

УДК: 617.77- 006.5/.6- 091.8

Особенности экспрессии P53, BCL-2, CD95 и IPO-38 при злокачественных эпителиальных опухолях кожи век с агрессивным течением

В. В. Вит, проф., докт.мед. наук, И. А. Сафроненкова, к. м. н., ст. науч. сотр.

Лаборатория патоморфологии и отделение микрохирургического лечения онкологических заболеваний глаза ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины»

e-mail: safronenkova@ukr.net

Ключові слова: злоякісні епітеліальні пухлини шкіри повік, маркери p53, Bcl-2, CD95, IPO38

Ключевые слова: злокачественные эпителиальные опухоли кожи век, маркеры p53, Bcl-2, CD95, IPO38

Вступ. Злоякісні епітеліальні пухлини (ЗЕО) шкіри повік володіють широким спектром біологічної поведінки — від існуючих роками і десятиліттями неінвазивних стаціонарних форм до агресивних прогресуючих варіантів з глибоким місцевим руйнівним ростом. Значна роль у неопластичній трансформації клітин і перебігу злоякісних новоутворень належить інактивзації регуляторних протеїнів, контролюючих апоптоз і проліферацію. Тому важливим є вивчення проліферативної, про- і антиапоптотичної активності при агресивних формах ЗЕО шкіри повік.

Мета дослідження — вивчення імуногістохімічних показників проліферативної (IPO38), про- і антиапоптотичної активності (CD95, Bcl-2 і p53) ЗЕО шкіри повік з агресивним перебігом

Матеріал і методи. Проведено імуногістохімічні дослідження за допомогою моноклональних антитіл Bcl-2, p53, IPO38 і CD95 біоптатів і тканини пухлини після екзентерація орбіти у 9 пацієнтів зі ЗЕО шкіри повік (4 чоловіки та 5 жінок) віком від 34 до 75 років (медіана 60,6) отримували комбіноване лікування (променева терапія + кріодеструкція) в ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Филатова НАМН України» в 2000–2008 роках.

Результати. Встановлено, що для ЗЕО шкіри повік з агресивним перебігом характерна гіперекспресія p53 (85,6±7,3) % і IPO38 (95,0±13,2) %, гіпоекспресія Bcl-2 (10,0±3,6) % і відсутність експресії CD95. Це свідчить про високий проліферативний потенціал і зниження апоптотичної активності пухлини.

Висновок. Визначено значення молекулярних маркерів, асоційованих з проліферативною активністю і активністю апоптозу ЗЕО шкіри повік. Підвищення експресії проліферативних маркерів p53 і IPO38, зниження антиапоптотичного маркера Bcl-2 і відсутність експресії маркера індуктора апоптозу CD95 характеризують біологічну агресивність пухлин

Expression P53, BCL-2, CD95 and IPO-38 SN malsgnant epstelsal tumors of the eyelid skin with an aggressive course

V. V. Vit, I. A. Safronenkova

SI «The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy NAMS of Ukraine»

e-mail: safronenkova@ukr.net

Introduction. Malignant epithelial tumors (Theo) of the eyelid skin have a broad spectrum of biological behavior — from existing for years and decades of stationary non-invasive forms of progressing to aggressive options with deep local destruirujushchego growth. It is known that a significant role in neoplastic cell transformation and progression of malignant neoplasms belongs inactivation of regulatory proteins controlling cell proliferation and apoptosis. Therefore, it is important to study the proliferative and pro-and anti-apoptotic activity in aggressive forms Theo eyelid skin.

Purpose — the study of immunohistochemical proliferative indices (IPO38), pro-and anti-apoptotic activity (CD95, Bcl-2 and p53) Theo eyelid skin with an aggressive course.

Material and methods. Immunohistochemical studies were carried out using monoclonal antibody Bcl-2, p53 and CD95 IPO38 biopsies and tumor tissue after orbital exenteration 9 patients with Theo eyelid skin (4 males and 5 females) aged

34 to 75 years (median 60.6) treated with combination therapy (radiotherapy + cryoablation) in SI «Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy. Filatov NAMS of Ukraine «in 2000–2008 years.

