

Прогностическое значение биологических маркеров у больных поверхностным и инвазивным раком мочевого пузыря

В.О. Матер, Н.В. Казанцева

Свердловский областной онкологический диспансер, Екатеринбург

PROGNOSTIC VALUE OF BIOLOGICAL MARKERS IN PATIENTS WITH SUPERFICIAL AND INVASIVE BLADDER CANCER

V.O. Mager, N.V. Kazantseva

Sverdlovsk Regional Cancer Dispensary

The study was undertaken to compare the levels of p53, bcl-2, and Ki-67 in 40 patients who had undergone radical mastectomy for bladder cancer and to evaluate their possible effect on survival. Only the level of p53 affected survival ($p = 0.052$). An immunohistochemical study, determination of p53 expression in particular, will enhance the accuracy of prognosis and will probably allow correcting the treatment.

Иммуногистохимия как метод морфологической диагностики, в основе которого лежат визуализация и оценка с помощью микроскопа результатов реакции антиген — антитело в срезах биопсированной ткани, все шире и шире применяется в практике лечебных учреждений онкологического профиля. В морфологической диагностике иммуногистохимические методы позволяют решать следующие задачи: уточнение гистогенеза опухолей, определение характера патологического процесса в плохо сохранившихся биоптатах или биоптатах с недостаточным объемом материала, уточнение вероятного источника метастазирования, оценка функционального состояния клеток опухоли, прогнозирование течения заболевания. Принципиальным отличием иммуногистохимии от других методов иммунологической диагностики, использующих реакцию антиген—антитело, является структурная специфичность исследования. Это означает, что в реакции оцениваются не только наличие сигнала (есть окрашивание или нет) и его сила (интенсивность окрашивания), но и пространственное распределение сигнала в гистологическом препарате (окрашивание мембран клеток, цитоплазмы, ядра и других структурных элементов).

Два последних десятилетия характеризовались бурным открытием все новых и новых онкогенов и опухолевых супрессоров. К настоящему времени известно около сотни потенциальных онкогенов (клеточных и вирусных) и около двух десятков опухолевых супрессоров.

Канцерогенез — это многоступенчатый процесс накопления мутаций и других генетических изменений, приводящих к нарушениям регуляции клеточного цикла, апоптоза, дифференцировки, морфогенетических реакций клетки, а также, вероятно, к неэффективному функционированию факторов специфического и неспецифического противоопухолевого иммунитета. Ключевую роль в возникновении указан-

ных свойств неопластической клетки играют нарушения функции опухолевых супрессоров и протоонкогенов. Так, ген *p53* регулирует клеточный цикл и апоптоз, контролирует целостность генома. Активируясь в ответ на самые разные неблагоприятные воздействия, *p53* осуществляет на транскрипционном уровне одновременно и активацию гена *bax*, и репрессию гена *bcl-2*. Кроме того, *p53* повышает экспрессию ряда генов *PIG*, продукты которых вызывают оксидативный стресс и, как следствие, нарушения проницаемости митохондриальной и ядерной мембран, а также трансактивирует некоторые киллерные рецепторы, в частности *Fas* и *KILLER/DR5* [1]. Несмотря на достигнутый в последние годы значительный прогресс в понимании базовых механизмов канцерогенеза, много вопросов остаются неясными. Это происходит главным образом из-за противоречивых результатов, полученных при ретроспективных исследованиях с относительно небольшим количеством пациентов. В последние годы сверхэкспрессия белков *p53* и *bcl-2* была исследована в различных злокачественных новообразованиях, включая переходноклеточный рак мочевого пузыря (РМП). В настоящее время наиболее известна роль гена *p53* и гена ретинобластомы.

