

П.А. Ковальчук  
А.Г. Дедков  
М.С. Кротевиц

Національний інститут раку,  
Київ, Україна

**Ключові слова:** фактори прогнозу, остеосаркома, метастази, імуногістохімічні маркери p53, Pgr, VEGF.

## ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ФАКТОРИ ПРОГНОЗУ РОЗВИТКУ МЕТАСТАЗІВ ОСТЕОСАРКОМИ

**Мета:** визначити прогностичне значення експресії імуногістохімічних маркерів p53, Р-глікопротеїну (Pgr), VEGF при остеосаркомі (ОС). **Об'єкт і методи:** ОС первинна та з метахронними метастазами в легені. Експресію p53, Pgr, VEGF визначали імуногістохімічним методом. Виживаність хворих оцінювали за методом Каплана — Мейєра, достовірність результатів — за t-критерієм Стьюдента. **Результати:** для визначення рівня експресії p53, Pgr, VEGF проведено імуногістохімічний аналіз біопсійного матеріалу 123 хворих на ОС. Виявлено варіабельність експресії VEGF і доведено, що рівень експресії цього маркера не може бути використаний як незалежний прогностичний чинник при ОС. Встановлено прогностичну значущість p53, Pgr при ОС. Виявлено пряму кореляційну залежність між експресією p53 і Pgr та розвитком метастазів ОС у легенях. **Висновки:** молекулярно-біологічне дослідження p53 та Pgr дає можливість визначити групу сприятливого прогнозу у пацієнтів з ОС.

### ВСТУП

Сучасні онкологічні дослідження тісно пов'язані з вивченням біологічних особливостей злоякісних пухлин будь-якої локалізації та нозологічної форми [1, 2]. Молекулярно-біологічне дослідження пухлинної тканини дає можливість виявити фактори її агресивної поведінки, що може слугувати підставою для індивідуалізації лікувальних заходів.

Для полірезистентних пухлинних клітин характерне виведення цитостатиків із клітини в міжклітинне середовище, механізм якого забезпечує Р-глікопротеїн (Pgr) — білок плазматичної мембрани. Дослідження експресії Pgr у хворих на остеосаркому (ОС) розпочали в 90-х роках минулого століття [3], і дотепер залишаються протиріччя стосовно його прогностичного значення.

У процесі метастазування та ранньої генералізації пухлинного процесу важливу роль відіграє активізація неоангіогенезу. Ендотеліальні клітини судинної сітки внаслідок активної проліферації мігрують в зону локального розвитку пухлини. Чільне місце в цьому процесі належить фактору росту ендотелію судин (vascular endothelial growth factor — VEGF), який зв'язується з ендотеліальними клітинами та стимулює їх проліферацію [4].

Білок p53, відомий як пухлинний супресор, відіграє важливу роль у канцерогенезі людини. Частота мутацій p53 при ОС коливається в межах 15–42% залежно від методу їх виявлення [5].

Визначення вищезгаданих прогностичних факторів дає можливість сформулювати групу сприятливого прогнозу та розширити показання до хірургічного лікування пацієнтів з метастазами ОС в легенях [6].

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженні опрацьовано гістологічні матеріали та вивчено результати лікування 123 хворих, які

проходили курс комбінованого лікування в Національному інституті раку з 2000 до 2016 р. з приводу ОС кісток із морфологічно підтвердженим діагнозом. У 73 хворих зі 123 (основна група) під час диспансерного спостереження після закінчення основного лікування виявлено рецидив захворювання у вигляді появи метастазів у легенях. У 50 пацієнтів (контрольна група) під час всього періоду спостереження не відмічено рецидиву захворювання. Середній вік пацієнтів становив 18,5 року (6–60 років). Середній термін спостереження — 49,1 міс (2–216 міс). Середній термін виявлення метастазів — 23,4 міс (6–42 міс).

Усі хворі з первинною ОС пройшли лікування згідно з локальним протоколом: передопераційна хіміотерапія, хірургічне лікування в обсязі радикальної резекції ураженого сегмента кістки та заміщення дефекту ендопротезом та ад'ювантна хіміотерапія із застосуванням трьох- або чотирьохкомпонентної схеми (цисплатин 120 мг/м<sup>2</sup>, доксорубіцин 60–70 мг/м<sup>2</sup>, метотрексат 12 г/м<sup>2</sup>, іфосфамід 8 г/м<sup>2</sup>).

