

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ДЕСМОКОЛЛИНОВ В ОПУХОЛИ ЛЕГКОГО БОЛЬНЫХ, ПОЛУЧАВШИХ ЛУЧЕВУЮ ТЕРАПИЮ

Статешный О.Н., Златник Е.Ю., Ульянова Е.П., Харагезов Д.А., Айрапетова Т.Г., Лейман И.А., Милакин А.Г., Гаппоева М.А., Витковская В.Н.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: elena-zlatnik@mail.ru

В качестве одного из факторов, ограничивающих распространение опухоли, рассматривается экспрессия десмоколлин – белков адгезии, препятствующих миграции ее клеток. В работе описано ИГХ-исследование экспрессии десмоколлин DSC1 и DSC3, а также мутантного p53 в биоптатах немелкоклеточного рака легкого различных гистологических вариантов 96 неоперабельных больных. У больных плоскоклеточным раком легкого проведено сравнение экспрессии десмоколлин в зависимости от выживаемости. Установлено, что экспрессия DSC3 выше в плоскоклеточном раке, чем в аденокарциноме ($p=0,039$). Стратификация больных по выживаемости показала, что до 3 и более лет дожили больные плоскоклеточным раком со статистически значимо более высокой экспрессией, чем дожившие до 2 лет после лечения ($p=0,011$), тогда как различий по экспрессии DSC1 не выявлено, хотя частота встречаемости положительной экспрессии DSC1 у больных с наиболее высокой выживаемостью была выше. Оценка экспрессии мутантного p53 не выявила различий в зависимости от продолжительности жизни больных. Расчет коэффициента DSC3/p53 оказался наиболее прогностически информативным: он был максимальным в опухолях больных с выживаемостью 2–3 года и выше по сравнению с теми, у кого летальный исход наступил в течение до 1 года и до 2 лет после постановки диагноза. Таким образом, при плоскоклеточном раке легкого у неоперабельных больных, подвергавшихся химиолучевому лечению, высокие значения DSC3/p53 (Me 2,1; Q1-Q3 1,98–5,0) говорят о преобладании в опухоли антионкогенных факторов над проонкогенными и могут быть расценены как фактор благоприятного прогноза.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак легкого, аденокарцинома легкого, иммуногистохимическое исследование, десмоколлины, выживаемость.

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF DESMOCOLLINS` EXPRESSION IN LUNG CARCINOMA OF INOPERABLE PATIENTS

Statshny O.N., Zlatnik E.Y., Ulianova E.P., Kharagezov D.A., Ayrapetova T.G., Leyman I.A., Milakin A.G., Gappoeva M.A., Vitkovskaya V.N.

National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation, e-mail: elena-zlatnik@mail.ru

Early diagnostics, prediction and treatment of lung cancer remains one of the most important problems of modern oncology. Expression of desmocollins – proteins of adhesion inhibiting tumor cell migration - is considered to be the factor limiting tumor prevalence. We studied the IHC-expression of desmocollines DSC1 and DSC3 as well as mut p53 in samples of NSCC of different histotypes (squamous cell carcinoma and adenocarcinoma) obtained by biopsy in 96 inoperable patients. Comparison of desmocollins` expression in squamous cell carcinoma was also studied in patients with different survival rate. We found that the expression of DSC3 in squamous cell carcinoma exceeded the one in adenocarcinoma ($p=0,039$). Tumors of patients with squamous cell carcinoma surviving to 3 years and more demonstrated higher DSC3 expression than of those who survived to 2 years after diagnosis ($p=0,011$), while no difference was noted in the levels of DSC1 expression though its incidence was higher in long-term surviving patients. Mut p53 expression in patients with different survival rate was similar. Calculation of DSC3/p53 ratio was more informative for prognosis: it was maximal in tumors of patients surviving to 2–3 years and more compared to those with fatal outcome during 1 or 2 years after diagnosis. Thus in lung squamous cell carcinoma of inoperable patients subjected to chemo- and radiotherapy high values of DSC3/p53 (Me 2,1; Q1-Q3 1,98–5,0) indicating the prevalence of antitumorogenic factors over prooncogenic ones could be regarded as a factor of favorable prognosis.

