
ЭКСПРЕССИЯ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ И РЕГУЛЯТОРОВ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА В УРОТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

И.А. Шалавин, И.И. Бабиченко

Кафедра патологической анатомии
Медицинский факультет
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Макляя, 8, Москва, Россия, 117198

С.А. Осипов, М.В. Самойлов

Отделения урологии и патологической анатомии
ЦКБ РАН
Литовский бульвар, 1а, Москва, Россия, 117593

Фрагменты опухолей мочевого пузыря были исследованы у 32 больных в стадии T_a (8 пациентов), T₁-2 G₁-2 (20), T₁G₃ (3), T₂G₃(1). Иммуногистохимическим методом изучали экспрессию интерфиламентов СК20 и белков-регуляторов клеточного цикла — P53, Ki-67. Установлено, что интенсивность окрашивания ядер с помощью антител к белку P53 позволяет оценить степень злокачественности опухолевых клеток, а патологический тип экспрессии СК 20 и высокий процент позитивно окрашенных ядер на белок Ki-67 характеризует инвазивные уротелиальные опухоли.

В последнее десятилетие заболеваемость раком мочевого пузыря (РМП) существенно возросла. По данным Росстата, число вновь выявленных больных в 2004 г. составило 12,5 тыс., что на 45% выше показателей 1990 г. [2]. У 50% пациентов с поверхностными новообразованиями развиваются рецидивы опухоли, 5-летняя выживаемость при мышечно-инвазивном РМП не превышает 47%. Из года в год увеличивается количество неоперабельных пациентов, нуждающихся в таргетной химиотерапии.

В последнее время большое значение в клинической практике приобретают иммуногистохимические методы оценки РМП. Цитокератин 20 (СК20) входит в состав сети промежуточных филаментов, основной опорной клеточной структуры. Являясь типоспецифическим компонентом цитоскелета уротелия, СК20 рекомендуется для выявления лимфогенных и гематогенных метастазов РМП. Показано, что развитие рецидивов T_a опухолей мочевого пузыря может быть связано с типом экспрессии СК20 [9]. Известно, что величина экспрессии гена p53, играющего ключевую роль в апоптозе и регуляции деления клеток, коррелирует с низкой выживаемостью пациентов и может характеризовать стадию развития опухоли [3; 4]. При многофакторном анализе случаев мышечно-инвазивного РМП показано, что гиперэкспрессия p53 может предсказывать прогрессирование опухоли, в том числе на фоне иммунотерапии [12], и высокую летальность [8].

В настоящее время накоплены данные о прогностическом значении маркера клеточной пролиферации — Ki-67, экспрессия которого может коррелировать со степенью дифференцировки опухолевых клеток и стадией опухоли [11]. Гиперэкспрессия Ki-67 свидетельствует о высоком риске рецидивирования неинвазивных опухолей мочевого пузыря [13].

В ряду прогностических факторов РМП наибольшее значение имеют стадия и степень злокачественности опухоли. Верификация инвазии опухоли в собственную пластинку часто затруднительна вследствие тангенциальных срезов, воспалительного инфильтрата, неизбежного термического и механического повреждения ткани. В то же время соответствие заключений о степени злокачественности РМП наблюдается лишь в 74% случаев [7].

С целью выявления иммуногистохимических критериев, объективно отражающих степень злокачественности и стадию РМП, были изучены экспрессия компонента цитоскелета СК 20 и белков-регуляторов клеточного цикла P53, Ki-67.

Материалы и методы исследования. У 32 пациентов (12 женщин, 20 мужчин) исследованы фрагменты опухолей, полученных при трансуретральной резекции мочевого пузыря и цистоскопии. Патогистологические диагнозы были сформулированы согласно критериям ВОЗ 2004 г. [1].

