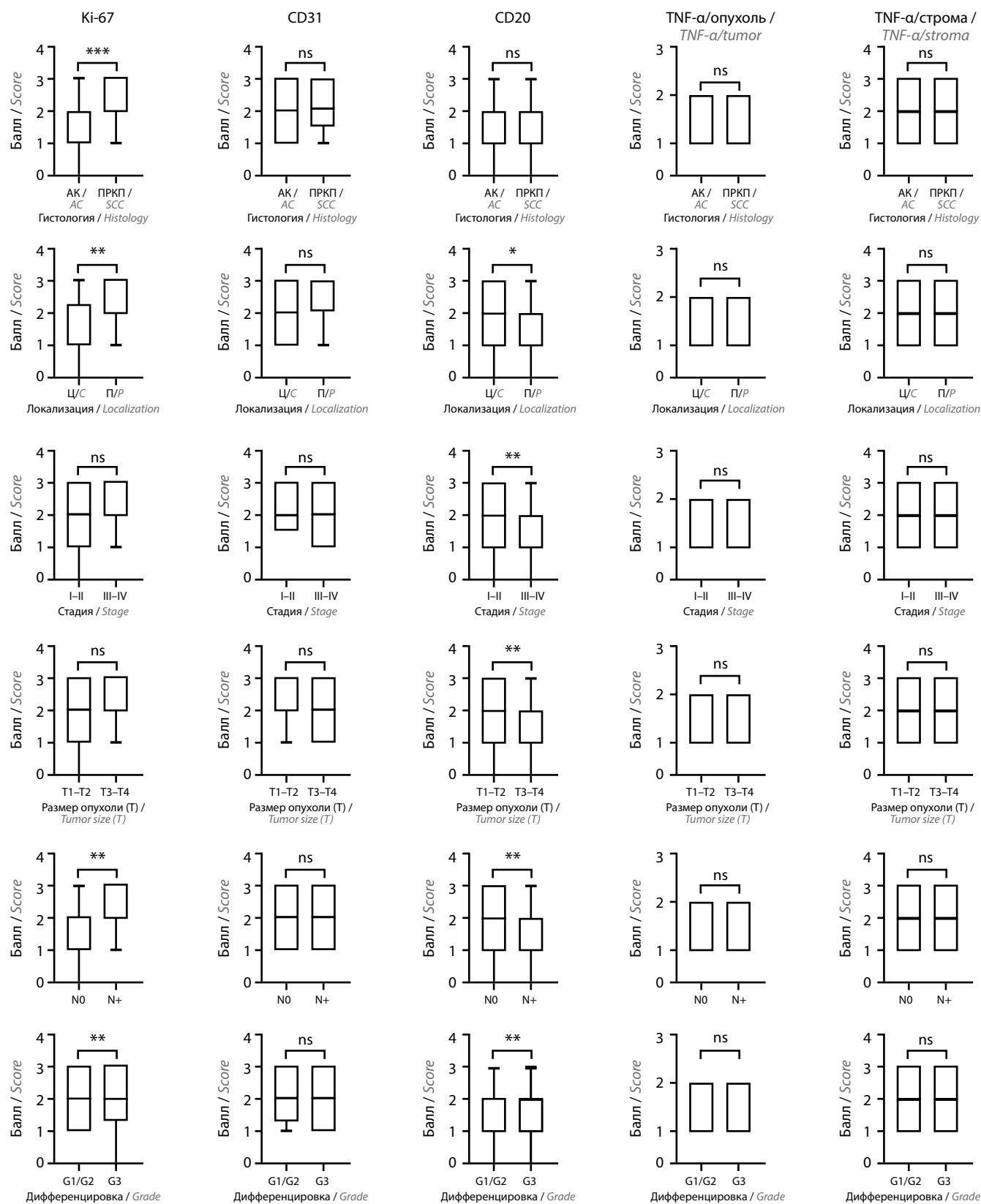


Рис. 1. Экспрессия фактора некроза опухоли α различной интенсивности в ткани немелкоклеточного рака легкого (иммуногистохимическое окрашивание с антителами к фактору некроза опухоли α): а — выраженная цитоплазматическая и мембранная экспрессия, $\times 20$; б — выраженная цитоплазматическая и мембранная экспрессия, $\times 40$; в — слабая цитоплазматическая и мембранная экспрессия, $\times 20$; г — слабая цитоплазматическая и мембранная экспрессия, $\times 40$