Keywords: squamous cell lung carcinoma, lung adenocarcinoma, immunohistochemistry, desmocollins, survival rate.

Рак легких продолжает оставаться основной причиной смертности от онкологических заболеваний как в России, так и в мире, вызывая наибольшее количество летальных исходов.

В России за 2020 год зарегистрировано 54 375 новых случаев заболевания, а во всем мире от рака легких ежегодно умирают более 1,1 млн человек [1]. Немелкоклеточный рак легких (НМРЛ) выявляется в 85% случаев злокачественных опухолей легких [2], при этом около 40% случаев НМРЛ диагностируются в IV стадии и 25% – в III стадии. Химиолучевая терапия назначается в связи с нерезектабельностью опухоли или неоперабельностью больных. Прогноз ее эффективности, оцениваемый по общей и бессобытийной выживаемости больных, зависит прежде всего от стадии. Однако в последние годы все больше внимания уделяется гетерогенности опухоли, ее генетическим и эпигенетическим особенностям, экспрессии различных рецепторов – потенциальных мишеней для таргетных препаратов и ингибиторов контрольных точек [3]. Такие характеристики опухоли, с одной стороны, могут иметь прогностическую значимость, а с другой – позволяют стратифицировать группу больных для применения различных методов лечения, которые способны наиболее полно проявить свою эффективность [4]. Гетерогенность НМРЛ связана, прежде всего, с гистогенезом, на основании которого выделяют плоскоклеточный рак (ПКР) и аденокарциному (АК) с помощью ИГХ-панели TTF1 и p40 или p63, дополненной при необходимости CK5/6, papsin или CK7. ИГХ-исследование, FISH и молекулярно-генетические методы позволяют проводить оценку биомаркеров, связь которых с прогнозом заболевания известна (ALK, c-MET, ROS, EGFR, RAS, BRAF, RET). Кроме того, изучаются возможности использования ряда биомаркеров с прогностической целью, а также в качестве мишеней для новых таргетных препаратов [5]. Среди них – десмоколлины 1 и 3 (DSC1 и DSC3), являющиеся кальций-зависимыми молекулами адгезии из суперсемейства кадгеринов и компонентами демосом, которые участвуют в формировании цитоскелета и обеспечивают нормальную структуру эпителия. DSC1 и DSC3 экспрессированы в плоском эпителии, их роль в канцерогенезе и опухолевом росте на протяжении ряда лет является предметом различных исследований. Несмотря на структурное сходство с E-кадгерином, роль которого в канцерогенезе описана, значение в нем десмоколлинов исследовано гораздо меньше, а результаты противоречивы. Экспрессия DSC3 при НМРЛ рассматривается как потенциальный фактор благоприятного прогноза, а также как дифференциально-диагностический маркер, помогающий разделить НМРЛ на ПКР и АК [6]. В обзоре, посвященном роли десмоколлинов в канцерогенезе, указано, что эктопическая экспрессия DSC3, внесенная с помощью вектора, подавляет рост и подвижность клеток НМРЛ через инактивацию EGFR/ERK сигнального пути, а также приводится ссылка на то, что DSC1 может быть маркером дифференцировки опухолевых клеток [7]. Другими исследователями не установлено прогностической значимости экспрессии DSC3 при опухолях головы и шеи, хотя эти опухоли в большинстве случаев также плоскоклеточные [8, 9].

Цель исследования – сравнительная оценка экспрессии десмоколлиннов в клетках плоскоклеточного рака легкого неоперабельных больных с разной клинической динамикой.

Материал и методы исследования. Под наблюдением находились 96 больных неоперабельным НМРЛ: 84 (87,5%) мужчин и 12 (12,5%) женщин в возрасте от 49 до 75 лет, в среднем $62,4 \pm 0,68$ года. Проведение исследования было утверждено этической комиссией «НМИЦ онкологии» МЗ России (№ 16 от 12.10.2021 г.). От каждого больного было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании. По гистологическому типу ПКР был идентифицирован у 78 (81,25%), АК у 18 (18,75%) пациентов; степень дифференцировки опухолей была G2-G3. Поскольку пациенты были неоперабельными, по анатомической классификации – центральный рак, преобладание по частоте ПКР по отношению к АК легких было объяснимым. Распределение больных НМРЛ по стадии заболевания было следующим: ПА – 2 (2,1%), ПВ – 14 (14,6%), ША – 51 (53,1%), ШВ – 29 (30,2%), т.е. частота III стадии выше, чем II стадии (83,3% (n=80) против 16,7% (n=16), $p < 0,001$). Такие факторы, как стадия, степень дифференцировки опухолевых клеток, предсказуемо влияли на выживаемость пациентов. Однако прогноз неблагоприятного исхода заболевания может быть обусловлен молекулярным профилем опухоли.

