

УДК 616.311-076

Информативность определения биомаркёров p53 и Ki-67 у пациентов с плоскоклеточным раком губы

М.А. ЕГОРОВ, Л.Р. МУХАМЕДЖАНОВА, Р.Н. КУЛАГИН, Р.Г. КУЗНЕЦОВА

Казанский государственный медицинский университет

Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, г. Чебоксары

Научно-консультативный центр заболеваний слизистой оболочки рта «Эксклюзив-Дент», г. Казань

Республиканская клиническая больница МЗ РТ, г. Казань

Михаил Алексеевич Егоров

соискатель кафедры терапевтической стоматологии

420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49

тел. 8-927-420-62-07, e-mail: misheerr@mail.ru

В работе изложены результаты изучения диагностической ценности определения биомаркёров p53 и Ki-67 у пациентов с хронической трещиной губы и плоскоклеточным раком губы. Показана ассоциация между степенью экспрессии белков p53 и Ki-67, тяжестью, длительностью заболевания и размером очага поражения.

Ключевые слова: иммуногистохимическая диагностика, хроническая трещина губы, рак губы, p53, Ki-67, биомаркёры.

Informativity of determination of biomarkers p53 and Ki-67 in patients with squamous cell carcinoma of lips

M.A. EGOROV, L.R. MUKHAMEDZHANOVA, R.N. KULAGIN, R.G. KUZNETSOVA

Kazan State Medical University

Chuvash State University named after I.N. Ulyanov, Cheboksary

Scientific and consultancy Center of mucositis treatment «Exclusive-Dent», Kazan

Republican Clinical Hospital of the Ministry of Health of the Republic of Tatarstan, Kazan

This article presents the study results of the diagnostic value of determination of biomarkers p53 and Ki-67 in patients with chronic labial fissure and squamous cell carcinoma of lips. The association between the degree of p53 and Ki-67 protein expression and severity and duration of a disease and the size of the lesion is demonstrated.

Key words: immunohistochemical diagnosis, chronic labial fissure, labial tumor, p53, Ki-67, biomarkers.

Распространенность предраковых и опухолевых заболеваний слизистой оболочки рта (СОР) [1, 2] и красной каймы губ (ККГ) достаточно высока и число пациентов с верифицированными неопластическими процессами постоянно увеличивается [3, 4]. Исследованиями отечественных и зарубежных ученых [5-9] показано, что 10-15% предраковых заболеваний ККГ способны малигнизироваться под действием различных экзогенных и эндогенных факторов, таких как: злоупотребление алкоголем, психоактивными веществами, табакокурением [10], вредных привычек кусания и облизывания губ, хронических травм острыми краями зубов, неудовлетворительной ги-

гиены полости рта, несанированной полости рта. Стратегически важным на диагностическом этапе является дифференциация предикторных симптомов и снижение влияния доказанных факторов риска малигнизации.

Клинические методы диагностики (осмотр, пальпация, определение размеров очага поражения и объема губы, стоматологического и мукозального статуса), лабораторные методы (общий анализ крови, биохимический анализ крови, бактериологические исследования), функциональные методы (измерение вакуумной стойкости капилляров, определение дискриминационной чувствительности) не позволяют в полной мере оценить характер по-

ражения, глубину инвазии и степень распространенности неопластического процесса [11, 12].

Иммуногистохимический метод продолжительное время используют для верифицирования рака различных локализаций, а также при диагностике предикторных (предраковых) заболеваний. Возможно использование полученных данных для составления ближайшего и отдаленного прогнозов течения предракового процесса. В этом отношении несомненный интерес представляют биомаркеры p53 и Ki-67.

p53 («ген-подавитель опухоли») расположен на коротком плече хромосомы 17. Играет основную роль в клеточном периодическом контроле и впоследствии в торможении опухолевых процессов. Белок p53, закодированный геном с тем же самым названием, регулирует апоптоз. Мутации в p53 заканчиваются прекращением апоптоза, что вызывает бесконтрольный рост и развитие патологических клеток [13-19]. Перспективным маркером пролиферативной активности является антиген Ki-67, экспрессирующийся практически во всех фазах клеточного цикла и, соответственно, отражающий величину пролиферативного пула. Ген, кодирующий Ki-67, расположен на длинном плече 10 хромосомы. Ki-67 относится к регуляторным белкам [14, 20].

