

УДК 617.77-006.6-097-092.18

И.А. Сафроненкова, В.А. Елагина

ОСОБЕННОСТИ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ОНКОБЕЛКОВ P53, VCL-2 И АНТИГЕНОВ CD95, ИПО38 У БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ ОПУХОЛЯМИ КОЖИ ВЕК

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П.Филатова НАМН Украины», г. Одесса, Украина

Резюме. Изучена экспрессия маркерных белков P53, Vcl-2 и антигенов CD95, ИПО38 в биоптатах 185 больных злокачественными эпителиальными опухолями (ЗЭО) кожи век. Установлена статистически значимая сопряженность экспрессии Vcl-2 со стадией опухолевого процесса, позитивная реакция которого выявляется в T_{2a} стадии (79,4 %). Коэкспрессия P53 и Vcl-2 при иммунофенотипе P53 (+) / Vcl-2 (+) является важным прогностическим маркером агрессивного поведения ЗЭО и может служить предиктором развития реци-

дивов. Высокая вероятность развития рецидивов зависит от характера и уровня экспрессии Vcl-2 и CD95: при Vcl-2 >10 % и негативной экспрессии CD95 в 98,9 % случаях прогнозируется рецидив опухоли; при индексе Vcl-2/CD95 >1.0 возможность развития рецидивов увеличивается в 21,5 раз.

Ключевые слова: злокачественные эпителиальные опухоли кожи век, P53, Vcl-2, CD95, ИПО38, прогноз рецидивов.

Введение. Актуальность проблемы злокачественных эпителиальных опухолей (ЗЭО) кожи век определяется высокими темпами роста во всем мире [8, 13] и высоким удельным весом (65-70 %) среди всех злокачественных опухолей органа зрения [8]. Несмотря на относительно благоприятное течение и многообразие методов лечения (хирургический, лучевой, лазерный, криодеструкция, комбинированный) частота рецидивов ЗЭО кожи век варьирует от 2, 2 до 30 % [1, 8].

Одним из возможных подходов к прогнозированию течения и оптимизации методов лечения злокачественных новообразований может рассматриваться изучение молекулярно-биологических маркеров опухоли, влияющих на ее биологические свойства [13]. Данные литературы свидетельствуют, что патогенез неоплазий связан с неспособностью опухолевых клеток подвергаться апоптозу. Одним из механизмов нарушения апоптоза являются мутации в генах, контролирующих этот процесс. Примерами подобных аномалий являются хорошо изученные гиперэкспрессия гена Vcl-2, тормозящего апоптоз, мутации в гене P53, препятствующие функционированию кодируемого им белка как индуктора апоптоза и уменьшение экспрессии CD95 [4, 5].

Пролиферативная активность является ведущим фактором, как в механизме злокачественной трансформации клеток, так и в биологическом поведении уже возникших опухолей. Представление о кинетике пролиферативных процессов постоянно расширяется и уточняется. Исследование особенностей пролиферации опухолевых клеток у больных с различными новообразованиями используется для прогноза течения заболевания и коррекции схем лечения. Имеются работы, результаты которых свидетельствуют про наличие корреляции между интенсивностью пролиферативного процесса и течением заболевания, а так же эффективностью проводимой лучевой терапии (ЛТ) [2, 6, 9, 13]. Однако согласованного мнения о прогностическом значении экспрессии

онкобелков P53 и Vcl-2 и антигенов CD95 и ИПО38 и сочетание этих факторов при ЗЭО кожи век не получено [4, 5, 10, 11, 12, 15, 16].

Цель исследования. Изучить особенности и прогностическое значение экспрессии онкобелков P53 и Vcl-2 и антигенов CD95 и ИПО38 при ЗЭО кожи век.

