Уушгины жижиг бус эст өмөнгийн эдэд PD-1/PD-L1 уургийн илрэлийг тодорхойлсон дүн

Б.Цэнд-Аюуш[1], Б.Уранчимэг[2], Б.Анархүү[3], Б.Нямжаргал[3], Р.Оргилмаа[4], Э.Баярмаа[1,2], Л.Саямаа[1,2]

[1]АШУҮИС, Био-Анагаахын Сургууль, Эмгэг судлал, Шүүх эмнэлгийн тэнхим
[2]АШУҮИС, Монгол-Японы Эмнэлэг, Эмгэг судлалын тасаг
[3]Хавдар Судлалын Үндэсний Төв, Эмгэг судлалын тасаг
[4]АШУҮИС, Сувилахуйн сургууль, Насанд хүрэгчдийн сувилахуйн тэнхим
Цахим хаяг: tsendayush.batsaikhan@gmail.com, Утас: 94993311

Түлхүүр үг:
CD274
CD279
Поликлонт эсрэгбие
Иммунохистохими

Товч утга: Хавдар судлалын үндэсний төвийн эмгэг судлалын тасагт уушгины жижиг бус эст өмөн оношлогдсон мэс заслын 31 эдийн блокийг түүвэрлэн авч, эдийн микроаррай бэлтгэн, PD-1 (CD279), PD-L1 (CD274) поликлон эсрэгбие ашиглан иммунохистохимийн шинжилгээ хийхэд нэг эд үнэлэх боломжгүй тул хасагдсан. Уушгины өмөнгийн эдэд нэвчсэн Т лимфоцитийн PD-1 уургийн илрэлийг үнэлэхэд эерэг будагдсан 22(73.3%), будагдаагүй 8(26.7%) илрэв. Уушгины жижиг бус эст өмөнгийн эсэд PD-L1 уургийн илрэлийг үнэлэхэд эерэг будагдсан 24(80.0%), огт будагдаагүй 6(20%) тус тус үнэлэгдсэн. PD-L1 уургийн нийлэгжил нь хавдрын үе шатаас хамааран ач холбогдол бүхий ялгаатай тодорхойлогдсон ($p<0.05$) бол хавдрын хистологи хэвшинж, хавдрын зэрэглэлтэй ач холбогдол бүхий ялгаа илэрсэнгүй. Уушгины жижиг бус эст өмөнгийн эдийн 80% нь PD-L1 эерэг, 73.3% нь PD-1 эерэг тодорхойлогдсон тул хистологи хэвшинжээс үл хамааран дархлаа эмчилгээг нэвтрүүлэх боломжтой.

Үндэслэл: PD-1/PD-L1 дарангуйлагчид нь дасан зохицох дархлааг дарангуйлах замын эсрэг үйлчилж дархлааны хяналтын цэгийг хориглодог.[1] PD-1 ба PD-L1 нь дархлаа зохицуулгад чухал үүрэгтэйгээс гадна Т эсийн идэвхжил ба дарангуйллаар зохицуулагддаг захын дархлаа тэвчилийг бий болгоно.[2] PD-1/PD-L1 ингибиторууд уушгины жижиг бус эст өмөнгийн (NSCLC) эмчилгээнд маш их ирээдүйтэй эмчилгээ гэж тооцогдож байна. Уушгины хавдрын эдэд PD-1/PD-L1 уургийн илрэлийг тодорхойлж, дархлаа эмчилгээг хэрэглэх боломж, эмчилгээний үр дүнг тооцох судалгаанууд олноор хийгдэж байна.[3] Одоогийн байдлаар олон төрлийн хавдрын эмчилгээнд хэрэглэх боломжтой PD-1 ба PD-L1-ийг онилсон 5 төрлийн дархлааны хяналтын цэгийн ингибиторуудыг АНУ-ын Хүнс, эмийн удирдлагын газраас хүлээн зөвшөөрсөн нь хорт хавдрын эмчилгээг шинэ эрин үе рүү урагшлуулж байна.[4] Манай улсад дархлаа эмчилгээний аргыг нутагшуулахын тулд уушгины хавдар оношлогдож буй эдэд PD-1/PD-L1 уургийн илрэлийг судлах шаардлагатай байна.