Больные не получали хирургического лечения в связи с нерезектабельностью, неоперабельностью и отказом пациента от хирургического лечения; всем назначали одновременную химиолучевую терапию в дозах 60 Гр в сочетании с препаратами (паклитаксел + карбоплатин, пеметрексед + карболатин) в соответствии со стандартами и клиническими рекомендациями по лечению рака легкого. В дальнейшем больные находились под наблюдением в ФГБУ «НМИЦ онкологии» МЗ РФ; при прогрессировании опухоли получали полихимиотерапию. Летальный исход, связанный с основным заболеванием, наступил среди больных ПКР в течение 1 года у 28 больных, в течение от 1 до 2 лет – у 30 больных, до 3 и более лет дожили 20 больных. Для АК эти показатели составили 6, 5 и 7 (33,3, 27,7 и 38,9% соответственно).

В опухолевых клетках биоптатов, взятых на диагностическом этапе, определяли экспрессию десмоколлиннов 1 и 3, а также мутантного p53. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводили на срезах с парафиновых блоков опухолей. Для ИГХ-исследования применяли протокол, опубликованный ранее [10]. Использовали поликлональные кроличьи антитела к DSC1 (1:50) и DSC3 (1:300) фирмы Invitrogen и к p53 (1:150) фирмы Cell Marque. Для визуализации применяли систему детекции UltraVision Quanto Detection System HRP DAB. Экспрессию маркеров анализировали по процентному содержанию окрашенных опухолевых клеток и по интенсивности окраски: 0; 1+ (слабая); 2+ (умеренная); 3+ (высокая). Экспрессия десмоколлиннов считалась положительной, если количество окрашенных клеток было более

10% и интенсивность окрашивания ≥ 2 . Опухоль считали положительной по экспрессии мутантного белка p53 при окрашивании более 25% ядер опухолевых клеток.

Полученные данные обрабатывали с помощью пакета прикладных программ Statistica 13,0 (StatSoftInc., США). Изучаемые данные проверяли на соответствие нормальному распределению по критерию Шапиро–Уилка. В связи с тем, что первичные данные не подчинялись закону нормального распределения, сравнение групп проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни (U-критерий): рассчитывали медиану (Me), нижний и верхний квартили (Q1-Q3). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Проводили сравнение экспрессии DSC1 и DSC3 между группами больных с различным гистологическим строением опухоли (ПКР, АК), а также между больными ПКР с различной общей выживаемостью (до 1 года, от 1 до 2 лет, от 2 до 3 и более лет).

Установлено, что экспрессия DSC3 при ПКР была статистически значимо выше, чем при АК, в отличие от DSC1, показатели экспрессии которого не различались в опухолях НМРЛ различного гистогенеза (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1

Сравнительная характеристика экспрессии десмоколлинов в опухолях ПКР и АК

Уровень экспрессии, %	Группа больных				p
	Плоскоклеточный рак (n=78)		Аденокарцинома (n=18)		
DSC3	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	*0,039
	40	0–80	30	0–67	
DSC1	10,5	0–30	7	0–25	0,479

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$)