Results. Found that for The eyelid skin with an aggressive course characterized by hyperoverexpression of p53 ($85,6 \pm 7,3$) % and IPO38 ($95,0 \pm 13,2$) %, hypoeexpression Bcl-2 ($10,0 \pm 3,6$) % and the lack of expression of CD95. This indicates a high proliferative potential and reduced apoptotic activity of the tumor.

Conclusion. Determine the value of molecular markers associated with proliferative and apoptotic activity The eyelid skin. Increased expression of proliferative markers p53 and IPO38, reducing the antiapoptotic marker Bcl-2 and the lack of expression of the marker CD95 inducer of apoptosis characterize the biological aggressiveness of tumors

Key words: malignant epithelial tumors of the eyelid skin, markers p53, Bcl-2, CD95, IPO38

Введение. Злокачественные эпителиальные опухоли (ЗЭО) кожи век обладают широким спектром биологического поведения — от существующих годами и десятилетиями неинвазивных стационарных форм до агрессивных прогрессирующих вариантов с глубоким местным деструктивным ростом.

Последний проявляется в инфильтрации мышц век, вовлечением в опухолевый процесс тканей орбиты, глазного яблока, поражением костных стенок глазницы, прорастанием в параназальные синусы и полость черепа.

Причины, обуславливающие возникновение такого агрессивного поведения ЗЭО кожи век, до сих пор не найдены. В литературе имеются единичные работы, посвященные изучению агрессивных форм ЗЭО кожи на гистоморфологическом и иммуногистохимическом уровнях [6, 10].

Известно, что значительная роль в неопластической трансформации клеток и течении злокачественных новообразований принадлежит инактивации регуляторных протеинов, контролирующих апоптоз и пролиферацию [1, 3].

При опухолевом росте клетки теряют способность подвергаться апоптозу, возникает дисбаланс между про- и антиапоптотическими факторами (Bcl-2 и p53 ингибиторы апоптоза, а CD95 — индуктор). По данным литературы, мутация p53 происходит на поздних стадиях развития новообразования и поэтому гиперэкспрессия мутантного белка p53 может считаться важным прогностическим признаком агрессивности опухолевого процесса [2, 15]. Однако данные относительно экспрессии онкопротеина Bcl-2 противоречивы. Одни авторы связывают гиперэкспрессию этого белка с неблагоприятным прогнозом [7]. Другие — при запущенных стадиях опухоли констатируют отсутствие экспрессии или гипоекспрессию Bcl-2 [6, 11].

При опухолевом процессе происходит нарушение функции генов-супрессоров, обуславливающих изменение пролиферативной активности опухоли, нарастающей по мере ее прогрессии. Установлено, что гиперэкспрессия антигена пролиферации,

определяемого посредством МкАТ ИПО-38, присуща для опухолей с высокой степенью злокачественности, агрессивным течением заболевания и распространением процесса [12]. Повышение пролиферативного потенциала эпителиальных опухолей при одновременном выявлении гиперэкспрессии p53 наблюдается при инфильтративном росте и частых рецидивах [4, 11, 13, 14]. Данные наблюдения были подтверждены и нашими исследованиями, в которых обнаружена повышенная экспрессия белка p53 и высокий пролиферативный потенциал клеток (гиперэкспрессия ИПО38) при рецидивах ЗЭО кожи век [5].

Учитывая вышеизложенное, нам представляется важным изучение пролиферативной, про- и антиапоптотической активности при агрессивных формах ЗЭО кожи век.

Цель исследования — изучение иммуногистохимических показателей пролиферативной (ИПО38), про- и антиапоптотической активности (CD95, Bcl-2 и p53) ЗЭО кожи век с агрессивным течением.

Материал и методы

Исследование проведено у 9 пациентов со ЗЭО кожи век (4 мужчины и 5 женщин) в возрасте от 34 до 75 лет (медиана 60,6) получавших комплексное лечение (лучевая терапия + криодеструкция) в ГУ «Институте глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины» в 2000–2008 годах.