Fig. 1. Expression of tumor necrosis factor α of varying intensity in non-small cell lung cancer tissue (immunohistochemical staining with antibodies against tumor necrosis factor α): а — pronounced cytoplasmic and membrane expression, $\times 20$; б — pronounced cytoplasmic and membrane expression, $\times 40$; в — weak cytoplasmic and membrane expression, $\times 20$; г — weak cytoplasmic and membrane expression, $\times 40$



* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$, ns – статистически незначимо / * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$, ns – not statistically significant

Рис. 2. Анализ ассоциации экспрессии Ki-67, фактора некроза опухоли α , CD20 и CD31 в образцах немелкоклеточного рака легкого и клинико-морфологических характеристик. N0/N+ – отсутствие/наличие регионарных метастазов; TNF- α – фактор некроза опухоли α ; АК – аденокарцинома; ПРКЛ – плоскоклеточный рак легкого; Ц – центральное расположение; П – периферическое расположение

Fig. 2. Analysis of the association of Ki-67, tumor necrosis factor α , CD20 and CD31 expression in non-small cell lung cancer samples and clinical and morphological characteristics. N0/N+ – nodal status; TNF- α – tumor necrosis factor α ; AC – adenocarcinoma; SCC – squamous cell lung cancer; C – central localization; P – peripheral localization

Статистический анализ. Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программы GraphPad Prizm v. 9. При сравнении показателей и оценке их взаимосвязей применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Анализ выживаемости проводили путем построения кривых дожития по методу Каплана–Майера. Сравнение достоверности различий выполняли при помощи логарифмического рангового критерия. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия Ki-67, CD20, CD31 и TNF- α в опухолях легкого. Мы провели анализ экспрессии Ki-67, CD20, CD31 и TNF- α в опухолях НМРЛ. Экспрессия Ki-67 обнаруживалась в опухолевых клетках в 99 % исследованных образцов и не наблюдалась в клетках стромы. Также мы показали, что при НМРЛ TNF- α экспрессируется как в стромальных, так и в опухолевых клетках (рис. 1). В опухолевых клетках экспрессия TNF- α обнаруживалась в 100 % образцов. В стромальных клетках TNF- α экспрессировался также во всех исследованных случаях. CD31+-клетки были обнаружены в различном количестве во всех исследованных образцах. CD20+-В-клетки присутствовали в строме опухолей легкого в 95 % случаев.

Далее мы провели анализ ассоциации экспрессии исследуемых маркеров с клинико-морфологическими характеристиками. Результаты представлены на рис. 2.

Согласно представленным результатам для экспрессии TNF- α в опухолевых клетках и строме опухоли не наблюдалось ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками. Экспрессия CD20 в строме опухоли ассоциирована с локализацией опухоли ($p = 0,0435$), со стадией заболевания ($p = 0,0044$), размером опухоли ($p = 0,0017$) и наличием регионарных метастазов ($p = 0,0071$). На более ранних стадиях при меньшем размере опухоли и отсутствии метастазов в лимфатических узлах наблюдалось более высокое содержание CD20+-В-клеток в опухолевой строме. Для Ki-67 характерна сильная ассоциация с гистологическим типом опухоли ($p < 0,0001$), ее локализацией ($p = 0,0012$) и наличием регионарных метастазов ($p = 0,0020$).

Прогностическая значимость Ki-67, CD20, CD31 и TNF- α в опухолях легкого. Для определения прогностической значимости экспрессии Ki-67, CD20, CD31 и TNF- α в опухолях легкого для пациентов с НМРЛ мы проанализировали выживаемость путем построения кривых дожития по методу Каплана–Майера и сравнили достоверность различий при помощи логарифмического рангового критерия. Результаты представлены на рис. 3.

Согласно данным, представленным на рис. 3, экспрессия TNF- α в клетках опухолевой стромы является благоприятным прогностическим фактором НМРЛ. В отношении Ki-67 и TNF- α в опухолевых клетках и CD20 в строме прогностической значимости не наблюдается. Высокая экспрессия CD31 в строме опухоли легкого

