

УДК 616.65-006.6-008.94

Алексинский В.С., Басинский В.А.

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Aliaksinski V., Basinski V.

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Анализ взаимосвязи экспрессии маркеров клеточного цикла с морфологическими параметрами и прогнозом заболевания при меланоме кожи

The analysis of correlations of the cell cycle markers expression with morphological parameters for skin melanoma

Резюме

Изучена взаимосвязь экспрессии маркеров клеточного цикла Ki67 (MIB-1), циклин D₁, p21^{WAF1CIP1} и p27^{KIP1} с морфологическими параметрами и прогнозом заболевания при меланоме кожи. Показано, что изменения в экспрессии ингибиторов циклин-зависимых киназ и циклина D₁ носят достаточно содружественный характер, а в меланомах со вторичными изменениями снижается позитивность циклина D₁, в то время как в эпителиоидно-клеточных меланомах экспрессия p21^{WAF1CIP1} и p27^{KIP1} примерно в 2 раза выше, чем в веретеноклеточных. Экспрессия маркера Ki67 (MIB-1) выше в меланомах с веретеноклеточным компонентом и обладает прогностической ценностью в отношении безрецидивной выживаемости пациентов с меланомой кожи: при повышении ее уровня снижается безрецидивная выживаемость пациентов, а при достижении значения 12% пациенты умирают в течение 5 лет после установки диагноза либо у них наблюдается рецидив заболевания.

Ключевые слова: меланома кожи, клеточный цикл, иммуногистохимия, прогноз.

Abstract

There was studied correlations of the cell cycle markers Ki-67 (MIB-1), cyclin D₁, p21^{WAF1CIP1} and p27^{KIP1} with morphological parameters and prognosis of the disease for skin melanoma. The was shown that expression of inhibitors of cycline-dependent kinases and cyclin D₁ were quite friendly. In melanomas with secondary changes there was decrease of expression of cycline D₁. In the same time, epithelioid-cell melanomas has higher expression of p21^{WAF1CIP1} and p27^{KIP1} over 2 times than spindle cell. The Expression of the marker KI67 (MIB-1) higher in melanomas with spindle cell component and has a predictive value in regard to non-residue survival in patients with melanoma: by increasing its level decreased disease-free survival. When meaning reaches of 12% the patients dying during five years after diagnosis or relapse occurs.

Keywords: skin melanoma, cell cycle, immunohistochemistry, prognosis.

ВВЕДЕНИЕ

В 2006 г. ВОЗ постулировала две стратегии иммунопрофилирования меланомы кожи для оценки прогноза заболевания [1]. Одна из них подразумевала использование иммуногистохимических маркеров для микростадирования (определения подстадий) опухолевого процесса, но в связи с тем, что в процессе опухолевой прогрессии экспрессия этих маркеров может сильно изменяться, реализация данного направления в применении иммуногистохимии была сведена к использованию маркеров «распознавания» клеток меланомы (для выявления сателлитов и микрометастазов в лимфоузлах), например, S-100 или MART-1. Таким образом, участие данных маркеров в прогнозировании заболевания играет хотя и важную, но косвенную роль. Другое направление, на наш взгляд, более перспективное, предполагает поиск маркеров для идентификации агрессивных клеточных субпопуляций в меланомах. Однако пока только небольшое количество маркеров (среди них Ki67 (MIB-1), циклин A, p16, p53 и некоторые другие) имеет прогностическое значение независимо от стандартных факторов прогноза – толщины по Breslow и изъязвления, причем эти предложенные ВОЗ маркеры прогрессии надежно «работают» в основном при тонких (до 1,5 мм) первичных меланомах без изъязвления.

В рамках поиска прогностически ценных для меланомы кожи иммуногистохимических маркеров нами была предложена панель, характеризующая клеточный цикл и представленная 4 моноклональными антителами: Ki67 (MIB-1), циклин D₁, p27^{KIP1}, p21^{WAF1/CIP1}.

