

УДК: 617.77–006.5/.6+57.083.3:001.18–0.89.168.7

Профили молекулярных маркеров (P53, BCL-2, CD95, ИПО38) как предикты развития рецидивов у больных злокачественными эпителиальными опухолями кожи век

И. А. Сафроненкова, к. м. н., ст. науч. сотр., Е. И. Драгомирецкая, науч. сотр.

Отделение микрохирургического лечения онкологических заболеваний глаза и лаборатория биохимии ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины»

Ключевые слова: злокачественные эпителиальные опухоли кожи век, моноклональные антитела (Bcl-2, p53, CD95 и ИПО38), прогноз рецидивов

Ключові слова: злоякісні епітеліальні пухлини шкіри повік, моноклональні антитіла (Bcl-2, p53, CD95 і IPO38), прогноз рецидивів

Введення. Для вибору тактики впливу на пухлину необхідно виявлення факторів прогнозу результату лікування. Суттєву допомогу в цьому може надати вивчення злоякісних епітеліальних пухлин (ЗЕП) шкіри век на імуногістохімічному рівні. **Мета.** Визначити інформативність експресії молекулярних маркерів p53, Bcl-2, CD95 і IPO38 в тканинах пухлини для прогнозування розвитку рецидивів у хворих ЗЕП шкіри повік.

Матеріал і методи. За допомогою молекулярних маркерів (p53, Bcl-2, CD95 і IPO38) проведені імуногістохімічні дослідження парафінових зрізів біоптатів у 185 пацієнтів зі ЗЕП шкіри повік (81 чоловік і 104 жінки) у віці від 34 до 89 років (Медіана = 64,3, SD = 11,1) перед лікуванням (променева терапія + криодеструкція). Для оцінки ймовірності розвитку рецидивів розроблена скорингова шкала, на основі якої побудована характеристична крива (ROC), знайдена оптимальна точка поділу, розрахована площа під ROC-кривою і проведена її статистична оцінка.

Результати. Знайдено порогові відносні значення експресії молекулярних маркерів, при яких підвищується ймовірність рецидивуючого перебігу пухлин. На основі знайдених порогових значень чотирьох маркерів розроблена ймовірнісна модель прогнозу рецидивів ЗЕП шкіри век, чутливість якої складає 97,1 %, специфічність — 85,0 %.

Висновки. 1. При індексі Bcl-2/CD95 > 1,0 шанси розвитку рецидиву ЗЕП підвищуються в 21, 5 рази. 2. При сумарній скоринговій оцінці факторів ризику (відносних значень експресії p53, Bcl-2, CD95 та IPO38) розвитку рецидиву ЗЕП шкіри повік пороговим є значення суми OR > 76,2. При цьому чутливість моделі прогнозу становить 97,1 %, а специфічність — 85,0 %.

Profiles of the molecular markers (P53, BCL-2, CD95, IPO38) as predictors of recurrence development in patients with malignant epithelial tumors of the eyelid skin

I. A. Safronenkova, E. I. Dragomiretskaya

SI «Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

Key words: malignant epithelial tumors of the eyelid skin, a monoclonal antibody (Bcl-2, p53, IPO38, CD95), the forecast of relapse

Introduction. To select the tactics impact on the tumor to identify predictors of treatment outcome. Substantial assistance in this study may have a malignant epithelial tumors (MET) of the eyelid skin at immunohistochemical level.

Purpose. Determine the information content of the expression of molecular markers of p53, Bcl-2, and CD95, IPO38 in tumor tissues to predict relapse in patients with MET eyelid skin.

Materials and methods. With the help of molecular markers (p53, Bcl-2, CD95, IPO38) conducted immunohistochemical studies of paraffin sections of biopsies from 185 patients with eyelid skin MET (81 men and 104 women) aged 34 to 89 years (median = 64,3, SD = 11,1) before treatment (radiotherapy + cryosurgery). To estimate the probability of recurrence developed a scoring scale on the basis of which carry out the construction of the characteristic curve (ROC), found the optimal point of separation, calculated the area under the ROC curve and held its statistical evaluation.