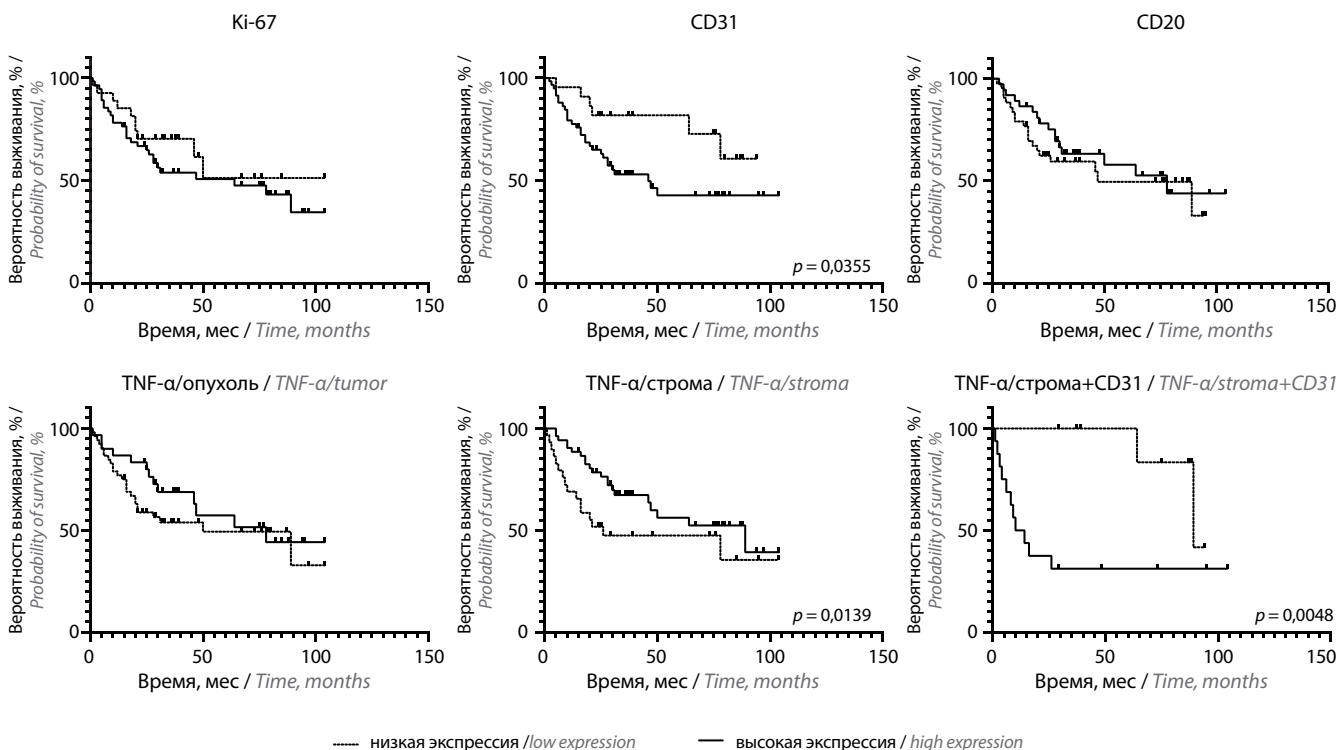


Рис. 3. Прогностическая значимость Ki-67, фактора некроза опухоли α , CD20 и CD31 при немелкоклеточном раке легкого
Fig. 3. Prognostic significance of Ki-67, tumor necrosis factor α , CD20 and CD31 in non-small cell lung cancer

Таблица 2. Статистический анализ прогностической значимости Ki-67, фактора некроза опухоли α , CD20 и CD31Table 2. Statistical analysis of prognostic significance Ki-67, tumor necrosis factor α , CD20 and CD31

Показатель Parameter	Однофакторный анализ Univariate analysis		
	Отношение рисков Hazard ratio	95 % доверительный интервал 95 % confidence interval	<i>p</i>
Ki-67 (высокая экспрессия/низкая экспрессия) Ki-67 (high expression/low expression)	1,400	(0,713–2,748)	0,3238
CD31 (высокая экспрессия/низкая экспрессия) CD31 (high expression/low expression)	2,335	(1,151–4,734)	0,0355*
CD20 (высокая экспрессия/низкая экспрессия) CD20 (high expression/low expression)	0,791	(0,411–1,520)	0,3020
TNF- α /опухоль (высокая экспрессия/низкая экспрессия) TNF- α tumor (high expression/low expression)	0,723	(0,378–1,393)	0,1752
TNF- α /строма (высокая экспрессия/низкая экспрессия) TNF- α /stroma (high expression/low expression)	0,555	(0,274–1,123)	0,0139*
TNF- α /строма+CD31 (высокая экспрессия/низкая экспрессия) TNF- α /stroma+CD31 (high expression/low expression)	0,197	(0,066–0,583)	0,0048*

*Статистически значимо.

