

УДК 616.31-006.6-033.2-036.87:616-078.33

НЕКОТОРЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ (P53, KI-67, CD34) ПРИ РАКЕ ОРГАНОВ ПОЛОСТИ РТА

Светицкий П.В., Новикова И.А., Нистратов Г.П., Аединова И.В., Волкова В.Л., Баужадзе М.В., Ульянова Е.П.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия. svetitskiy.p@gmail.com

Проведенные иммуногистохимические исследования экспрессии таких молекулярно-биологических маркеров, как p53, ki-67, CD34 у больных раком органов полости рта с регионарными метастазами и рецидивами, показали высокие цифры экспрессии опухолевыми клетками p53 в группе больных с метастазами, превосходящие данный показатель в группах без метастазов и с рецидивами в два и более раз. Преобладание опухолей с низкой пролиферативной активностью в группах больных без метастазов и с рецидивами, тогда как в группе с метастазами преобладали опухоли умеренной пролиферативной активности. Отмечено, что при оценке внутриопухолевой микрососудистой плотности с использованием CD34 превалирование сосудов крупного диаметра с утолщенной стенкой может быть связано с наличием или возможным развитием метастазов и рецидивов, являясь неблагоприятным предиктором заболевания.

Ключевые слова: рак органов полости рта, регионарные метастазы, рецидивы, микрососудистая инвазия.

SOME MOLECULAR-BIOLOGICAL MARKERS (P53, KI-67, CD34) IN CANCER OF THE MOUTH

Svetitskiy P.V., Novikova I.A., Nistratov G.P., Aedinova I.V., Volkova V.L., Bauzhadze M.V., Uljanova E.P.

Rostov Research Oncologic Institute of Ministry of Health the Russian Federation, Rostov-on-Don, svetitskiy.p@gmail.com

Immunohistochemical expression studies of molecular biological markers as p53, ki-67, CD34 in patients with cancer of the oral cavity with regional metastases and recurrences showed high numbers of p53 expression by tumor cells in patients with metastatic disease, surpassing the figure in groups without metastases and relapse in two or more times. Predominance of tumors with low proliferative activity in patients without metastases and relapses, whereas in the group with moderately metastatic tumor dominated proliferative activity. It is noted that when assessing intratumoral microvessel density using CD34, the prevalence of large diameter vessel with a thickened wall can be associated with the presence or development of metastases and possible relapse of the disease being unfavorable predictor.

Keywords: cancer of the oral cavity, regional metastases, recurrence, microvascular invasion.

В России в структуре онкологической заболеваемости населения в 2013 году рак слизистой оболочки полости рта составляет около 5,5 % [3]. Среди опухолей головы и шеи данная патология занимает второе место, после рака гортани [7]. У мужчин данное заболевание встречается в 4 раза чаще, чем у женщин. Максимальное число заболеваний приходится на возрастную группу 40–60 лет, наиболее трудоспособный возраст [7,1].

Рак орофарингеальной зоны среди причин летальности стоит на 4-ом месте после рака легкого, желудка и колоректальной зоны [7].

В Российской Федерации смертность от рака органов полости рта у мужчин занимает 7 место, в то время как у женщин – 16-е и составили в 2007 году 8,1 и 1,1 на 100 тысяч населения [7,1].

Развитие регионарных метастазов после комбинированного лечения наблюдается у 40–75 % больных, а отдаленное метастазирование выявляется в 15 % [5].

Лечение регионарных метастазов, в большинстве случаев, осуществляется хирургически, но ряд авторов утверждают, что необходимо проводить комбинированное лечение, где первым этапом является лучевая терапия [6].

Следует отметить, что после комбинированного и даже комплексного лечения местные рецидивы у больных раком органов полости рта возникают в 25–40 % [4].

Для опухолевого процесса с распространенностью Т3 3-х и 5-летняя выживаемость равна 27 % и 19 %, в то время как Т4 – 21 % и 13 % [8]. Данные П.Ю. Полякова с соавт. (1997) свидетельствуют, что при IV стадии 3-х летняя выживаемость не зависит от метода лечения и не превышает 10,9 %.

Пятилетняя выживаемость при комбинированном методе лечения у больных с I стадии составила 60–85 %, при II стадии – 50–60 % [9]. Наличие III стадии РОПР дает возможность прогнозировать пятилетнюю безрецидивную выживаемость у больных после комбинированного и комплексного лечения не более чем в 10–12 %. В то время как при IV стадии независимо от методов лечения трехлетняя безрецидивная выживаемость составляет 5,0–10,9 % [6].

