

Прогностическое значение экспрессии иммуногистохимических маркеров Ki-67, MMP-9 и коллагена IV у больных папиллярным уротелиальным раком мочевого пузыря

В.П. Авдошин, И.И. Бабиченко, Е.В. Котельникова
РУДН, Москва

Контакты: Владимир Павлович Авдошин susya@kmail.ru

Проведена оценка прогностического значения экспрессии маркеров Ki-67, матричной металлопротеиназы-9 (MMP-9) и коллагена IV при различных уротелиальных опухолях мочевого пузыря (ОМП). Исследован биопсийный и операционный материал 43 пациентов (27 мужчин и 16 женщин) в возрасте от 42 до 87 лет (средний возраст $66 \pm 1,5$ года), получавших комбинированное лечение по поводу ОМП. Установлено, что по мере увеличения стадии опухолевого процесса возрастает степень злокачественности клеток, увеличивается их пролиферативная активность, повышается экспрессия MMP-9.

Ключевые слова: уротелиальные опухоли мочевого пузыря, иммуногистохимическое исследование, прогностические маркеры

Prognostic significance of Ki-67, MMP-9 and Col IV immunohistochemical markers at bladder tumors

V.P. Avdoshin, I.I. Babichenko, E.V. Kotelnikova
Russian Peoples Friendship University, Moscow

The prognostic value of the expression Ki-67, MMP-9 and collagen IV were estimated in urotelial bladder tumors. The biopsy and surgery samples from 43 patients (27 males and 16 females) aged 42 to 87 years (mean age 66 ± 1.5 years) who received combination treatment for urotelial tumors. It has been found that Ki-67, MMP-9 and collagen IV are important prognostic markers of urotelial invasive bladder carcinoma.

Key words: urotelial bladder tumors, immunohistochemical markers, prognostic markers

Введение

Уротелиальные опухоли занимают 7–10-е место в структуре злокачественных новообразований [1–3], темпы прироста их заболеваемости постоянно увеличиваются. Ежегодно в России от рака мочевого пузыря (РМП) умирают 7,4 тыс. человек [1]. Высокая смертность от РМП свидетельствует о неэффективности терапевтического вмешательства и диктует необходимость исследования молекулярных механизмов опухолевой прогрессии. Высокая экспрессия опухолевыми клетками матриксных металлопротеиназ (ММП) может лежать в основе опухолевой прогрессии и метастазирования раковых опухолей различного генеза за счет способности протеолитических ферментов расплавлять различные компоненты внеклеточного матрикса, включая базальные мембраны эпителия [3–6].

В настоящей работе с помощью иммуногистохимической (ИГХ-) методики было проведено изучение экспрессии MMP-9 в клетках уротелия при различных видах их опухолевой трансформации.

Цель исследования — оценка прогностического значения экспрессии Ki-67, MMP-9, коллагена IV в различных уротелиальных опухолях мочевого пузыря.

Материалы и методы

В работе был использован операционный материал 43 пациентов, в числе которых 16 (37%) женщин и 27 (63%) мужчин. Средний возраст больных составил $66 \pm 1,5$ года. Все пациенты находились на лечении в урологических отделениях ГКБ № 64 и ГКБ № 29, являющихся клиническими базами кафедры урологии и оперативной нефрологии РУДН.

Исследования проводились в иммуногистохимической лаборатории кафедры патологической анатомии РУДН.

У всех пациентов по данным клинико-лабораторных и инструментальных обследований была выявлена опухоль мочевого пузыря.