Материал и методы. Исследован биопсийный материал от 185 пациентов ЗЭО кожи век (81 мужчина и 104 женщины) в возрасте от 34 до 89 лет (M=64,3, SD=11,1) получавших комбинированное лечение (лучевая терапия+криодеструкция) в ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П.Филатова АМН Украины» с 1998 по 2008 г. Базальноклеточный рак был у 156 (84,3 %) пациентов, плоскоклеточный – у 17 (9,2 %), метатипический – у 12 (6,5 %). Стадию заболевания определяли по Международной классификации TNM (7-е издание, 2010 г.). С T_{2a} стадией было 34 больных, T_{2b} – 72, T_{3a} – 73, T_{3b} – 6. Рецидив развился у 34 больных в сроки от 1 до 6 лет.

Иммуногистохимические исследования проведены в ГУ «Институте патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины» (г. Киев) у 185 больных ЗЭО кожи век до начала лечения. Применялись моноклональные антитела (МКАТ): Cytokeratin (clon MNF116), Vcl-2 (clon 124), p53 (clon DO-7), CD95/Fas (clon XD2) фирмы Dako Cytomation, Дания и ИПО-38 (ГУ Институт патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины). Для иммуногистологического исследования использовались парафиновые срезы биоптатов ЗЭО кожи век толщиной 4-6 мкм.

Для визуализации комплекса антиген-антитело использовался непрямой иммунопероксидазный метод, где активность пероксидазы определялась при помощи 3-диаминобензидин тетрагидрохлорида (ДАБ) (фирма Даксо, Дания). Срезы ткани опухоли докрашивали гематоксилином, помещали в бальзам и исследовали под световым

микроскопом. В качестве отрицательного контроля использовался физиологический раствор, в качестве положительного – Cytokeratin. Положительным результатом считалось наличие специфического коричневого окрашивания цитоплазмы при выявлении экспрессии Cytokeratin и Bcl-2, ядра – при экспрессии p53 и ИПО38, поверхностной мембраны и цитоплазмы – при CD95. Степень экспрессии МКАТ оценивали полуколичественным способом, учитывая долю окрашенных клеток и интенсивность окрашивания. Результаты интерпретировали по следующим критериям: (-) – реакция отсутствует (<10 %, а для p53 – <20 %), (+) – умеренная окраска незначительной доли клеток (11-30 %), (++) – умеренное или сильное окрашивание 31-50 % клеток, (+++) – сильное окрашивание большинства опухолевых клеток (>51 %). Количественное содержание оценивали по процентному соотношению числа позитивных клеток к общему числу опухолевых клеток в поле зрения.

Для сравнения двух связанных и несвязанных величин использовался *t* – критерий Стьюдента (для параметрических данных). Для сравнения двух связанных величин применялся критерий Манн-Уитни (для непараметрических данных). Корреляционный анализ проведен с использованием коэффициента Пирсона (для параметрических данных) и коэффициента Спирмана (для непараметрических данных). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Для анализа точности диагностического теста при двух альтернативных состояниях (рецидив – без рецидива) использован ROC – анализ (Receiver Operating Characteristic analysis) с построением ROC – кривых. ROC – кривая – это характеристическая кривая зависимости чувствительности (sensitivity) от специфичности (specificity). Оптимальным является сочетание максимальных значений чувствительности и специфичности. Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью программы «Statistica 9.0», ROC анализ выполнен с использованием программы MedCalc 9 (Demo).

Результаты исследования и их обсуждение. P53 (+) опухолей было 105 (56,8 %). Уровень экспрессии был вариабелен: слабая, умеренная и выраженная экспрессия отмечалась соответственно в 27 (25,7 %), 47 (44,8 %) и 31 (29,5 %) случаях. Bcl-2 позитивная реакция обнаружена в 92 (49,7 %). При Bcl-2 (+) случаях – в 23 (25,2 %) – уровень экспрессии был слабым, в 33 (36,3 %) – умеренным и выраженным – в 35 (38,5 %). Позитивная экспрессия CD95 установлена в 95 (51,4 %) случаях, а ИПО38 – в 148 (80,5 %). Слабая, умеренная и выраженная экспрессия отмечались соответственно для CD95 – в 33 (34,7 %), 40 (42,1 %) и 22 (23,2 %) случаев, для ИПО38 – в 25 (16,9 %), в 50 (33,8 %) и в 73 (49,3 %) соответственно.