Пацієнтам з рецидивом захворювання хіміотерапію 2-ї лінії проводили з використанням альтернуючих курсів за схемою: карбоплатин 600 мг/м<sup>2</sup> (по 300 мг/м<sup>2</sup> — 2 дні), етопозид 300 мг/м<sup>2</sup> (по 150 мг/м<sup>2</sup> — 2 дні) — 1-й та 3-й курс; іфосфамід 9 г/м<sup>2</sup> (по 3 г/м<sup>2</sup> — 3 дні, месна 4 г/м<sup>2</sup> — 4 дні), етопозид 300 мг/м<sup>2</sup> (по 150 мг/м<sup>2</sup> — 2 дні) — 2-й курс з інтервалом 21 день, — та хірургічне видалення всіх метастатичних вогнищ у легенях.

Перед початком лікування проводили визначення експресії імуногістохімічних маркерів (p53, VEGF, Pgr) у біопсійному матеріалі за стандартною методикою: депарафінізація, демаскування, пероксидазний блок, інкубація зрізів із робочим розчином первинного антитіла, кон'югант вторинних антитіл, нанесення хромогену, контрастування з гематоксиліном. Імуногістохімічні дослідження проводяться на зрізах тов-

щиною 4 мкм. Для позитивного контролю використовували тканинні зразки з визначеною позитивною реактивністю, для негативного — проводили процедуру без застосування первинних антитіл.

Отримані препарати вивчали та фотографували за допомогою мікроскопа OLYMPUS CX 41 з камерою і програмним забезпеченням за стандартизованих умов. Відповідь була негативною, якщо експресія не була виявлена, позитивною — при встановленні ядерної експресії, відповідно, білка p53 і мембранно-цитоплазматичної — VEGF та Pgp.

Достовірність у двох групових порівняннях було визначено *t*-критерієм Стьюдента (якщо дані були розподілені нормально) та непараметричним критерієм  $\chi^2$  Пірсона (у разі, якщо розподіл даних не узгоджувався з нормальним). Аналіз показників виживаності хворих проводили за методом Каплана — Мейера. Розбіжності вважали істотними при рівні  $p < 0,05$ . Для розрахунків використовували програми MS Excel та Statistica 6.0.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Біопсійний матеріал всіх 123 пацієнтів з ОС вивчено з урахуванням експресії p53. Позитивною вона виявилася майже у половини пацієнтів (у 61 випадку). Але визначено суттєву різницю в структурному розподілі позитивної експресії p53 в основній та контрольній групах. У групі хворих, у яких виявлено метастази ОС в легенях, експресію p53 встановлено у  $68,49 \pm 4,3\%$  осіб (50 з 73). У пацієнтів із довготривалим безрецидивним спостереженням — у  $22,00 \pm 5,9\%$  ( $p=0,02$ ; рис. 1).

Статистично достовірно виявилася залежність 5-річної виживаності від рівня експресії p53 ( $p = 0,01$ ). Загальна 5-річна виживаність пацієнтів із позитивною експресією досліджуваного білка становила  $46,6 \pm 6,4\%$ , а з негативною —  $88,6 \pm 4,0\%$  (рис. 2).

J.S. Wunder та співавтори (2005) [7] намагалися простежити залежність між статусом p53 та генералізацією пухлинного процесу у хворих на ОС без метастазів і при цьому виявили мутації гена p53 в 19% зразків. Проте дослідники не встановили асоціації p53 з ризиком розвитку рецидиву ОС. Інші автори виявили експресію p53 в 32% випадків низькодиференційованої ОС, а показники 3-річної безрецидивної виживаності пацієнтів із пухлинами з відсутністю експресії p53 були достовірно вищими (64%) порівняно з хворими на ОС з експресією p53 (17%) ( $p=0,008$ ). Отримані нами дані підтверджують дослідження S. Ferragali та співавторів [8], які встановили, що наявність експресії p53 пов'язана з незадовільними показниками виживаності.

Підвищену експресію VEGF виявлено у 87 (70,7%) досліджуваних хворих на ОС. У більшості випадків експресію фактора відзначено у пацієнтів з агресивними формами ОС, у яких виявлено метастази після закінчення лікування. Проте різниця між контрольною та основною групою була статис-