Зорилго: Жижиг бус эст өмөн бүхий уушгины эдэд PD-1/PD-L1 уургийн илрэлийг иммунохистохимийн аргаар тодорхойлж, эмгэг судлалын зарим үзүүлэлттэй уялдуулан судлах

Арга, аргачлал: Бид Хавдар судлалын үндэсний төв (ХСҮТ)-ийн Эмгэг судлалын тасагт 2017-2020.11 сарын хооронд уушгины жижиг бус эст өмөн оношлогдсон мэс заслын 31 сорьцын лааны тосон цутгамагийг түүвэрлэн авч, тус бүрээс 3 мм голчтой эдийн микроаррай бэлтгэн, иммунохистохимийн PD-1/PD-L1 поликлон эсрэгбиесийг ашиглан будаж, шилэн слайдыг гэрлийн микроскопт харж үнэлсэн. Хавдрын эд орчмын дархлааны эсэд PD-1, өмөнгийн эсэд PD-L1 уургийн илрэлийг будагдсан эсийн тоогоор буюу <1% бол сөрөг, эерэг үнэлгээг ≥1%, ≥25%, ≥50% гэж ангилан, нийт 4 бүлэг болгосон. Хэт жижиг, үнэлэх боломжгүй тул нэг эд үнэлгээнээс хасагдсан. Үр дүнгийн статистик боловсруулалтыг STATA 12.0 программын тойм статистик, Хи квадрат тест, one-way ANOVA анализ цэс ашиглан гүйцэтгэхдээ $p<0.05$ үед статистик ач холбогдолтой гэж үзлээ.

Үр дүн: Бидний судалгаанд хамрагдсан 30 эмчлүүлэгчийн дундаж нас 63±9.2, үүнээс эрэгтэй 23(76.7%), эмэгтэй 7(23.3%) байв. Уушгины жижиг

бус эст өмөнг хистологийн дэд хэвшинжээр ангилбал 22(73.3%) нь хавтгай эст өмөн, 8(26.7%) нь булчирхайлаг эст өмөн байв. TNM үе шатаар ангилахад I шатанд 10(33.3%), II шатанд 14(46.7%), III шатанд 6(20%), IV шатанд 1(3.3%) оношлогдов.

PD-1 уургийн илрэлийг хавдарт нэвчсэн Т лимфоцитийн будагдалтын тоогоор үнэлэхэд 8(26.7%) нь будагдсан эсийн тоо <1% буюу сөрөг, үлдсэн 22(73.3%) нь эерэг будагдалт үзүүлсэнээс 13(43.3) нь 1-25%, 1(3.3%) нь 25-50%, 8(26.7%) нь 50-иас дээш хувь будагдсан (Зураг 1). PD-L1 уургийн илрэлийг хавдрын эсэд тодорхойлоход судалгаанд хамрагдсан сорьцын 6(20.0%)-д нь будагдаагүй буюу сөрөг, 24(80.0%) нь эерэг илэрсний 9(30.0%) нь 1-25%, 5(16.7%) нь 25-50%, 10(33.3%) нь 50-иас дээш хувьтай будагдсан үр дүн гарсан (Зураг 1).

PD-1 уургийн илрэлийг өмөнгийн хэлбэртэй харьцуулан судлахад хавтгай эст өмөнгийн 16(69.6%) нь, булчирхайлаг эст өмөнгийн 6(85.7%) нь эерэг үр дүн үзүүлсэн нь статистик ач холбогдол бүхий (p=0.39) ялгаагүй байлаа.

