

Иммуногистохимическое исследование в оценке степени злокачественности немышечно-инвазивного папиллярного уротелиального рака мочевого пузыря

В.В. Пугачев, Н.А. Горбань, К.Н. Сафиуллин, О.Б. Карякин

ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздрава России, Обнинск

Контакты: Нина Андреевна Горбань perovanina@mail.ru

Степень злокачественности опухоли и pT стадия являются важными прогностическими критериями при немышечно-инвазивном папиллярном уротелиальном раке мочевого пузыря (РМП), поэтому имеет большое значение точное определение этих параметров. **Цель исследования** — оценка возможности молекулярно-биологических маркеров (уровень Ki-67, экспрессия p53, CK20 и C-erbB-2) в уточнении степени злокачественности и инвазивного потенциала папиллярного уротелиального РМП. Исследован материал после трансуретральной резекции мочевого пузыря (МП) 57 пациентов (46 мужчин и 11 женщин) в возрасте от 24 до 75 лет (средний возраст $56 \pm 1,5$ года) с немышечно-инвазивным уротелиальным РМП, относящихся к группе промежуточного и неблагоприятного прогноза по балльной системе EORTC, проходивших комбинированное лечение в Медицинском радиологическом научном центре с 1998 по 2005 г. (сроки наблюдения — от 2 до 9 лет после операции).

Ключевые слова: папиллярный уротелиальный рак, степень злокачественности, p53, Ki-67, CK20, C-erbB-2, иммуногистохимическое исследование

Immunohistochemical study in the grading of non-muscle-invasive papillary urothelial carcinoma of the bladder

V.V. Pugachev, N.A. Gorban, K.N. Safiullin, O.B. Karyakin

Medical Radiology Research Center, Ministry of Health of Russia, Obninsk

Tumor grade and pT stage are significant prognostic factors in non-muscle-invasive papillary urothelial bladder carcinoma (BC) therefore the accurate identification of these indicators are of great importance. The purpose of the investigation was to determine whether molecular biological markers (Ki-67 level, p53, CK20, and C-erbB-2 expression) may specify the grade and invasive potential of papillary urothelial BC. The investigators examined the specimens taken after transurethral resection of the bladder from 57 patients (46 men and 11 women) aged 24 to 75 years (mean age 56 ± 1.5 years) with non-muscle-invasive papillary urothelial BC referring to as a moderate and poor prognostic group according to the EORTC scoring system, who had received combined treatment at the Medical Radiology Research Center in 1998 to 2005 (the postoperative follow-up was 2 to 9 years).

Key words: papillary urothelial carcinoma, malignancy grade, p53, Ki-67, CK20, C-erbB-2, immunohistochemical examination

По мере развития молекулярно-генетических исследований и накопления информации выяснилось, что на генетическом уровне уротелиальные инвазивные опухоли мочевого пузыря (МП) сильно отличаются от неинвазивных наличием большого количества генетических альтераций, вовлекающих различные области хромосом [1, 2]. Папиллярный уротелиальный рак низкой степени злокачественности (НСЗ) считается генетически стабильной опухолью, а папиллярный уротелиальный рак высокой степени злокачественности (ВСЗ) — генетически нестабильной и по своим характеристикам близкой к инвазивному уротелиальному раку с высоким инвазивным потенциалом [1, 2]. Степень злокачественности опухоли и стадия pT являются важными прогностическими критериями при немышечно-инвазивном папиллярном уротелиальном раке мочевого пузыря (РМП), которые входят в систему баллов и таблицы риска

EORTC отдельно для краткосрочного и долгосрочного прогнозирования рецидивирования и прогрессирования у каждого конкретного больного [3]. Поэтому имеет большое значение точное определение этих параметров.

Цель исследования — оценка возможности молекулярно-биологических маркеров в уточнении степени злокачественности и инвазивного потенциала папиллярного уротелиального РМП.

Материалы и методы

Исследован материал после трансуретральной резекции (ТУР) МП 57 пациентов (46 мужчин и 11 женщин) в возрасте от 24 до 75 лет (средний возраст $56 \pm 1,5$ года) с немышечно-инвазивным уротелиальным РМП, относящихся к группе промежуточного и неблагоприятного прогноза по балльной системе EORTC, проходивших комбинированное лечение в Медицин-

Таблица 1. Характеристика ИГХ-маркеров, использованных в исследовании

Маркер (клон)	Положительный контроль	Производитель	Рабочее разведение	Время инкубации, мин
Ki-67 (MIB-1)	Миндалины	DakoCytomation	1:100	60
p53	Рак гортани	DakoCytomation	1:100	60
C-erbB-2	Рак молочной железы, мультиблок из 4 опухолей	DakoCytomation	1:400	30
CK20	Нормальный уротелий	DBS	1:100	60

ском радиологическом научном центре в период с 1998 по 2005 г. (сроки наблюдения — от 2 до 9 лет после операции).