Цель исследования — оценка степени информативности определения уровня экспрессии иммуногистохимических маркеров p53 и Ki-67 в диагностике предраковых заболеваний красной каймы губ.

Материалы и методы

Иммуногистохимическому исследованию были подвергнуты 63 биоптата пациентов, находившихся на учете в Республиканском онкологическом диспансере МЗ РТ с диагнозом «рак губы». При включении пациентов в исследование учитывали следующие критерии: возраст, пол, характер поражения: эрозивные, инфильтративные очаги, пролиферативные процессы; выраженность гиперкератоза и гиперемии по периферии очага поражения; объем и площадь поражения; вовлеченность в процесс анатомических образований губ: бугорка верхней губы, филтрума, комиссуральных зон; срок давности заболевания и наличие вредных привычек (по данным анамнестического исследования); степень распространения по международной классификации TNM.

Биопсию проводили по стандартной методике: под инфильтрационной анестезией (2%-ный раствор лидокаина гидрохлорида) при помощи мукотома проводили забор материала на границе со здоровой тканью, далее материал фиксировался в 10%-ном растворе нейтрального формалина и транспортировался в лабораторию молекулярной онкологии для дальнейшей подготовки к иммуногистохимическому исследованию [21].

Всего изготовлено 2 мультиблока TMA (технология tissue microarray) из гистологического материала 63 пациентов. Были определены наиболее репрезентативные участки для последующего иммуногистохимического исследования. Для каждого случая выбрано как минимум 2 точки из очага опухолевого поражения. Для технического выполнения мультиблока был использован программно-аппаратный комплекс TMA Master (3DHISTECH Ltd, Венгрия). Все подготовленные для изучения препараты (окрашенные стекла) проходили автоматизированное сканирование на сканере для гистологических препаратов Mirax MIDI (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия).

Подсчет индекса пролиферации Ki-67 и индекса p53 проводился с использованием морфометрической окулярной сетки Автандилова в 20 полях зрения, увеличение $\times 400$, при этом учитывалось 500 клеток. Для p53 учитывались только интенсивно окрашенные черно-коричневого цвета ядра, а для Ki-67 — позитивно окрашенные ядра любой степени интенсивности. Полученные результаты

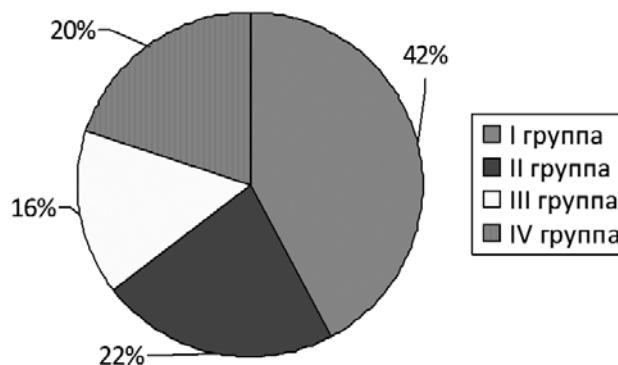
были подвергнуты статистической обработке с использованием стандартного пакета статистических программ.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

В ходе исследования пациенты были ранжированы по группам в зависимости от степени экспрессии p53, всего выделено 4 группы. Первую группу составили 19 пациентов (8 женщин, 11 мужчин), средний возраст которых составил 73,1 года. Интенсивность окрашивания биоптатов составила от 0 до 10%. Во вторую группу вошли 10 пациентов (3 женщины и 7 мужчин, средний возраст — 70,3 года), гистологические препараты которых имели степень окрашивания от 11 до 30%. В третью группу определены 7 пациентов (2 женщины и 5 мужчин, средний возраст — 78,42 года); интенсивность окраски гистологических препаратов — от 31 до 50%. Четвертую группу составили 9 пациентов (4 женщины и 5 мужчин, медиана возраста — 67,8 года). Данная группа показала степень экспрессии маркера p53 свыше 51% (рис. 1). Результаты окрашивания сопоставляли с клиническими проявлениями, сроками давности заболевания, степенью распространения по международной классификации TNM.

Рисунок 1.