Сайн ялгаралтай өмөнгийн 4(66.7%), дунд зэргийн ялгаралтай өмөнгийн 13(76.5%), муу ялгаралтай өмөнгийн 5(71.4%) нь эерэг тодорхойлогдсон нь PD-1 уургийн нийлэгжил хавдрын зэрэглэлээс хамаарсан статистик ач холбогдол бүхий (p=0.88) ялгаагүй байв (Хүснэгт 1).

Хүснэгт 1. PD-1 уургийн нийлэгжлийг хавдрын хистологийн хэвшинж, зэрэглэл болон үе шаттай харьцуулсан дүн (хувиар)

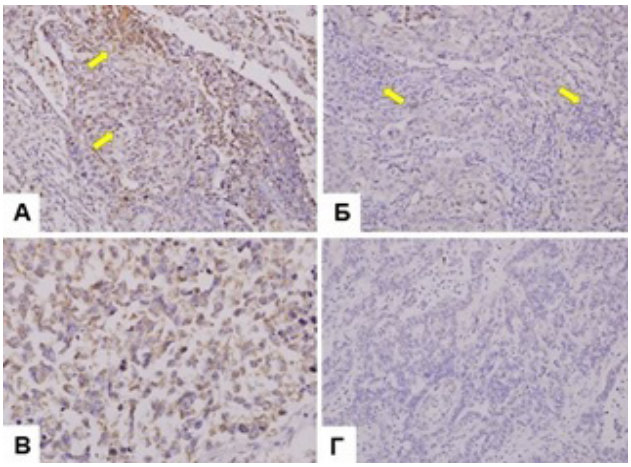
		PD-1		*p* утга
		Сөрөг	Эерэг	
Хистологийн хэвшинж	Хавтгай эст өмөн	7 (30.4%)	16 (69.6%)	*0.39*
	Булчирхайлаг эст өмөн	1 (14.3%)	6 (85.7%)	
Хавдрын зэрэглэл	Сайн	2 (33.3%)	4 (66.7%)	*0.88*
	Дунд	4 (23.5%)	13 (76.5%)	
	Муу	2 (28.6%)	5 (71.4%)	
Хавдрын үе шат	I	3 (30.0%)	7 (70.0%)	*0.37*
	II	3 (21.4%)	11 (78.6%)	
	III	1 (20.0%)	4 (80.0%)	
	IV	1 (100%)	0 (0%)	

I шатны 7 (70.0%) нь, II шатны 11 (78.6%), III шатны 4 (80.0%) хавдарт PD-1 уургийн илрэл эерэг будагдсан (p=0.37) бол PD-L1 уургийн илрэл I шатны 10 (100%), II шатны 11 (78.6%), III шатны 2 (40.0%), IV шатны 1 (100%) хавдарт эерэг будагдалт үзүүлсэн нь статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай (p=0.05) байлаа (Хүснэгт 2).

Хүснэгт 2. PD-L1 уургийн нийлэгжлийг хавдрын хистологийн хэвшинж, зэрэглэл болон үе шаттай харьцуулсан дүн (хувиар)

		PD-L1		*p* утга
		Сөрөг	Эерэг	
Хистологийн хэвшинж	Хавтгай эст өмөн	4 (17.4%)	19 (82.6%)	*0.51*
	Булчирхайлаг эст өмөн	2 (28.6%)	5 (71.4%)	
Хавдрын зэрэглэл	Сайн	1 (16.7%)	5 (83.3%)	*0.81*
	Дунд	3 (17.6%)	14 (82.4%)	
	Муу	2 (28.6%)	5 (71.4%)	
Хавдрын үе шат	I	0 (0%)	10 (100%)	***0.05***
	II	3 (21.4%)	11 (78.6%)	
	III	3 (60.0%)	2 (40.0%)	
	IV	0 (0%)	1 (100%)	