Примечание. TNF- α — фактор некроза опухоли α .

*Statistically significant.

Note. TNF- α — tumor necrosis factor α .

является фактором неблагоприятного прогноза. Статистический анализ прогностической значимости исследованных маркеров представлен в табл. 2.

Таким образом, высокое содержание CD31+-клеток в опухолевой строме является неблагоприятным прогностическим фактором, в то время как экспрессия TNF- α в этих клетках служит показателем хорошего прогноза НМРЛ. Затем мы провели анализ прогностической значимости комбинации 2 выявленных маркеров. Оказалось, что их сочетание TNF- α /строма (высокий)+CD31 (низкий) является намного более значимым прогностическим фактором, чем каждый из этих маркеров в отдельности.

ОБСУЖДЕНИЕ

Злокачественность первичной опухоли может быть обусловлена большим количеством факторов. С одной стороны, на прогрессию заболевания влияют определенные особенности непосредственно опухолевых клеток (такие как повышенная способность к пролиферации, отсутствие контактного торможения и др.). С другой стороны, сильное влияние на распространение опухолевого процесса оказывает микроокружение опухоли. Так, повышенное содержание эндотелиальных клеток способствует неоангиогенезу, иммуносупрессорных клеток — уходу от иммунологического надзора, макрофагов, ассоциированных с опухолью, — подавлению нормальной воспалительной реакции. В данном исследовании проведен анализ прогностической зна-

чимости как маркеров опухолевых клеток (Ki-67, TNF- α), так и некоторых маркеров стромальных клеток (CD20, CD31 и TNF- α).

Ki-67 экспрессируется в пролиферирующих клетках и традиционно используется в клинической практике для оценки пролиферативной активности клеток опухолей различных нозологий. Несмотря на, казалось бы, очевидную связь экспрессии данного белка с неблагоприятным прогнозом, его прогностическая значимость продолжает оставаться предметом дискуссий. Немелкоклеточному раку легких посвящено несколько исследований. В некоторых из них продемонстрирована ассоциация его экспрессии с прогнозом, в то время как в других такой закономерности не обнаружено. Возможно, это связано с отсутствием стандартного порога оценки, и исследователи используют различные критерии для формирования групп сравнения с низкой и высокой экспрессией [3]. Наше исследование показало, что экспрессия Ki-67 в опухолевых клетках НМРЛ достоверно ассоциирована с гистологическим типом опухоли и наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах. Более высокое содержание Ki-67+-клеток встречается при плоскоклеточном варианте опухолей и наличии регионарных метастазов. Однако анализ выживаемости не выявил прогностической значимости Ki-67 в опухолях НМРЛ как в целом, так и по каждой гистологической группе (данные не представлены), что согласуется с некоторыми опубликованными данными [4].

Еще одной основополагающей особенностью процесса канцерогенеза является способность клеток опухоли и ее микроокружения к модулированию процесса ангиогенеза. CD31 (PECAM-1) — трансмембранный гликопротеин, являющийся маркером эндотелиальных клеток и участвующий в миграции лейкоцитов в воспалительный очаг (осуществляющий регуляцию проницаемости и целостности капилляров) [5]. Его экспрессия наблюдается во многих видах опухолей, таких как гепатоцеллюлярная карцинома [6, 7], рак почки [8], легкого [9], колоректальный рак [10], рак яичников [11] и др. Мы показали, что содержание CD31⁺-клеток в опухоли не ассоциировано с клинико-морфологическими характеристиками, однако является неблагоприятным прогностическим фактором НМРЛ. Полученные данные согласуются с тем, что повышенная васкуляризация опухоли часто свидетельствует о ее прогрессировании и плохом прогнозе заболевания. Для некоторых других типов опухолей, например для колоректального рака, показано, что экспрессия CD31 коррелирует с низким показателем выживаемости [10]. Эти данные согласуются с результатами другого исследования [12]. Однако также имеются сведения об отсутствии прогностической значимости CD31 на примере рака яичников [11]. Кроме того, исследования показывают, что высокий уровень CD31 в опухоли коррелирует с большим ее размером [10, 13], высокими показателями злокачественности [10, 14] и более поздней стадией заболевания [10]. Неоднозначные данные имеются по поводу связи экспрессии CD31 и метастатического статуса опухолей (наличие метастазов в регионарные лимфатические узлы [13] или отдаленных метастазов при отсутствии регионарных метастазов [10]). Однако согласно результатам ряда исследований высокий уровень экспрессии CD31 в образцах рака почки коррелирует с лучшими показателями общей выживаемости [8].