Распределение пациентов по группам в зависимости от степени экспрессии p53



В первой группе (табл. 1) чаще встречались пациенты со степенью распространения $T_1N_0M_0$, реже $T_2N_0M_0$. По длительности течения заболевания отмечаются сроки от 1 до 5 месяцев. Поскольку данные были получены в ходе ретроспективного анализа амбулаторных карт онкологических больных, а графа «жалобы» заполнялась со слов пациента, мы не можем с определенной степенью уверенности определить длительность заболевания. По этой причине некоторые высказывающиеся варианты из обсуждения результатов исключены. Размер очага поражения в среднем 2 см, однако единичные пациенты имели очаг 3×3 см. В первой группе отмечается однородность в отношении характера течения — преимущественно язвенные формы поражения красной каймы губ.

Распространение опухолевого процесса во второй группе имело чаще всего $T_2N_0M_0$, у 4 пациентов — $T_1N_0M_0$. У всех отмечена длительность заболевания свыше 6 месяцев (максимум до 12 месяцев). По размеру очага имеются схожие данные с первой группой, хотя 3 пациента имели очаги до 3 см в диаметре и преобладали также язвенные формы.

В третьей группе наблюдался парадоксальный размер очагов — до 1 см в диаметре. Средняя длительность заболевания достигала 5 лет. Распространенность опухолей была чаще $T_2N_0M_0$, реже — $T_1N_0M_0$. В данной группе пациенты имели чаще всего опухоли с экзофитным характером роста.

Таблица 1.
Сопоставление групп пациентов (биоптаты, окрашенные на р53) и клинических данных

Сравниваемые признаки	I группа 0-10%	II группа 10-30%	III группа 30-50%	IV группа Более 50%
TNM	$T_{1\text{ (или 2)}}N_0M_0$	$T_{2\text{ — неясное преобладание}}^{T_{1\text{ (или 2)}}N_0M_0}$	$T_{2\text{ (реже 1)}}N_0M_0$	$T_{1\text{ (2)}}N_0M_0$
Длительность заболевания	5 мес.	Более 6 мес., (до года)	6 мес., (более года)	Годы
Размер поражения	До 2,0 см в диаметре, редко 2,0 x 3,0 см	2,0 x 2,5 см в диаметре	До 1,0 см в диаметре	Более 3,5 см в диаметре
Возраст	73,1 года	70,3 года	78,4 года	67,8 года
Разное	Однородность в отношении язвенных форм	Преобладание язвенных форм, редко — экзофитные	Преобладание экзофитных форм	Преобладание инфильтративно-язвенных форм
Вредные привычки	—	—	Курение	Курение

Таблица 2.
Сопоставление групп пациентов (биоптаты, окрашенные на Ki-67) и клинических данных

Сравниваемые признаки	I группа 0-30%	II группа 30-50%	III группа Более 50%
TNM	$T_{1\text{ (чаще 2)}}N_0M_0$	$T_{1\text{ (2,3,4)}}N_0M_0$	$T_1N_0M_0 / T_1N_0M_0\ 50\%/50\%$
Длительность заболевания	Менее 6 мес.	Более 6 мес, до 2 лет	От нескольких месяцев до 1 года
Размер поражения	1,8-2,5 см в диаметре	До 3,5 см в диаметре	Не более 1,0 см в диаметре
Возраст	70,4 года	70,3 года	70,4 года
Разное	Преобладание инфильтративно-язвенных форм	Отмечаются эрозивные поражения, суб- и тотальные поражения губ	-
Вредные привычки	-	-	-

Четвертая группа пациентов отличается более длительным течением заболевания — свыше 1 года и размерами очагов поражения красной каймы губ от 2,5-3,5 см и более, в некоторых случаях встречались суб- и тотальные поражения губ. Пациенты данной группы имели инфильтративно-язвенные поражения. По распространенности чаще всего встречались $T_3N_0M_0$, однако выявлены и $T_2N_0M_0$ (табл. 1).