Ki67 (MIB-1) считается одним из наиболее оптимальных маркеров клеточной пролиферации: с помощью этого антитела возможно определение ростовой фракции опухолевой клеточной популяции [2], но прогностическая ценность его экспрессии в меланоме кожи оценивается неоднозначно. По некоторым данным [3, 4], экспрессия Ki67 (MIB-1) не является прогностическим фактором для первичной меланомы: в узловых меланомах уровень пролиферации практически не влияет на прогрессию болезни, не связан с толщиной опухоли и не оказывает влияния на отсутствие рецидивов или выживаемость в целом. С другой стороны, имеются данные, что для меланомы аноректальной и синоназальной локализаций более низкий уровень экспрессии Ki67 (MIB-1) ассоциирован с лучшими показателями выживаемости [5, 6], а в доброкачественных меланоцитарных поражениях индекс Ki67 (MIB-1) составляет менее 5% (диапазон 0–4%), и окрашивание присутствует вблизи дермо-эпидерmalного соединения, тогда как в меланомах средний индекс составляет 27% (диапазон 5–50%), а структура окрашивания носит гетерогенный характер [7]. Некоторые авторы [8] не только нашли значительную корреляцию между экспрессией маркерного гена Ki67 (MIB-1) в меланомах кожи и выживаемостью, а также наличием метастазов, но и продемонстрировали важную роль антигена Ki67 (MIB-1) для дифдиагноза между родимыми пятнами и меланомами.

Комплексы «циклин/циклин-зависимая киназа» (Cyclin/Cdk) регулируют продвижение клетки по фазам клеточного цикла. Активность циклин-зависимых киназ регулируетсяprotoонкогенами и опухолевыми супрессорами. p27^{KIP1} и p21^{WAF1/CIP1} относятся к семейству Cip/Kip ингибиторов циклин-зависимых киназ. Белки Cip/Kip действуют как положительные регуляторы комплексов “cyclin D/CDK4” и отрицательные регуляторы комплексов “cyclin A/CDK2” и “cyclin E/CDK2”. Повышение экспрессии p27^{KIP1} в нормальных клетках приводит к остановке клеточного цикла в фазе G1, а p21^{WAF1/CIP1} также способен регулировать и останавливать клеточный цикл, ингибирует репликацию ДНК [9–12]. Циклин D₁ гиперпродуцируется в меланомах и играет важную роль в формировании их злокачественного фенотипа [13–15].



ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ взаимосвязи маркеров клеточного цикла Ki67 (MIB-1), циклин D₁, p27^{KIP1} и p21^{WAF1/CIP1} с морфологическими параметрами и прогнозом заболевания при меланоме кожи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили 65 меланом кожи, полученных при хирургическом лечении пациентов Гродненской области, не подвергавшихся лучевой и химиотерапии, с ретроспективно известными исходами течения опухолевого процесса. Медиана возраста пациентов составила 62 (51; 70) года, а медиана безрецидивной продолжительности жизни пациентов в послеоперационном периоде равнялась 38 (15; 90) месяцам (в скобках приведены нижний и верхний квартили).

Оценивались макроскопические параметры меланомы: большой и малый размеры, высота и степень пигментации (оценивалась полуколичественно от 0 до 3 баллов), исходя из линейных размеров, определялась площадь основания опухоли в плоскости кожи, ее объем и эксцентризитет (фактор формы) опухоли.

Для гистологического исследования с парафиновых блоков получали срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивались гематоксилином и эозином по стандартной методике. Оценивались такие морфологические параметры меланомы, как стадия инвазивного роста по Кларку, толщина по Breslow (в мм), на основании которой определялась стадия рГ согласно требованиям ВОЗ к TNM-классификации меланомы кожи, гистологический тип, отмечалось наличие вторичных изменений в опухоли (изъязвлений и некрозов), выраженность перитуморозной лимфогистиоцитарной инфильтрации (ПТИ).

