

© Коллектив авторов, 2000  
УДК 616.24-006.6-037:616-008

О. И. Костылева, Е. С. Герштейн, А. Ю. Дыхно,  
А. В. Васильев, Б. Е. Полоцкий, Н. Е. Кушлинский

## РЕЦЕПТОР ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА (ЭФР) И ЭФР-ПОДОБНЫЕ ПЕПТИДЫ КАК ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

*НИИ клинической онкологии*

Легкое является органом, в формировании которого принимают участие эпидермальный фактор роста (ЭФР),  $\alpha$ -трансформирующий фактор роста ( $\alpha$ -ТФР) и другие представители семейства ЭФР-подобных пептидов в качестве локальных регуляторов пролиферации и дифференцировки клеток [5, 7, 9, 16, 17]. ЭФР и  $\alpha$ -ТФР (принадлежащие к семейству ЭФР-подобных пептидов) взаимодействуют с общим рецептором (РЭФР) на мембране клетки-мишени. РЭФР рассматривается в настоящее время в качестве одного из тканевых маркеров опухолей различного гистогенеза, важных в прогностическом плане [1, 6, 8], а также как потенциальная мишень для блокирования передачи митогенного сигнала в клетку [1]. Тем не менее, несмотря на активное экспериментальное и клиническое исследование, однозначного понимания роли ЭФР-подобных пептидов и их рецепторов при различных злокачественных опухолях человека нет.

До настоящего времени не существует и единого мнения о взаимосвязи экспрессии РЭФР с клиническим течением немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ).

**Материалы и методы.** В исследование включены 63 больных в возрасте от 22 до 78 лет, получивших хирургическое лечение в отделении торакальной онкологии ОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН с мая 1994 г. по май 1997 г. Центральный рак легкого был диагностирован у 43 больных, периферический — у 20.

Анализ гистологических препаратов проводился в соответствии с 4-м изданием «Руководства по стадированию рака» (1989), подготовленным Американским противораковым союзом.

По стадиям больные распределялись следующим образом: больные с I стадией составили 40% (25 пациентов), со II стадией — 6% (4), с III стадией — 46% (30 человек; с IIIA стадией — 24 и с IIIB — 6) и с IV стадией — 8% (4 человека).

Образцы опухолей и гистологически неизменной ткани легкого получали и обрабатывали, как описано ранее [3].

**Определение РЭФР.** Анализ содержания РЭФР в мембранной фракции опухолей проводили модифицированным радиолигандным методом Т. J. Benraad и J. F. Foekens [4], используя в качестве лиганда (ЛИГ) мышинный ЭФР (receptor grade, «Sigma», США), йодированный с помощью  $\text{Na}^{125}\text{I}$  в присутствии хлорамина Т (удельная радиоактивность 40–122 Ки/ммоль). Мембранные препараты, содержащие 0,2–1,0 мг/мл белка, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с 3,5 нмоль  $^{125}\text{I}$ -ЭФР в присутствии или отсутствии 200-кратного избытка немеченого ЭФР. Реакция прекращалась при добавлении 75% суспензии гидроксилапатита (DNA-grade, «Sigma», США) в K, Na-PBS-буфере (pH 7,4) на льду. После 3 последовательных отмываний K, Na-PBS-буфером при 4 °C пробы радиометрировали на  $\gamma$ -счетчике «Cobra-II Autogamma»

O.I.Kostyleva, E.S.Gershtein, A.Yu.Dykhno, A.V.Vasiliev,  
B.E.Polotsky, N.E.Kushlinsky

## EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGF) RECEPTOR AND EGF-LIKE PEPTIDES AS SURVIVAL PROGNOSIS FACTORS IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER

*Institute of Clinical Oncology*

Epidermal growth factor (EGF),  $\alpha$ -transforming growth factor ( $\alpha$ -TGF) and other representatives of the EGF-like peptide family contribute to lung development as local regulators of cell proliferation and differentiation [5,6,9,16,17]. The EGF and  $\alpha$ -TGF (belonging to the EGF-like peptide family) interact with a common receptor (EGFR) on target cell membranes. The EGFR is presently considered a prognositically significant tissular marker of tumors of different origin [1,6,8] and a potential target to block mitogenic signal penetration into cells [1]. However, the role of EGF-like peptides and their receptors in various human cancers is still ambiguous notwithstanding the active experimental and clinical study of these factors.

There are at present different opinions on relationship of EGFR expression and clinical course of non-small cell lung cancer (NSCLC).

**Materials and Methods.** We performed a study of relationship between EGFR expression and clinical course of NSCLC in 63 patients aged 22 to 78 years receiving surgery at the Thoracic Oncology Department, N.N.Blokhin CRC, during May 1994 to May 1997. There were 43 cases with centric and 20 cases with peripheral lesions.

Histological study of surgical specimens was performed in compliance with American Anticancer Union's recommendations on cancer staging (4th ed., 1989).

Case distribution with respect to disease stage was as follows: 40% (25 patients) with stage I, 6% (4 patients) with stage II, 46% (30 patients including 24 with stage IIIA and 6 with stage IIIB) and 8% (4 patients) with stage IV.

Preparation of specimens of tumors and histologically intake tissue was performed as described elsewhere [3].

**EGFR Assay.** Assay of EGFR in tumor membrane fraction was carried out by modified radioligand technique developed by T.J.Benraad and J.F.Foekens [4] using murine EGF (receptor grade, Sigma, USA) iodinated with  $\text{Na}^{125}\text{I}$  in the presence of chloramine T (specific radioactivity 40-122 Ci/mmol) as a ligand (LIG). Membrane samples containing 0.2-1.0 mg/ml protein were incubated 1 h at room temperature with 3.5 nmol  $^{125}\text{I}$ -EGF with or without 200-fold excess of unlabeled EGF. The reaction was stopped by adding 75% hydroxylapatite (DNA-grade, Sigma, USA) suspension in K, Na-PBS buffer (pH 7.4) on ice. After three successive washings with K, Na-PBS buffer at 4°C radioactivity of samples was measured using a Cobra-II Autogamma  $\gamma$ -counter (Packard, Australia) and concentration of specifically bound  $^{125}\text{I}$ -EGF was calculated. Tissues containing not less than 5 fmol EGFR/mg membrane protein were considered EGFR- positive.