Большое значение для прогноза течения рака разных локализаций уделяется исследованиям таких молекулярных маркеров, как: белок Ki 67 (пролиферация) p53, CD34 (внутриопухолевая микрососудистая плотность). Следует отметить, что в литературе имеются противоречивые сведения в отношении точности прогнозирования этих факторов, поэтому в регулярной практике их использование не рекомендуется [2,10].

Мы не встречали работ, посвященных исследованию данных маркеров у больных раком органов полости рта, что послужило основанием к исследованию новых способов прогнозирования развития регионарных метастазов и рецидивов у больных раком органов полости рта с использованием Ki 67, p53, CD34.

Цель исследования. Изучение экспрессии некоторых молекулярно-биологических маркеров (p53, ki-67, CD34) при раке органов полости рта без метастазов, в группе с метастазами и рецидивами и оценка возможности их индивидуального или комплексного использования для прогнозирования течения злокачественного процесса.

Материалы и методы. Объектом исследования были 90 больных РОПР, которые были разделены на 3 группы по 30 человек, первая группа с наличием регионарных метастазов, вторая – без метастазов, третья – с рецидивами, проходивших лечение в отделении опухолей головы и шеи ФГБУ «РНИОИ» МЗ РФ в 2004–2012 гг.

Мужчин было 69, женщин – 21. Возраст больных составлял 36–75 лет. По распространенности процесса: со II стадией (T2N0M0) было 19 человек, III – 37 (T2N1M0 – 9, T3N0M0 – 21, T3N1M0 – 7), IV - 34 (T3N2M0 – 5, T4N0M0 – 17, T4N1M0 – 12).

У 73 (81,1 %) больных опухолевым процессом был поражен язык, у 17 (18,9 %) – слизистая дна полости рта. На языке опухоль располагалась чаще на боковой поверхности (54,4 %).

У всех больных был плоскоклеточный рак. Высокая степень дифференцировки (G1) имела место у 24 больных, средняя степень (G2) – 43 и низкая степень (G3) – 23.

Иммуногистохимическое исследование проводили на срезах с парафиновых блоков, предназначенных для стандартного морфологического исследования. Использовались в работе первичные антитела: антиген ki-67, пролиферативная активность (ядерное окрашивание), нормальный и мутантный тип p53 (ядерное окрашивание), CD34 (мембранное окрашивание эндотелиальных клеток).

Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. «Демаскировку» антигенов проводили в PT-LinkThermo. Протокол включал в себя предварительный нагрев до 65 °С, восстановление антигена в течение 20 минут при температуре 97 °С и дальнейшее охлаждение до 65 °С. Затем стекла промывались в течение 1–3 минут TBS-буфером (Dako) и помещались в автостейнер Thermo Scientific для окрашивания в автоматическом режиме. Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали систему детекции Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System. Срезы докрасивали гематоксилином Майера, для заключения использовали бальзам Bio-Mount. Оценку экспрессии маркеров изучали как минимум на 10 случайно выбранных полях с применением светового микроскопа «Leica» (Германия) под увеличением x10, x20, x40.

В исследовании применяли следующие критерии оценки маркеров:

- 1) опухоль считали отрицательной по p53, если в ткани опухоли отсутствовала ядерная реакция с антителами или количество окрашенных клеток было менее 25 %, и положительной по p53, если было окрашено более 25 % ядер опухолевых клеток;
- 2) для оценки пролиферативной активности опухоли подсчитывали количество ki-67-положительных опухолевых клеток, приходящихся на 200-300 опухолевых клеток.

Маркеры пролиферативной активности расценивались на основе наиболее часто употребляющегося способа оценки пролиферативной активности:

- 0 % – 20 % – низкая пролиферативная активность,
- 21 % – 50 % – умеренная пролиферативная активность,
- 51 % – 100 % – высокая пролиферативная активность.

3) Для оценки ангиогенеза в опухолях использовали индекс внутриопухолевой микрососудистой плотности (intratumor microvessel density – MVD), который определяется стандартным иммуногистохимическим методом с использованием эндотелиальных антигенов и позволяет количественно оценить процесс ангиогенеза в опухоли. Микрососуды окрашивали антителом CD34. Количество сосудов определяли в каждом поле зрения препарата при использовании объектива х40.