Клеточный цикл меланобластов изучался при помощи маркера клеточной пролиферации Ki-67 (MIB-1), антител к циклину D₁ и ингибиторам циклин-зависимых киназ p27^{KIP1} и p21^{WAF1/CIP1}. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование выполнено с использованием моноклональных мышиных антител фирмы DAKO по следующей методике [16]: из парафиновых блоков готовились срезы толщиной 5 мкм, переносились на предметные стекла ultrafrost+; срезы в вертикальном положении высушивали 18 ч при комнатной температуре, далее помещали в термостат на 30 мин при температуре 60 °C. После этого проводилась депарафинизация в ксилоле (в батарее из 3 емкостей по 3 мин в каждой) и дегидратация в этиловом спирте (в батарее из 3 емкостей в спиртах восходящей крепости по 3 мин в каждой). Предметные стекла со срезами переносились в цитратный буфер pH 6.0 и помещались в водяную баню при температуре 98 °C на 30 мин. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы обрабатывались 3%-й перекисью водорода. Первичные антитела наносились в стандартном разведении. Срезы инкубировались в течение 30 мин при комнатной температуре. В качестве визуализирующей системы использовали комплекс вторичных антител EnVision фирмы DAKO с диаминбензидином. Затем срезы промывали проточной водой, докрашивали гематоксилином и заключали в канадский бальзам. Проводились положительные и отрицательные контрольные реакции.

Для количественной оценки результатов ИГХ-реакции микропрепараты были сфотографированы при помощи микроскопа Axiostar и цифровой камеры Canon (объектив $\times 40$, разрешение 1600×1200 пикселей). Количественной мерой экспрессии ядерного маркера Ki67 (MIB-1) явился клеточный пролиферативный индекс (КПИ): находилась процентная доля Ki67-позитивных клеточных ядер в опухоли (показатель обозначался как КПИ).

Аналогично (в процентах) оценивалась экспрессия ядерных маркеров p27^{KIP1} и p21^{WAF1/CIP1}, а также ядерная экспрессия циклина D₁, (показатели обозначались как p27%, p21% и Cys% соответственно). Общая (вне зависимости от паттерна окрашивания) экспрессия маркера циклин D₁ оценивалась количественно при помощи компьютерной программы Aperio Image Scope в максимально возможном количестве полей зрения по стандартному алгоритму подсчета позитивных пикселов “Positive Pixel Count v9”, исходя из показателя «позитивность» (или positivity, поэтому показатель обозначался как Cys_p). Стромальные прослойки и просветы сосудов, а также гистологические артефакты исключались из анализа. Помимо этого, для циклина D₁ была оценена полуколичественным методом (по шкале от 0 до 3) интенсивность цитоплазматического (Cys_{инт.цит.}) и ядерного (Cys_{ядр.}) окрашивания.

Для статистической обработки полученных результатов использовался пакет прикладных программ STATISTICA 10.0 согласно руководству О.Ю. Ребровой по работе с данным программным обеспечением [17]: описательная статистика (Me (LQ; UQ) – медиана (верхний quartиль; нижний quartиль)), непараметрический корреляционный анализ Спирмена, сравнения множественных независимых групп Краскела – Уоллиса и медианный тест 2 независимых групп Манна – Уитни. Также применялся ROC-анализ и оценка выживаемости (регрессионная модель Каплана – Майера, тест сравнения выживаемости в двух и множественных группах, дискриминантный анализ для прогнозирования 5-летней выживаемости). Результаты считались статистически значимыми при p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке корреляционных связей между исследуемыми параметрами меланомы кожи обнаружено следующее: пролиферативная активность опухоли, определенная по маркеру KI67 (MIB-1), не была связана с макроскопическими и гистологическими параметрами опухоли (во всех случаях p>0,05).

Также ни один из показателей, характеризующих экспрессию маркера циклин D₁, не обнаружил корреляционных взаимосвязей с макроскопическими характеристиками опухоли (во всех случаях p>0,05). Аналогичным образом вели себя ингибиторы циклин-зависимых киназ, хотя следует отметить, что маркер p27^{KIP1} все же показал отрицательную взаимосвязь с эксцентризитетом опухоли, r_s=-0,31, p=0,04.

Позитивность циклина D₁ обратно коррелировала с выраженностью вторичных изменений в меланомах (r_s=-0,35, p=0,029), но с остальными гистологическими характеристиками опухоли циклин D₁ и ингибиторы циклин-зависимых киназ не коррелировали (во всех случаях p>0,05).