Protein concentration in NSCLC membrane fraction and normal lung tissue was measured by Lowry (1951) using a

(«Packard», Австралия) и рассчитывали количество специфически связанного  $^{125}\text{I}$ -ЭФР. РЭФР-положительными считали ткани, содержащие не менее 5 фмоль РЭФР/мг мембранного белка.

Концентрацию белка в мембранной фракции НМРЛ и нормальных тканей легкого определяли методом Lowry (1951) на спектрофотометре DU 650 («Beckman», США), содержание ДНК в цитозольной фракции тканей — методом Бартона в присутствии дифениламинового реагента.

**Исследование ЛИГ РЭФР в цитозольной фракции тканей.** Непосредственно перед определением концентрации факторов роста лиофилизированные цитозолы восстанавливали минимальным объемом (0,1–0,2 мл) РИА-буфера, содержащего 0,01 М Na-фосфатный буфер (pH 7,4), 0,15 М NaCl, 0,01 М ЭДТА, 0,5% БСА и 0,1% NaN<sub>3</sub>. Данным методом определяется суммарное содержание всех пептидов (самого ЭФР,  $\alpha$ -ТФР, амфигулина, cripto и др.), взаимодействующих с РЭФР мембран плаценты человека. Для построения калибровочной кривой в качестве стандарта использовали рекомбинантный человеческий  $\alpha$ -ТФР («Sigma», США) в концентрациях от 0 до 200,0 нг на пробу. В полипропиленовые пробирки помещали по 25 000–35 000 cpm (обороты в минуту)  $^{125}\text{I}$ -ЭФР и по 30 мкл калибровочных растворов  $\alpha$ -ТФР или исследуемых цитозолей тканей. После инкубации в течение 24 ч при 4 °C осаждали ЛИГ-рецепторные комплексы суспензией гидроксилата, как описано в методе определения РЭФР. Считали радиоактивность осадков на  $\gamma$ -счетчике «Cobra-II Autogamma» («Packard», Австралия), строили калибровочные кривые зависимости количества связанного меченого ЛИГ от количества добавленного в пробу  $\alpha$ -ТФР и рассчитывали содержание ЭФР-подобных пептидов в исследуемых образцах, выражая его в пг/мг ДНК. Ткань считали содержащей ЭФР-подобные пептиды, если полученная концентрация ЛИГ РЭФР была отличной от нуля.

Достоверность отличий средних значений содержания РЭФР и их ЛИГ сравнивали по *t*-критерию Стьюдента, а частоты распределения — по критерию  $\chi^2$ . Во всех случаях различия считали достоверными при  $p \leq 0,05$ . Анализ общей и безрецидивной выживаемости проводили методом Каплана — Мейера с оценкой достоверности различий по *F*-критерию для малых групп.

По мнению некоторых исследователей [10, 13, 14], для опухолей легкого характерна гиперэкспрессия РЭФР по сравнению с непораженной тканью легкого. Полученные нами данные (табл. 1), однако, не подтверждают это предположение: различия между средними концентрациями РЭФР в опухолях и непораженной ткани легкого не были статистически значимыми. При этом необходимо отметить хорошо выраженную тенденцию ( $\chi^2=3,27$ ;  $p=0,07$ ) к тому, что опухоли значительно чаще, чем окружающая неизменная ткань легкого, содержат РЭФР.

Продукцию ЛИГ РЭФР до сих пор исследовали только *in vitro* в культурах клеток НМРЛ, а в клинике изучалась экспрессия  $\alpha$ -ТФР при НМРЛ [11, 15]. В нашем исследовании средние концентрации ЛИГ в опухолях и непораженной ткани были одинаковыми, хотя в опухолях ЛИГ обнаруживались достоверно чаще, чем в гистологически неизменной ткани легкого ( $\chi^2=4,53$ ;  $p=0,03$ ) (см. табл. 1). Таким

DU 650 spectrophotometer (Beckman, USA), cytosol fraction DNA was measured by Barton's technique in the presence of diphenylamine reagent.

**Study of EGFR LIG in Tissue Cytosol Fraction.** Immediately before measuring growth factor contents the freeze dried cytosols were reduced with minimal volumes of RIA-buffer containing 0.01 M Na-phosphate buffer (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 0.01 M EDTA, 0.5% BSA and 0.1% NaN<sub>3</sub>. This assay determines the total content of proteins (EGF itself,  $\alpha$ -TGF, amphiregulin, cripto and others) binding to human placental membranes. Recombinant human  $\alpha$ -TGF (Sigma, USA) at concentrations 0 to 200.0 ng per specimen was used as standard to draw up calibration curve.  $^{125}\text{I}$ -EGF at 25,000 to 35,000 cpm and  $\alpha$ -TGF calibration solution or tested tissue cytosol, 30  $\mu\text{cl}$ , were transferred to polypropylene tubes. After 24-h incubation at 4 °C LIG-receptor complexes were precipitated with hydroxylapatite suspension as described in EGFR Assay. The precipitate radioactivity was measured using a Cobra-II Autogamma  $\gamma$ -counter (Packard, Australia), calibration curves of bound labeled LIG content with respect to  $\alpha$ -TGF were drawn up and EGFR-like peptide concentrations were calculated and expressed as pg/mg DNA. A tissue was considered EGFR-like peptide-positive if EGFR LIG concentration was above zero.

Significance of differences in mean EGFR and their LIG concentrations was determined by Student's *t*-test, significance of differences in distribution frequencies was determined by  $\chi^2$ -test. The differences were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$  in all cases. Analysis of overall and disease-free survivals was performed by Kaplan-Meier methodology with assessment of differences by *F*-test for small groups.