Статистическая обработка осуществлялась программой Statistica 6,0.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведение ИГХ исследования выявило наличие достоверных различий экспрессии опухолевыми клетками Ki-67 и P53 между группами больных раком органов полости рта без метастазов, с метастазами и рецидивами (табл. 1).

Таблица 1

Экспрессия опухолевыми клетками Ki-67 и P53 в исследуемых группах %.

Маркеры пролиферации и апоптоза	Группа без метастазов	Группа с метастазами	Группа с рецидивами
Ki-67	24,3±2,6	46,7±4,1*	27,5±2,9 °
P53	21,2±3,9	60,1±3,7*	33,5±3,6* °

* – отличия показателей, статистически достоверных по отношению к группе без метастазов ($p \leq 0,05$).

° – отличия показателей, статистически достоверных по отношению к группе с метастазами ($p \leq 0,05$).

Анализ данных показал, что в группе больных раком органов полости рта с метастазами показатели экспрессии маркера p53 превосходило в 2,8 и 1,8 показатель в группах без метастазов и с рецидивами ($p \leq 0,05$). В то время как в группе без метастазов, по сравнению с рецидивной группой, показатели в 1,6 раза были меньше ($p < 0,05$).

Проведенное исследование пролиферативной активности опухолей показали преобладание опухолей с низкой пролиферативной активностью в группах без метастазов и с рецидивами, в то время как в группе с метастазами преобладали опухоли умеренной пролиферативной активности. Минимальное количество опухолей с высокой ПА выявлено в группе без метастазов, максимальное – в группе с метастазами. Соотношение доли опухолей с низкой ПА к доле опухолей с высокой ПА в группе без метастазов составило 10, в группе с рецидивами – 5,7, тогда как в группе с метастазами – 1.

Доля пролиферирующих ki-67 положительных клеток в группе без метастазов находилась в пределах от 10 % до 55 % клеток, в группе с метастазами от 20 % до 70 %, в группе с рецидивами от 10 % до 60 %.

Таблица 2

Доля опухолей с различной пролиферативной активностью (ПА) в исследуемых группах

	Группа без метастазов (n=30)	Группа с метастазами(n=30)	Группа с рецидивами(n=30)
Низкая ПА	66,7% (n=20)	20% (n=6)	56,7% (n=17)
Умеренная ПА	26,6% (n=8)	60% (n=18)	33,3% (n=10)
Высокая ПА	6,7% (n=2)	20% (n=6)	10% (n=3)

Из табл. 2 следует, что в группе с метастазами отмечается максимальный индекс пролиферативной активности, превышающий аналогичный показатель в 1,9 и 1,7 раза в группе без метастазов и с рецидивами ($p \leq 0,05$). Однако статистически значимой разницы пролиферативной активности между группами без метастазов и с рецидивами не получено.

Данные, полученные при оценке внутриопухолевой микрососудистой плотности, показали, что метастазирующие опухоли органов полости рта имели наиболее активные процессы пролиферации опухолевых клеток, в группе больных с рецидивами их активность была несколько ниже и регистрировалась не по всем изученным показателям, в опухолях больных без метастазов она была минимальной среди всех исследованных групп. Так, процессы неоангиогенеза имели схожую активность в опухолях больных раком органов полости рта с метастазами и рецидивами и превышали показатели в группе больных без метастазов.

Данные, отражающие экспрессию CD34 на эндотелии микрососудов опухолей полости рта в группах без метастазов, с метастазами и с рецидивами, представлены в табл. 3.

Таблица 3

Сравнительная характеристика внутриопухолевой микрососудистой плотности

Исследуемая группа	Диаметр капилляра (мкм)			Среднее количество сосудов в 1 поле зрения
	минимальный	максимальный	средний (M±m)	
Группа без метастазов	2,3	39,4	6,6 ± 0,5	6,4±0,7
Группа с метастазами	3,6	44,5	9,2 ± 0,7*	8,8±0,9*
Группа с рецидивами	3,8	46,7	10,6 ± 0,6 *	9,7±0,8*

Примечание: * – отличия показателей достоверны по отношению к группе без метастазов ($P \leq 0,05$);

- – отличие достоверно по отношению к группе с метастазами ($P \leq 0,05$).