Длительность существования опухоли до поступления в Институт составила от 2 до 7 лет (медиана 4,4). Число рецидивов — от 2 до 4 (4 — в одном случае и в четырех случаях — соответственно 2 и 3). Сроки развития рецидивов колебались от 4 до 158 месяцев (медиана 35,7). Экзентерация орбиты проведена в сроки от 1,4 до 33,1 месяцев (медиана 18,3) после лечения. Время наблюдения за пациентами — от 4 до 7 лет (медиана 5,3).

Два пациента были с первичными опухолями, остальные — с рецидивами, возникшими после лечения по месту жительства. В одном случае — опухоль не была диагностирована, и больная в течение 6 месяцев получала консервативное лечение по поводу халязиона нижнего века с включением УВЧ-терапии. В трех случаях проводилась близкофокусная ЛТ и хирургическое удаление новообразования. На момент поступления в Институт, клинически, у 5

пациентов наблюдалась узловатая форма ЗЭО кожи век, а у 4 — инфильтративная. Во всех случаях отмечалось изъязвление новообразования. Стадию заболевания определяли по классификации pTNM (7-е издание, 2010 г.) Международного Противоракового Союза (UICC) и Американского Объединенного Комитета по Раку (AJCC). Согласно этой классификации, все больные были с запущенными опухолями, в основном 3_a стадии (6 пациентов). В двух случаях диагностирована 2_b стадия и в одном — 3_a. У 6 человек новообразованная ткань поражала 1\3 наружного угла глаза с вовлечением обоих век и распространением на хрящ, интратерминальный край и спайку век (в двух случаях опухоль прорастала в ткани передней отдела орбиты). У трех пациентов опухоль локализовалась во внутреннем углу глаза и поражала на 1\3 всю толщу обоих век (в одном случае — прорастала в спайку и передний отдел орбиты).

В 8 случаях диагностирован базальноклеточный (БК) рак и в одном — плоскоклеточный (ПК).

Проведено иммуногистохимическое исследование парафиновых срезов биоптатов до начала лечения (лучевая терапия + криодеструкция) и ткани опухоли после экзентерации орбиты у больных ЗЭО кожи век. Использовались моноклональные антитела (MkAT): Cytokeratin (clon MNF116), Bcl-2 (clon 124), p53 (clon DO-7), CD95/Fas (clon XD2) и системы визуализации Ep Vision фирмы Dako Cytomation, Дания и ИПО-38 (ГУ Институт патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАМН Украины, Киев).

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/Fas. 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.

Статистический анализ проведен с использованием лицензионного пакета «Statistica 9.0» (StatSoft corp.) в модуле описательная статистика. Количественные показатели в работе представлены в виде среднего арифметического и среднеквадратического отклонения (SD).

Результаты и их обсуждение

Имуногистохимическое исследование биоптатов ЗЭО кожи век до начала лечения (лучевая терапия + криодеструкция) показало наличие в клетках опухоли гиперэкспрессии p53 (81,1±6,0). Гиперэкспрессия онкобелка p53 отмечена и в тканях опухоли после экзентерации орбиты, сохраняясь практически на том же уровне, что и в биопсийном материале, составляя (85,6 ±7,3) % клеток.

Экспрессия p53 наблюдалась в клеточных ядрах и диффузно распределялась по всему образованию без окраски стромы (рис. 1).

Экспрессия ИПО38 в опухолевых клетках биоптатов составила (50,0±19,6) %. В тканях опухоли после экзентерации орбиты отмечена тенденция к ее повышению — (95,0±13,2) %. Клеточная реакция проявлялась в виде интенсивной и равномерной окраски ядер опухолевых клеток. Отмечалась неравномерность распределения в паренхиме с небольшим преобладанием пролиферирующих клеток по периферии новообразования, указывая тем самым, на различия в пролиферативной активности разных участков опухоли. В тканях опухоли после экзентерации экспрессия ИПО38 носила мозаичный характер и наблюдалась в клетках на границе стромы и кровеносных сосудов (рис.2).