Some authors believe [10,13,14] that lung cancer demonstrates EGFR hyperexpression as compared with normal lung tissue. However, our findings (table 1) do not confirm this opinion because differences in mean lung tumor and intact tissue EGFR concentrations were not statistically significant. It should be noted however that there was a marked tendency ( $\chi^2=3.27$ ,  $p=0.07$ ) to a much more frequent EGFR-positivity of the tumors as compared with the surrounding intact tissue.

EGFR LIG production was studied only *in vitro* in NSCLC cell cultures while clinical study was carried out for  $\alpha$ -TGF in NSCLC [11,15]. In our study mean tumor and intact tissue LIG concentrations were similar though LIG-positive tumors were encountered at a significantly higher rate than intact lung tissues ( $\chi^2=4.53$ ,  $p=0.03$ ) (see table 1). Thus, NSCLC contains both components of EGFR-dependent regulation of cancer growth (LIG and EGFR) significantly more frequently than normal lung tissue.

Tumor EGFR and EGFR LIG expression frequency and degree did not depend upon clinical and anatomical type of NSCLC though the EGF-like peptides were encountered significantly more frequently both in centric and peripheral tumors as compared with histologically intact lung tissue (table 2).

It should be noted that we failed to find statistically significant differences in EGFR and their LIG contents as expressed by tumors and histologically intact lung tissues at all disease stages. There was no relationship between EGFR and EGFR LIG expressions in tumors and histologically intact lung

Таблица 1

Table 1

**Содержание РЭФР и их ЛИГ (ЭФР-подобных пептидов) в опухоли и гистологически неизменной ткани легкого (ГНТ) у больных НМРЛ**

**Contents of EGFR and its LIG (EGF-like peptides) in tumors and histologically intact lung tissue (HIT) in NSCLC cases**

| Исследованные образцы | Количество образцов | Количество РЭФР <sup>+</sup> -тканей, % | Уровень ЭФР, фмоль/мг белка ( $M \pm m$ )         | Количество ЛИГ <sup>+</sup> -тканей, % | Уровень ЛИГ, пг/мг ДНК ( $M \pm m$ )       |
|-----------------------|---------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------|
| Опухоль / Tumor       | 63                  | 75*                                     | 76,0 $\pm$ 19,1                                   | 62**                                   | 1140 $\pm$ 317                             |
| ГНТ / HIT             | 63                  | 68*                                     | 57,7 $\pm$ 10,1                                   | 36 **                                  | 1140 $\pm$ 336                             |
| Test specimens        | No. of specimens    | Percentage of EGFR <sup>+</sup> tissues | EGFR content, fmol/mg protein ( $Mean \pm S.D.$ ) | Percentage of LIG <sup>+</sup> tissues | LIG content, pg/mg DNA ( $Mean \pm S.D.$ ) |

\*  $\chi^2=3,27$ ;  $p=0,07$ . \*\*  $\chi^2=4,53$ ;  $p=0,03$ .

образом, в опухоли при НМРЛ достоверно чаще обнаруживаются оба компонента, необходимых для РЭФР-зависимого механизма регуляции роста злокачественного новообразования, а именно — и ЛИГ, и РЭФР.

Частота и уровни экспрессии РЭФР и их ЛИГ в опухолях не зависят от клинко-анатомической формы НМРЛ, хотя и при центральной, и при периферической локализации НМРЛ ЭФР-подобные пептиды достоверно чаще обнаруживаются в опухоли по сравнению с гистологически неизменной тканью легкого (табл. 2).

Следует отметить, что мы не обнаружили достоверных отличий в количествах РЭФР и их ЛИГ, экспрессируемых опухолями и гистологически неизменной тканью легкого на всех стадиях заболевания. Также не было обнаружено никакой зависимости между экспрессией РЭФР и их ЛИГ в опухолях и гистологически неизменной ткани легкого и такими клинко-морфологическими характеристиками опухолевого процесса, как стадия заболевания, первичная опухоль и поражение регионарных лимфоузлов.

Прогноз выживаемости при НМРЛ основывается на клинко-морфологических данных. Известно, что до 70—80% рецидивов заболевания появляются у пациентов НМРЛ в первые 18 мес после хирургического лечения [2].

Нами прослежена в течение 1—36 мес судьба 32 из 63 больных НМРЛ и представилось возможным проанализировать

tissue and clinical morphological characteristics such as disease stage, primary site and regional lymph node involvement.

Prognosis of survival in NSCLC is made basing on clinical morphological findings. As known up to 70-80% disease recurrence is detected in NSCLC cases within 18 months following surgery [2].

We followed up fates of 32 of the 63 patients with NSCLC for 1 to 36 months to analyze EGFR and EGFR LIG expressions in prognosis of overall and disease-free survivals in NSCLC. Retrospective statistical analysis was made with no respect to postoperative chemotherapy because of too few patients with NSCLC studied.

There were no significant differences in the overall and disease-free survivals between cases with EGFR-positive and EGFR-negative cancers in the 32 patients liable to follow-up. However, a more thorough study revealed a tumor EGFR threshold of 50 fmol/mg membrane protein above which there was a statistically significant ( $p=0.03$ ) fall in disease-free survival of NSCLC patients (fig. 1).

Owing to a good survival of cases with EGFR content under 50 fmol/mg protein (1 death within the follow-up) we failed to draw up overall survival curves.

After the cases were stratified with respect to patients' age, disease stage, tumor size, disease advance the EGFR lost its prognostic value.