Операционный и биопсийный материал фиксировали в 10% формалине и подвергали стандартной проводке на гистопротессоре и заливке в парафиновые блоки. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Обнаружение тканевых антигенов осуществлялось с помощью сывороток моноклональных антител к P53 (DO-7, Dako), Ki-67 (MM1, Diagnostic Biosystems) и СК20 (Ks 20.8, Dako). Выявление иммунных комплексов проводилось при помощи биотинной системы детекции на основе пероксидазы хрена (LSAB+, Dako). Реакция на СК20 в каждом случае оценивалась как нормальная (окрашенный поверхностный слой зонтичных клеток), либо как патологическая (наличие иммунореактивности всех слоев эпителия) [5]. Экспрессия белка-регулятора P53 оценивалась как количественно в %, так и качественно в зависимости от интенсивности реакции по порядковой шкале от 0 до 3 [10]. Индекс пролиферации по Ki-67 (ИП Ki-67) определялся отношением количества иммунореактивных ядер клеток к общему числу ядер клеток и выражался в %.

Результаты исследования. Средний возраст больных был 67,5 лет (25—87 лет). У одного пациента найдена инвертированная папиллома, у 7 (21,9%) — опухоль низкого злокачественного потенциала (ОНЗП), 24 больных (75%) при первичной биопсии имели инвазивный рак T1 (65,6%) и T2 (9,4%, табл.).

При иммуногистохимическом исследовании экспрессии P53 в различных уротелиальных опухолях интенсивность диаминобензидиновой реакции была различной, от 1 до 3 баллов. Слабая реакция (1+) отмечалась в инвертированной папилломе, интенсивное окрашивание соответствовало инвазивным карциномам с высокой степенью злокачественности. В отличие от карцином высокой степени злокачественности в опухолях с низкой степенью злокачественности интенсивная экспрессия P53 отмечалась в 2 раза реже ($p = 0,047$).

В группе неинвазивных опухолей мочевого пузыря нормальный и патологический типы экспрессии СК20 выявлялись в равном отношении, тогда как во всех инвазивных карциномах, за исключением одной T1 опухоли, наблюдался только патологический тип реакции СК20. В связи с этим между группами Та и T1-T2 выявлено значимое отличие в доле новообразований с патологическим типом экспрессией СК20 ($p = 0,006$, табл.).

**Клинические и иммуногистохимические характеристики
неинвазивных и инвазивных опухолей мочевого пузыря**

Характеристики	Ta (n = 8)	T1-T2 (n = 24)	p*
Средний возраст, лет	58,00	69,67	0,07
Пол (М/Ж)	5/3	15/9	0,37
Степень злокачественности опухолевых клеток			
G1-2	8	21	0,38
G3	0	4	
Экспрессия P53			
Слабая (1+)	5	12	0,77
Интенсивная (2-3+)	3	12	
Экспрессия СК20	4/4	1/23	0,006
Нормальный / патологический тип			
Средний ИП Ki-67, %	7,79	26,86	0,006

Примечание. *Определена с использованием двустороннего критерия Фишера при сравнении экспрессии P53 и СК20, а также критерия Манна-Уитни при сравнении ИП Ki-67.

ИП Ki-67 варьировал от 3,4% в ОНЗП до 83,7% в инвазивной карциноме. В инвертированной папилломе индекс пролиферации составил 6%. При сравнении ИП Ki-67 неинвазивных (7,79%) и инвазивных (26,86%) опухолей обнаружены значимые различия (табл., $p = 0,006$). Не отмечалось связи ИП Ki-67 со степенью злокачественности опухолевых клеток, возрастом, полом больных. Различия средних значений ИП клеток по показателю Ki-67 в группах нормальной/патологической экспрессии СК20, а также слабой/интенсивной экспрессии P53 не имели статистической значимости.

Обсуждение результатов. При сравнении иммуногистохимических характеристик карцином низкой и высокой степени злокачественности выявлены достоверные различия в экспрессии P53. Значимые различия между опухолями Ta и T1-T2 были обнаружены в типе экспрессии СК20 и пролиферативной активности клеток по показателю Ki-67.