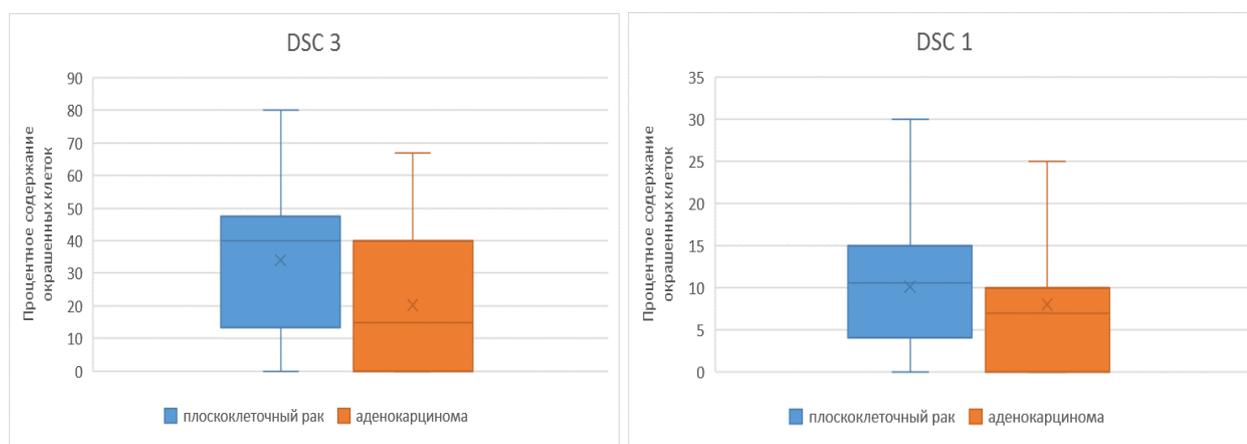


Рис. 1. Экспрессия десмоколлинов в опухолях больных НМРЛ (ПКР и АК)

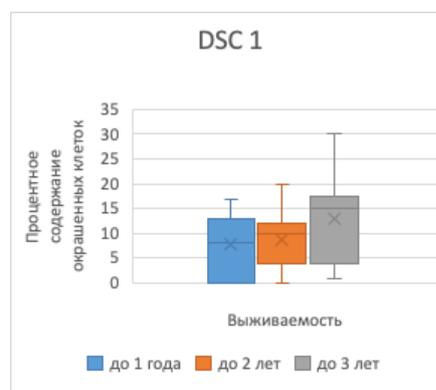
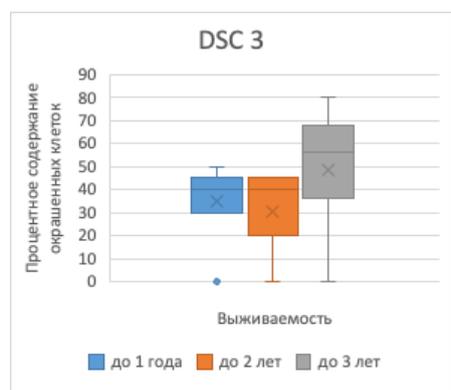
В связи с немногочисленностью больных АК дальнейшие исследования проводили с больными ПКР. В таблице 2 и на рисунке 2 (А, Б) представлена экспрессия десмоколлинов у больных ПКР с различной выживаемостью. Как видно из приведенных данных, индивидуальный разброс показателей во всех сравниваемых группах колебался в широких пределах. У больных, проживших от 2 до 3 и более лет, отмечена максимальная экспрессия DSC3 по сравнению с прожившими 1 и 2 года, в последнем случае различия статистически значимы. Экспрессия маркера DSC3 определялась не у всех больных, а только у 22 (78,6%), проживших до 1 года, у 25 (83,3%), проживших 2 года, и у 18 (90%), проживших 3 и более года (рис. 3).

Таблица 2

Сравнительная характеристика экспрессии десмоколлинов в опухолях ПКР больных с различной выживаемостью

Уровень экспрессии %	Выживаемость						p-value
	До 1 года (I)		От 1 до 2 лет (II)		От 2 до 3 лет (III)		
	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	
DSC3	40	0–50	41,5	0–45	56	0–80	(I-II) = 0,089 (I-III) = 0,115 *(II-III) = 0,011
DSC1	9,5	0–17	10	0–20	15	1–30	(I-II) = 0,368 (I-III) = 0,521 (II-III) = 0,088

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$)



А

Б

Рис. 2. Экспрессия десмоколлинов в опухолях больных ПКР при различной выживаемости
А – DSC3; Б – DSC1

Экспрессия DSC1 также имела широкую индивидуальную вариабельность и регистрировалась не во всех опухолях, однако в опухолях больных ПКР, проживших от 2 до 3

и более лет, она отмечена во всех случаях (100%), у проживших от 1 до 2 лет – в 25 (83%) и у проживших до 1 года – в 15 (53,5%) случаях. Различия по частоте случаев с положительной экспрессией десмоколлингов в опухолях больных ПКР с различной выживаемостью оказались более демонстративными для DSC1, чем для DSC3 (рис. 3).