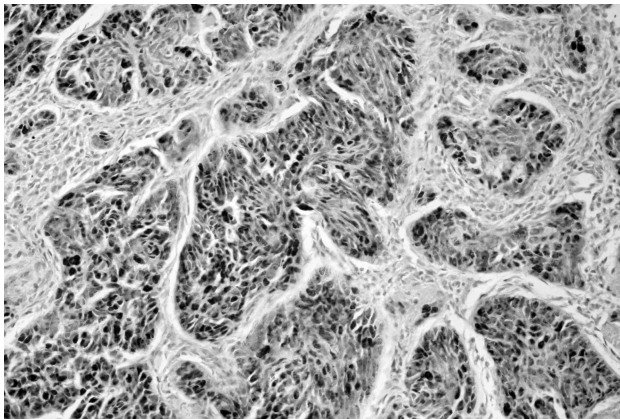
Экспрессия протоонкогена Bcl-2 была средней степени выраженности (++) и наблюдалась в цитоплазме фокальных скоплений клеток опухоли с легкой акцентуацией клеток по периферии. Наиболее четкое проявление экспрессии Bcl-2 наблюдалось в клетках, расположенных вблизи кровеносных сосудов новообразования и на границе со стромой (Рис.3). Число иммунопозитивных клеток в биоптате опухоли составило (35,0±3,3) %, а в новообразованной ткани после экзентерации — (10,0±3,6) %. Снижение уровня антиапоптотической активности в ткани опухоли после экзентерации оказалось статистически значимым (p = 0,02).

Экспрессия CD95 в клетках опухоли — как в биопсийном материале, так и в тканях опухоли после экзентерации была отрицательной во всех случаях.

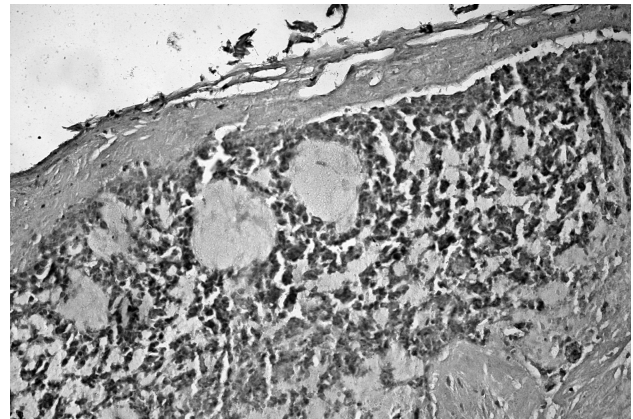
Таким образом, гиперэкспрессия p53 и ИПО38, гипоекспрессия Bcl-2 и отсутствие экспрессии CD95 являются неблагоприятными маркерами прогрессирования ЗЭО кожи век. Установлено, что с ростом агрессивности опухоли экспрессия ИПО38 имела тенденцию к повышению, а экспрессия Bcl-2 достоверно снижалась. Это свидетельствует о высоком пролиферативном потенциале и снижении апоптотической активности опухоли, что обуславливает быстрый темп роста, глубокую инвазию окружающих тканей и быстрое развитие рецидивов новообразований.

Заключение

Проведенное иммуногистохимическое исследование определило значение молекулярных маркеров, ассоциированных с пролиферативной активностью и активностью апоптоза ЗЭО кожи век. Повышение экспрессии пролиферативных маркеров p53 и ИПО38, снижение антиапоптотического маркера Bcl-2 и отсутствие экспрессии маркера индуктора апоптоза CD95 характеризуют биологическую агрессивность опухолей.

