

---

## **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<sub>a</sub> (8 пациентов), T<sub>1</sub>-2 G<sub>1</sub>-2 (20), T<sub>1</sub>G<sub>3</sub> (3), T<sub>2</sub>G<sub>3</sub>(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<sub>a</sub> 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.