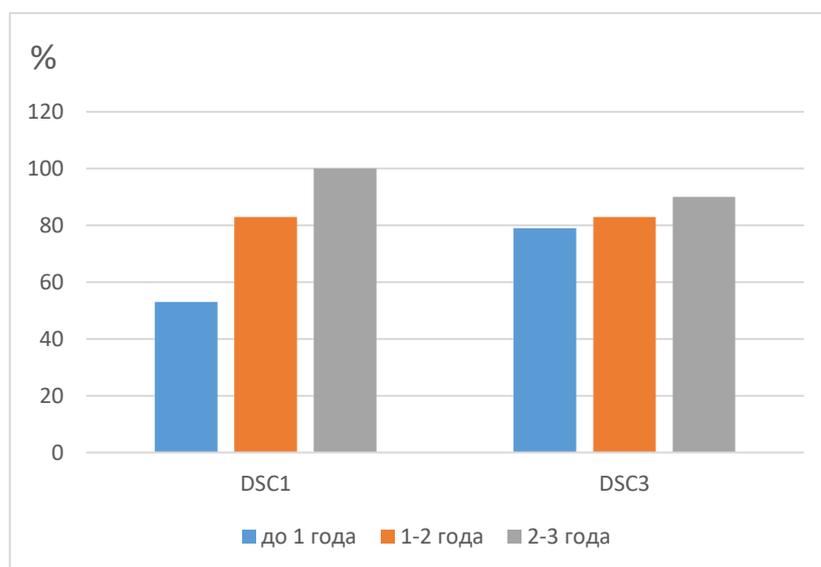


Рис. 3. Частота положительной экспрессии десмоколлингов в опухолях больных ПКР с различной выживаемостью

В таблице 3 и на рисунке 4 представлена экспрессия мутантного p53 в опухолях сравниваемых групп больных ПКР. По этому показателю не выявлено статистически значимых различий в зависимости от их выживаемости.

Таблица 3

Сравнительная характеристика экспрессии p53 в опухолях ПКР больных с различной выживаемостью

Уровень экспрессии %	Выживаемость						p-value
	До 1 года (I)		От 1 до 2 лет (II)		От 2 до 3 лет (III)		
	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	
p53	35	6–60	27	7–70	20	5–60	(I-II) = 0,258 (I-III) = 0,115 (II-III) = 0,894