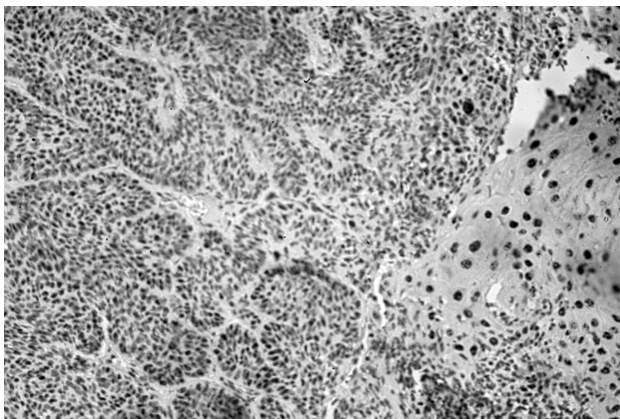


а

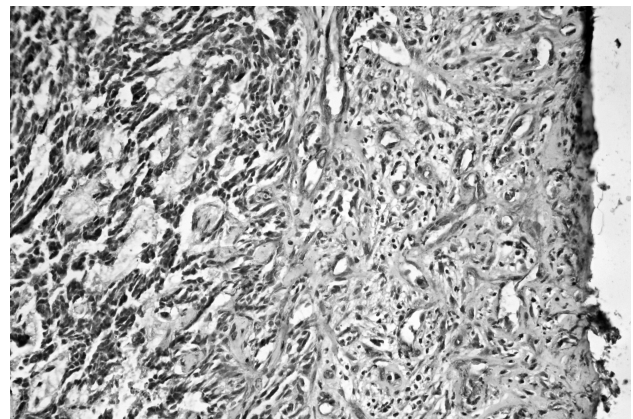


б

Рис. 1. Экспрессия p53 в БК раке кожи век, выявленная в тканях биоптата (а) и тканях после экзентерации орбиты (в): а — иммунная реакция на p53 в виде интенсивного (+++) ядерного окрашивания 90 % опухолевых клеток независимо от их локализации. Клеточные элементы стромы не окрашиваются; б — интенсивная (+++) экспрессия большинством (90 %) опухолевых клеток, независимо от их локализации в опухолевом комплексе. Стромальные элементы дают отрицательную реакцию за исключением структур кровеносных сосудов



а

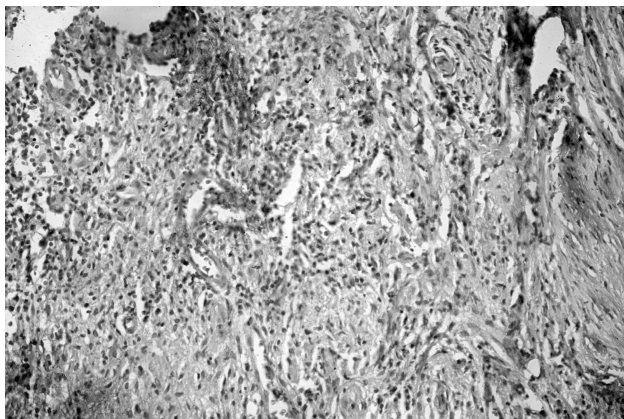


б

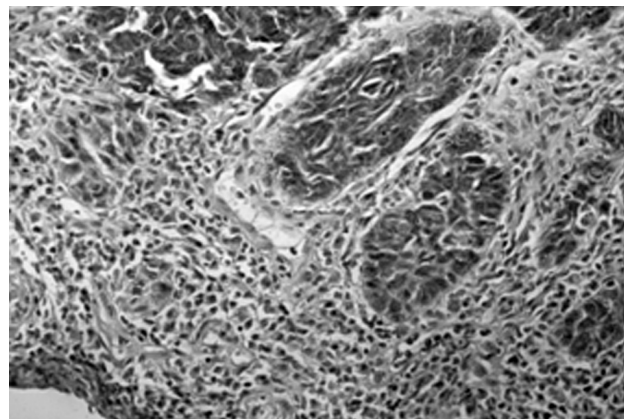
Рис. 2. Экспрессия ИПО38 в БК раке кожи век, выявленная в тканях биоптата (а) и тканях после экзентерации орбиты (в): а — иммунная реакция на ИПО38 в виде интенсивной (+++) ядерной экспрессии клеток, формирующих частокол. В центре опухолевых комплексов экспрессируются единичные клетки; б — интенсивная (+++) экспрессия большинства опухолевых клеток независимо от локализации. В некоторых комплексах экспрессия определяется преимущественно в клетках, расположенных на границе со стромой и кровеносными сосудами. Клетки стромы не окрашиваются.