Таблица 2

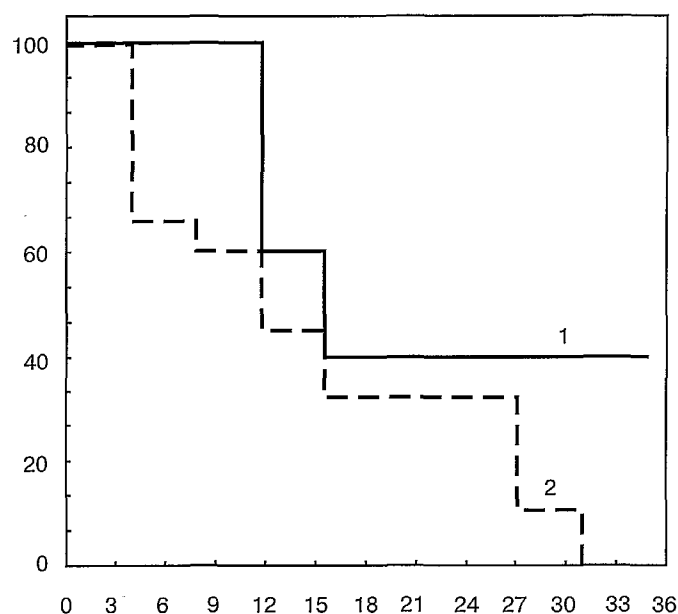
Table 2

**Содержание ЭФР-подобных пептидов в опухоли и гистологически неизменной ткани легкого (ГНТ) в зависимости от клинко-анатомической формы НМРЛ**

**Contents of EGF-like peptides in tumors and histologically intact lung tissues (HIT) with respect to NSCLC anatomical type**

| Локализация опухоли                     | Количество образцов | ЛИГ <sup>+</sup> -опухоли, %          | Уровень ЛИГ в опухоли, пг/мг ДНК ( $M \pm m$ )   | ЛИГ <sup>+</sup> - ГНТ, %          | Уровень ЛИГ в ГНТ, пг/мг ДНК ( $M \pm m$ )     |
|-----------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------|
| Центральный рак<br>Central cancer       | 43                  | 60*                                   | 1293 $\pm$ 465                                   | 40*                                | 1293 $\pm$ 421                                 |
| Периферический рак<br>Peripheric cancer | 20                  | 65**                                  | 833 $\pm$ 209                                    | 25**                               | 584 $\pm$ 215                                  |
| Tumor location                          | No. of specimens    | Percentage of LIG <sup>+</sup> tumors | Tumor LIG content, pg/mg DNA ( $Mean \pm S.D.$ ) | Percentage of LIG <sup>+</sup> HIT | HIT LIG content, pg/mg DNA ( $Mean \pm S.D.$ ) |

\*  $\chi^2=3,8$ ;  $p=0,05$ . \*\*  $\chi^2=4,8$ ;  $p=0,03$ .



**Рис. 1. Безрецидивная выживаемость больных НМРЛ в зависимости от порогового уровня РЭФР в опухоли, равного 50 фмоль/мг белка.**

1 — РЭФР < 50 фмоль/мг белка; 2 — РЭФР ≥ 50 фмоль/мг белка. Здесь и на рис. 2—5 по осям абсцисс — время наблюдения, мес; по осям ординат — выживаемость, %.

**Fig. 1. Disease-free survival in NSCLC with respect to a tumor EGFR threshold 50 fmol/mg protein**

1, EGFR < 50 fmol/mg protein; 2, EGFR ≥ 50 fmol/mg protein. Here and in figs. 2–5 numbers on the x axes are months of follow-up; numbers on the y axes are percentages of survival.

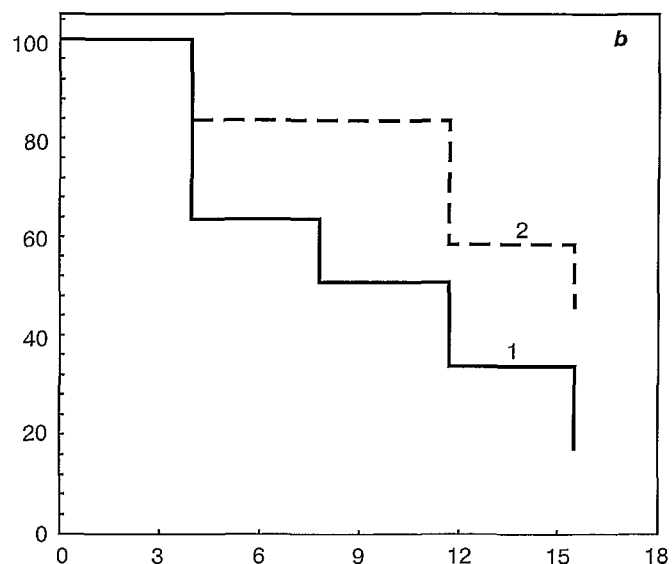
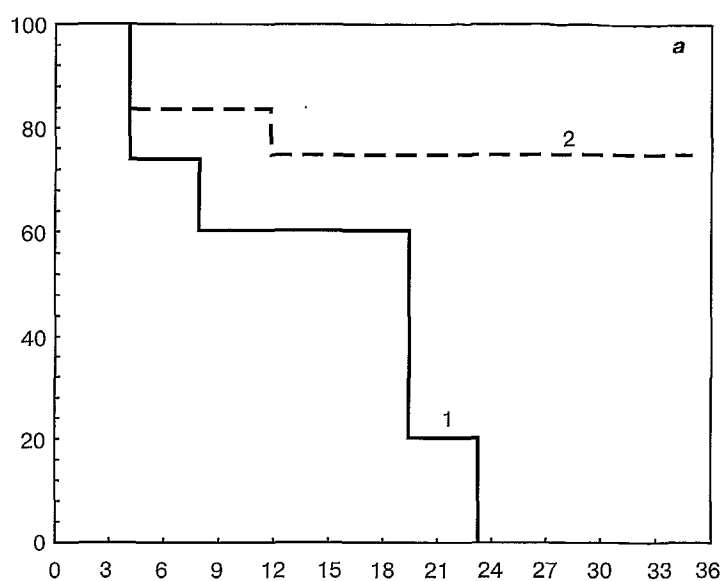
значение экспрессии РЭФР и их ЛИГ в прогнозе общей и безрецидивной выживаемости больных НМРЛ. Следует отметить, что в связи с малочисленностью группы больных НМРЛ ретроспективный статистический анализ проводился без учета послеоперационной химиолучевой терапии.