Экспрессия KI67 (MIB-1) в ядрах клеток опухолевой паренхимы не была связана с экспрессией всех остальных исследуемых ИГХ-маркеров, зато уровни экспрессии ингибиторов циклин- зависимых киназ прямо коррелировали друг с другом (r_s=0,39, p=0,007) и с экспрессией циклина D₁ (табл. 1). Причем связь экспрессии p21^{WAF1/CIP1} с экспрессией циклина D₁ была менее выраженной, поскольку данный маркер не показал статистически значимой корреляции с интенсивностью цитоплазматического и ядерного окрашивания циклина D₁ (p>0,05), хотя в последнем случае все же отмечалась тенденция к прямой корреляции.

Использование тестов сравнения независимых групп дало следующие результаты: тест Манна – Уитни не выявил различий по средним значениям всех иммуногистохимических показателей между опухолями округлой и вытянутой форм (во всех случаях p>0,05).

Таблица 1

Характер корреляционных связей экспрессии ингибиторов циклин-зависимых киназ с показателями экспрессии циклина D₁

ИГХ-показатели	rs	p
p21% & Cyc _p	0,34	0,04
p21% & Cyc%	0,42	0,01
p21% & Cyc _{инт.яд.}	0,3	0,068
p27% & Cyc _p	0,57	<0,001
p27% & Cyc%	0,4	0,008
p27% & Cyc _{инт.цит.}	0,54	<0,001
p27% & Cyc _{инт.цит.}	0,39	0,01

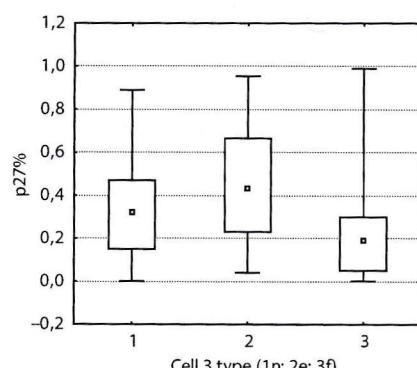
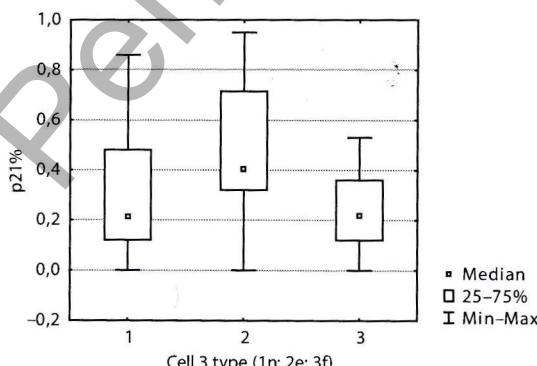
Меланомы с наличием вторичных изменений и без них различались по позитивности циклина D₁ (тест Манна – Уитни, p=0,03, U=111): в меланомах без вторичных изменений она была равна 0,7 (0,46; 0,78), а в меланомах со вторичными изменениями – 0,47 (0,33; 0,66).

Множественные сравнения меланом различных цитологических типов показали отсутствие различий их по уровням КПИ и показателям экспрессии циклина D₁ (тест Краскела – Уоллиса и медианный тест, p>0,05 во всех случаях). В случае же маркеров p21^{WAF1CIP1} и p27^{KIP1} определялось различие их экспрессии при выделении 3 групп опухолей по клеточному строению (см. рисунок): p=0,06 и 0,08, соответственно – тест Краскела – Уоллиса; p=0,038 и 0,01, соответственно – медианный тест. Но при выделении 4 групп (с дополнительным смешанно-клеточным типом) данные различия пропадали (p>0,05).

Попарный анализ методом Манна – Уитни с применением поправки Бонферрони показал, что имеется статистически значимое различие в экспрессии p21^{WAF1CIP1} и p27^{KIP1} между эпителиоидно- и веретеноклеточными меланомами (p=0,016 и 0,048 соответственно). В эпителиоидно-клеточных меланомах экспрессия данных маркеров примерно в 2 раза выше, чем в веретеноклеточных.