Многочисленные исследования опухолей мочевого пузыря установили связь между степенью выраженности экспрессии маркеров и клиническим результатом. Однако стало очевидным, что исследование одного какого-либо маркера не обеспечивает необходимой базы для прогнозирования течения заболевания и соответственно принятия решения о дальнейшем лечении пациента [2]. Выявление мутантного *p53* с повышенной частотой отмечается в инвазивных опухолях [3]. Определение этого маркера имеет прогностическое значение в отношении частоты рецидивов, реакции на химиотерапию, связанный с опухолью показатель выживаемости [4, 5]. Красноречивые результаты были получены в исследовании F. Ong и соавт. [6], в котором

была отмечена высокая экспрессия *bcl-2* в мышечно-инвазивных опухолях (63%), что определило более низкий местный контроль за заболеванием и низкую 3-летнюю выживаемость. А наличие сочетания экспрессии *bcl-2* и *p53* у пациентов, страдающих инвазивным РМП, определило значительное снижение 3-летней выживаемости и безрецидивной выживаемости.

Исследование таких маркеров клеточной пролиферации, как *Ki-67*, позволяет прогнозировать темп роста опухоли и реакцию опухоли на проводимую химиотерапию [3]. *Ki-67* также является независимым прогностическим фактором в отношении рецидивирования у больных с поверхностными формами РМП, имеющих высокий риск [5]. РМП в общей статистике всех злокачественных новообразований составляет около 4%. По абсолютному приросту среди онкоурологических заболеваний РМП занимает 3-е место, уступая раку предстательной железы и раку почки [7]. Ежегодно в Свердловской области регистрируется около 360 новых случаев заболевания РМП, около 210 человек в области ежегодно умирает от этого заболевания.

Материал и методы

Целью настоящего исследования были сравнение уровня экспрессии таких биологических маркеров, как *p53*, *bcl-2*, *Ki-67*, у 40 больных, подвергнутых радикальной цистэктомии по поводу РМП, и возможность их влияния на выживаемость. Все больные были разделены на 2 группы по 20 человек в каждой (табл. 1). В 1-ю группу были включены больные с поверхностными формами РМП, имеющие как одиночные, так и множественные опухоли, без поражения регионарных лимфатических узлов и без уретерогидронефроза. Во 2-ю группу были включены больные, имеющие мышечно-инвазивный рак, у 7 имелись метастазы в единичном лимфатическом узле и у 9 — уретерогидронефроз. У всех больных был переходноклеточный рак различной степени аномалии (табл. 2), пациенты с рецидивными опухолями, а также пациенты, получавшие неoadъювантное лечение, не включались в исследование. Пациенты с первично-множественным раком также не включались в исследование.

Исследования проводились на операционном материале онкоурологического отделения ГУЗ СООД Екатеринбурга. В исследовании использовали парафиновые срезы, окрашенные гематоксилином и эозином и по Ван Гизону.

Иммуногистохимические реакции ставили на серийных парафиновых срезах по общепринятой методике с демаскировкой антигенов в СВЧ-печи. В качест-

Таблица 1. Характеристика групп пациентов

Группа	pT1	pT2	Одиночные опухоли	Множественные опухоли	pN0	pN+	Уретерогидронефроз одно/двусторонний
1-я	20	—	9	11	20	—	—
2-я	—	20	18	2	13	7	9

Таблица 2. Распределение обследованных в зависимости от степени аномалии опухоли

Группа	Высокодифференцированные опухоли (G1)	Умеренно-дифференцированные опухоли (G2)	Низкодифференцированные опухоли (G3)
1-я	13	6	1
2-я	5	13	2

ве первичных специфических антител использовали моноклональные антитела к *p53* (Novocastra, RTU-*p53*-DO7), *bcl-2* (Novocastra, RTU-*bcl-2*), *Ki-67* (Novocastra, RTU-*Ki-67*-MM1). В качестве вторичных антител и визуализирующей системы применяли Novostain Universal Detection Kit (Novocastra, NCL-RTU-D). Ядра докрашивали гематоксилином. Результаты иммуногистохимической реакции оценивали для *Ki-67* и *bcl-2* путем подсчета процента окрашенных ядер. Оценку экспрессии *p53* проводили путем подсчета процента интенсивно окрашенных ядер. Для диагностики использовали микроскопы «Axiolab» (Zeiss). Для статистического анализа данных использовались программы Microsoft Excel 2002 (Microsoft Corp.) с модулем расчета доверительных интервалов «CI» (автор Rob Herbert), Primer of Biostatistics 4.03 (автор S.A. Glantz) и Statistica 6.0 (StatSoft Inc.). Все количественные признаки тестировались на соответствие их распределению нормальному критерию Шапиро — Уилка. Параметрические данные описаны в виде «среднее $\pm$ стандартное квадратичное отклонение», непараметрические данные в виде медианы и в скобках 95%-го доверительный интервал. Биноминальные признаки представлены в виде абсолютного значения и доли (в скобках 95% доверительный интервал для этой доли). Другие качественные признаки описывались простым указанием абсолютного значения и доли (в процентах) для каждой категории. Отношение шансов (ОШ) указано (в скобках) с 95% доверительным интервалом.