Судалгаанд хамрагдсан хавтгай эст өмөнгийн 19(82.6%), булчирхайлаг эст өмөнгийн 5(71.4%)-д нь (p=0.51), сайн ялгаралтай 5(83.3%), дунд ялгаралтай 14(82.4%), муу ялгаралтай 5(71.4%) өмөнгийн сорьцод PD-L1 уургийн илрэл эерэг үнэлэгдсэн (p=0.81) бөгөөд хавдрын хистологи хэвшинж ба зэрэглэл хооронд статистик ач холбогдол бүхий ялгаа ажиглагдсангүй (Хүснэгт 2). PD-L1 будагдалтад хавдрын үе шат (F(6.23)=0.75 p=0.6) ба хистологийн дэд хэвшинжээс (F(1.28)=0.28 p=0.6) хамаарах статистик ач холбогдол бүхий ялгаа ажиглагдсангүй.



Зураг 1. PD-1 ба PD-L1 уургийн илрэл.
(А) Хавдар орчмын дархлааны эсүүдийн цитоплазм ба мембран PD-1-т эерэг будагдсан байдал (бор өнгөөр, сумаар заасан, өсгөлт x200). (Б) Хавдар орчмын дархлааны эсүүд PD-1-т будагдаагүй байдал (сумаар, өсгөлт x200). (В) Хавдрын эсүүд PD-L1-т цитоплазмын эерэг будагдсан байдал (бор өнгөөр, өсгөлт x400). (Г) Хавдрын эсүүд PD-L1-т будагдаагүй байдал (өсгөлт x200).

PD-1 ба PD-L1 уургийн нийлэгжил хооронд статистик ач холбогдол бүхий (chi2=0.17; p=0.68) ялгаатай байдал ажиглагдсангүй (Хүснэгт 3).

Хүснэгт 3. PD-1 ба PD-L1 уургийн нийлэгжлийн харилцан хамаарлын дүн (хувиар)

PD-1	PD-L1		*p* утга
	Сөрөг	Эерэг	
Сөрөг	2 (25.0%)	6 (75.0%)	*0.68*
Эерэг	4 (18.2%)	18 (81.8%)	

Хэлцэмж: Omori нарын 2018 оны судалгаанд уушгины жижиг бус эст өмөн оношлогдсон 76 өвчтөн хамрагдан, хавдрын эсрэг эмчилгээ хийлгэхээс өмнө ба дараа PD-L1 уургийн илрэлийг үнэлсэн. Будагдалтаар нь 0%, 1-49%, 50%-иас дээш гэсэн 3 бүлэгт хуваж, сүүлийн 2 бүлгийг эерэг гэж дүгнэн, эмчилгээний өмнө ба дараах будагдалтын ялгаатай байдлыг тодорхойлсон. Хавдрын эсрэг эмчилгээ хийхээс өмнө 38(50%)-д, эмчилгээний дараа 36(47%)-д нь PD-L1 уураг эерэг илэрсэн бөгөөд эмчилгээний өмнө ба дараах ялгаатай байдал нь 38%-тай байсан.[5] Шинижилгээний эерэг үр дүн 50%-иас дээш байгаа нь бидний судалгааны үр дүнтэй дүйж байна.

Э.Түмэнжин нарын 2018 оны судалгаанд бүдүүн шулуун гэдэсний хавдрын мэс засал хийлгэсэн 116 өвчтөн хамрагдан, PD-1 ба PD-L1 уургийн илрэлийг тодорхойлоход 39(33.6%) ба 52(44.8%) нь эерэг үр дүнтэй байсан. Уургийн илрэл өндөр байх нь тавилан муутайг илэрхийлэхээс гадна TGF-β, Foxp3-ийн илрэл өндөр байхтай хамааралтай. PD-1 ба PD-L1-т чиглэсэн дархлаа эмчилгээ нь бүдүүн шулуун гэдэсний

хавдартай өвчтөнүүдэд туслах эмчилгээний арга болох боломжтой гэж үзсэн байна.[6] Бидний судалгааны түүврийн хэмжээ бага боловч, уургийн илрэлийн эерэг үр дүн 70-80%-тай байгаа нь дархлаа эмчилгээг нэвтрүүлэх боломжтойг харуулж байна.