Проведенный анализ показал, что характер экспрессии P53, Bcl-2, CD95 и ИПО38 в клетках ЗЭО кожи век не зависит от того, была ли на мо-

мент начала лечения первичная опухоль или рецидив, а также от локализации, размера опухоли и от локального контроля.

Экспрессия протеина Bcl-2 статистически значимо связана со стадией процесса ($p=0,0009$), тогда как для P53, CD95 и ИПО38 эта связь отсутствует. Наиболее чаще экспрессия Bcl-2 наблюдалась в T2a стадии (79,4 %) и понижалась к T2в и T3a стадиям соответственно до 43,1 % и 45,2 %. В T3в стадии она составила лишь 16,7 %.

В исследуемой группе больных ЗЭО кожи век ($n=185$) рецидивы заболевания наблюдались в 34 случаях. Из них, в 31 (91,2 %) случае выявлены P53 – позитивные опухоли, в 33 (97,1 %) – Bcl-2 позитивные клетки. В 30 (88,2 %) случаях была положительная экспрессия ИПО38. Экспрессия CD95 была отрицательной во всех случаях рецидива ЗЭО кожи век.

Таким образом, для рецидивов ЗЭО кожи век характерна положительная экспрессия P53, Bcl-2 и отрицательная экспрессия CD95. Эта связь – статистически значима (соответственно $p=0,0000$, $0,0001$ и $0,0000$). Для характера экспрессии ИПО38 наличие статистически значимой связи не установлено.

Нами также исследована взаимосвязь P53 и Bcl-2 экспрессий (коэкспрессия) и ее ассоциация с рецидивом. Установлено, что большинство рецидивов – 22 (64,7 %) из 34, возникло при иммунофенотипе P53 (+)/Bcl-2 (+), и, как показал анализ, это статистически значимо выше, чем при других фенотипах ($p < 0,0003$).

Для оценки возможности прогноза рецидива ЗЭО кожи век по уровню экспрессии Bcl-2, P53, CD95 и ИПО38 нами применен ROC- анализ с построением ROC – кривых. В нашем случае ROC – кривые построены на основе относительных (%) показателей уровня экспрессии Bcl-2, P53, CD95 и ИПО38. Информативность теста определяется тем, насколько высоко лежит его характеристическая кривая, то есть, чем дальше находится кривая от диагонали, тем больше площадь под кривой и выше информативность.

Как следует из данных рис. 1, при построении ROC – кривой для P53 была определена точка разделения позитивного теста (35 %). При уровне экспрессии P53 больше 35 % чувствительность теста составляет 67,7 %, а специфичность – 78,7 %. Площадь под ROC – кривой составляет 0,78 ($p=0,0001$). Площадь под ROC – кривой для ИПО38 составляет 0,66 %, а точка разделения позитивного теста равна 75 %. При уровне экспрессии ИПО38 >75 %, чувствительность теста равна 50,0 %, а специфичность – 79,3 %.

Таким образом, при совместном использовании значений уровня экспрессии онкобелка P53 и антигена ИПО38, в случае положительной реакции (P53 >5 % и ИПО38 >75 %) обеспечивается специфичность (отсутствие рецидива ЗЭО кожи век) в 92,2 %.