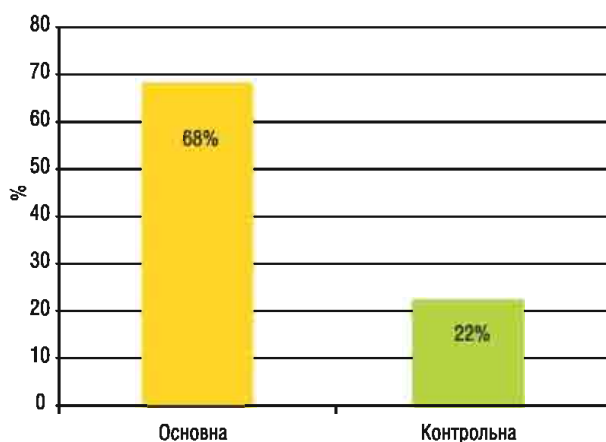


Рис. 1. Частота виявлення p53 в ядрах пухлинних клітин у матеріалах біопсії основної та контрольної груп

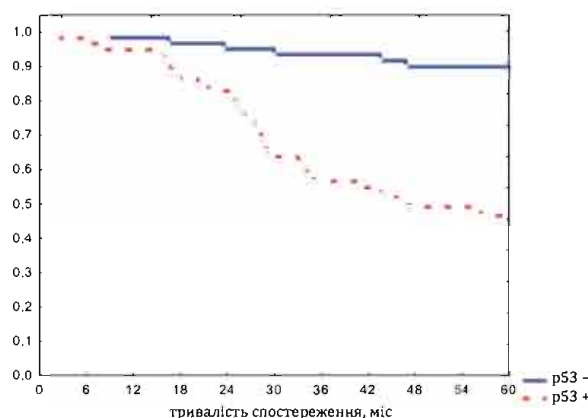


Рис. 2. Показники 5-річної виживаності пацієнтів залежно від експресії білка p53

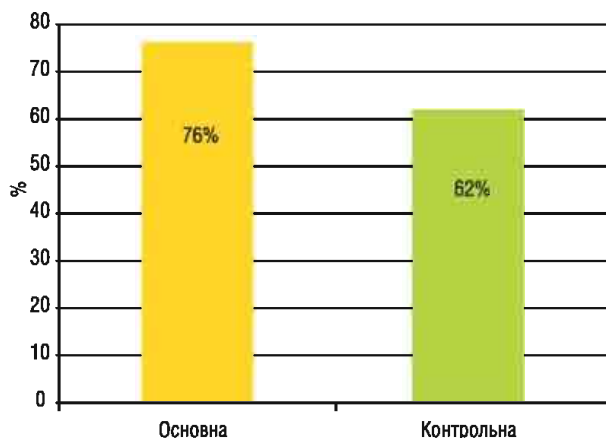


Рис. 3. Порівняльна частота виявлення експресії VEGF в цитоплазмі пухлинних клітин в матеріалах біопсії основної та контрольної груп

тично незначущою —  $62,0 \pm 6,9$  та  $76,7 \pm 5,0\%$  спостережень відповідно ( $p > 0,05$ ; рис. 3).

Статистично недостовірно виявилася і різниця 5-річної виживаності хворих на ОС залежно від експресії VEGF ( $p = 0,16$ ). Загальна 5-річна виживаність пацієнтів з позитивною експресією досліджуваного білка становила  $64,6 \pm 5,1\%$ , а з негативною —  $77,6 \pm 6,9\%$  (рис. 4).

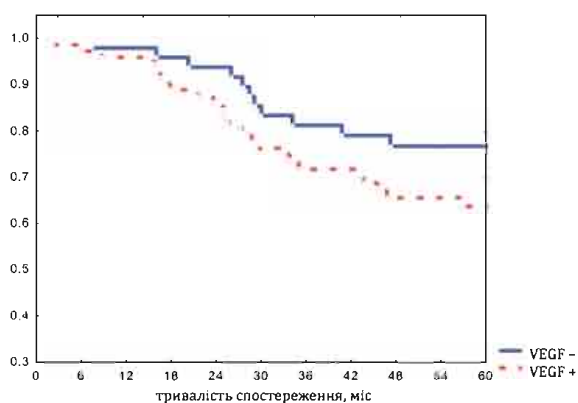


Рис. 4. Показники 5-річної виживаності пацієнтів залежно від експресії VEGF

Аналіз імуногістохімічної експресії VEGF у зразках пухлини у пацієнтів з ОС показав, що маркер визначається в більшості випадків і не може характеризувати високий ризик рецидиву або метастазування. Деяка різниця у виживаності залежно від експресії VEGF може бути пов'язана з наявністю подвійної експресії з p53 або Pgr.