Жалобы на боли над лоном и в области мочевого пузыря выявлены у 38 (92,4 %) пациентов, наличие примеси крови — у 43 (100 %), наличие сгустков крови в моче — у 38 (92,4 %), задержку мочеиспускания — у 7 (16,9 %), частые и болезненные позывы к мочеиспусканию — у 38 (92,4 %). При анализе анамнестических данных только 11 (24,5 %) пациентов ранее обследовались в урологических стационарах, где был верифицирован диагноз. Остальные пациенты обратились в лечебное учреждение с вышеуказанными жалобами

впервые. Анализ результатов инструментального и сонографического исследования показал, что при ультразвуковом обследовании при поступлении в стационар наличие опухоли мочевого пузыря выявлено у 32 (73,5 %) пациентов, у 11 (26,4 %) пациентов выявление опухоли было невозможным из-за наличия сгустков в просвете пузыря или гематомпады. При цистоскопии опухоль пузыря была выявлена у всех пациентов (100 %). Однако у 10 (24 %) пациентов цистоскопическая картина не соответствовала злокачественным опухолям.

Гистологическая оценка новообразований выполнена согласно классификации ВОЗ 2004 г. и зарубежных исследований [7, 8]. При этом были выявлены 17 (16 %) неинвазивных уротелиальных опухолей, в том числе 7 папиллом, 10 (23 %) опухолей низкого злокачественного потенциала (ОНЗП) и 26 (61 %) инвазивных уротелиальных карцином. В группе T1 карцином, инфильтрирующих субэпителиальную соединительную ткань, в 18 (42 %) случаев выявлен инвазивный рак, 6 (14 %) случаев отнесены в группу T2 карцином, инфильтрирующих мышечную оболочку мочевого пузыря, и 2 (5 %) новообразования отнесены к группе T3 (табл. 1).

По степени злокачественности опухоли разделены на следующие группы: папилломы и ОНЗП составили нулевую группу — 17 (40 %) случаев, карциномы низкой степени злокачественности (НСЗ) G1 — 14 (33 %) опухолей и карциномы высокой степени злокачественности (ВСЗ) G2 — 12 (28 %) случаев (табл. 2).

ИГХ-исследование проводилось в соответствии со стандартным протоколом. Ткани фиксировали в 10 % забуференном формалине (рН 7,4) и заливали в парафин. Использован парафин с температурой плавления 54 °С. Нарезали серийные срезы толщиной 5 мкм и наклеивали на поли-L-лизинные стекла. Депарафинизация выполнена в термостате при температуре 60 °С в течение 1 ч. После погружения в ксилол срезы регидрировались проводкой по спиртам в убывающей концентрации в течение 15 мин.

Восстановление антигенной активности осуществлялось методом теплового демаскирования в 0,01 М цитратном буфере в микроволновой печи при мощности 300 Вт в течение 20 мин.

Блокирование эндогенной пероксидазной активности выполнено с помощью 3 % перекиси водорода в течение 10 мин.

Таблица 1. Экспрессия Ki-67, MMP-9 и коллагена IV в уротелиальных опухолях мочевого пузыря в зависимости от стадии заболевания

Опухоль (ВОЗ, 2004 г.)	Стадия	Уровень экспрессии Ki-67 ($M \pm s$), %	Уровень экспрессии MMP-9 ($M \pm s$), у. е.	Уровень экспрессии коллагена IV ($M \pm s$), у. е.	Всего
Уротелиальная папиллома	Ta	$3,3 \pm 2,5$	$0,4 \pm 0,8$	$1,4 \pm 0,5$	7
ОНЗП	Ta	$3,2 \pm 2,3$	$0,7 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,5$	10
Инвазивная карцинома	T1	$16,4 \pm 13,5$	$1,8 \pm 1,1$	$0,5 \pm 0,6$	18
	T2	$21,0 \pm 7,3$	$2,2 \pm 0,8$	$0,3 \pm 0,5$	6
	T3	$41,0 \pm 8,5$	$3,0 \pm 0,0$	0	2
Итого...					43
Достоверность различий		Папиллома, ОНЗП-карцинома T1; $p < 0,01$; T1-T2; $p = 0,04$ T2-T3; $p = 0,04$	ОНЗП-карцинома T1; $p = 0,01$ ОНЗП-карцинома T2; $p < 0,01$ ОНЗП-карцинома T3; $p = 0,03$	Папиллома, ОНЗП-карцинома T1, T2, T3; $p < 0,01$	