Сравнительный анализ параметрических признаков проводился с помощью критерия Стьюдента, непараметрических количественных признаков критерия Манна — Уитни. Для сравнения качественных признаков использовались критерии χ^2 -квадрат (χ^2) и Фишера. Для всех сравнений ошибка первого рода (α) устанавливалась равной 0,05. Нулевая гипотеза об отсутствии различий между группами отвергалась, если вероятность ошибки (p) отклонить эту нулевую гипотезу не превышала 0,05.

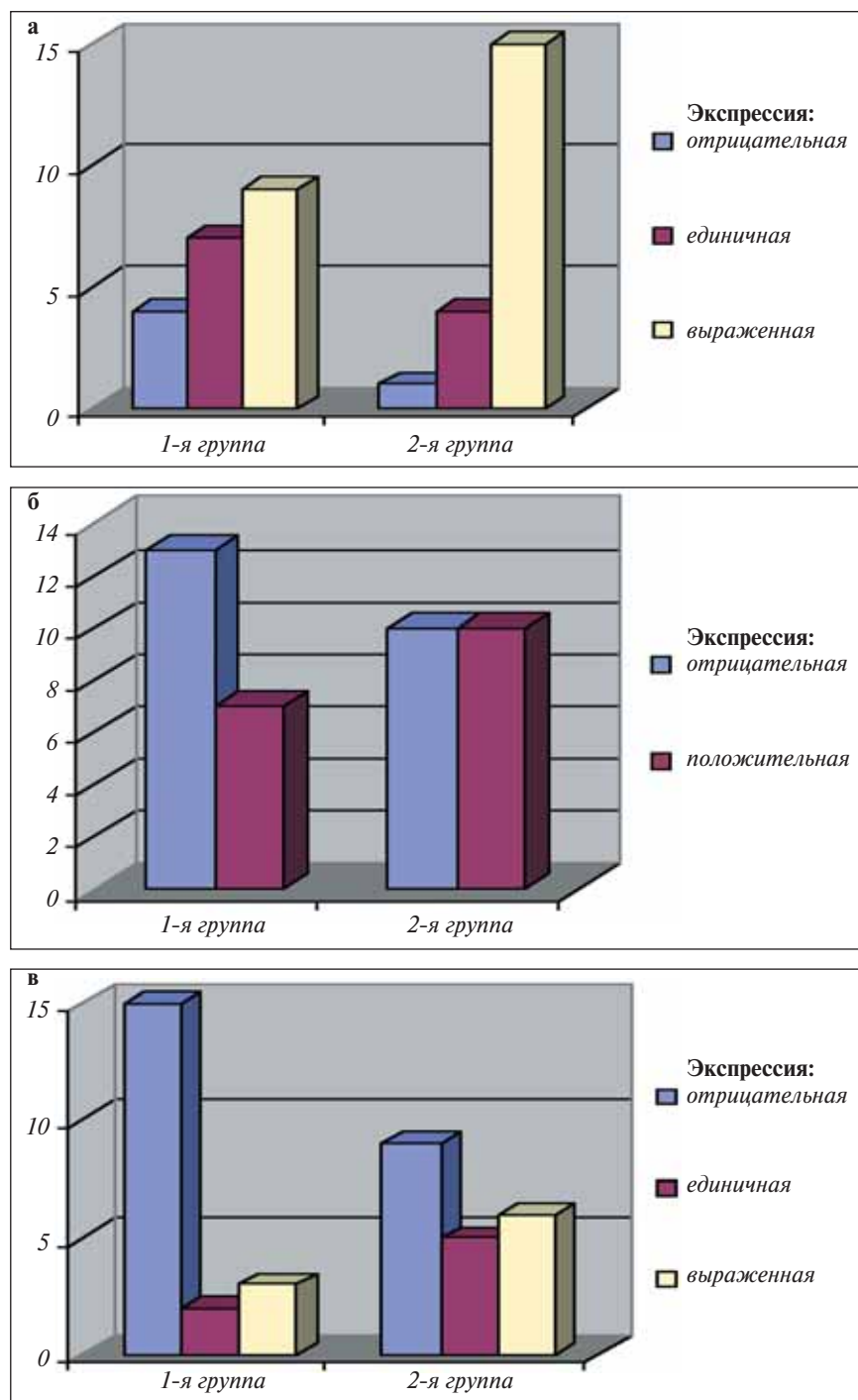


Рис. 1. Экспрессия Ki-67 (а), p53 (б) и bcl-2 (в) в группах больных РМП

Результаты

Нами было проведено сравнение степени экспрессии Ki-67, p53, bcl-2 в обеих группах больных РМП (рис. 1)

Отсутствия различий между группами по некоторым признакам (табл. 3) могут быть обусловлены недостаточной мощностью критериев (способностью выявлять различия там, где они действительно

есть) вследствие малочисленности групп.

Рассчитать медиану выживаемости для 1-й группы оказалось невозможным, для 2-й она составила 14 мес. Для сравнения кривых выживаемости применялся критерий Гехана. По критерию Гехана получено статистически достоверное различие кривых выживаемости 1-й и 2-й групп ($p=0,007$; рис. 2).

При проведении анализа групп получены статистически достоверные различия по таким параметрам, как степень анаплазии опухоли ($p=0,016$), мультифокальность процесса ($p=0,006$), выживаемость в группах ($p=0,002$).

Не получено статистически достоверного различия в группах по уровню экспрессии исследуемых маркеров. Отсутствия различий могут быть обусловлены недостаточной мощностью критериев (способностью выявлять различия там, где они действительно есть) вследствие малочисленности групп. При сравнительном анализе выживших и умерших на выживаемость оказывали статистически достоверное влияние возраст ($p=0,043$), степень инвазии опухоли ($p=0,002$), мультифокальный характер роста опухоли ($p=0,001$; табл. 4).