У дослідженні Y. Qi та співавторів (2011) [9] позитивна реакція при визначенні VEGF виявлена також у 70% хворих, а загальна 5-річна виживаність у цих пацієнтів становила 73,7% проти 34,8% у хворих з негативною реакцією при імуногістохімічному дослідженні маркера ( $p = 0,003$ ). Але результати низки робіт все ж таки свідчать про те, що при великій кількості клітин з експресією VEGF не спостерігається кореляції з виживаністю [4, 10, 11]. Присутній у клітинах ОС фактор VEGF, скоріше за все, вказує на те, що ОС є високоагресивною пухлиною з характерною здатністю до раннього метастазування та бурхливого розвитку неопластичного процесу.

Найбільш високий рівень позитивної експресії білка Pgr відзначено у групі пацієнтів із несприятливими результатами лікування, тобто у хворих з діагностованими рецидивами патологічного процесу у вигляді метастазів у легенях — 52 ( $71,2 \pm 5,2\%$ ) випадки серед 73 хворих основної групи та 21 ( $42,0 \pm 7,1\%$ ) — серед 50 хворих, які не мали метастазів у період спостереження ( $p = 0,02$ ; рис. 5).

Аналіз експресії маркера Pgr в зразках ОС показав статистично достовірну різницю у виживаності хворих з позитивним та негативним результатом при визначенні експресії зазначеного маркера. Загальна виживаність пацієнтів за наявності експресії досліджуваного білка становила  $64,6 \pm 5,6\%$ , а при негативних результатах імуногістохімічного дослідження —  $82,5 \pm 5,3\%$  ( $p = 0,04$ ; рис. 6).

Отримані результати можуть свідчити про те, що позитивна реакція при визначенні Pgr може бути ознакою високої агресивності пухлини. Пацієнтів з таким показником слід відносити до групи високого ризику.

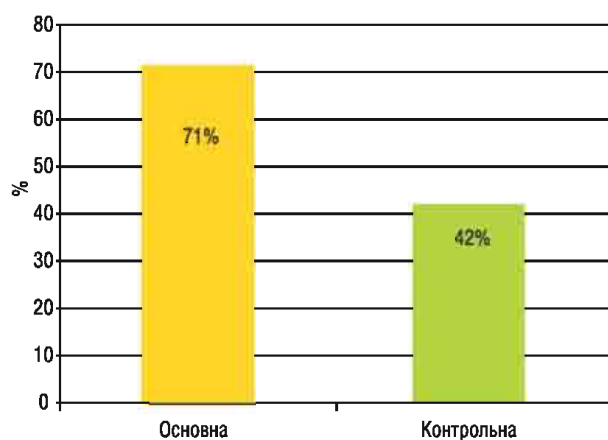


Рис. 5. Порівняльна частота виявлення Pgr в пухлинних клітинах у матеріалах біопсії основної та контрольної груп

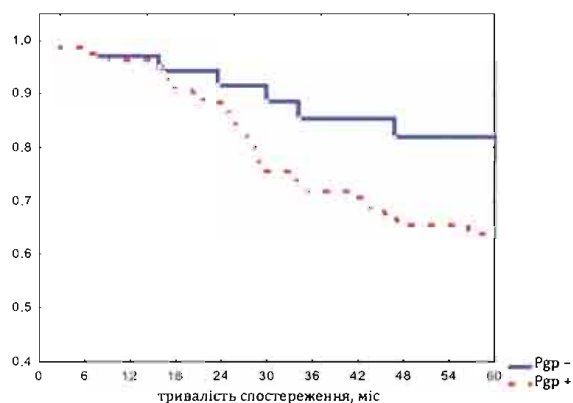


Рис. 6. Показники 5-річної загальної виживаності пацієнтів основної і контрольної груп залежно від експресії білка Pgr

Схожі показники були отримані N. Baldini та співавторами (1995). Вони вказують на низьку загальну 5-річну виживаність у пацієнтів із позитивною реакцією при визначенні Pgr. У першій групі вона становила 42% проти 80% у пацієнтів із негативною реакцією при вивченні цього маркера ( $p = 0,002$ ) [12]. У більш ранніх публікаціях автори демонструють незначну різницю у виживаності хворих із позитивним та негативним Pgr. Так, Y. Gao та співавтори (2016) у своєму звіті підкреслюють, що показники Pgr не впливають на рівень виживаності, хоча у 13 (72,2%) хворих із 18, у яких виявлено позитивну реакцію Pgr, діагностовано метастази ОС у ранній період спостереження [13].

## ВИСНОВКИ

Показана прогностична цінність визначення при імуногістохімічному дослідженні експресії p53 та Pgr. Наведені дані дозволяють рекомендувати визначення експресії білків Pgr при ОС для оцінки прогнозу безрецидивної виживаності.