Таблица 2. Экспрессия Ki-67, MMP-9 и коллагена IV в уротелиальных опухолях мочевого пузыря в зависимости от степени злокачественности опухоли

Опухоль (ВОЗ, 2004 г.)	Степень злокачественности	Уровень экспрессии Ki-7 ($M \pm s$), %	Уровень экспрессии MMP-9 ($M \pm s$), у. е.	Уровень экспрессии коллагена IV ($M \pm s$), у. е.	Всего
Уротелиальная папиллома	Ta (0)				17
ОНЗП		$3,2 \pm 2,3$	$0,6 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,5$	
Инвазивная карцинома	НСЗ	$12,9 \pm 4,2$	$1,4 \pm 0,8$	$0,8 \pm 0,6$	14
	ВСЗ	$26,9 \pm 16,7$	$2,8 \pm 0,6$	0	12
Итого...					43
Достоверность различий		Ta – НСЗ; $p < 0,01$ НСЗ – ВСЗ; $p < 0,01$	Ta – НСЗ; $p = 0,02$ НСЗ – ВСЗ; $p < 0,01$	Ta – НСЗ; $p = 0,03$ НСЗ – ВСЗ; $p < 0,01$	

В работе использованы следующие антитела к антигенам человека:

- моноклональные мышинные антитела к белку Ki-67 (MM1, Diagnostic Biosystems, 1:200);
- очищенные антитела кроличьей антисыворотки к ММР-9 (Thermoscientific, 1:400).
- моноклональные мышинные антитела к коллагену IV (PHM-12, Thermoscientific, 1:100).

Для проведения ИГХ-реакции на срезы наносили 50 мкл разведенной первичной сыворотки. Срезы инкубировались при 37 °C в течение 30 мин. Выявление иммунных комплексов проводили при помощи безбиотиновой системы детекции на основе пероксидазы хрена (BioGenex, США). Срезы докрашивали гематоксилином Майера.

В качестве индикатора пролиферативной активности использован индекс пролиферации (ИП) Ki-67 (ИП Ki-67), который определялся долей интенсивно окрашенных ядер при учете 300 клеток, выраженной в процентах.

Оценку интенсивности ИГХ-реакции с ММР-9 проводили по следующим параметрам: 0 — отсутствие коричневых гранул в цитоплазме клеток, 1 — наличие отдельных мелких гранул в цитоплазме, 2 — распределение в отдельных клетках крупных гранул, 3 — наличие крупных гранул в цитоплазме большинства клеток.

Распределение коллагена IV в базальной мембране уротелия оценивали полуколичественным методом по следующим показателям: 0 — отсутствие коллагена вдоль базальной мембраны, 1 — наличие тонкой полоски коллагена, 2 — толстая полоска коллагена вдоль базальной мембраны, сравнимая по толщине и интенсивности окрашивания со стенкой сосудов подслизистой оболочки мочевого пузыря.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы STATISTICA 6.0. В табл. 1, 2 приведены средние значения $M \pm s$, где s — среднее квадратическое отклонение. Учитывая ненормальное распределение полученных статистических показателей, сравнение двух независимых групп осуществляли непараметрическим методом при помощи U-критерия Манна—Уитни. Достоверным считали различия средних показателей при уровне статистической значимости $p < 0,05$. Корреляционные взаимоотношения между стадией опухоли, степенью злокачественности, ИП клеток (Ki-67), выраженностью экспрессии ММР-9 и коллагена IV оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена.

Результаты

При гистологическом исследовании неизменной слизистой оболочки мочевого пузыря выявлено: слизистая оболочка складчатая, переходный эпителий состоит из базального, промежуточного и поверхностного слоя зонтичных клеток. Толщина эпителиально-

го пласта составляет 5–6 клеточных слоев. Признаков воспаления и атипии не выявлено.