Гистологические срезы опухолевой ткани окрашивали гематоксилином и эозином и использовали для иммуногистохимического (ИГХ) исследования. Блокирование эндогенной пероксидазы проводили охлажденной 3 % перекисью водорода в течение 10 мин. С целью восстановления антигенной структуры клеток фиксированного в формалине и заключенного в парафин материала использовали прогревание гистологических срезов в водяной бане в течение 20 мин в 0,01 М цитратном буферном растворе (рН 6,0).

Инкубацию с первичными антителами к Ki-67, p53 и цитокератину 20 (CK20) проводили при комнатной температуре в течение 60 мин, к онкопротеину C-erbB-2 — 30 мин (табл. 1). Для визуализации продуктов иммунной реакции была использована полимерная система EnVision (Dako), в качестве хромогенного субстрата применяли раствор диаминобензидина (Dako, Liquid DAB+), ядра докрашивали гематоксилином. В качестве отрицательного контрольного образца использовали срезы, на которые наносили лишь вторичные антитела без предварительного нанесения первичных.

Степень дифференцировки опухоли и стадию опухолевого процесса оценивали согласно рекомендациям ВОЗ 2004 г. [1]. Положительной экспрессией белка Ki-67 считали наличие специфического окрашивания в коричневый цвет ядер опухолевых клеток (индекс Ki-67 — количество положительно окрашенных опухолевых клеток, выраженное в процентах), p53 — специфического ядерного окрашивания более чем в 25 % опухолевых клеток. Патологической реакцией с антителами к CK20 считали как диффузное, так и очаговое цитоплазматическое окрашивание более половины толщи пласта уротелиальных опухолевых клеток, а также полное отсутствие его. Экспрессию онкопротеина C-erbB-2 оценивали согласно рекомендациям для рака молочной железы. Положительной реакцией считали экспрессию +3 и +2.

Индекс Ki-67 и экспрессию p53, CK20 и C-erbB-2 сравнивали с клинико-морфологическими параметрами (стадия Т, степень дифференцировки опухоли),

используя дисперсионный анализ, t-тест Стьюдента, таблицы сопряженности 2×2 (χ^2 , точный критерий Фишера). Значимым принимали уровень $p \leq 0,05$. Статистическую обработку полученных параметров проводили с применением пакета прикладных программ Statistica 10.0 [4].

Результаты

У всех пациентов морфологически верифицирован немышечно-инвазивный папиллярный уротелиальный РМП по материалу ТУР.

В 42 случаях имел место папиллярный уротелиальный рак НСЗ, в 15 — папиллярный уротелиальный рак ВСЗ.

На момент исследования стадия рТа (неинвазивный рак) была у 42, рТ1 (инвазия в собственную пластинку слизистой оболочки) — у 15 пациентов. Подавляющее большинство опухолей рТа стадии имели НСЗ, а в большинстве случаев папиллярного уротелиального рака ВСЗ была уже стадия рТ1. И только небольшое количество опухолей НСЗ имели инвазию в собственную пластинку слизистой оболочки. Связь между степенью злокачественности опухоли и ее стадией рТ статистически достоверна (табл. 2).

Изучение пролиферативной активности показало: при папиллярном уротелиальном раке НСЗ средний уровень Ki-67 достигал 13,1 %, при ВСЗ — 50,7 %. Различие статистически достоверно ($p = 0,00000$, t-тест). Причем в опухолях НСЗ Ki-67-положительные клетки локализовались преимущественно у базальной мембраны, и 24 опухоли из 42 имели уровень Ki-67 10 % и менее. При папиллярном уротелиальном раке ВСЗ экспрессия Ki-67 выявлялась в опухолевых клетках на любом уровне эпителиального пласта. При стадии

Таблица 2. Взаимотношение степени злокачественности опухоли и ее стадии Т

Стадия	Рак НСЗ, n (%)	Рак ВСЗ, n (%)	p
рТа	39 (68,4)	3 (5,3)	0,000
рТ1	3 (5,3)	12 (21)	