Среди биологических маркеров влияние на выживаемость отмечено только у гена опухолевой супрессии p53 ($p=0,052$).

Обсуждение

Наряду с традиционными прогностическими факторами, такими как клинические и гистологические, в настоящее время широко используются биологические факторы. Комбинация клинко-морфологических и биологических факторов является наиболее предпочтительной для прогнозирования течения РМП, а также для выбора адекватной лечебной тактики [3, 7].

Пристальное изучение роли протоонкогенов и онкогенов в человеческом организме обусловлено тем обстоятельством, что во многих случаях при достаточ-

но благоприятных клинических и морфологических признаках опухоли мочевого пузыря ведут себя агрессивно, а проводимое лечение не приводит к желаемому эффекту. При достаточной осведомленности о роли того же *p53* в регуляции клеточного цикла не совсем ясна его прогностическая ценность при поверхностных опухолях мочевого пузыря. Однако известно, что у пациентов с инвазивными опухолями мочевого пузыря экспрессия *p53* приводит к значительному повышению риска рецидива и значительному снижению общей и раковоспецифичной выживаемости (D. Skinner, K. Syrigos, 1999). По данным Uchida и соавт. (2002), экспрессия *p53* в опухолях мочевого пузыря коррелировала с клинической стадией заболевания, а комбинация экспрессии *p53* и *bcl-2* явилась крайне неблагоприятным фактором течения заболевания. Еще в одном исследовании (T.T. Wu, Y.H. Lee, 2001) у 137 больных РМП в 78,5% случаев отмечена экспрессия *p53*, причем наиболее она была выражена у пациентов с низкодифференцированными опухолями (95%), а также у пациентов, имеющих мышечно-инвазивные опухоли (97%). В группе исследованных нами инвазивных опухолей мочевого пузыря экспрессия *p53* отмечена ровно у половины больных, и у этих же пациентов отмечена более высокая по сравнению с первой частота прогрессии и смерти от прогрессирования.