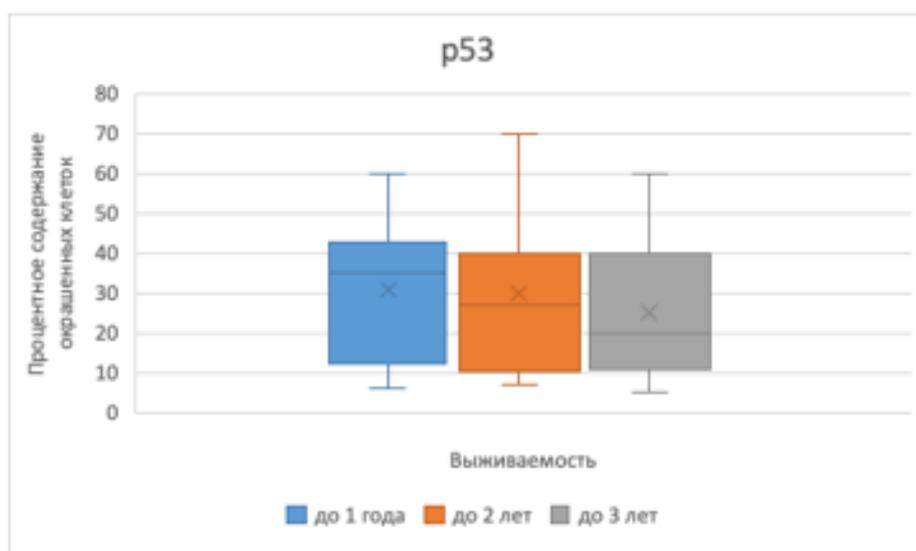


Рис. 4. Экспрессия p53 в опухолях больных ПКР при различной выживаемости

Поскольку в литературе описан синергизм экспрессии гена DSC3 с нормальным p53, мы предположили его антагонистическое действие с мутантным p53 и для характеристики соотношения факторов антиканцерогенной и проканцерогенной активности провели вычисление коэффициента DSC3/p53. Чем выше данный показатель, т.е. чем выше экспрессия антионкогенного фактора, тем лучше должен быть прогноз ПКР. Результаты вычисления коэффициента у больных с различной выживаемостью приведены в таблице 4. Выявлены статистически значимые различия между предлагаемым нами коэффициентом DSC3/p53 в опухолевых клетках больных ПКР с различной выживаемостью: при продолжительности жизни от 2 до 3 лет и более его значения были наивысшими среди сравниваемых групп. Не отмечено статистически значимых различий между показателями больных, проживших до 1 и от 1 до 2 лет.

Таблица 4

Коэффициент DSC3/p53 в опухолях ПКР больных с различной выживаемостью

Уровень экспрессии %	Выживаемость						p-value
	До 1 года (I)		От 1 до 2 лет (II)		От 2 до 3 лет (III)		
	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	
p53	1,0	0,95–1,14	0,81	0,44–1,6	2,1	1,98–5,0	(I-II) = 0,769 *(I-III) = 0,043 *(II-III) = 0,0135

Примечание: * – статистически значимые различия (p<0,05)

При НМРЛ ген DSC3 действует как супрессор опухолевого роста, ингибирующий EGFR/ERK, его онкосупрессорная активность связана с p53, а его потеря ассоциируется с гиперметилированием ДНК [11]. Поскольку экспрессия DSC3 зависит от p53, воздействия, повреждающие ДНК (среди которых и облучение) и способные увеличивать экспрессию p53, могут менять негативную экспрессию DSC3 на позитивную, что расценивается как один из механизмов эффекта лучевой терапии при НМРЛ [12]. В связи с экспрессией в опухолевой ткани преимущественно мутантного p53 реализуется его проонкогенное действие, возможно, опосредованное через угнетение экспрессии DSC3.

У больных ПКР, исследованных нами, проживших от 2 до 3 и более лет, экспрессия DSC3 была наибольшей, хотя статистически значимые отличия выявлены только от показателей больных, проживших от 1 до 2 лет, а отличия от показателей больных с летальным исходом в течение 1 года не были статистически значимы, следовательно, экспрессия DSC3 в качестве отдельного показателя на данной выборке не показала прогностической значимости. Уровень экспрессии мутантного p53 не имел статистически значимых различий между группами больных с различной выживаемостью и, следовательно, не обладал прогностической значимостью при ПКР легкого, в отличие от ряда других опухолей, при которых она выявлена как нами, так и другими авторами [13, 14, 15]. Использование предлагаемого коэффициента DSC3/p53 позволяет установить статистически значимые различия между больными с наиболее высокой выживаемостью и больными, прожившими как до 1 года, так и от 1 до 2 лет. По нашим данным, совместное использование экспрессии DSC3 – антионкогенного фактора и мутантного p53 – антиапоптотического и проонкогенного фактора позволяет уточнить прогноз для неоперабельных больных ПКР, находящихся на химиолучевом лечении.

Выводы

1. В опухолях неоперабельных больных НМРЛ уровень экспрессии DSC3 при ПКР статистически значимо выше, чем при АК.
2. При ПКР легкого у неоперабельных больных высокие значения DSC3/p53 говорят о преобладании в опухоли антионкогенных факторов над проонкогенными и могут быть расценены как потенциальный маркер благоприятного прогноза при химиолучевом лечении.
3. Раздельная оценка экспрессии этих маркеров обладает меньшей прогностической информативностью (DSC3) или не проявляет ее (p53).