Results. Found threshold values relative expression of molecular markers, which increases the probability of recurrent MET eyelid skin. Based on the thresholds found four markers developed a probabilistic model for prediction of recurrence MET eyelid skin, where the sensitivity was 97.1 %, specificity — 85.0 %.

Conclusions. 1. When the index Bcl-2/CD95 > 1.0 chances of relapse increase MET age of 21, 5 times. 2. If the total scoring risk assessment (relative values of p53, Bcl-2, CD95 and IPO38) recurrence MET eyelid skin is a threshold value for the sum OR > 76,2. The sensitivity of the model prediction was 97.1 % and specificity — 85.0 %.

© И. А. Сафроненкова, Е. И. Драгомирецкая, 2013

Введение. Об эффективности лечения злокачественных эпителиальных опухолей (ЗЭО) кожи век обычно судят по частоте рецидивов, которые нередко могут быть крупнее первичных опухолей и протекают более агрессивно. Рецидивные опухоли труднее поддаются лечению, чем первичные, и требуют более радикальных подходов к его назначению. Одним из путей оптимизации лечения ЗЭО кожи век является индивидуальный подход к выбору тактики воздействия на опухоль. Для его осуществления необходимо выявление факторов прогноза исхода лечения ЗЭО кожи век. Существенную помощь в этом может оказать изучение эпителиальных опухолей на иммуногистохимическом уровне.

Известно, 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 Bcl-2, тормозящего апоптоз, мутации в гене P53, препятствующие функционированию кодируемого им белка как индуктора апоптоза и уменьшение экспрессии CD95 [1, 2]. В механизме злокачественной трансформации клеток и в биологическом поведении уже возникших опухолей ведущим фактором является пролиферативная активность. Исследование особенностей пролиферации опухолевых клеток у больных с различными новообразованиями используется для прогноза течения заболевания и коррекции схем лечения. Имеются работы, результаты которых свидетельствуют о наличии корреляции между интенсивностью пролиферативного процесса и характером течения заболевания, а также эффективностью проводимой лучевой терапии [4, 6, 7]. Однако согласованного мнения о прогностическом значении экспрессии онкобелков (P53 и Bcl-2) и антигенов (CD95 и ИПО38), а также сочетания этих факторов при ЗЭО кожи век не получено [2, 3, 8, 9].

Цель исследования — определить информативность экспрессии молекулярных маркеров P53, Bcl-2, CD95 и ИПО38 в тканях опухоли для прогнозирования развития рецидивов у больных ЗЭО кожи век.

Материал и методы

Исследованы биоптаты 185 пациентов со ЗЭО кожи век (81 мужчина и 104 женщины) в возрасте от 34 до 89 лет (Медиана = 64,3, SD = 11,1) перед комбинированным лечением (лучевая терапия + криодеструкция), проведенным в ГУ «Институте глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины» в 1998–2008 годах. Стадию заболевания определяли по Международной классификации pTNM (7-е издание, 2010 г.) [3]. T_{2a}N₀M₀ стадия была у 34 больных, T_{2b}N₀M₀ — у 72, T_{3a}N₀M₀ — у 73 и T_{3b}N₀M₀ — у 6. Рецидив развился у 34 пациентов в сроки от 1 до 6 лет.

Имуногистохимические исследования парафиновых срезов биоптатов ЗЭО кожи век проведены с помощью моноклональных антител (МКАТ): Cytokeratin (clon

MNF116), Bcl-2 (clon 124), p53 (clon DO-7), CD95/Fas (clon XD2) и системы визуализации En Vision фирмы Dako Cytomation (Дания) и ИПО38 (ГУ Институт патологии, онкологии и радиобиологии имени Р. Е. Кавецкого НАН Украины). Степень экспрессии МКАТ оценивали полуквантитативным способом, учитывая долю окрашенных клеток и интенсивность окрашивания. Результаты интерпретировали по следующему критерию: (–) — 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 отношению числа позитивных клеток к общему числу опухолевых клеток в поле зрения.