Нами не выявлено существенной разницы в группах при исследовании экспрессии *Ki-67*: она была практически одинаковой в группах больных поверхностным РМП и у больных с инвазивными формами (80 и 95% соответственно). В исследованиях Okamura и соавт. (1990) была отмечена корреляция между повышенной экспрессией *Ki-67* и стадией заболевания, степенью злокачественности опухоли.

Таблица 3. Сравнительный анализ групп больных РМП

Признак	1-я группа	2-я группа	p
Возраст, годы	58,4±10,1	59,2±7,5	0,791
Пол			
мужской	18 90% (70–97%)	18 90% (70–97%)	1,000
женский	2 10% (3–30%)	2 10% (3–30%)	
Мультифокальность			
есть	11 55% (34–74%)	2 10% (3–30%)	0,006
нет	9 45% (26–66%)	18 90% (70–97%)	
Степень G			
G1	13 (65%)	4 (20%)	0,016
G2	6 (30%)	14 (70%)	
G3	1 (5%)	2 (10%)	
Экспрессия <i>Ki-67</i>			
отрицательная	4 (20%)	1 (5%)	0,128
единичная	7 (35%)	4 (20%)	
выраженная	9 (45%)	15 (75%)	
Экспрессия <i>p53</i>			
отрицательная	13 65% (43–82%)	10 50% (30–70%)	0,523
положительная	7 35% (18–57%)	10 50% (30–70%)	
Экспрессия <i>bcl-2</i>			
отрицательная	15 (75%)	9 (45%)	0,151
единичная	2 (10%)	5 (25%)	
выраженная	3 (15%)	6 (30%)	
Исход			
выжили	18 90% (70–97%)	8 40% (22–61%)	0,002
умерли	2 10% (3–30%)	12 60% (39–78%)	