Для Bcl-2 – площадь под ROC – кривой составляет 0,83 ($p=0,0001$). Точка разделения пози-

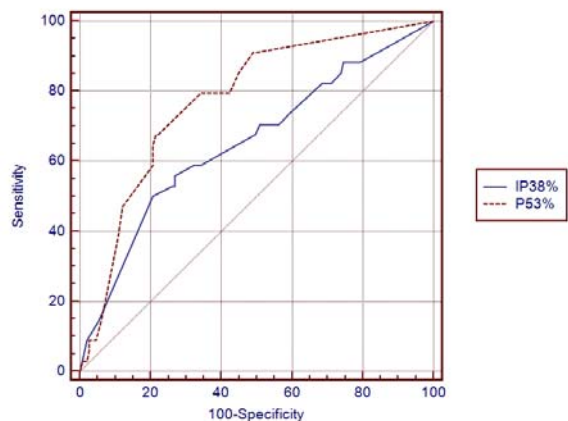


Рис. 1. ROC – кривая информативности экспрессии ИПО38 и P53 в клетках опухоли больных ЗЭО кожи век с рецидивом и без рецидива

тивного теста равна 10 %. Следовательно, при уровне экспрессии Bcl-2 > 10 % чувствительность теста составляет 97,6 %, а специфичность – 66,2 %. Для CD95 площадь под ROC – кривой составляет 0,77 %. Точка разделения негативного теста ≤ 10 %. Следовательно, при уровне экспрессии CD95 ≤ 10 %, чувствительность теста составляет 99,9 %, а специфичность – всего 52,9 % (рис. 2).

Следовательно, при совместном использовании значений уровня экспрессии онкобелка Bcl-2 и антигена CD95, в случае позитивной реакции Bcl-2 (> 10 %) и негативной CD95 (≤ 10 %) обеспечивает чувствительность (вероятность рецидива ЗЭО кожи век) в 98,8 %, что может служить прогностическим тестом развития рецидива.

Известный постулат, согласно которому баланс про- и антиапоптотических факторов определяют поведение опухоли, мы проверили введя индекс Bcl-2/CD95. Нами установлено, что из 34 рецидивов ЗЭО кожи век в 31 (91,2 %) случае отмечен высокий индекс Bcl-2/CD95 (> 1.0). Это свидетельствует о том, что при рецидивах происходит угнетение проапоптотического и доминирование антиапоптотического фактора, что отражается в индексе их соотношения. Вычисление отношения шансов (Odds Ratio) – отношение вероятности развития рецидива ЗЭО век к вероятности того, что этот рецидив не произойдет, показало, что наличие индекса Bcl-2/CD95 > 1.0 может рассматриваться как фактор риска развития рецидива ЗЭО кожи век, при этом шансы его развития повышаются в 21,5 раза (OR=21,5, 95 % ДИ 6,3 ÷ 73,8).

Выводы

1. При злокачественных эпителиальных опухолях кожи век положительная экспрессия протеина Bcl-2 статистически значимо связана со стадией опухолевого процесса. Наиболее чаще Bcl-2 позитивные клетки наблюдаются в T_{2a} стадии (79,4 %).

2. Коэкспрессия P53 и Bcl-2 при иммунофенотипе P53 (+) / Bcl-2 (+) является важным при-

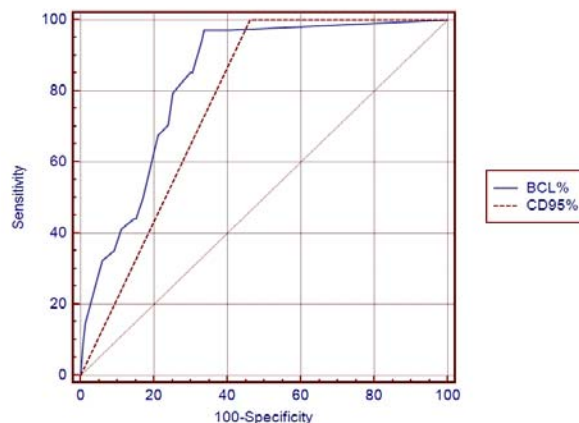


Рис. 2. ROC – кривая информативности экспрессии Bcl-2 и CD95 в клетках опухоли больных ЗЭО век с рецидивом и без рецидива

знаком развития рецидива злокачественных эпителиальных опухолей кожи век.