Для количественной оценки факторов риска (относительные значения экспрессии P53, CD95, Bcl-2, ИПО38), связанных с исходом лечения ЗЭО кожи век, выраженных в виде бинарного отклика (рецидива нет — «0», рецидив есть — «1») рассчитывали отношения шансов по таблице 2x2 и 95 % доверительный интервал. Для количественной оценки вероятности развития рецидивов была разработана скоринговая (от англ. слова score — счет) шкала, которая представляет собой сумму значений отношения шансов (OR) для признаков, имеющих значение OR больше единицы, то есть наиболее значимых с точки зрения возможности развития рецидива. На основе скоринговой шкалы оценки проведено построение характеристической кривой (ROC). Найдена оптимальная точка разделения, рассчитана площадь под ROC кривой и проведена ее статистическая оценка [5]. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистический анализ проведен с использованием лицензионного пакета «Statistica 9.0» (StatSoft corp.), ROC анализ — с помощью биомедицинского пакета MedCalc 9.1.

Результаты и их обсуждение

Определен характер экспрессии каждого молекулярного маркера (P53, Bcl-2, CD95, ИПО38) относительно влияния на исход лечения (рецидив) ЗЭО кожи век. Молекулярные маркеры, которые по данным анализа имеют статистически значимую сопряженность с исходом лечения, могут рассматриваться как факторы риска. Характер экспрессии молекулярных маркеров P53, Bcl-2, CD95 и ИПО38 при наличии рецидива опухолевого процесса у больных ЗЭО кожи век представлен в таблице 1.

Как следует из представленных в таблице 1 данных, при положительной экспрессии молекулярных маркеров P53 и Bcl-2 имеется статистически значимая сопряженность с рецидивом опухолевого процесса, а для ИПО38 — она отсутствует. Экспрессия CD95 при рецидивах опухоли в 100 % случаев была отрицательной.

Различия между средними значениями относительных (%) величин экспрессии МКАТ P53 и Bcl-2 в ткани опухоли у больных ЗЭО кожи век с рецидивом и без рецидива — статистически значимы (соответственно $p_1 = 0,02$, $p_2 = 0,04$), что наглядно представлено на рисунках 1 и 2.

Вышеизложенное дает право использовать относительные значения этих показателей в качестве

Таблица 1. Характер экспрессии молекулярных маркеров P53, Vcl-2, CD95 и ИПО38 у больных ЗЭО кожи век без рецидива и с рецидивом опухоли

МКАТ	Характер экспрессии МКАТ	Больные без рецидива (n = 151)		Больные с рецидивом (n = 34)		χ^2	p
		n	%	n	%		
Vcl-2	+	62	41,1	33	97,1	34,8	0,000
	-	89	58,9	1	2,9		
P53	+	75	49,7	31	91,2	19,5	0,000
	-	76	50,3	3	8,8		
CD95	+	81	53,6	0	0	32,4	0,000
	-	70	46,4	34	100,0		
ИПО38	+	118	78,7	30	88,2	1,6	0,204
	-	33	21,3	4	11,8		

Примечание: p — уровень значимости различий между исследуемыми группами по критерию сопряженности χ^2

самостоятельного прогностического критерия возможного развития рецидива.

Известный постулат, согласно которому баланс про- и антиапоптотических факторов определяет поведение опухоли, мы проверили, введя индекс Vcl-2/CD95, отражающий этот баланс. Установлено, что из 34 рецидивов ЗЭО век в 31 (91,2 %) случае отмечен высокий индекс Vcl-2/CD95 (> 1,0) и имеется статистически значимая сопряженность его с рецидивом опухолевого процесса ($\chi^2=39,6$, p=0,000). Вычисление отношения шансов (OR) — отношение вероятности развития рецидива ЗЭО век к вероят-

ности того, что этот рецидив не произойдет, показало, что наличие индекса Vcl-2/CD95 >1,0 может рассматриваться как фактор риска развития рецидива ЗЭО век, при этом шансы его развития повышаются в 21,5 раза (OR=21,5, 95 % ДИ 6,3 ч73,8).