Определение злокачественного потенциала и инвазивных свойств уротелиальных опухолей мочевого пузыря возможно на основе клинических макроскопических признаков, гистологического строения, а также иммуноморфологических особенностей новообразований.

Для оценки пролиферативной активности был использован ИП Ki-67, который определялся отношением количества клеток с интенсивной ядерной реакцией на Ki-67 к общему числу клеток.

В уротелиальных новообразованиях выявлен широкий спектр пролиферативной активности. При исследовании группы папиллом средний ИП Ki-67 составил $3,3 \pm 2,5$ %. ОНЗП также характеризовались умеренной пролиферацией ($3,2 \pm 2,3$ %), пролиферирующие клетки встречались преимущественно в базальном и промежуточном слоях. В инвазивных карциномах стадии T1 уровень пролиферации соответствовал $16,4 \pm 13,5$ %, при стадии T2 — $21,0 \pm 7,3$ %, а стадии T3 — $41,0 \pm 8,5$ % соответственно, что свидетельствует о повышении пролиферативной активности опухолевых клеток по мере увеличения стадии заболевания. Достоверные различия выявлены между папилломами и ОНЗП-карциномой T1; опухолями стадии T1–T2 и T2–T3 (см. табл. 1).

При изучении степени злокачественности опухолевых образований были выявлены следующие закономерности: в папилломах и ОНЗП ИП соответствовал $3,2 \pm 2,3$ %; в карциномах НСЗ ИП Ki-67 составил $12,9 \pm 4,2$ %, в инвазивном РМП высокой степени злокачественности отмечены значения ИП ($26,9 \pm 16,7$ %), что также соответствует высокому уровню статистической значимости между Ta — НСЗ и НСЗ — ВСЗ (см. табл. 2).

Таким образом, пролиферативная активность уротелиальных опухолей, определяемая с помощью моноклональных антител Ki-67, служит чувствительным тестом для выявления популяции пролиферирующих клеток в папилломах и ОНЗП. ИП Ki-67, также позволяет дифференцировать уротелиальные карциномы различной степени злокачественности и отражает скорость роста новообразования.

Экспрессия ММР-9 исследовалась в различных опухолевых образованиях от папилломы до карциномы высокой степени злокачественности. Как правило, фермент выявлялся в цитоплазме опухолевых клеток в виде мелких или крупных гранул, при этом отмечалась различная интенсивность окрашивания продуктами диаминобензидиновой реакции.

Согласно результатам полуколичественного анализа распределения ММР-9 в различных опухолевых образованиях мочевого пузыря, наименьший уровень экспрессии ММР-9 отмечен в папилломах моче-

вого пузыря ($0,4 \pm 0,8$ у. е.) и ОНЗП ($0,7 \pm 0,5$ у. е.), достоверных различий между этими показателями нами не выявлено.

В инвазивных карциномах (T1, T2, T3) мочевого пузыря уровень экспрессии ММР-9 увеличивался более чем в 2,5 раза и достоверно отличался от аналогичного показателя в папилломах и ОНЗП. Однако достоверных различий между стадиями развития карцином нами не выявлено.

В связи с этим была исследована экспрессия ММР-9 в зависимости от степени злокачественного потенциала опухолевых клеток. Полученные данные показали, что существуют достоверные различия по показателю ММР-9 между доброкачественными (Ta) и злокачественными (T1, T2) опухолями мочевого пузыря. Кроме этого, по экспрессии ММР-9 достоверно различаются уротелиальные карциномы низкой и высокой степени злокачественности.

Таким образом, показатели экспрессии ММР-9 позволяют достоверно различать доброкачественные и злокачественные опухоли мочевого пузыря, а также проводить дифференциальную диагностику уротелиальных карцином низкой и высокой степени злокачественности.