Проведя оценку внутриопухолевой микрососудистой плотности, выявленной нами при иммуногистохимическом исследовании с использованием антител CD34, мы обнаружили, что в группе без метастазов она составила $6,4 \pm 0,7$ сосуда в 1 поле зрения. В группах с метастазами и рецидивами наиболее выраженные изменения внутриопухолевой микрососудистой плотности, по сравнению с группой без метастазов, соответствовали превышению в 1,4 и 1,5 раза количества окрашенных антителами CD34 сосудов, и равнялось для опухолей данных групп $8,8 \pm 0,9$ и $9,7 \pm 0,8$ сосуда в 1 поле зрения.

Несмотря на данные литературы, согласно которым белок Ki 67 и p53 точности прогнозирования не дают [10], по нашему мнению, данные маркеры недооценены и могут быть использованы для прогноза течения заболевания рака органов полости рта, о чем свидетельствуют полученные результаты исследования.

Заключение

1. Проведенное исследование показало наиболее значимые показатели экспрессии опухолевыми клетками p53 в группе с метастазами, превосходящее данный показатель в группах без метастазов и с рецидивами в два и более раз ($p \leq 0,05$). Исследование пролиферативной активности опухолей групп больных раком органов полости рта с наличием регионарных метастазов, без них и с рецидивами показало преобладание опухолей с низкой пролиферативной активностью в группах без метастазов и с рецидивами, тогда как в группе с метастазами преобладали опухоли умеренной пролиферативной активности.

Таким образом, высокие показатели экспрессии опухолевыми клетками p53, ki-67 могут расцениваться как неблагоприятные прогностические признаки.

2. Проведенные иммуногистохимические исследования с использованием эндотелиального антигена у больных раком органов полости рта показали, что преобладание сосудов крупного диаметра с утолщенной стенкой может быть связано с наличием или возможным развитием метастазов и рецидивов, являясь неблагоприятным предиктором заболевания.

Список литературы

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в 2007 году // Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. – 2009. – Т.20. – № 3(77). – Приложение 1. – С. 8-138.
2. Егоров М.А., Мухамеджанова Л.Р., Кулагин Р.Н., Кузнецова Р.Г. Информативность определения биомаркеров P53 и KI-67 у пациентов с плоскоклеточным раком губы // Практическая медицина. – 2013. – Т. 1, № 1–2 (69). – С.36-39.
3. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2013 году (заболеваемость и смертность). – М., 2015. – С.250.
4. Кропотов М.А. Органосохраняющие и реконструктивные операции на нижней челюсти в комбинированном лечении рака слизистой оболочки полости рта: дисс. ... д-ра мед. наук. – М., 2004.
5. Нуммаев Г.М., Джумаев М.Г., Хыдыров Х.Б., Бабаев К.А. Эффективные методы лечения рака слизистой оболочки органов полости рта и ротоглотки // Матер. I съезда онкологов стран СНГ. – М., 1996. – С.272-273.
6. Поляков П.Ю., Коршунова А.И., Ларионова Н.А., Олтаржевская Н.Д. Нетрадиционные подходы к лучевому лечению онкологических больных // Вопросы онкологии. – 1997. – № 5. – С. 487-492.
7. Чиссов В.И. и соавторы. Основные показатели состояния специализированной онкологической помощи населению России в 2009 году. – М., 2010. – С.168.
8. Laramore G.E., Coltrera M.D., Karen J.H. Tumors of Head and Neck // Clinical Oncology. 8th ed. / Ed. Rubin Ph.-Philadelphia: W.B. Saunders company. – 2001. – P.405-461.
9. Sun TP, Ching CT, Cheng CS, Huang SH, Chen YJ, Hsiao CS, Chang CH, Huang SY, Shieh HL, Liu WH, Liu CM, Chen CY. The use of bioimpedance in the detection/screening of tongue cancer // Cancer Epidemiol. – 2010 Apr; 34(2):207-11. Epub 2010 Jan 22.

10. Zhao H, Ljungberg B, Grankvist K, Rasmuson T, Tibshirani R, Brooks JD, et al. Gene expression profiling predicts survival in conventional renal cell carcinoma. PLoS Med 2006; 3:13.

Рецензенты:

Франциянц Е.М., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «РНИОИ» МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону;

Каймакчи О.Ю., д.м.н., ассистент кафедры онкологии Ростовского государственного медицинского университета, г. Ростов-на-Дону.