Наявність експресії VEGF у пухлинних клітинах біопсійного матеріалу не може бути розцінена як фактор прогнозу перебігу захворювання у пацієнтів із ОС.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Posthuma DB, Witlox MA, Kaspers GJ. Molecular alterations as target for therapy in metastatic osteosarcoma: a review of literature. *Clin Exp Metastasis* 2011; **28**: 493–503.
2. Gorlick R, Anderson P, Andrulis I, *et al.* Biology of childhood osteogenic sarcoma and potential targets for therapeutic development: meeting summary. *Clin Cancer Res* 2003; **9** (15): 5442–53.
3. Zhao ZG, Ding F, Liu M, *et al.* Association between P-glycoprotein expression and response to chemotherapy in patients with osteosarcoma: a systematic and meta-analysis. *J Cancer Res Ther* 2014; **10**: 206–9.
4. Zhuang Y, Wei M. Impact of vascular endothelial growth factor expression on overall survival in patients with osteosarcoma: a meta-analysis. *Tumour Biol* 2014; **35** (3): 1745–9.
5. Gokgoz N, Wunder J, Mousses S, *et al.* Comparison of p53 mutations in patients with localized osteosarcoma and metastatic osteosarcoma. *Cancer* 2001; **92**: 2181–9.
6. Steliga MA, Vaporciyan AA. Surgical management of pulmonary metastases from osteosarcoma in pediatric and adolescent patients. *Pediatric Adolescent Osteosarcoma*. Springer, 2009: 185–201.
7. Wunder JS, Gokgoz N, Parkes R, *et al.* TP53 mutations and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study. *J Clin Oncol* 2005; **23** (7): 1483–90.
8. Ferrari S, Bertoni F, Zanella L, *et al.* Evaluation of P-glycoprotein, HER-2/ErbB-2, p53, and Bcl-2 in primary tumor and metachronous lung metastases in patients with high-grade osteosarcoma. *Cancer* 2004; **100** (9): 1936–42.
9. Qu Y, Xu J, Jiang T, *et al.* Difference in pre- and postchemotherapy vascular endothelial growth factor levels as a prognostic indicator in osteosarcoma. *J Int Med Res* 2011; **39** (4): 1474–82.
10. Chen D, Zhang Y, Zhu K, *et al.* A systematic review of vascular endothelial growth factor expression as a biomarker of prognosis in patients with osteosarcoma. *Tumour Biol* 2013; **34**: 1895–9.
11. Lammi J, Fan M, Rossenthal H, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor correlates with the advance of clinical osteosarcoma. *Int Orthop* 2012; **36**: 2307–13.
12. Baldini N, Scotlandi K, Barbanti-Brodano G, *et al.* Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. *N Engl J Med* 1995; **3**: 1380–5.
13. Gao Y, Yao L, Shen JK, *et al.* Evaluation of P-glycoprotein (Pgp) expression in human osteosarcoma by high-through put tissue microarray. *J Orthop Res* 2016; **34**: 1606–12.

## IMMUNOHISTOCHEMICAL PROGNOSIS FACTORS OF THE DEVELOPMENT OF OSTEOSARCOMA METASTASIS

P.A. Kovalchuk, A.G. Diedkov, M.S. Krotevich

**Summary. Aim:** to determine the prognostic value of expression of immunohistochemical markers p53, P-glycoprotein (Pgp), VEGF in patients with osteosarcoma (OS). **Subjects and methods:** primary OS and OS with lung metastases. Expression of p53, Pgp, VEGF was determined by immunohistochemical method. The survival rate of patients was assessed by Kaplan — Meier method, the accuracy of results — by Student's *t*-criterion. **Results:** for determine the expression level of p53, Pgp, VEGF was performed immunohistochemical analysis of biopsy material of 123 patients with OS. The expression of VEGF demonstrated that this marker can not be used as an independent prognostic marker in patients with OS. Prognostic significance of p53, Pgp in patients with OS was established. The correlation of p53 and Pgp expression dependents on OS metastases in the lungs. **Conclusion:** molecular biological research of p53 and Pgp makes it possible to identify a group with good prognosis among patients with OS.

**Key Words:** prognostic factors, osteosarcoma, metastases, immunohistochemical markers p53, Pgp, VEGF.

## Адреса для листування:

Ковальчук П.А.

03022, Київ, вул. Ломоносова, 33/43

Національний інститут раку

E-mail: dr.pavel.kovalchuk@gmail.com

Одержано: 17.01.2017