Используя возможность ROC анализа, на основании относительных значений экспрессии молекулярных маркеров P53, Vcl-2, CD95 и ИПО3 проведена оценка вероятности развития рецидива ЗЭО кожи век (табл. 2).

Как видно из данных таблицы 2, площадь под ROC — кривой для Vcl-2 и CD95 соответственно составляет 0,83 (p = 0,0001), и 0,77 (p = 0,0001). Оптимальная точка разделения, при которой достигаются наиболее высокие значения чувствительности и специфичности, для Vcl-2 составила > 10 % (чувствительность — 97,6 %, специфичность — 66,2 %), для CD95 — ≤10 (чувствительность — 100 %, специфичность — 52,9 %). Для P53 и ИПО38

Таблица 2. Сравнительная оценка прогнозирующей способности МКАТ P53, Vcl-2, CD95 и ИПО3 в развитии рецидивов у больных ЗЭО кожи век по данным ROC анализа

МКАТ	Площадь под ROC кривой	p	Точки разделения (%)	Чувствительность (%)	Специфичность (%)
Vcl-2	0,83	0,0001	>10	97,6	66,2
P53	0,78	0,0001	>35	67,7	78,7
CD95	0,77	0,0001	≤10	100,0	52,9
ИПО38	0,66	0,005	>75	50,0	79,3

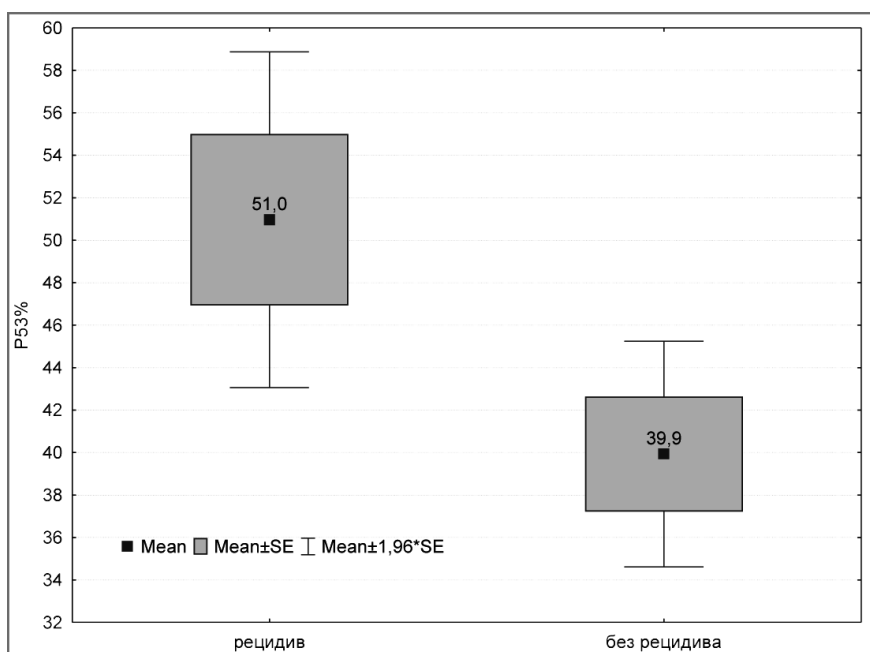


Рис. 1. Средние значения и разброс относительных показателей (%) уровня экспрессии P53 в ткани опухоли больных ЗЭО кожи век с рецидивом и без рецидива