Известно, что мутация p53 может быть связана со стадией и степенью дифференцировки клеток рака мочевого пузыря и может представлять неблагоприятный фактор, характеризующий высокий риск развития опухолевой прогрессии [8; 14]. Однако это положение оспаривается многими авторами [13; 15]. Выявляемая иммуногистохимическим методом в опухолевых клетках экспрессия p53, как правило, характеризует наличие мутации данного гена, однако по данным К.Т. Kelsey и соавт. [10] мутации гена p53 в уротелиальных опухолях составляют лишь 10%. В то же время большинство уротелиальных опухолей характеризуются высоким процентом клеток, экспрессирующих белок P53. В настоящем исследовании, практически во всех уротелиальных опухолях, включая инвертированную папиллому, отмечалось большое количество клеток с положительной к P53 иммуногистохимической реакцией. В свою очередь статистически значимые различия выявлены в изменении интенсивности окрашивания опухолей с низкой и высокой степенью злокачественности. Скорее всего слабopоложительное окрашивание опухолевых клеток с высокой степенью дифференцировки может быть связано не с наличием мутации гена p53, а с его функциональной неактивностью, за счет белков MDM2 и BCL-2, принимающих участие в активировании

и разрушении P53 [10]. По этой причине широкое использование данного маркера в качестве прогностического фактора ограничено.

Нами показано, что СК20 является молекулярным маркером, характеризующим наличие инвазивного роста опухолей мочевого пузыря. Перспективность использования антител к данному белку в качестве маркера определяется тем фактом, что патологический тип его экспрессии связан с риском развития раннего рецидива РМП, так как он отмечается в 98% инвазивных карцином [5]. В изучаемом нами материале была выявлена та же тенденция, у 95% инвазивных карцином (T1-T2) по сравнению с 53% опухолей без инвазии (Ta) был отмечен патологический тип экспрессии СК20. Таким образом, патологический тип экспрессии СК20 является достоверным признаком инвазивного РМП и, в комплексе с клиническими и морфологическими критериями, данный маркер может быть использован для верификации инвазии опухоли.

Прогностическое значение высокой пролиферативной активности уротелиальных клеток при РМП [3] общепризнанно. Ki-67 — надежный индикатор опухолевой пролиферации, глубины инвазии, степени злокачественности, прогрессии и рецидива РМП [6]. В представленных наблюдениях процент позитивно окрашенных на Ki-67 клеточных ядер позволил достоверно различить неинвазивные и инвазивные опухоли, при этом данный показатель значительно возрастал по мере увеличения глубины опухолевой инвазии.

Таким образом, из всех исследованных нами иммуногистохимических маркеров интенсивность окрашивания ядер с помощью антител к белку P53 позволяет оценить степень злокачественности опухолевых клеток, а патологический тип экспрессии СК 20 и высокий процент позитивно окрашенных ядер на белок Ki-67 характеризует инвазивные уротелиальные опухоли. Применение панели из антител к P53, Ki-67 и СК20 можно рекомендовать для иммуногистохимического исследования биопсийного и операционного материалов уротелиальных опухолей мочевого пузыря для диагностики и прогнозирования клинического течения заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Андреева Ю.Ю., Завалишина Л.Э., Франк Г.А.* Классификация эпителиальных опухолей мочевого пузыря // *Арх. Патол.* — 2006. — Т. 68. — № 5. — С. 46—53.
- [2] *Здравоохранение в России, 2005: стат. сб. / Под ред. Суринова А.Е.* — М.: Федер. служба гос. статистики, 2006. — С. 60.
- [3] *Корнеев И.А.* Прогностическое значение пролиферативного индекса Ki-67 в переходноклеточной карциноме лоханки и мочеточника // *Вопр. Онкол.* — 2005. — Т. 51. — № 2. — С. 211—215.
- [4] *Маслюкова Е.А., Пожариский К.М., Карелин М.И., Старцев Т.П., Тен В.П.* Роль Ki-67, мутантного гена-супрессора p53 и онкопротеина HER-2neu в прогнозе и клиническом течении рака мочевого пузыря // *Вопр. Онкол.* — 2006. — Т. 52. — № 6. — С. 643—648.
- [5] *Alsheikh A., Mohamedali Z., Jones E., Masterson J., Gilks C.B.* Comparison of the WHO/ISUP classification and cytokeratin 20 expression in predicting the behavior of low-grade papillary urothelial tumors. *World/Health Organization/International Society of Urologic Pathology // Mod. Pathol.* — 2001. — Vol. 14, Issue 4. — P. 267—272.