При сравнении двух групп (тест Манна – Уитни) не было различий по иммуногистохимическим показателям между меланомами, содержащими и не содержащими невусные клетки (p>0,05 во всех случаях). То же самое можно сказать и про меланомы, сгруппированные по содержанию эпителиоидно-клеточного компонента, но в данном случае имелась тенденция к более высокой экспрессии маркера p21^{WAF1CIP1} в меланомах с эпителиоидными клетками, U=165,5, p=0,06.

В отличие от вышеперечисленных клеточных компонентов, веретеноклеточный компонент продемонстрировал влияние на пролиферативную активность



Различия меланом по экспрессии ингибиторов циклин- зависимых киназ в зависимости от клеточного типа (1n – невоклеточные меланомы, 2e – эпителиоидноклеточные, 3f – веретеноклеточные)

меланомы: опухоли, содержащие веретеновидные клетки, в 2 раза более высоко экспрессировали маркер клеточной пролиферации KI67 (MIB-1). Кроме того, меланомы с веретеноклеточным компонентом характеризовались на уровне тенденции более высокой ядерной экспрессией циклина D₁. Описанные зависимости приведены в табл. 2.

При оценке взаимосвязи экспрессии исследуемых маркеров с выживаемостью найдено, что только KI67 (MIB-1) взаимосвязан с безрецидивной продолжительностью жизни пациентов (тест Спирмена: $r_s = -0,33$, $p=0,037$): с повышением КПИ падает выживаемость пациентов. Для изучения возможности прогнозировать безрецидивную 5-летнюю выживаемость по величине экспрессии KI67 (MIB-1) на основании полученных значений пролиферативного индекса была построена ROC-кривая со следующими параметрами: площадь под кривой 0,7 (асимптотический 95%-й доверительный интервал 547–860), стандартная ошибка 0,08, $p=0,024$. Из имеющегося ряда значений координат кривой было выбрано значение КПИ, обладающее максимальной специфичностью и чувствительностью. Оптимальное значение исследуемой переменной составило 12% (чувствительность 0,59, специфичность 0,65). Затем выборка была разбита на две группы: в 1-ю вошли пациенты с меланомой, клетки которой демонстрировали уровень экспрессии KI67 (MIB-1), превышающий полученную пороговую точку, во 2-ю – пациенты со значением КПИ ниже пороговой точки. При анализе выживаемости с помощью теста Гехана – Уилкоксона было найдено статистически значимое различие в безрецидивной выживаемости пациентов в указанных группах ($p=0,029$): лица, относящиеся к 1-й группе, продемонстрировали худшие показатели выживаемости по сравнению с пациентами 2-й группы.

Однако ROC-анализ не выявил пороговых значений всех остальных исследуемых ИГХ-маркеров клеточного цикла, при которых пациенты могли бы «переходить» в неблагоприятную для исхода группу (рецидив либо смерть от меланомы в течение 5 лет после постановки диагноза).

Сравнение безрецидивной выживаемости пациентов, сгруппированных по интенсивности различных паттернов экспрессии маркера циклин D₁, также не показало статистически значимых различий в полученных группах (тест Краскела – Уоллиса и медианный тест, а также тест сравнения выживаемости во множественных группах: $p>0,05$ во всех случаях). При сравнении ИГХ-параметров меланом пациентов, сгруппированных по 5-летней безрецидивной выживаемости, методом Манна – Уитни найдены статистически значимые различия только в значениях уровня экспрессии маркера KI67 (MIB-1): в меланомах пациентов, имевших рецидивы либо умерших от меланомы в течение 5 лет после постановки диагноза, значение данного маркера составило 13,2 (7; 31,8)%, а у пациентов, не имевших рецидивов в течение 5 лет после постановки диагноза, – 6,6 (1,8; 13,9)%.