Р.Оргилмаа нарын уушгины жижиг эст өмөнгийн эмчилгээнд дархлааны хяналтын цэгийн ингибиторуудыг ашиглах боломж ба бэрхшээлтэй талыг судалсан 2019 оны тойм өгүүлэлд үсэрхийлэл өгсөн жижиг эст өмөнгийн эмчилгээнд ниволумабыг (PD-1-н эсрэг моноклон эсрбэгбие) хэрэглэх нь эмчилгээний үр дүн өндөртэй байгаа бөгөөд уушгины жижиг эст өмөнтэй өвчтөнүүдийн хавдрын дархлаа эмчилгээний сонголтод тактик боловсруулагдан гарна гэсэн өндөр хүлээлт бүхий олон судалгаа эмнэлзүйн туршилтын шатандаа явж байгааг дурдсан байгаагаас[7] үзвэл хавдрын дархлаа эмчилгээ өргөн хүрээний өндөр үр дүн үзүүлж эхлээд байгаа бөгөөд манай улсад ч мөн эмчилгээний шинэ аргыг нэвтрүүлэх, нутагшуулах хэрэгцээ үүсч байна.

Kim Hyojin нарын 2018 оны тойм өгүүлэлд худалдаанд гарсан иммунохистохимийн эсрэгбиесийн автомат будгийн протокол, илрүүлэх систем ба PD-L1 уургийн илрэлийн эерэг будагдалтыг үнэлэх босгын ялгаатай байдал зэрэг нь эмгэг судлаачдыг мухардалд оруулж байгаагаас гадна зарим эсрэгбие нь биомаркерын (EGFR, ALK) тестүүдтэй хавсарч хэрэглэхийг шаардаж байгаа нь шинжилгээний боломжийг хязгаарлаж байгааг дурджээ. Ийм учраас PD-L1-н эсрэгбиеүдийн үр дүнг стандартчилах төслүүд хэрэгжиж эхлээд байгааг тэмдэглэсэн байна.[3]

Зарим судалгаагаар жижиг бус эст өмөнгийн эдэд илрэх PD-L1 будгийн эерэг үр дүн нь PD-1/PD-L1-ийн моноклон эсрэгбиеийн эмчилгээний хариу урвалыг таамаглахаас гадна тавиланг тодорхойлох биомаркер болох чадвартай нь тодорхой болсон[8] байхад, зарим судалгаанд PD-L1-н хэт өндөр илрэл эмчилгээний хариу урвалыг таамаглах, тавилангийн биомаркер болж чадахгүй гэж тэмдэглэсэн байна.[9] Ийм ялгаатай үр дүн нь шинжилгээний арга, ашигласан эсрэгбиеийн клон, эерэг байдлыг тодорхойлох хязгаарын утга, PD-L1 илрэлийн хетероген байдал ба байршил (хавдрын эсүүд, дархлааны эсүүд) зэрэг уургийн илрэлийг үнэлэх хэлбэлзэл ба тайлбарлах субъектив байдлын ялгаатай байдлаас шалтгаалсан байж болно[10] гэж таамаглаж байна.

Дүгнэлт: Жижиг бус эст өмөнгийн эдэд PD-1 уургийн илрэл 73.3%, PD-L1 уургийн илрэл 80.0%-д эерэг тодорхойлогдсон тул хистологи хэвшинжээс үл хамааран дархлаа эмчилгээг нэвтрүүлэх боломжтой. PD-L1 уургийн илрэл хавдрын үе шатаас хамаарч статистик ач холбогдол бүхий (p=0.05) ялгаатай байлаа.