Список литературы

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. 252 с.
2. Price A. Emerging developments of chemoradiotherapy in stage III NSCLC // *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2012. Vol. 9, Is. 10. P. 591–598. DOI: 10.1038/nrclinonc.2012.135.
3. Харатегзов Д.А., Лазутин Ю.Н., Златник Е.Ю., Сагакянц А.Б., Мирзоян Э.А., Милакин А.Г., Статешный О.Н., Чубарян А.В., Лейман И.А. Биомаркеры для иммунотерапии немелкоклеточного рака легкого // *Южно-Российский онкологический журнал*. 2021. № 2(3). С.31-41. DOI:10.37748/2686-9039-2021-2-3-4.
4. Faurobert E., Bouin A.P., Albiges-Rizo C. Microenvironment, tumor cell plasticity, and cancer // *Current opinion in oncology*. 2015. Vol. 27, Is. 1. P. 64–70. DOI: 10.1097/CCO.000000000000154.
5. Villalobos P, Wistuba II. Lung Cancer Biomarkers // *Hematology/Oncology Clinics of North America Journal*. 2017. Vol. 31, Is. 1. P. 13-29. DOI: 10.1016/j.hoc.2016.08.006.
6. Bakulesh Kh. Desmocollin-3 and Cancer // *Biomedical Journal Scientific & Technical Research*. 2017. Vol. 1, Is. 5. P. 1511-1514. DOI: 10.26717/BJSTR.2017.01.000473.
7. Zhou G., Yang L., Gray A., Srivastava A.K., Li C., Zhang G., Cui T. The role of desmosomes in carcinogenesis // *Oncology Targets Therapy*. 2017. Vol. 10. P. 4059-4063. DOI: 10.2147/OTT.S136367.
8. Riss D., Pammer J., Grasl M. Kaider A., Schneider S., Erovic B. M.. No evidence for desmocollin 3 to serve as a prognostic marker in primary radiotherapy of head and neck cancer. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2015. Vol. 127, Is. 1-2. P. 24–30. DOI: 10.1007/s00508-014-0618-1.
9. Liu Y.Q., Zou H.Y., Xie J.J., Fang W.K. Paradoxical Roles of Desmosomal Components in Head and Neck Cancer. *Biomolecules*. 2021. Vol. 11, Is. 6. P. 914. DOI: 10.3390/biom11060914.
10. Новикова И.А., Максимова Н.А., Позднякова В.В., Максимова М.И., Ильченко М.Г., Ульянова Е.П., Гранкина А.О. Некоторые иммуногистохимические особенности меланоцитарных образований кожи // *Современные проблемы науки и образования*. 2016. № 5. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25132> (дата обращения: 10.02.2023).
11. Cui T., Chen Y., Yang L., Knösel T., Huber O., Расына-Gengelbach M., Petersen I. The p53 target gene desmocollin 3 acts as a novel tumor suppressor through inhibiting EGFR/ERK pathway in human lung cancer // *Carcinogenesis*. 2012. Vol. 33, Is. 12. P. 2326-2333. DOI: 10.1093/carcin/bgs273.
12. Kavathiya K., Kumar L., Verma A., Soni A. Desmocollin-3 and Cancer // *Acta scientific cancer biology*. 2019. Vol. 3, Is. 9. P. 19-28.

13. Кит О.И., Златник Е.Ю., Базаев А.Л., Демидова А.А., Новикова И.А. Индивидуальный прогностический алгоритм риска прогрессирования рака пищевода после хирургического лечения // Сибирский онкологический журнал. 2020. Т.19, № 5. С. 44-50.
14. Li J.P., Zhang X.M., Zhang Z., Zheng L.H., Jindal S., Liu Y.J. Association of p53 expression with poor prognosis in patients with triple-negative breast invasive ductal carcinoma // *Medicine (Baltimore)*. 2019. Vol. 98, Is. 18. P. e15449. DOI: 10.1097/MD.00000000000015449.
15. Schaafsma E., Takacs E.M., Kaur S., Cheng C., Kurokawa M. Predicting clinical outcomes of cancer patients with a p53 deficiency gene signature // *Scientific reports*. 2022. Vol. 12, Is. 1. P. 1317. DOI: 10.1038/s41598-022-05243-6.