Известно, что риск развития онкологических заболеваний часто ассоциирован с хроническим воспалением [15–17]. Одним из первых цитокинов, описанных как важнейший воспалительный медиатор опухолевых клеток, является TNF- α — ключевой хемокин воспаления, участвующий в активации клеточной пролиферации, дифференцировке и апоптозе. Основными источниками этого цитокина являются макрофаги и Т-клетки, а также NK-клетки и нейтрофилы. Связывание TNF- α с рецепторами приводит либо к индукции апоптоза, опосредованного активацией каспаз, либо к развитию воспаления, обусловленного запуском антиапоптотических путей и повышением экспрессии провоспалительных цитокинов, основными драйверами которых становятся активированные NF- κ B, AP-1 и MAP-киназный каскад. Такие полярные биологические эффекты TNF- α опосредуют его противоречивое значение в канцерогенезе.

Также необходимо отметить, что многие опухолевые клетки сами начинают экспрессировать TNF- α . Его экспрессия описана для рака яичников, молочной железы,

эндометрия, желудка, поджелудочной железы, печени, предстательной железы, мочевого пузыря, колоректального рака и др. [18]. При оценке экспрессии данного белка необходимо учитывать тип клеток, которые его производят. Мы провели анализ экспрессии TNF- α в образцах НМРЛ и показали, что во всех исследованных случаях его экспрессию можно было обнаружить в опухолевых клетках. Помимо этого, его экспрессия была выявлена в строме всех исследованных опухолей. Мы оценили ассоциацию экспрессии TNF- α с клинико-морфологическими параметрами и его прогностическую значимость. Ни для стромальной, ни для опухолевой экспрессии TNF- α ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками опухоли выявлено не было. При оценке прогностической значимости оказалось, что экспрессия данного белка в опухолевых клетках не является прогностически значимой. Однако анализ экспрессии TNF- α в стромальных клетках показал, что он может быть маркером благоприятного прогноза при НМРЛ. Опубликовано крайне мало исследований, посвященных данной проблеме. Поиск прогностически значимых молекул для НМРЛ продолжает оставаться актуальной научной задачей.

Поскольку одной из клеточных популяций, продуцирующих TNF- α , являются В-клетки, на следующем этапе исследования мы оценили прогностическую значимость их количества в опухолевой строме. Было выявлено, что для экспрессии CD20 в строме опухоли наблюдалась ассоциация с локализацией опухоли ($p = 0,0435$), ее размером ($p = 0,0017$), стадией заболевания ($p = 0,0044$) и наличием регионарных метастазов ($p = 0,0071$). На более ранних стадиях при меньшем объеме опухоли и отсутствии метастазов в лимфатических узлах обнаружено более высокое содержание CD20⁺-В-клеток в опухолевой строме. Это свидетельствует о том, что содержание В-клеток ассоциировано с более благоприятными клиническими характеристиками. Однако при оценке прогностической значимости оказалось, что содержание В-клеток в опухолевой строме не коррелирует с прогнозом заболевания.