Литература

1. Глузман Д. Ф. Диагностическая иммуноцитохимия опухолей / [Д. Ф. Глузман, Л. М. Складенко, В. А. Надгорная и др]. — Киев: Морион, 2003. — С. 6–15.
2. Канцерогенез: [Руководство] / Д. Г. Заридзе, Г. И. Алев, А. Д. Альштейн, Г. А. Белицкий // М.: Медицина, 2004. — 576 с.
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. Колесник А. П. Молекулярные маркеры прогрессирования колоректального рака / А. П. Колесник, И. Д. Паламарчук, А. М. Сидоренко // Онкология. — 2006. — № 1. — С.13–17.
5. Масляков Г. Н. Роль иммуногистохимических маркеров в диагностике рака мочевого пузыря / Г. Н. Масляков, А. Н. Понукалин, Е. Н. Цмокалюк [и др]. Саратовский научно-медицинский журн. — 2009. — № 5(4). — С. 608–611.
6. Сафроненкова И. А. Экспрессия онкобелков P53, Vcl-2 и антигенов CD95, ИПО38 у больных злокачественными эпителиальными опухолями век. / Сафроненкова И. А. // Офтальмол. журн. — 2012. — № 3. — С.53–57.
7. Чупров И. Н. Клинико-морфологическая характеристика разных типов роста базальноклеточного рака кожи / И. Н. Чупров // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина. — 2009. — Вып. 1. — С. 145–151.
8. Грищенко П. О. Прогнозування клінічного плинку рака гортані на основі комплексного імуногістохімічного



а



б

Рис. 3. Экспрессия Bcl-2 в БК раке кожи век выявленная в тканях биоптата (а) и тканях после экзентерации орбиты (в): а — экспрессия средней степени (++) выраженности определяется только в фокальных скоплениях опухолевых клеток среднего размера. На остальном протяжении эпителиоцитов опухоли и стромальных элементах реакция отрицательная. Положительная реакция выявляется в клетках, расположенных вблизи кровеносных сосудов новообразования, то есть вблизи стромальных перегородок; б — экспрессия средней степени (++) выраженности в опухолевых клетках, преимущественно расположенных на границе со стромой. Клетки стромы не окрашиваются

го дослідження / П. О. Грищенко, О. В. Ковтуненко, І. С. Шпонка [та ін]. // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. — 2006. — № 5. — С.35–36.

9. **Ansarin H.** Expression of p53 in aggressive and non-aggressive histologic variants of basal cell carcinoma / Ansarin H., Daliri M., Soltani-Arabshahi R. // Eur. J. Dermatol. — 2006. — Vol. 16. — No 5. — P. 543–547.
10. **Auepemkiate S.** P53 expression related to the aggressive infiltrative histopathological feature of basal cell carcinoma / Auepemkiate S., Boonyaphiphat P., Thongsuksai P. // Histopathology. — 2002. — Vol. 40. — No 6. — P.568–573.
11. **Hobart W.** Walling. Aggressive basal cell carcinoma: Presentation, pathogenesis and management // W. Hobart Walling, W. Scott Fosco, A. Pedram Geraminejad [et al] // Cancer and Metastasis Reviews. — 2004. — V. 23. — P.389–402.
12. **Lukyanova N. Yu.** Expression of p53 and Bcl-2 proteins in epithelial ovarian carcinoma with different grade of differentiation / N. Yu. Lukyanova, G. I. Kulik, O. V. Yurchenko [et al] // Experimental Oncology. — 2000. — T. 22, № 1. — С.91–93.

13. **Mikhalap S.** Monoclonal antibody IPO-38 in evaluation of proliferative activity of tumor cells / S. Mikhalap, L. Shlapatska, A. Berdova [et al] . // Experimental Oncology. — 2000. — T. 22. — № 2. — С.36–38.
14. **Nakopoulou L.** Study of phosphor-p-catenin subcellular distribution in invasive breast carcinomas in relation to their phenotype and the clinical outcome / L. Nakopoulou, E. Mylona, I. Papadaki [et al]. // Modern Pathology. — 2006. — V. 19. — P. 556–563.
15. **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.
16. **Stoenescu T. M.** Assessment tumor markers by immunohistochemistry (Ki67, p53 and Bcl-2) on a cohort of patients with cervical cancer in various stages of evolution / T. M. Stoenescu, L. D. Ivan, N. Stoenescu [et al] // Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi. — 2011. — № 115(2). — P. 485–92.