3. Высокая вероятность развития рецидива опухоли у больных злокачественными эпителиальными опухолями кожи век связана с характером и уровнем экспрессии Bcl-2 и CD95. При Bcl-2 > 10 % и отрицательной экспрессии CD95 в 98,9 % случаев прогнозируется рецидив опухоли.

4. При индексе Bcl-2/CD95 > 1,0 вероятность развития рецидива злокачественных эпителиальных опухолей кожи век повышается в 21,5 раз.

Перспективы дальнейших исследований.

Изученные молекулярно – биологические маркеры злокачественных эпителиальных опухолей кожи век – P53, Bcl-2 и CD95 перспективны не только для изучения прогноза заболевания, но и для коррекции схем лечения.

Литература

1. Буйко А.С. Эпителиальные злокачественные опухоли век стадии T₃₋₄: комбинированное лечение или скальпель? / А.С. Буйко, И.А. Сафроненкова, О.В. Питерова // Офтальмол. ж. – 2002. – № 1. – С. 30-34.
2. Голдобенко Г.В. Факторы прогноза и возможность индивидуализации лучевого лечения онкологических больных / Г.В. Голдобенко, С.В. Канав // Вопр. онкол. – 2000. – Т. 46, № 3. – С. 361-365.
3. Горбань Н.А. Экспрессия антигена Ki-67 и белка P53 как показателей агрессивности течения плоскоклеточного рака гортани / Н.А. Горбань, В.П. Тен, В.А. Панкратов // Вопр. онкол. – 2007. – Т. 53, № 6. – С. 668-673.
4. Канцерогенез: [Руководство] / Д.Г. Заридзе, Г.И. Алев, А.Д. Альтштейн, Г.А. Белицкий. – М.: Медицина, 2004. – 576 с.
5. Колесник А.П. Молекулярные маркеры прогрессирования колоректального рака / А.П. Колесник, И.Д. Паламарчук, А.М. Сидоренко // Онкология. – 2006. – № 1. – С. 13-17.
6. Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза / Б.П. Ко-

- пнин // Биохимия. – 2000. – Т. 65, Вып. 1. – С. 5-33.
7. Молочков В.А. Проблемы и перспективы развития дерматологии / В.А. Молочков, А.М. Вавилов, А.В. Молочков // Рос. ж. кож. и венер. болезней. – 2004. – № 3. – С. 4-7.
 8. Офтальмоонкология : Руководство для врачей / [Бровкина А.Ф., Вальский В.В., Гусев Г.А. и др.] ; под ред. А.Ф. Бровкиной. – М.: Медицина, 2002. – 424 с.
 9. Пожарисский К.М. Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний / К.М. Пожарисский, Е.Е. Леенман // Арх. патол. – 2000. – № 5. – С. 3-11.
 10. Characterization of p53 gene mutations in basal cell carcinomas: comparison between sun-exposed and less-exposed skin areas / Y. Matsu-mura, C. Nishigori, T. Yagi [et al.] // Int. J. Cancer. – 1996. – Vol. 65. – P. 778-780.
 11. Immunohistochemical nuclear staining for p53, PCNA and Ki-67 in different histologic variants of basal cell carcinoma / T.L. Barrett, K.J. Smith, J.J. Hodge [et al.] // J. Am. Acad. Dermatol. – 1997. – Vol. 37 – P. 430-437.
 12. Immunology and growth characteristics of ocular basal cell carcinoma / J. M. Rohbach, R. Stiemer, A. Mayer [et al.] // Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. – 2001. – Vol. 239. – P. 35-40.
 13. Incidence Estimate of Nonmelanoma Skin Cancer in the United States / H.W. Rogers, M.A. Weinstock, A.R. Harris [et al.] // Arch. Dermatol. – 2010. – Vol. 146. – P. 283-287.
 14. Molecular biomarkers and site of first recurrence after radiotherapy for head and neck cancer / O.U. Ataman, S.M. Bentzen, G.D. Wilson [et al.] // Eur. J. Cancer. – 2004. – Vol. 40. – P. 2734-2741.
 15. P53 gene mutations in human epithelial skin cancers / J-P. Moles, C. Moyret, B. Guillot [et al.] // Oncogene. – 1993. – Vol. 8. – P. 583-588.
 16. P53 mutations and chromosome instability in basal cell carcinomas developed at an early or late stage / M. D'Errico, A.S. Calcagnile, R. Corona [et al.] // Cancer. Res. – 1997. – Vol. 57. – P. 747-752.