В целом в группе из 32 больных НМРЛ достоверных различий показателей общей и безрецидивной выживаемости в зависимости от наличия или отсутствия РЭФР в опухоли не наблюдалось. Однако при более детальном изучении был выявлен пороговый уровень РЭФР в опухолях легкого, равный 50 фмоль/мг белка мембран, при превышении которого наблюдается статистически достоверное снижение показателя безрецидивной выживаемости ( $p=0,03$ ) больных НМРЛ (рис. 1).

Учитывая хорошую выживаемость больных с уровнем РЭФР менее 50 фмоль/мг белка (в этой группе за период наблюдения умер 1 больной), нам не удалось построить кривые общей выживаемости.

При разделении больных на группы в зависимости от возраста, стадии заболевания, размера опухоли, распространенности опухолевого процесса прогностическое значение РЭФР в отдельных группах не проявлялось.

Проведен анализ прогностического значения экспрессии РЭФР в гистологически неизмененной ткани легкого. Была выявлена пороговая концентрация РЭФР в гистологически неизмененной ткани легкого, равная 20 фмоль/мг белка мембран. При ее превышении наблюдаются статистически



**Рис. 2. Общая (а) и безрецидивная (б) выживаемость больных НМРЛ при концентрации РЭФР в гистологически неизмененной ткани легкого относительно порогового уровня, равного 20 фмоль/мг белка.**

1 — РЭФР > 20 фмоль/мг белка; 2 — РЭФР ≤ 20 фмоль/мг белка.

**Fig. 2. Overall (a) and disease-free (b) survivals in NSCLC with respect to an EGFR threshold concentration in histologically intact lung tissue 20 fmol/mg protein.**

1, EGFR > 20 fmol/mg protein; 2, EGFR ≤ 20 fmol/mg protein.

We analyzed prognostic significance of EGFR expression in histologically intact lung tissue to discover an EGFR threshold concentration of 20 fmol/mg membrane protein above which there was a statistically significant deterioration of overall ( $p=0.04$ ) and disease-free ( $p=0.05$ ) survivals of NSCLC patients (fig. 2).

Thus, patients with tumor and intact tissue EGFR concentrations under 50 fmol/mg protein and under 20 fmol/mg protein, respectively, have better survival.

Previous studies [12,15] failed to find clear-cut relationship between EGFR LIg expression and survival in NSCLC.

достоверное ухудшение показателей общей ( $p=0,04$ ) и безрецидивной ( $p=0,05$ ) выживаемости больных НМРЛ (рис. 2).

Таким образом, лучше выживают больные, у которых в опухоли и окружающей опухоль ткани содержатся РЭФР в концентрации менее 50 и менее 20 фмоль/мг белка соответственно.

В проведенных ранее исследованиях [12, 15] не выявлено однозначной взаимосвязи между экспрессией ЛИГ РЭФР и выживаемостью больных НМРЛ. В связи с этим в работе проведена оценка влияния экспрессии ЭФР-подобных пептидов в опухоли на общую и безрецидивную выживаемость больных НМРЛ.

В общей группе больных не выявлено достоверных различий между показателями общей и безрецидивной выживаемости больных с ЛИГ<sup>+</sup>- и ЛИГ<sup>-</sup>-опухолями. Для прогноза выживаемости больных НМРЛ, по-видимому, имеет значение также экспрессия ЭФР-подобных пептидов в гистологически неизменной ткани легкого. Обнаружено (рис. 3, а), что больные, у которых гистологически неизменная ткань легкого содержала ЛИГ РЭФР, жили достоверно меньше ( $p=0,002$ ). Такая же закономерность наблюдалась и при сравнении показателей безрецидивной выживаемости в данных группах больных НМРЛ: чаще рецидивы выявлялись среди больных, гистологически неизменная ткань легкого которых содержала ЭФР-подобные пептиды ( $p=0,02$ ) (рис. 3, б).

Таким образом, экспрессия ЭФР-подобных пептидов в гистологически неизменной ткани легкого достоверно ухудшает прогноз общей и безрецидивной выживаемости больных НМРЛ.

Поскольку для функционирования механизма локальной регуляции необходимо наличие в клетке как минимум двух его компонентов, а именно ЛИГ и их рецепторов, представляло интерес проанализировать клиническое значение одновременного присутствия как РЭФР-, так и ЭФР-подобных пептидов в опухолях и гистологически неизменной ткани легкого при НМРЛ. У больных НМРЛ для опухолей наиболее характерна одновременная экспрессия РЭФР- и ЭФР-подобных пептидов (49%) (условно «аутокринный» фенотип РЭФР<sup>+</sup>ЛИГ<sup>+</sup>), а в гистологически неизменной ткани легкого такой фенотип был обнаружен только у 29% больных. В то же время для гистологически неизменной ткани легкого было более характерно сочетание РЭФР<sup>+</sup>ЛИГ<sup>-</sup> (40% больных). В опухолях легкого одинаково часто встречались два сочетания РЭФР и их ЛИГ: РЭФР<sup>-</sup>ЛИГ<sup>-</sup> и РЭФР<sup>-</sup>ЛИГ<sup>+</sup> (в 13% случаев). Фенотипическая элиминация РЭФР и/или их ЛИГ в опухоли и в гистологически неизменной ткани встречалась у 51 и 71% больных НМРЛ соответственно.

Нами были обнаружены статистически достоверно лучшие показатели безрецидивной выживаемости больных с РЭФР<sup>-</sup>ЛИГ<sup>+</sup>-опухолями по сравнению с больными, опухоли которых имели фенотип РЭФР<sup>+</sup>ЛИГ<sup>+</sup> ( $p=0,05$ ) (рис. 4). Через 11 мес рецидивы возникли у всех больных, опухоли которых продуцировали и ЛИГ, и РЭФР, в то время как безрецидивная выживаемость больных с опухолями, экспрессировавшими только ЛИГ, составила 61%, а в период с 12-го до 19-го месяца наблюдения снизилась до 16%.