Дискриминантный анализ показал, что исследуемые ИГХ-показатели клеточного цикла не обладают хорошей предиктивной функцией в отношении безрецидивной 5-летней выживаемости, о чем говорит уровень значимости $p>0,05$, а также низкий процент корректной классификации – менее 70%, а в процессе обратного пошагового анализа из модели были удалены все переменные, но в последнюю очередь уровень

Таблица 2
Результаты сравнения меланом, содержащих (группа 1) и не содержащих (группа 0) веретеновидные клетки

ИГХ-показатели	Me (LQ; HQ)		U	p
	веретеновидные клетки			
0	0	1		
КПИ	6 (1,8; 15)	12,2 (7,3; 17,4)	160	0,036
Сус%	9,4 (0; 54,5)	27 (10,5; 60)	154	0,066

экспрессии маркера Ki67 (MIB-1) ($F=3,74$, $p=0,066$). Таким образом, предложенная ИГХ-панель и полученные при ее использовании показатели не могут быть использованы для построения валидной дискриминантной модели для прогноза безрецидивной 5-летней выживаемости пациентов с меланомой кожи, а из всей использованной ИГХ-панели только маркер клеточной пролиферации Ki67 (MIB-1) полезен для прогнозирования безрецидивной продолжительности жизни пациентов.

ВЫВОДЫ

- Изменения в экспрессии ингибиторов циклин-зависимых киназ и циклина D₁ идут в одном направлении и носят достаточно содружественный характер. В меланомах со вторичными изменениями снижается позитивность циклина D₁.
- В эпителиоидно-клеточных меланомах экспрессия p21^{WAF1/CIP1} и p27^{KIP1} примерно в 2 раза выше, чем в веретеноклеточных. Веретеноклеточные популяции в меланомах также ассоциированы с в 2 раза более высокой пролиферативной активностью опухоли, оцененной по маркеру Ki67 (MIB-1).
- По нашим данным, из всех исследованных нами ИГХ-маркеров клеточного цикла прогностической ценностью в отношении безрецидивной выживаемости пациентов с меланомой кожи независимо от стадии инвазивного роста по Кларку, толщины по Breslow или гистологического типа опухоли обладает только маркер клеточной пролиферации Ki67 (MIB-1), в связи с чем рекомендуется широкое его использование в рутинной практике врачей-патологоанатомов и обязательное включение в ИГХ-панель для оценки меланомы кожи. При повышении уровня экспрессии данного маркера снижается безрецидивная выживаемость пациентов, а критическим значением для оценки прогноза безрецидивной 5-летней выживаемости следует считать значение КПИ, равное 12%: при достижении этого значения у пациентов наблюдается рецидив заболевания или наступает смерть.

ЛИТЕРАТУРА

- LeBoit P.E., Burg G., Weedon D., Sarasin A. (eds.) (2006) *Classification of Tumours. Pathology and Genetics Skin Tumours* [electronic resource]. Lyon: IARC press. Available at: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb6/> (accessed 25 January 2016).
- Gerdes J. (1990) Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin. Cancer Biol.*, vol. 1, no 3, pp. 199–206.
- Ilmonen S., Hernberg M., Pyrhönen S., Tarkkanen J., Asko-Seljavaara S. (2005) Ki-67, Bcl-2 and p53 expression in primary and metastatic melanoma. *Melanoma Res.*, vol. 15, no 5, pp. 375–381.
- Flørenes V.A., Maelandsmo G.M., Faye R., Nesland J.M., Holm R. (2001) Cyclin A expression in superficial spreading malignant melanomas correlates with clinical outcome. *J. Pathol.*, vol. 195, no 5, pp. 530–536.
- Ben-Izhak O., Bar-Chana M., Sussman L., Dobiner V., Sandbank J., Cagnano M., Cohen H., Sabo E. (2002) Ki67 antigen and PCNA proliferation markers predict survival in anorectal malignant melanoma. *Histopathology*, vol. 41, no 6, pp. 519–525.
- Kim D.K., Kim D.W., Kim S.W., Kim D.Y., Lee C.H., Rhee C.S. (2008) Ki67 antigen as a predictive factor for prognosis of sinonasal mucosal melanoma. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.*, vol. 1, no 4, pp. 206–210.