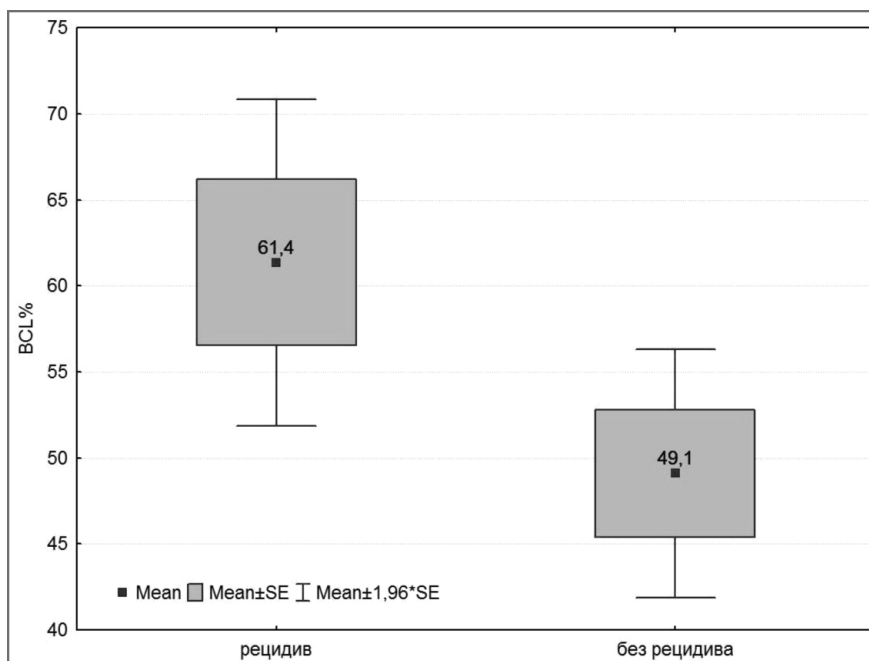


Рис. 2. Средние значения и разброс относительных показателей (%) уровня экспрессии Bcl-2 в ткани опухоли больных ЗЭО кожи век с рецидивом и без рецидива

площадь под ROC — кривой соответственно составила 0,78 ($p = 0,0001$) и 0,66 ($p = 0,005$), оптимальная точка разделения для P53 — $> 35\%$, (чувствительность — 67,7 %, специфичность более высокая — 78,7 %), а оптимальная точка разделения для ИРО38 — $> 75\%$ (чувствительность — низкая — 50 %, специфичность, как и для P53, более высокая — 79,3 %).

Статистическая оценка двух тестов на основе совместного использования данных о двух молекулярных маркерах Bcl-2 и CD95 показала, что если у пациентов со ЗЭО кожи век относительные показатели экспрессии Bcl-2 превышают указанные критические значения ($> 10\%$), а экспрессия CD95 — отсутствует, то имеется высокая вероятность развития рецидива опухоли (98,9 %). При совместной оценке P53 и ИРО38 установлено, что при превышении их пороговых значений экспрессии (соответственно $> 75\%$ и $> 35\%$) обеспечивается высокая вероятность безрецидивного течения заболевания — в 92,2 % случаев.

Таким образом, показатели экспрессии молекулярных маркеров P53, Bcl-2, CD95 и ИРО38, а также их сочетания обладают различной чувствительностью и специфичностью для прогноза рецидива опухоли. На основе найденных оптимальных точек разделения рецидивирующего и безрецидивного характера течения опухолевого процесса для всех рассматриваемых молекулярных маркеров были созданы бинарные переменные относительно порогового значения оптимальных точек разделения по данным ROC анализа («0» ниже порогового зна-

чения, «1» выше порогового значения), после чего произведен расчет отношения шансов (OR). Данные приведены в таблице 3 в порядке снижения роли молекулярных маркеров в развитии рецидива.