В ходе исследования удалось установить корреляцию ($r=0.64$) между степенью экспрессии р53 и распространенностью по TNM, длительностью заболевания (III группа не имеет такой связи). На примере I и II групп имеется связь ($r=0.52$) степени окрашивания и давности заболевания. В интервале от 0% до 50% окрашивания отмечается корреляция с возрастом ($r=0.58$), однако по IV группе (свыше 50%) информативность данного биологического маркера низкая. Удалось установить, что при увеличении

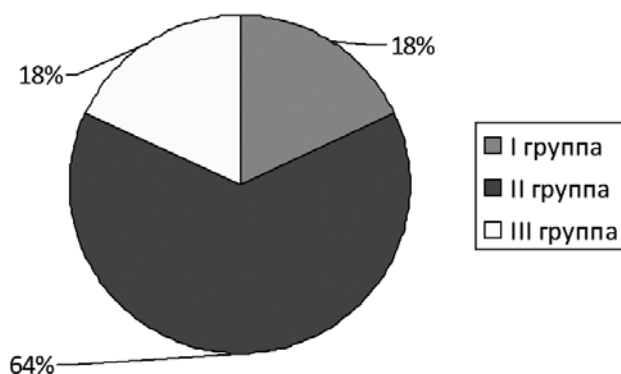
очага поражения в диаметре степень экспрессии р53 пропорционально увеличивается; исключение составила IV группа.

Таким образом, определение степени экспрессии р53 достаточно информативно при прогнозировании течения заболевания на ранних стадиях.

На основании полученных при микроскопическом исследовании окрашенных биоптатов на Ki-67 всех пациентов разделили на 3 группы (рис. 2). В первую группу вошли 9 пациентов (из них 3 женщины и 6 мужчин, средний возраст — 70,4 года). Степень экспрессии в процентном соотношении в данной группе составила от 0 до 30%. Вторую группу составили 33 пациента (11 женщин, 22 мужчины, средний возраст — 70 лет). Данная группа явилась самой многочисленной. Окрашивание биопсийного материала выявило от 31 до 50%. Третью группу образовали пациенты, биопсийный материал которых имел

индекс окраски от 51 до 90%. В группу вошли 9 человек, из них 2 женщины и 5 мужчин, средний возраст составил 70,42 года.

Рисунок 2.
Распределение пациентов по группам в зависимости от степени экспрессии Ki-67



ЛИТЕРАТУРА

- Белёва Н.С. Совершенствование диагностики и комплексного лечения в системе диспансеризации больных красным плоским лишаем слизистой оболочки полости рта: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Пермь, 2010. — С. 8-9.
- Белёва Н.С., Либик Т.В. Факторы системного риска у больных с проявлениями красного плоского лишая слизистой оболочки полости рта // Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых. — Пермь, 2009. — С. 191-194.
- Соловьев М.М. Рак слизистой оболочки полости рта и языка (резервы улучшения результатов лечения) // Практическая онкология. — 2003. — Т. 4, № 1. — С. 42.
- Филурин М.Д. Комплексная диагностика предрака красной каймы губ и слизистой оболочки рта и ее значение для клинической практики: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Омск, 1994. — С. 2.
- Breiteneder Gelef, S. et al. Angiosarcomas Express Mixed Endothelial Phenotypes of Blood and Lymphatic Capillaries // Am.J. Pathol. — 1999. — Vol. 154. — P. 385-394.
- Chen Y., Zhang W. MMPs, TIMP-2, and TGF-beta1 in the cancerization of oral lichen planus // Head & Neck [Head Neck]. — 2008 Sep. — Vol. 30, № 9. — P. 1237-45.
- Hadzi-Mihailovic M. Expression of Fas/FasL in patients with oral lichen planus // Journal Of B.U.ON.: Official Journal Of The Balkan Union Of Oncology [J BUON]. — 2009 Jul-Sep. — Vol. 14, № 3. — P. 487-93.
- Marker of metastasis in lip cancer / I. Fernandez-Angel, A. Rodriguez-Archilla, J. Aneiros Cachaza [et al.] // Eur J. Dermatol. — 2003. — № 13(3). — P. 276-279.
- Oral cancer after using Swedish suns (smokess tobacco) for 70 years — a case report / U.K. Zatterstrom, M. Svensson, L. Sand [et al.] // Oral Dis. — 2004. — № 10(1). — P. 50-53.
- Gene Expression Profiling of Human Lung Tissue from Smokers with Severe Emphysema / A. Spira, J. Beane, V. Pinto-Plata [et al.] // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. — 2004. — № 31(6). — P. 601-610.
- Фомина Ю.В. Диагностика доброкачественных и неопластических заболеваний слизистой оболочки полости рта с использованием оптических методов: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Н. Новгород, 2003. — С. 3-4.