Ном зүй:

1. *Constantinidou, A., Alifieris, C. & Trafalis, D. T. Targeting Programmed Cell Death -1 (PD-1) and Ligand (PD-L1): A new era in cancer active immunotherapy. Pharmacol. Ther. 194, 84–106 (2019).*
2. *Flies, D. B. & Chen, L. The new B7s: Playing a pivotal role in tumor immunity. Journal of Immunotherapy vol. 30 (2007).*
3. *Kim, H. & Chung, J. H. PD-L1 Testing in Non-small Cell Lung Cancer: Past, present, and future. Journal of Pathology and Translational Medicine vol. 53 (2019).*
4. *Xia, L., Liu, Y. & Wang, Y. PD-1/PD-L1 Blockade Therapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Current Status and Future Directions. Oncologist 24, (2019).*
5. *Omori, S. et al. Changes in programmed death ligand 1 expression in non-small cell lung cancer patients who received anticancer treatments. Int. J. Clin. Oncol. 23, (2018).*
6. *Enkhbat, T. et al. Programmed cell death ligand 1 expression is an independent prognostic factor in colorectal cancer. Anticancer Res. 38, 3367–3373 (2018).*
7. *Regzedmaa, O., Zhang, H., Liu, H. & Chen, J. Immune checkpoint inhibitors for small cell lung cancer: Opportunities and challenges. Onco. Targets. Ther. 12, 4605–4620 (2019).*
8. *Sun, J. M. et al. Prognostic significance of PD-L1 in patients with non-small cell lung cancer: A large cohort study of surgically resected cases. in Journal of Thoracic Oncology vol. 11 (2016).*
9. *Sorensen, S. F. et al. PD-L1 expression and survival among patients with advanced non–small cell lung cancer treated with chemotherapy. Transl. Oncol. 9, (2016).*
10. *Gao, S. S. et al. Therapy Line and Associated Predictors of Response to PD-1/PD-L1-Inhibitor Monotherapy in Advanced Non-small-Cell Lung Cancer: A Retrospective Bi-centric Cohort Study. J. Thorac. Oncol. 8, 2220–2229 (2019).*

Determination of PD-1 / PD-L1 protein expression in non-small cell lung cancer

Tsend-Ayush B[1], Uranchimeg B[2], Anarkhuu B[3], Nyamjargal B[3], Orgilmaa R[4], Bayarmaa E[1,2], Sayamaa L[1,2]

[1]Department of Pathology and Forensic Medicine, School of Bio-Medicine, MNUMS
[2]Department of Pathology, Mongolia-Japan teaching hospital, MNUMS
[3]Department of Pathology, National Cancer Center
[4]Department of Adult Nursing, School of Nursing, MNUMS
Email: tsendayush.batsaikhan@gmail.com, Tel: 94993311

Methods: In the pathology department of the National Cancer Center, 31 surgical tissue blocks diagnosed with non-small cell lung cancer were sampled, tissue microarrays were prepared, and immunohistochemical analysis was performed using polyclonal antibodies PD-1 (CD279) and PD-L1 (CD274). One specimen was excluded because it was not possible to evaluate.
Results: Evaluation of T-lymphocyte PD-1 protein expression in lung cancer tissue revealed positive staining 22 (73.3%), and no staining 8 (26.7 %) was detected. Evaluation of PD-L1 protein expression in non-small lung cancer cells 24 (80.0%) and not stained 6 (20.0%) were evaluated, respectively. PD-L1 protein expression was determined to be significantly different depending on the stage of the tumor ($p < 0.05$), but no significant differences were found in the histology of the tumor and the grade of the tumor.
Conclusion: Since 80% of non-small lung cancer cells are PD-L1 positive and 73.3% are PD-1 positive, it is possible to introduce immunotherapy regardless of histological pattern.

Keyword: CD274, CD279, polyclonal antibody, immunohistochemistry