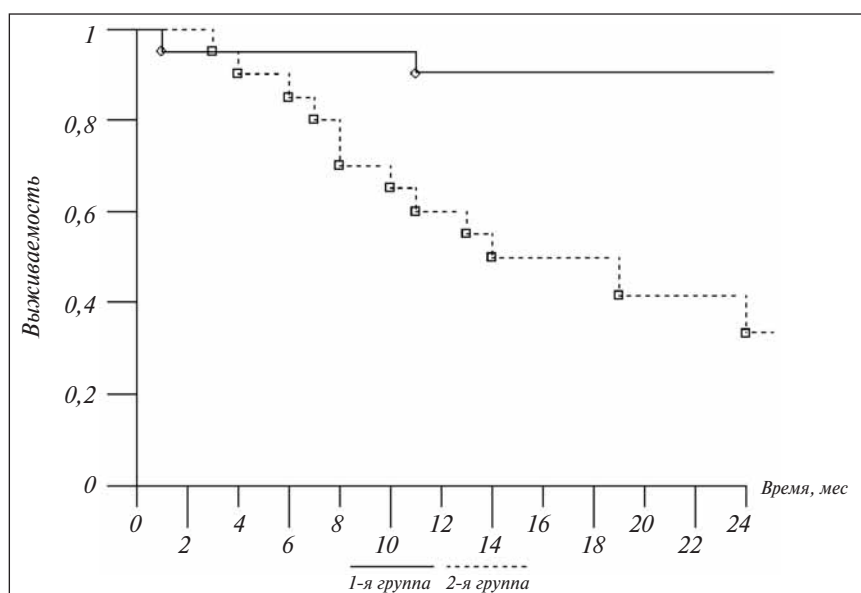


Рис. 2. Медиана выживаемости в 1-й и 2-й группах

Таблица 4. Сравнительный анализ выживших и умерших

Признак	Выжившие	Умершие	p; ОШ
Возраст, годы	56,7±9,2	62,6±6,7	0,043
Пол			
мужской	24 92% (76–98%)	12 86% (60–96%)	0,602
женский	2 8% (2–24%)	2 14% (4–40%)	
pT			
pT1	18 69% (50–83%)	2 14% (4–40%)	0,002; 13,5 (2,4–74,9)
pT2	8 31% (17–50%)	12 86% (60–96%)	
pN			
pN0	23 88% (71–96%)	10 71% (45–88%)	0,214; 3,0 (0,6–16,3)
pN1	3 12% (4–29%)	4 29% (12–55%)	
Мультифокальность			
есть	13 50% (32–68%)	14 100% (78–100%)	0,001; ОШ рассчиты- вать нельзя
нет	13 50% (32–68%)	0 0% (0–22%)	
Уретерогидронефроз			
есть	22 85% (66–94%)	9 64% (39–84%)	0,234; 3,0 (0,7–14,1)
нет	4 15% (6–34%)	5 36% (16–61%)	
Степень G			
G1	12 (46%)	5 (36%)	0,796
G2	12 (46%)	8 (57%)	
G3	2 (8%)	1 (7%)	
Экспрессия Ki-67			
отрицательная	4 15% (6–34%)	1 7% (1–31%)	0,640; 2,4 (0,2–23,5)
положительная	22 85% (66–94%)	13 93% (69–99%)	
Экспрессия p53			
отрицательная	18 69% (50–83%)	5 36% (16–61%)	0,052; 4,1 (1,0–16,0)
положительная	8 31% (17–50%)	9 64% (39–84%)	
Экспрессия bcl-2			
отрицательная	17 65% (46–81%)	7 50% (27–73%)	0,500; 1,9 (0,5–7,1)
положительная	9 35% (19–54%)	7 50% (27–73%)	

Литература

1. Копнин Б.П. Механизмы действия онкогенов и опухолевых супрессоров.
2. Queiro Z.J.A., Ruiz C.J.L., Palmero M.L. et al. Prognostic value for progression of the regulating proteins of the cellular cycle in pT1G3 bladder tumors. *Actas Urol Esp* 2005; 29 (3): 261–8.
3. Матвеев Б.П., Фигурин К.М., Карякин О.Б. Рак мочевого пузыря. М., 2001.
4. Маслюкова Е.А. Иммуногистохимические маркеры у больных инвазивным ра-

- ком мочевого пузыря. Опыт применения. Тезисы VI Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы лечения онкоурологических заболеваний». М.; 2005. с 55.
5. Amirghofran Z., Monabati A., Khezri A., Malek-Hosseini Z. Apoptosis in transitional cell carcinoma of bladder its relation to proliferation and expression of p53 and bcl-2. *Pathol Oncol Res* 2004; 10 (3): 154–8. Epub 2004 Sep 25.

По мнению большинства исследователей [6, 8], экспрессия *bcl-2* чаще встречается в опухолях с неблагоприятным прогнозом и агрессивных, низкодифференцированных опухолях, причем экспрессия *bcl-2* влияет на снижение безрецидивной выживаемости. В нашем исследовании экспрессия *bcl-2* выявлена чаще при инвазивных опухолях, однако влияния на выживаемость этот фактор не оказывал.

Выводы

В настоящее время хорошо известны и широко применяются в практике такие прогностические факторы, как степень опухолевой инвазии, мультифокальность роста и степень анаплазии опухоли и т.д. Тем не менее применение иммуногистохимии позволяет улучшить точность прогноза течения заболевания и своевременно корректировать лечение. Опираясь на наш скромный опыт, мы считаем, что важное значение играет определение уровня экспрессии *p53*. Экспрессия таких маркеров, как *Ki-67* и *bcl-2*, хоть и была выявлена чаще в инвазивных опухолях, однако не оказала влияния на выживаемость.

6. Ong F., Moonen L.M., Gallee M.P. et al. Prognostic factor in transitional cell cancer of the bladder: an emerging role for bcl-2 and p53. *Radioter Oncol* 2001; 61 (2): 169–75.
7. Бухаркин Б.В., Давыдов М.И., Карякин О.Б. и др. Клиническая онкоурология. М., 2003.
8. Wu T.T., Chen J.H., Lee Y.H., Huang J.K. The role of bcl-2, p53, and Ki-67 index in predicting tumor recurrences for low grade superficial transitional cell bladder carcinoma. *J Urol* 2000; 163 (3): 758–60.