По полученным значениям OR была создана скоринговая шкала оценки прогноза рецидива, состоящая из суммы значений OR всех имеющихся у больных факторов риска (обобщенная оценка — ОО), где каждый фактор вносит свой взвешенный вклад в возможность развития рецидива у каждого конкретного больного:

$$OO = 7,7 \times P53^{*+} + 20,3 \times CD95^{*+} + 64,7 \times Bcl-2^{*+} + 3,8 \times ИРО38$$

(* относительные значения экспрессии P53, CD95, Bcl-2, ИРО38)

Таблица 3. Оценка влияния факторов риска (экспрессии молекулярных маркеров P53, Bcl-2, CD95 и ИРО38) на рецидив опухолевого процесса у больных ЗЭО кожи век

МКАТ	Отношение шансов (OR)	95 % доверительный интервал (ДИ)		p
		Нижний предел	Верхний предел	
Bcl-2	64,7	8,6	486,7	0,000
CD95 *	20,3	-	-	-
P53	7,7	3,4	17,5	0,000
ИРО38	3,8	1,8	8,4	0,000

Примечание: * во всех случаях рецидива опухолевого процесса экспрессия CD95 была (-), поэтому для расчета OR вместо «0» использовали значение 0,5 [5].

По этой шкале значения суммарной оценки колеблются от «0» (отсутствие всех четырех факторов риска) до «96,5» единиц (присутствуют все четыре фактора риска).

Таким образом, в зависимости от сочетания четырех факторов риска скоринговая оценка принимает соответствующие значения.

Медиана по суммарной скоринговой оценке молекулярных маркеров в группе больных без рецидива составила 20,3 (0–96,5), а с рецидивом — 92,7 (20–96,5).

Различия средних значений скоринговой оценки у больных без рецидива и с рецидивом опухоли — статистически значимы ($p=0,000$) (рис. 3). Это дает право использовать данный показатель для создания прогностического теста.

Для разработки теста прогноза рецидивов ЗЭО кожи век на основе значений скоринговой шкалы оценки молекулярных маркеров проведен ROC анализ с построением ROC-кривой. Площадь под ROC-кривой составила 0,95 ($p=0,0001$). Максимальное значение чувствительности (97,1 %) и специфичности (85 %) теста соответствует оптимальной точке разделения $> 76,2 \%$. Таким образом, если скоринговая оценка выше пороговой ($> 76,2 \%$), то имеется основание прогнозировать возможность развития рецидива ЗЭО кожи век (рис. 4).

Главная характеристика теста — это отношение правдоподобия (LR^+), которое одновременно характеризует и чувствительность и специфичность. В данном случае $LR^+ = 6,5$. Следовательно, вероятность получить положительное значение теста у

больных (рецидив) ЗЭО кожи век в 6,5 выше, чем у больных без рецидива.

Из представленной на рисунке 4 диаграммы видно, что больные с рецидивом (за исключением одного пациента) имеют скоринговую оценку выше порогового ($> 76,2 \%$), а у больных в группе без рецидивов опухоли значения скоринговой оценки как выше, так и ниже порогового значения. Это позволяет выделить в группу риска развития рецидива пациентов со значением скоринговой оценки выше порогового.

На момент наблюдения в эту группу риска вошли 22 больных. При дальнейшем наблюдении за этими пациентами установлено, что у трех из них наблюдался рецидив ЗЭО кожи век соответственно через 455, 1055 и 1381 день после комбинированного лечения (лучевая терапия + криодеструкция).

Таким образом, больные из «группы риска» нуждаются в постоянном диспансерном наблюдении, чтобы своевременно диагностировать рецидив новообразования и выбрать адекватное лечение.

Что касается одного пациента с рецидивирующей опухолью, у которого скоринговая оценка оказалась ниже пороговой, то возможно, у него имели место иные факторы риска развития рецидива, поиск которых будет продолжен в других исследованиях.

В таблице 4 приведены клинические примеры, отражающие классификационные принципы скоринговой модели факторов риска развития рецидивов ЗЭО кожи век, полученной на основе относительных значений экспрессии молекулярных маркеров P53, Vcl-2, ИПО38 и индекса P53/CD95.