- [6] *Blasco-Olaetxea E., Belloso L., Garcia-Tamayo J.* Superficial bladder cancer: study of the proliferative nuclear fraction as a prognostic factor // *Eur. J. Cancer.* — 1996. — Vol. 32A, Issue 3. — P. 444—446.
- [7] *Bol M.G., Baak J.P. et al.* Reproducibility and prognostic variability of grade and lamina propria invasion in stages Ta, T1 urothelial carcinoma of the bladder // *J. Urol.* — 2003. — Vol. 169, Issue 4. — P. 1291—1294.
- [8] *Esrig D., Elmajian D., Groshen S., Freeman J.A., Stein J.P., Chen S.C., Nichols P.W., Skinner D.G., Jones P.A., Cote R.J.* Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer // *N. Engl. J. Med.* — 1994. — Vol. 331, Issue 19. — P. 1259—1264.
- [9] *Harnden P., Mahmood N., Southgate J.* Expression of cytokeratin 20 redefines urothelial papillomas of the bladder // *Lancet.* — 1999. — Vol. 353, Issue 9157. — P. 974—977.
- [10] *Kelsey K.T., Hirao T., Schned A., Hirao S., vi-Ashok T., Nelson H.H., Andrew A., Karagas M.R.* A population-based study of immunohistochemical detection of p53 alteration in bladder cancer // *Br. J. Cancer.* — 2004. — Vol. 90, Issue 8. — P. 1572—1576.
- [11] *Kruger S., Muller H.* Correlation of morphometry, nucleolar organizer regions, proliferating cell nuclear antigen and Ki67 antigen expression with grading and staging in urinary bladder carcinomas // *Br. J. Urol.* — 1995. — Vol. 75, Issue 4. — P. 480—484.
- [12] *Lacombe L., Dalbagni G., Zhang Z.F., Cordon-Cardo C., Fair W.R., Herr H.W., Reuter V.E.* Overexpression of p53 protein in a high-risk population of patients with superficial bladder cancer before and after bacillus Calmette-Guerin therapy: correlation to clinical outcome // *J. Clin. Oncol.* — 1996. — Vol. 14, Issue 10. — P. 2646—2652.
- [13] *Liukkonen T., Rajala P., Raitanen M., Rintala E., Kaasinen E., Lipponen P.* Prognostic value of MIB-1 score, p53, EGFr, mitotic index and papillary status in primary superficial (Stage pTa/T1) bladder cancer: a prospective comparative study. The Finnbladder Group // *Eur. Urol.* — 1999. — Vol. 36, Issue 5. — P. 393—400.
- [14] *Llopis J., Alcaraz A., Ribal M.J., Sole M., Ventura P.J., Barranco M.A., Rodriguez A., Corral J.M., Carretero P.* p53 expression predicts progression and poor survival in T1 bladder tumours // *Eur. Urol.* — 2000. — Vol. 37, Issue 6. — P. 644—653.
- [15] *Lipponen P.K.* Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional-cell bladder cancer and its prognostic value // *Int. J. Cancer.* — 1993. — Vol. 53, Issue 3. — P. 365—370.

EXPRESSION OF INTERMEDIATE FILAMENTS AND CELL CYCLE REGULATORS IN BLADDER TUMORS

I.A. Shalavin, I.I. Babichenko

Department of Pathological Anatomy
People's Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

S.A. Osipov, M.V. Samoylov

Departments of Urology and Pathological Anatomy
Central Clinical Hospital of the Russian Academy of Sciences
Litovskiy boulevard, 1a, Moscow, Russia, 117593

Intermediate filament (CK20) and cell cycle regulators (P53, Ki-67) were evaluated by immunohistochemical technique in 32 samples of bladder tumors (Ta — 8, T1-2G1-2 — 20, T1G3 — 3 and T2G3 — 1). Research has shown that intensity of P53 staining allow to defined the grade of tumor cells. Pathological type of CK20 distribution in cells and its high proliferative index (Ki-67) permit to reveal invasive urothelial tumors.