Степень распространения очагов поражения в I группе — $T_1N_0M_0$, однако чаще $T_2N_0M_0$. Длительность заболевания была не менее 6 месяцев, а размер очага поражения на губе находился в пределах от 1,8 до 2,5 см. Вторая группа имела распространение более широкое — $T_{2-4}N_0M_0$, однако в единичных случаях выявлено $T_1N_0M_0$. Давность заболевания определялась в диапазоне от 6 месяцев до 1-2 лет. Возрастной состав всех трех групп был одинаков, однако диапазон I и II групп был более широк, в отличие от III группы. Пациенты I группы имели инфильтративно-язвенный характер поражений, в то время как во второй группе преобладал эрозивный характер поражения губы. Пациенты III группы имели схожие данные с I и II группой по распространенности опухоли по системе TNM; при этом отношение $T_1N_0M_0$ / $T_2N_0M_0$ определилось как 50 на 50%. Длительность заболевания пациенты отмечали менее 1 года (в некоторых случаях до 1-2 месяцев). Размер очага сопоставим с длительностью и имел не более 1 см в диаметре (табл. 2).

Таким образом, удалось установить связь степени экспрессии Ki-67 с TNM ($p=0,71$), длительностью заболевания ($p=0,46$) и размером очага поражения ($p=0,59$). Однако высокий уровень экспрессии данного биологического маркера не может свидетельствовать о «продвинутой» и распространенности опухолевого процесса.

- Фомина Ю.В., Гажва С.И. Оптическая когерентная томография в диагностике заболеваний слизистой оболочки полости рта // Приложение к НМЖ. Стоматология. — 2003. — С. 122.
- Чумаков П.М. P53 с мутацией в кодоне 273 увеличивает вероятность амплификации гена dhjv в клетках Rat-1 и LIM1215 / П.М. Чумаков // Генетика. — 1995. — Т. 31, № 5. — С. 611-616.
- Acay R.R., Felizzola C.R. Evaluation of proliferative potential in oral lichen planus and oral lichenoid lesions using immunohistochemical expression of p53 and Ki67 // Oral Oncology [Oral Oncol]. — 2006 May. — Vol. 42, № 5. — P. 475-80. Date of Electronic Publication: 2005 Dec 20.
- De Sousa F.A., Paradella T.C., Carvalho Y.R. Comparative analysis of the expression of proliferating cell nuclear antigen, p53, bax, and bcl-2 in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma // Annals Of Diagnostic Pathology [Ann Diagn Pathol]. — 2009 Oct. — Vol. 13, № 5. — P. 308-12. Date of Electronic Publication: 2009 Jul 10.
- Ebrahimi M., Boldrup L. Expression of novel p53 isoforms in oral lichen planus // Oral Oncology [Oral Oncol]. — 2008 Feb. — Vol. 44, № 2. — P. 156-61. Date of Electronic Publication: 2007 Apr 05.
- Immunohistochemical detection of p53 in archival formalin-fixed tissues of lip and intraoral squamous cell carcinomas from Norway / S.O. Ibrahim, A.C. Johannessen, E.N. Vassstrand [et al.] // APMIS. — 1997. — № 10. — P. 757-764.
- Murti P.R. P53 expression in oral precancer as a marker for malignant potential // Journal Of Oral Pathology & Medicine: Official Publication Of The International Association Of Oral Pathologists And The American Academy Of Oral Pathology [J Oral Pathol Med]. — 1998 May. — Vol. 27, № 5. — P. 191-6.
- P53 mutational spectra are different between squamous-cell carcinomas of the lip and the oral cavity / C. Ostwald, P. Hillmann, J. Schweder [et al.] // Int J. Cancer. — 2000. — № 1. — P. 82-86.
- Ebrahimi M., Boldrup L., Wahlén Y.B. Decreased expression of the p63 related proteins beta-catenin, E-cadherin and EGFR in oral lichen planus // Oral Oncology [Oral Oncol]. — 2008 Jul. — Vol. 44, № 7. — P. 634-8. Date of Electronic Publication: 2007 Oct 23.
- Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Издание 3-е, доп. и перераб. — Казань, 2004. — 452 с.