Что касается сочетаний экспрессии РЭФР- и ЭФР-подобных пептидов в гистологически неизменной ткани легкого, то нам удалось проанализировать значение только

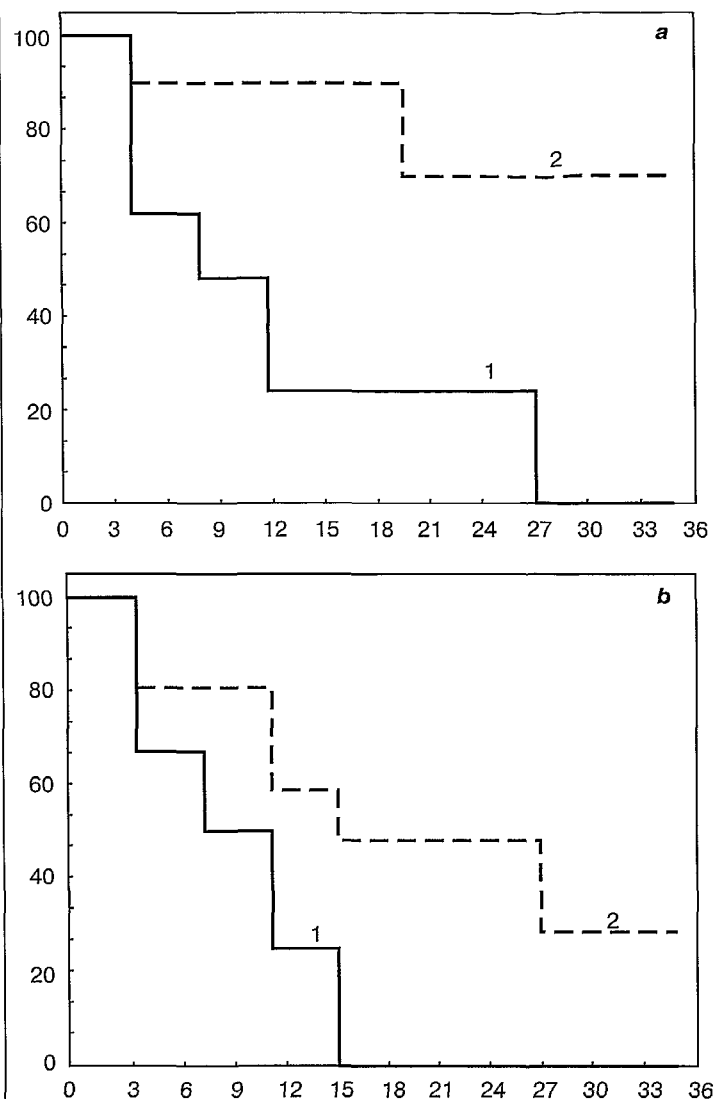


Рис. 3. Влияние содержания ЛИГ в гистологически неизменной ткани (ГНТ) легкого на общую (а) и безрецидивную (б) выживаемость больных НМРЛ.

1 — ЛИГ+ГНТ; 2 — ЛИГ-ГНТ.

Fig.3. Overall (a) and disease-free (b) survivals in NSCLC with respect to the presence of LIg in histologically intact lung tissue (HIT) 1, LIg+HIT; 2, LIg-HIT.

In view of this we attempted to evaluate the effect of tumor EGF-like peptide effect on overall and disease-free survival in NSCLC.

There were no statistically significant differences in overall and disease-free survivals between cases with LIg-positive and LIg-negative tumors. It seems that expression of the EGF-like peptide in histologically intact lung tissue is also of importance for prognosis of survival in NSCLC. We found (fig.3,a) that patients with LIg-positive intact lung tissue had a longer survival ( $p=0.002$ ). The same relationship was seen when disease-free survivals in these groups were compared: recurrence was more frequently detected in patients whose intact lung tissues contained EGF-like peptides ( $p=0.02$ ) (fig.3,b).

Thus, EGF-like peptide expression in histologically intact lung tissue is a significantly poor prognostic factor as to both overall and disease-free survival of NSCLC patients.

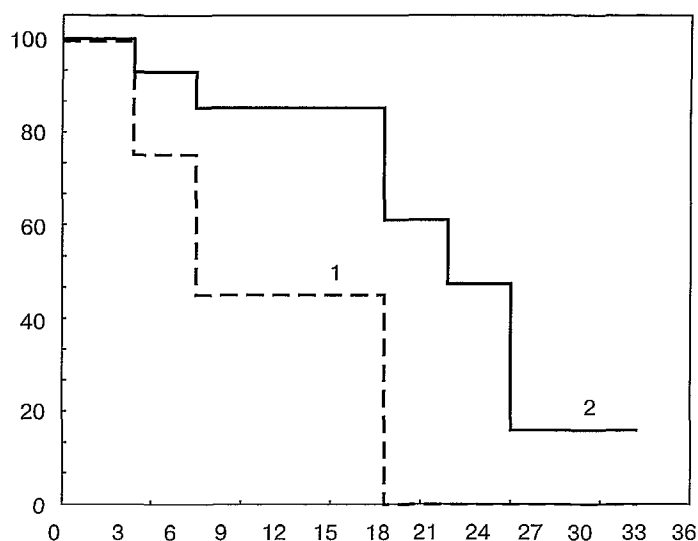


Рис. 4. Безрецидивная выживаемость больных НМРЛ с фенотипами опухолей РЭФР<sup>+</sup>ЛИГ<sup>+</sup> (1) и РЭФР<sup>-</sup>ЛИГ<sup>+</sup> (2).

Fig. 4. Disease-free survival of NSCLC patients with EGFR<sup>+</sup>LIG<sup>+</sup> (1) and EGFR<sup>-</sup>LIG<sup>+</sup> (2) tumor phenotypes.