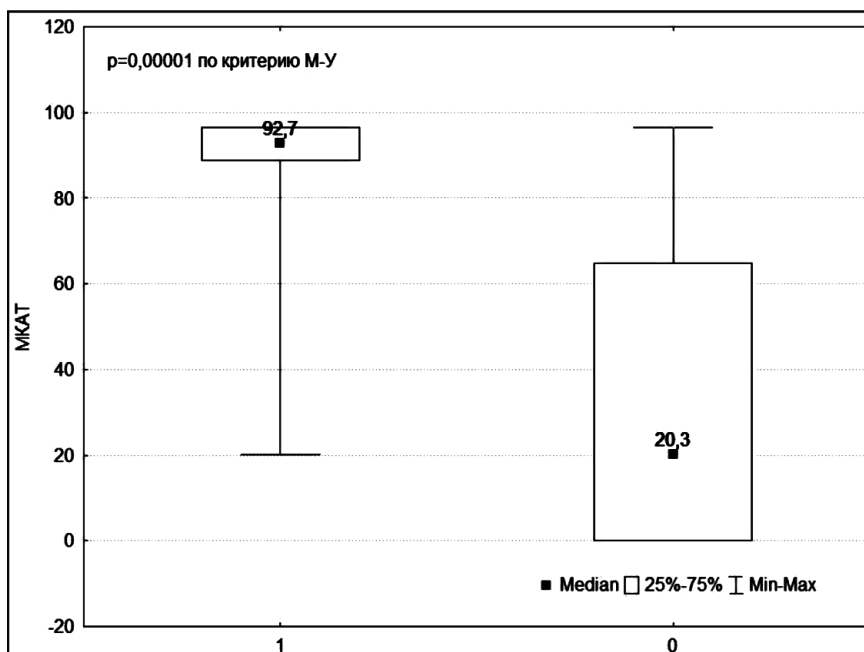


Рис. 3. Медианы и разброс показателей скоринговой оценки у больных ЗЭО кожи век с рецидивом (1) и без рецидива (0)

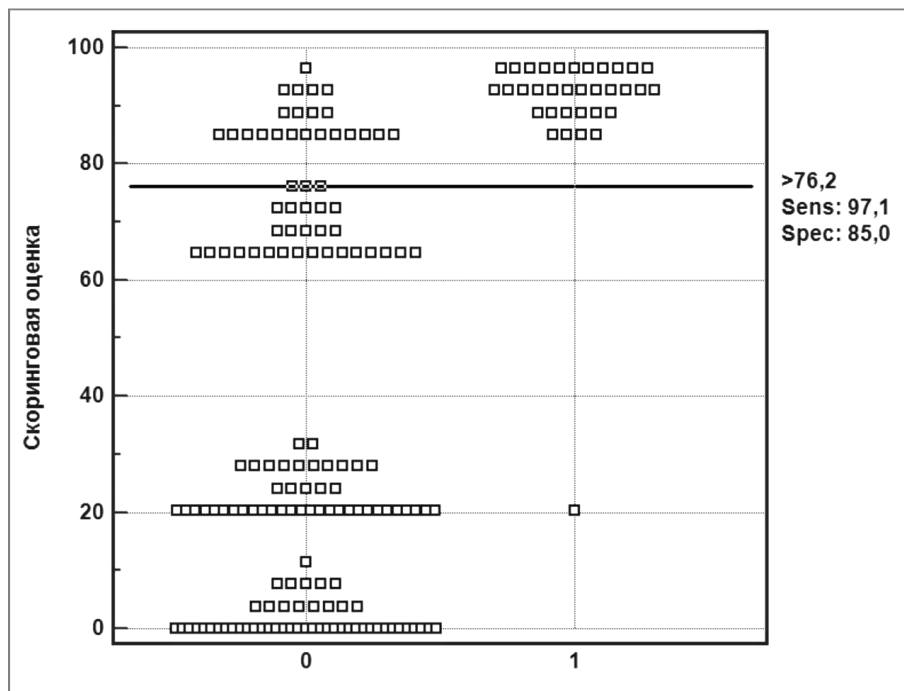


Рис. 4. Точечная диаграмма значений скоринговой оценки у каждого больного без рецидива (0) и с рецидивом (1) ЗЭО кожи век