ОСОБЛИВОСТІ І ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ОНКОБІЛКІВ P53, BCL-2 І АНТИГЕНІВ CD95, IPO38 У ХВОРИХ НА ЗЛОЯКІСНІ ЕПІТЕЛІАЛЬНІ ПУХЛИНИ ШКІРИ ПОВІК

I.O. Safronenkova, V.A. Elagina

Резюме. Досліджена експресія маркерних білків P53, Bcl-2 та антигенів CD95, IPO38 у біоптатах 185 хворих на злоякісні епітеліальні пухлини (ЗЕП) шкіри повік. Встановлено статистично значимий зв'язок експресії Bcl-2 зі стадією пухлинного процесу, позитивна реакція якого виявляється у T_{2a} стадії (79,4 %). Коекспресія P53 і Bcl-2 при імунотипі P53 (+) / Bcl-2 (+) є важливим прогностичним маркером агресивної поведінки ЗЕП і можуть служити предикторами розвитку рецидивів. Висока можливість розвитку рецидивів залежить від характеру та рівня експресії Bcl-2 і CD95: при Bcl-2 >10 % та негативній експресії CD95 у 98,9 % випадках прогнозується рецидив пухлини; при індексі Bcl-2/CD95 >1.0 можливість розвитку рецидивів зростає у 21,5 разів.

Ключові слова: злоякісні епітеліальні пухлини шкіри повік, P53, Bcl-2, CD95, IPO38, прогноз рецидивів.

FEATURES AND PROGNOSTIC VALUE OF THE EXPRESSION OF ONCOPROTEINS P53, BCL-2 AND ANTIGENS CD95, IPO38 IN PATIENTS WITH MALIGNANT EPITHELIAL TUMORS OF THE EYELID SKIN

I.A. Safronenkova, V.A. Elagina

Abstract. The expression of marker proteins p53, Bcl-2 and antigens CD95, IPO38 in biopsies from 185 patients with malignant epithelial tumors (MET) of the eyelid skin was studied. Statistically significant conjugacy of the Bcl-2 expression with the tumor stage was established. A positive reaction is more often detected at stage T_{2a} (79,4 %). The coexpression of P53 and Bcl-2 with immunophenotype P53 (+) / Bcl-2 (+) is an important prognostic marker of the aggressive behavior of eyelid MET and can be a predictor of tumor recurrences. A high likelihood of the development of recurrences depends on the nature and level of the expression of Bcl-2 and CD95. With Bcl-2 >10 % and a negative expression of CD95 a tumor recurrence is predicted in 98,9 % of the cases. If the index of Bcl-2 / CD95 is > 1,0 a possibility of the development of recurrences increases 21.5 times.

Key words: eyelid skin malignant epithelial tumors, P53, Bcl-2, CD95, IPO38, prognosis of recurrences.

State Institution "V.P. Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of the National Academy of Sciences of Ukraine" (Odessa, Ukraine)

Рецензент – доц. О.П. Пересунько

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 3 (63), part 1. – P. 230-233

Надійшла до редакції 16.07.2012 року