двух сочетаний: РЭФР<sup>+</sup>ЛИГ<sup>+</sup> и РЭФР<sup>+</sup>ЛИГ<sup>-</sup> (рис. 5, а и б). Нами было обнаружено, что показатели общей ( $p=0,002$ ) и безрецидивной ( $p=0,03$ ) выживаемости больных, у которых в гистологически неизменной ткани легкого содержались только РЭФР и отсутствовали их ЛИГ, были достоверно выше, чем тех, у кого в окружающей опухоль ткани выявлялись оба исследуемых показателя.

**Заключение.** В результате проведенных исследований нами обнаружено, что на показатели общей и безрецидивной выживаемости больных НМРЛ оказывает влияние экспрессия РЭФР и их ЛИГ как в опухоли, так и в гистологически неизменной ткани легкого. Общая и безрецидивная выживаемость больных, у которых опухоль и гистологически неизменная ткань легкого экспрессировали одновременно РЭФР- и ЭФР-подобные пептиды, были достоверно ниже, чем в случае отсутствия экспрессии одного из компонентов РЭФР-зависимого механизма регуляции роста клеток. Обнаруженные изменения показателей общей и безрецидивной выживаемости, таким образом, отражают более агрессивный характер течения НМРЛ в том случае, если в легком пациента обнаружены одновременно РЭФР и их ЛИГ.

Отсутствие взаимосвязи между экспрессией РЭФР и их ЛИГ в легком и известными клинико-морфологическими характеристиками НМРЛ может, по-видимому, отражать независимый характер этих новых факторов прогноза выживаемости больных НМРЛ, однако в связи с малочисленностью исследованной группы больных требуется дальнейшее изучение этого вопроса.

#### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCE

1. Герштейн Е. С., Костылева О. И., Кушлинский Н. Е. // Вестн. Рос. онкол. науч. центра РАМН. — 1995. — № 2. — С. 51—59.
2. Давыдов М. И., Полоцкий Б. Е. Рак легкого. — М., 1994. — С. 216.
3. Костылева О. И., Герштейн Е. С., Радченко А. А. и др. // Вопр. биол. мед. и фарм. хим. — 1998. — № 1. — С. 30—34.
4. Benraad T. J., Foekens J. F. // Ann. clin. Biochem. — 1990. — Vol. 27 — P. 272—273.

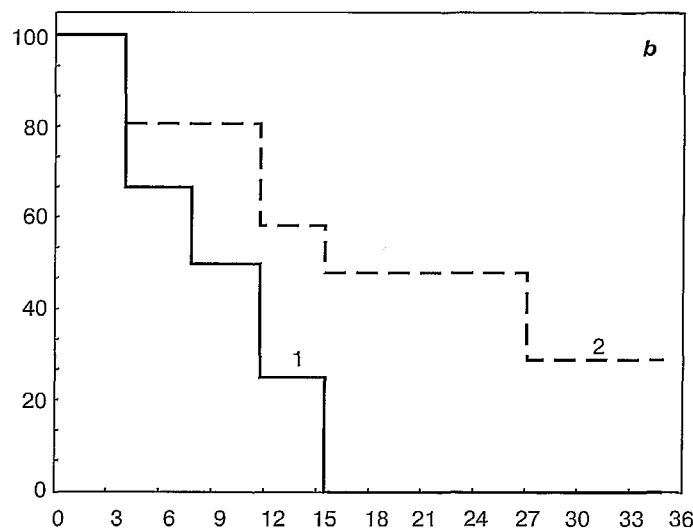
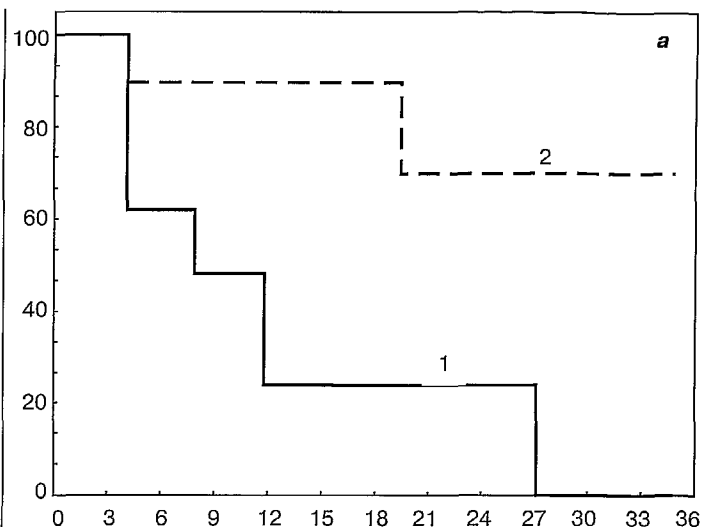


Рис. 5. Влияние РЭФР/ЛИГ-статуса гистологически неизменной ткани легкого на общую (а) и безрецидивную (б) выживаемость больных НМРЛ.

1 — РЭФР<sup>+</sup>ЛИГ<sup>+</sup>; 2 — РЭФР<sup>-</sup>ЛИГ<sup>+</sup>

Fig. 5. Overall (a) and disease-free (b) survival in NSCLC with respect to EGFR/LIG status 1, EGFR<sup>+</sup>LIG<sup>+</sup>; 2, EGFR<sup>-</sup>LIG<sup>+</sup>.

Since at least two components (LIG and its receptor) of local regulation are needed for this mechanism to function it was interesting to analyze clinical value of simultaneous presence of EGFR and EGF-like peptides in tumors and histologically intact lung tissue in NSCLC cases. A predominance (49%) of both EGFR and EGF-like peptide expressions (conventional autocrine phenotype EGFR<sup>+</sup>LIG<sup>+</sup>) was characteristic of tumors in NSCLC, while in histologically intact tissues this phenotype was encountered only in 29% of the cases. The combination EGFR<sup>+</sup>LIG<sup>-</sup> was typical (40%) for the histologically intact lung tissue. The combinations EGFR<sup>-</sup>LIG<sup>-</sup> and EGFR<sup>+</sup>LIG<sup>-</sup> were equally (13%) frequent in lung tumors. Phenotypic elimination of EGFR and/or its LIG in tumors and histologically intact lung tissue was found in 51% and 71% of NSCLC cases, respectively.