Коллаген IV является основным компонентом базальной мембраны эпителиальных клеток, он также встречается в стенке артериальных сосудов и собственном веществе соединительной ткани. Инвазивные свойства опухолевых клеток связаны с разрушением этого важного компонента соединительной ткани. В настоящем исследовании изучалось распределение коллагена IV в базальной мембране и строме различных опухолевых образованиях от папилломы до карциномы высокой степени злокачественности. Коллаген IV выявлялся вдоль базальной мембраны эпителиальных клеток в виде тонкой коричневой полоски различной интенсивности.

Результаты полуколичественного анализа распределения коллагена IV в базальной мембране различных опухолевых образований мочевого пузыря представлены в табл. 1. Как видно из приведенных данных, самый высокий уровень экспрессии коллагена IV отмечен в папилломах мочевого пузыря ($1,4 \pm 0,5$ у. е.) и ОНЗП ($1,3 \pm 0,5$ у. е.), достоверных различий между этими показателями нами не выявлено. В базальной мембране инвазивных карцином (T1, T2, T3) мочевого пузыря уровень экспрессии коллагена IV уменьшался более чем в 2 раза и достоверно отличался от аналогичного показателя в папилломах и ОНЗП. Однако достоверных различий между стадиями развития карцином нами не выявлено.

Было исследовано распределение коллагена IV в базальной мембране опухолей в зависимости от их степени злокачественного потенциала, полученные данные представлены в табл. 2. Как видно из табл. 2, существуют достоверные различия по распределению коллагена

IV в базальной мембране при доброкачественных (Ta) и злокачественных (T1, T2) опухолях мочевого пузыря. По интенсивности окрашивания коллагена IV в базальной мембране опухолей достоверно различаются уротелиальные карциномы низкой и высокой степени злокачественности.

Таким образом, показатели распределения коллагена IV характеризуют доброкачественные и злокачественные опухоли мочевого пузыря, а также позволяют проводить дифференциальную диагностику уротелиальных карцином низкой и высокой степени злокачественности.

Обсуждение

Изучение молекулярных особенностей онкогенеза открывает новые возможности диагностики и лечения уротелиальных опухолей мочевого пузыря, помогает в определении инвазивных свойств и биологического потенциала опухолей.

В ряде случаев определение инвазии РМП в собственную пластинку слизистой оболочки представляет некоторые трудности (A. Lopez-Beltran, L. Cheng, 2003). При изготовлении гистологических срезов сопочковые структуры неизбежно попадают в срез в скошенном положении и в субэпителиальной соединительной ткани появляются изолированные гнезда неинвазивных опухолевых клеток. При хроническом цистите, часто сопровождающем уротелиальные новообразования, в воспалительном инфильтрате затруднено обнаружение отдельных инвазирующих клеток. Термическое повреждение также препятствует корректной оценке клеточной морфологии. В подобных ситуациях диагноз инвазии может быть принят либо отвергнут с помощью ИГХ-реакции на ММР-9.

В табл. 3 представлены корреляционные отношения между морфологическими характеристиками опухолей мочевого пузыря и исследованными их ИГХ-показателями.

Как видно из представленных данных, между стадией опухолевого роста и степенью злокачественности опухолевых клеток существует выраженная положительная корреляция (0,872), что свидетельствует о значительном клеточном атипизме в опухолях высоких стадий. Это положение подтверждается и высокой корреляционной зависимостью между стадией опухоли и индексом пролиферативной активности опухолевых клеток по показателю Ki-67 (0,850). Как следует из данных табл. 3, эта зависимость несколько выше между степенью злокачественности опухолевых клеток и их пролиферативной активностью (0,866), чем между стадией процесса и пролиферацией клеток. Стадия опухолевого процесса также умеренно положительно коррелирована с экспрессией в клетках ММР-9 (0,655) и отрицательно с распределением в базальной мембране коллагена IV ($-0,654$). При этом следует отметить более высокий уровень положительной корреляции экспрессии ММР-9 в клетках со