На последнем этапе работы мы провели комплексный анализ прогностической значимости стромальной экспрессии TNF- α и CD31, так как именно эти маркеры по отдельности продемонстрировали прогностическую значимость. Оказалось, что их сочетание, а именно высокое содержание TNF- α ⁺-клеток в строме опухоли и низкое содержание CD31⁺-клеток является намного более значимым прогностическим фактором (отношение рисков 0,1966), чем данные маркеры по отдельности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что для более точной оценки прогноза заболевания необходимо учитывать комплекс маркеров, индивидуально подобранный под определенный тип опухоли. Именно такие анализы в перспективе могут быть мощным инструментом в арсенале клинических онкологов.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Li H., Fan X., Houghton J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem* 2007;101(4):805–15. DOI: 10.1002/jcb.21159.
- Al-Shibli K.I., Donnem T., Al-Saad S. et al. Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(16):5220–7. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0133.
- Jakobsen J.N., Sorensen J.B. Clinical impact of Ki-67 labeling index in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2013;79(1):1–7. DOI: 10.1016/j.lungcan.2012.10.008.
- Yoo J., Jung J.H., Lee M.A. et al. Immunohistochemical analysis of non-small cell lung cancer: correlation with clinical parameters and prognosis. *Journal of Korean medical science* 2007;22(2):318–25. DOI: 10.3346/jkms.2007.22.2.318.
- Lertkietmongkol P., Liao D., Mei H. et al. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol* 2016;23(3):253–9. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000239.
- Qian H., Yang L., Zhao W. et al. A comparison of CD105 and CD31 expression in tumor vessels of hepatocellular carcinoma by tissue microarray and flow cytometry. *Exp Ther Med* 2018;16(4):2881–8. DOI: 10.3892/etm.2018.6553.
- Bosmuller H., Pfefferle V., Bittar Z. et al. Microvessel density and angiogenesis in primary hepatic malignancies: differential expression of CD31 and VEGFR-2 in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Pathol Res Pract* 2018;214(8):1136–41. DOI: 10.1016/j.prp.2018.06.011.
- Virman J., Bono P., Luukkaala T. et al. VEGFR3 and CD31 as prognostic factors in renal cell cancer. *Anticancer Res* 2015;35(2):921–7.
- Emmert A.O., Oellerich A., Füzesi L. et al. Waldmann-Beushausen R. et al. Prognostic significance of CD31 Expression in patients with non-small-cell-lung cancer. *Advances Lung Cancer* 2016;5(3):21–9. DOI: 10.4236/alc.2016.53003.
- Mohamed S.Y., Mohammed H.L., Ibrahim H.M. et al. Role of VEGF, CD105, and CD31 in the prognosis of colorectal cancer cases. *J Gastrointest Cancer* 2019;50(1):23–34. DOI: 10.1007/s12029-017-0014-y.
- Rask L., Hogdall C.K., Kjaer S.K. et al. Association of CD31 and p53 with survival of ovarian cancer patients. *Anticancer Res* 2019;39(2):567–76. DOI: 10.21873/anticancer.13149.
- Gulubova M., Vlaykova T. Prognostic significance of mast cell number and microvascular density for the survival of patients with primary colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24(7):1265–75. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2007.05009.x.
- Saad R.S., Liu Y.L., Nathan G. et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2004;17(2):197–203. DOI: 10.1038/modpathol.3800034.
- Cammarota R., Bertolini V., Pennesi G. et al. The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker. *J Transl Med* 2010;8:112. DOI: 10.1186/1479-5876-8-112.
- Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420(6917):860–7. DOI: 10.1038/nature01322.
- Furman D., Campisi J., Verdin E. et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med* 2019;25(12):1822–32. DOI: 10.1038/s41591-019-0675-0.
- Taniguchi K., Karin M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol* 2018;18(5):309–24. DOI: 10.1038/nri.2017.142.
- Mercogliano M.F., Bruni S., Elizalde P.V., Schillaci R. Tumor necrosis factor alpha blockade: an opportunity to tackle breast cancer. *Front Oncol* 2020;10:584. DOI: 10.3389/fonc.2020.00584.

Вклад авторов

О.В. Ковалева: анализ литературных данных, статистическая обработка данных, написание текста статьи;
 М.А. Рашидова, П.А. Подлесная, Д.В. Самойлова: получение экспериментальных данных;
 В.В. Мочальникова: сбор материала для исследования, получение экспериментальных данных;
 А.Н. Грачев: разработка концепции исследования, написание текста статьи.

Authors' contributions

O.V. Kovaleva: analysis of literary data, statistical data processing, article writing;
 M.A. Rashidova, P.A. Podlesnaya, D.V. Samoilova: obtaining experimental data;
 V.V. Mochalnikova: collecting material for research, obtaining experimental data;
 A.N. Gratchev: development of the research concept, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

О.В. Ковалева / O.V. Kovaleva: <https://orcid.org/0000-0001-6132-9924>
 М.А. Рашидова / M.A. Rashidova: <https://orcid.org/0000-0002-3267-4232>
 Д.В. Самойлова / D.V. Samoilova: <https://orcid.org/0000-0001-5639-0835>
 П.А. Подлесная / P.A. Podlesnaya: <https://orcid.org/0000-0003-2312-5546>
 В.В. Мочальникова / V.V. Mochalnikova: <https://orcid.org/0000-0001-5275-7134>
 А.Н. Грачев / A.N. Gratchev: <https://orcid.org/0000-0003-2137-1866>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interests.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-09069).

Financing. The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 18-29-09069).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 26.08.2021. Принята к публикации: 16.11.2021.

Article submitted: 26.08.2021. Accepted for publication: 16.11.2021.