We discovered that patients with EGFR<sup>+</sup>LIG<sup>+</sup> tumors had a statistically better ( $p=0.05$ ) disease-free survival than cases

5. Dazzi H., Hasleton P. S., Tratcher N. // Br. J. Cancer. — 1989. — Vol. 59, N 5. — P. 746—749.
6. Harris A. L., Nicholson S., Sainsbury R. et al. // Monogr. natl. Cancer Inst. — 1992. — Vol. 11. — P. 181—187.
7. Johansson A., Rorsman F., Forsberg K. et al. // Anticancer Res. — 1990. — Vol. 10, N 5B. — P. 1373—1374.
8. Klijn J. G., Berns P. M., Schmitz P. I., Foekens J. A. // Endocr. Rev. — 1992. — Vol. 13, N 1. — P. 3—17.
9. Kaiser U., Schardt C., Brandscheidt D. et al. // J. Cancer Res. clin. Oncol. — 1993. — Vol. 119, N 11. — P. 665—668.
10. Pavelic K., Banjac Z., Pavelic J., Spaventi S. // Anticancer Res. — 1993. — Vol. 12 — P. 1133—1138.
11. Pecur L., Kapitanovic S., Soncki Z. et al. // Ibid. — 1994. — Vol. 14. — P. 2839—2844.
12. Perez—Soler R., Donato N. J., Zhang H. Z. et al. // Proc. Annu. Meet. Am. Soc. clin. Oncol. — 1992. — Vol. 11. — P. A828.
13. Sorcher S. M., Russak V., Graziano S. et al. // Mol. Pathol. — 1995. — Vol. 8, N 4. — P. 450—455.
14. Sozzi G., Pastorino U., Miozzo M. et al. // Int. Cancer Chemo Prevent. Conf, 2—nd. — Berlin, 1993. — P. 88.
15. Tateishi M., Ishida T., Mitsudomi T., Sugimachi K. // Br. J. Cancer. — 1991. — Vol. 63. — P. 130—133.
16. Veale D., Kerr N., Gibson G. J., Harris A. L. // Cancer Res. — 1989. — Vol. 49. — P. 1313.
17. Volm M., Efferth T., Mattern J. // Anticancer Res. — 1996. — Vol. 12. — P. 11—20.

Поступила 08.09.99/Submitted 08.09.99

© Коллектив авторов, 2000  
УДК 616.33-006.6-097

М. П. Никулин, А. Б. Итин, В. Ю. Сельчук,  
В. И. Роттенберг

## ЭКСПРЕССИЯ КАРБОГИДРАТНЫХ АНТИГЕНОВ НА КЛЕТКАХ РАКА ЖЕЛУДКА

НИИ клинической онкологии

Кроме общеизвестных групп крови системы АВ0 и Rh-фактора, существует целый ряд подгрупп крови человека, менее известных в клинической трансфузиологии. Среди этих подгрупп можно упомянуть системы групповых антигенов Р, М, N, Келл, Даффи, Лютеран, Люис и др. Наследование большинства указанных групп подчиняется менделевским законам, тип наследования других отличается большой сложностью. В онкологии последние 10—15 лет наиболее интенсивно изучается система антигенов Люис (Lewis). Впервые анти-Lewis-антитела описал Муран в 1946 г. В последующем Уоткинсом и Морганом в результате биохимических исследований установлено, что антигены системы Lewis и АВ0 имеют сходное строение и представляют собой гликопротеиды и гликолипиды, содержащие олигосахаридные цепи.

with EGFR<sup>+</sup>LIG<sup>+</sup> tumors (fig.4). All patients with EGFR<sup>+</sup>LIG<sup>+</sup> tumors developed recurrence within 11 months while disease-free survival of patients with EGFR<sup>+</sup>LIG<sup>+</sup> tumors was 61% to decrease to 16% during month 12 to 19.

As concerns histologically intact lung tissue we managed to analyze only EGFR<sup>+</sup>LIG<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup>LIG<sup>-</sup> combinations (figs.5,a and b). We discovered that overall ( $p=0.002$ ) and disease-free ( $p=0.03$ ) survivals were significantly better in cases with EGFR<sup>+</sup>LIG<sup>-</sup> tumors.

Conclusion. We discovered that expression of EGFR and its LIG both in tumors and histologically intact lung tissue has effect on overall and disease-free survival in NSCLC. Both overall and disease-free survivals were significantly lower in cases with tumors and histologically intact lung tissue expressing both EGFR and EGF-like peptides as compared to cases without one of the components of EGFR-dependent cell growth regulation mechanism. These changes in the overall and disease-free survivals are therefore indicative of a more aggressive course of NSCLC in cases with the presence of both EGFR and its LIG in the patients' lungs.

The absence of relationship between EGFR and its LIG expression in lungs with clinical morphological characteristics of NSCLC may be due to independence of these new factors of survival prognosis in NSCLC. However, this issue requires further analysis because there were too few cases in our study.

M.P.Nikulin, A.B.Itin, V.Yu.Selchuk, V.I.Rottenberg

## CARBOHYDRATE ANTIGEN EXPRESSION ON GASTRIC CANCER CELLS

Institute of Clinical Oncology

There are a number of human blood subgroups that are less studied than the common AB0 and Rh-factor in clinical transfusiology. These subgroups include P, M, N, Kell, Duffy, Luteran, Lewis and other antigens. Most of these groups are inherited in accordance with Mendel laws while some of them demonstrate a much more complicated inheritance pattern. There is an intensive cancer-related study of the Lewis antigens over the last 10-15 years. Anti-Lewis antibody was first described by Murane in 1946. Later Watkins and Morgan performed biochemical investigation to establish that Lewis and AB0 antigens have a similar structure and are glycoproteids and glycolipids containing oligosaccharide chains. These chains consist of 5 monosaccharides such as D-galactose, L-fucose, N-acetyl-D-galactosamine and N-acetylneuraminic