Таблица 3. Корреляционные отношения между ИГХ- и морфологическими характеристиками опухолей мочевого пузыря

Фактор	Показатель	TNM	G	Ki-67	MMP-9	Col IV
TNM	Коэффициент корреляции	1,000	0,872	0,850	0,655	−0,654
	<i>p</i>		0,01	0,01	0,01	0,01
	N	43	43	43	43	43
G	Коэффициент корреляции	0,872	1,000	0,866	0,761	−0,796
	<i>p</i>	0,01		0,01	0,01	0,01
	N	43	43	43	43	43
Ki-67	Коэффициент корреляции	0,850	0,866	1,000	0,671	−0,671
	<i>p</i>	0,01	0,01		0,01	0,01
	N	43	43	43	43	43
MMP-9	Коэффициент корреляции	0,655	0,761	0,671	1,000	−0,602
	<i>p</i>	0,01	0,01	0,01		0,01
	N	43	43	43	43	43
Col IV	Коэффициент корреляции	−0,654	−0,796	−0,671	−0,602	1,000
	<i>p</i>	0,01	0,01	0,01	0,01	
	N	43	43	43	43	43

Примечание. Col IV — коллаген IV.

степенью злокачественности опухоли (0,761) и высокую отрицательную корреляцию между этим показателем и распределением коллагена IV вдоль базальной мембраны опухоли (−0,796).

Скорее всего, эти данные можно объяснить наличием умеренной положительной корреляционной связи между ИП клеток по показателю Ki-67 и экспрессией в клетках MMP-9 (0,671). В свою очередь, экспрессия в клетках MMP-9 имеет умеренную отрицательную корреляционную связь с распределением вдоль базальной мембраны коллагена IV (−0,602).

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что по мере увеличения стадии опухолевого процесса возрастает степень злокачественности клеток и увеличивается их пролиферативная

активность. В активно пролиферирующих клетках возрастает экспрессия MMP-9, которая разрушает коллаген IV базальной мембраны уротелия и активизирует инвазию опухолевых клеток в подлежащие ткани.

Следовательно, проведение данных исследований позволяет не только более точно определить стадию опухолевого роста, но и предположить ее распространенность в окружающие ткани.

Все вышеизложенное позволяет считать вероятным высокую степень рецидива опухоли при высокой экспрессии MMP-9. В связи с этим возникает необходимость тщательного динамического наблюдения за данной категорией пациентов с обязательными общеклиническим и эндоскопическим обследованием, целью которого будет выявление возможного рецидива заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аксель Е.М. Заболеваемость злокачественными новообразованиями мочевых и мужских половых органов в России в 2003 г. Онкоурология 2005;1:6–9.
2. Суринов А.Е. Здравоохранение в России, 2005. Сб. статей. М., 2006; с.10.
3. Epstein J.I., Amin M.B., Reuter V.R. et al. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. Am J Surg Pathol 1998;22(12):1435–48.
4. Amin M.B., Murphy W.M., Reuter V.E. et al. A symposium on controversies in the pathology of transitional cell carcinomas of the urinary bladder. Anat Pathol 1996;1:1–39.
5. Cameron K.M., Lupton C.H. Inverted papilloma of the lower urinary tract. Br J Urol 1976; 48:567–577.
6. Lopez-Beltran A., Pacelli A., Rothenberg H.J. et al. Carcinosarcoma and sarcomatoid carcinoma of the bladder: clinicopathological study of 41 cases. J Urol 1998;159:1497–503.
7. Kunze E., Schauer A., Schmitt M. Histology and histogenesis of two different types of inverted urothelial papillomas. Cancer 1983;51:348–58.
8. Lopez-Beltran A., Croghan G.A., Croghan I. et al. Prognostic factors in bladder cancer. A pathologic, immunohistochemical, and DNA flow-cytometric study. Am J Clin Pathol 1994;102:109–14.