Из данных, представленных в таблице 4, следует, что у первых четырех больных, у которых скоринговая оценка ниже пороговой (< 76,2 %), на момент наблюдения рецидива ЗЭО кожи век не отмечено. У других четырех пациентов со скоринговой оценкой выше пороговой (> 76,2 %) выявлены рецидивы опухоли. Сроки наблюдения за представленными пациентами составили от 3,5 до 12 лет (M = 6,4).

Таким образом, найдены пороговые относительные значения экспрессии молекулярных маркеров, при которых повышается вероятность рецидивирующего течения ЗЭО кожи век. На основе найденных пороговых значений четырех маркеров разработана вероятностная модель прогноза рецидивов

ЗЭО кожи век, чувствительность которой составляет 97,1 %, специфичность — 85,0 %.

Выводы

1. Наличие индекса Vcl-2/CD95 >1,0 может рассматриваться как фактор риска развития рецидива ЗЭО век, при этом шансы его развития повышаются в 21, 5 раза.

2. При суммарной скоринговой оценке факторов риска (относительных значений экспрессии P53, Vcl-2, CD95 и ИПО38) развития рецидива ЗЭО кожи век пороговым является значение суммы OR > 76,2. При этом чувствительность модели прогноза составляет 97,1 %, а специфичность — 85,0 %.

Таблица 4. Клинические примеры, отражающие классификационные принципы скоринговой модели факторов риска (относительных значений экспрессии P53, CD95, Vcl-2, ИПО38) развития рецидивов ЗЭО кожи век

Больные	Факторы риска				Скоринговая оценка	Сроки наблюдения (месяцы)	Наличие рецидива
	P53	Vcl-2	P53/CD95	ИПО38			
К-ко	+	-	+	+	31,8	4025	нет
Т-ва	-	+	-	+	68,5	1254	нет
В-к	+	+	-	-	72,4	1176	нет
Л-ой	+	+	-	+	76,2	1370	нет
П-п	-	+	+	+	88,8	1605	есть
П-ов	-	+	+	-	92,7	4488	есть
О-ко	+	+	+	-	92,7	1511	есть
С-ва	+	+	+	+	96,5	3356	есть

Примечание: (+) — наличие фактора риска; (-) — отсутствие фактора риска

Литература

1. **Заридзе Д. Г.**, Алев Г. И., Альпштейн А. Д., Белицкий Г. А. Канцерогенез: [Руководство]. М.: Медицина, 2004. — 576 с.
2. **Колесник А. П.** Молекулярные маркеры прогрессирования колоректального рака / А. П. Колесник, И. Д. Паламарчук, А. М. Сидоренко // Онкология. — 2006. — № 1. — С.13–17.
3. **Копнин Б. П.** Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза / Б. П. Копнин // Биохимия. — 2000. — Т.65. — Вып.1. — С.5–33.
4. **Пожариский К. М.** Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний / К. М. Пожариский, Е. Е. Леенман // Арх. пат. — 2000. — № 5. — С.3–11.
5. **Реброва О. Ю.** Статистический анализ медицинских данных / О. Ю. Реброва. М.: Медиа Сфера, 2003. — 312 с.
6. **Ataman O. U.** 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. — V.40. — P.2734–2741.
7. **Barrett T. L.** 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. — V.37 — P.430–437.
8. **D’Errico M.** 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. — V.57. — P.747–752.
9. **Rohbach J. M.** 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. — V.239. — P.35–40.

Поступила 14.02.2013.