Поступила 10.06.2013

References

1. **Gluzman DF, Sklyarenko LM, Nadgornaya VA.** Diagnostic immunocytochemistry of tumors. Kiev: Morion; 2003: 6–15.
2. **Zaridze DG, Alev GI, Altshtein AD, Belitskii GA.** Carcinogenesis: (Manual). M.: Meditsina; 2004. 576 p.
3. **Kopin BP.** The target of the oncogenes and tumor suppressor: the key to understanding the basic mechanisms of carcinogenesis. Biokhimiia. 2000; 65(1): 5–33. Russian.
4. **Kolesnik AP, Palamarchuk ID, Sidorenko AM.** Molecular markers of progression of colorectal cancer. Onkologiya. 2006; 1: 13–7. Russian.
5. **Maslyakov GN, Ponukalin AN, Tsmokalyuk EN et al.** The role of immunohistochemical markers in the diagnosis of bladder cancer. Saratovskii nauchno-meditsinskii zhurnal. 2009; 4(5): 608–11. Russian.
6. **Safronenkova IA.** Expression of oncoproteins p53, Bcl-2 and antigen CD95, IPO38 in patients with malignant epithelial tumors of the eyelids. Oftalmol Zh. 2012; 3: 53–7. Russian.
7. **Chuprov IN.** Clinical — morphological characteristics of different types of basal cell skin cancer growth. Vestnik Sankt-Peterburgskogo Universiteta. Seriya 11. Meditsina. 2009; 1: 145–51. Russian.
8. **Grishchenko PO, Kovtunenkov OV, Shponka IS et al.** Prediction of clinical current of cancer of the larynx in an integrated immunohistochemical study. Zhurnal vushnykh, nosovykh i gorlovykh khvorob. 2006; 5: 35–6. Ukrainian.

9. **Ansarin H, Daliri M, Soltani-Arabshahi R.** Expression of p53 in aggressive and non-aggressive histologic variants of basal cell carcinoma. *Eur. J. Dermatol.* 2006;16(5): 543–7.
10. **Auepemkiate S, Boonyaphiphat P, Thongsuksai P.** P53 expression related to the aggressive infiltrative histopathological feature of basal cell carcinoma. *Histopathology.* 2002; 40(6): 568–73.
11. **Hobart W, Walling, Scott Fosco W, Pedram Geraminejad A et al.** Aggressive basal cell carcinoma: Presentation, pathogenesis and management. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2004; 23: 389–402.
12. **Lukyanova NYu, Kulik GI, Yurchenko OV et al.** Expression of p53 and Bcl-2 proteins in epithelial ovarian carcinoma with different grade of differentiation. *Experimental Oncology.* 2000; 22(1): 91–3.
13. **Mikhalap S, Shlapatska L, Berdova A et al.** Monoclonal antibody IPO-38 in evaluation of proliferative activity of tumor cells. *Experimental Oncology.* 2000; 22(2): 36–8.
14. **Nakopoulou L, Mylona E, Papadaki I et al.** Study of phosphor-p-catenin subcellular distribution in invasive breast carcinomas in relation to their phenotype and the clinical outcome. *Modern Pathologi.* 2006: 19: 556–3.
15. **Rohbach JM, Stiemer R, Mayer A et al.** Immunology and growth characteristics of ocular basal cell carcinoma. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2001; 239: 35–40.
16. **Stoenescu TM, Ivan LD, Stoenescu N et al.** Assessment tumor markers by immunohistochemistry (Ki67, p53 and Bcl-2) on a cohort of patients with cervical cancer in various stages of evolution. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* 2011; 115(2): 485–92.

Received 10.06.2013