Таблица 3. Взаимоотношение уровня Ki-67 и степени злокачественности опухоли

Уровень Ki-67	Рак НСЗ, n (%)	Рак ВСЗ, n (%)	p
> 50 %	1 (1,8)	8 (14)	0,0000
< 50 %	41 (71,9)	7 (12,3)	

Таблица 4. Взаимоотношение уровня Ki-67 и pT стадии

Уровень Ki-67	pTa, n (%)	pT1, n (%)	p
> 50 %	1 (1,8)	7 (12,3)	0,0002
< 50 %	41 (71,9)	8 (14)	

Таблица 5. Взаимоотношение экспрессии p53 и степени злокачественности опухоли

Экспрессия p53	Рак НСЗ, n (%)	Рак ВСЗ, n (%)	p
p53+	8 (14)	9 (15,8)	0,0049
p53-	34 (59,7)	6 (10,5)	

Таблица 6. Взаимоотношение экспрессии p53 и pT стадии

Экспрессия p53	pTa, n (%)	pT1, n (%)	p
p53+	8 (14)	9 (15,8)	0,0049
p53-	34 (59,7)	6 (10,5)	

Та средний уровень Ki-67 составил 15,1 %, а при стадии T1 – 45 % ($p = 0,000023$, t-тест).

Согласно результатам полуколичественного анализа Ki-67 связан и со степенью злокачественности, и со стадией опухолевого процесса (табл. 3, 4).

Положительная реакция ядер опухолевых клеток с антителами к p53 обнаружена в 17 (29,8 %) случаях. В группе пациентов с папиллярным уротелиальным раком ВСЗ экспрессия p53 протеина наблюдается в большинстве случаев, причем у всех 9 пациентов этой группы с экспрессией p53 уже была инвазия в собственную пластинку слизистой оболочки, т. е. группа p53-положительных опухолей ВСЗ совпадает с группой p53-положительных опухолей pT1 стадии. Имеется высокая статистически значимая корреляция между экспрессией p53 и стадией T, степенью злокачественности ($p = 0,0049$) (табл. 5, 6).

При анализе СК20 мы рассмотрели варианты, когда положительной экспрессией считали только экспрессию СК20 более чем на половину эпителиального пласта и когда патологической экспрессией СК20 считали не только положительное окрашивание более чем на половину эпителиального пласта, но и полное отсутствие окрашивания.

Эти 2 варианта мы проанализировали в связи со степенью злокачественности и стадией pT (табл. 7). Оценка экспрессии СК20 не повлияла на результат оценки связи со стадией pT: эти параметры не связаны друг с другом. При оценке степени злокачественности 2 подхода могут дополнить друг друга.

Выявление нормальной экспрессии СК20 только зонтичными клетками характерно для опухолей НСЗ, а экспрессия его более чем на половину толщи эпителиального пласта – для опухолей ВСЗ. Полное отсутствие экспрессии СК20 отмечено у 14 пациентов, 11 из них имели папиллярный уротелиальный рак НСЗ и 3 – папиллярный уротелиальный рак ВСЗ.

Экспрессия C-erbB-2 характерна для опухолей ВСЗ и опухолей с инвазией в собственную пластинку слизистой оболочки. Причем у 11 из 12 пациентов с папиллярным уротелиальным раком ВСЗ и экспрессией онкопротеина C-erbB-2 уже имеется инвазия в собственную пластинку слизистой оболочки (табл. 8).

Коэкспрессия любых 3 маркеров преобладала в группе папиллярного уротелиального рака ВСЗ

Таблица 7. Соотношение экспрессии СК20 более чем на половину толщи эпителиального пласта и патологической экспрессии со степенью злокачественности опухоли и pT стадией

Экспрессия СК20	Рак НСЗ, n (%)	Рак ВСЗ, n (%)	p	pTa, n (%)	pT1, n (%)	p
СК20 > 1/2 пласта	18 (31,6)	11 (19,3)	0,04	19 (33,3)	10 (17,5)	0,13
СК20 < 1/2 пласта	24 (42,1)	4 (7)		23 (40,4)	5 (8,8)	
СК20-нормальный	13 (22,8)	1 (1,8)	0,057	12 (21)	2 (3,5)	0,21
СК20-патологический	29 (50,9)	14 (24,5)		30 (52,6)	13 (22,8)	

Таблица 8. Взаимосвязь экспрессии C-erbB-2 с pT стадией и степенью злокачественности опухоли

Экспрессия C-erbB-2	Рак НСЗ, n (%)	Рак ВСЗ, n (%)	p	pTa, n (%)	pT1, n (%)	p
C-erbB-2+	14 (27,5)	12 (23,5)	0,0024	14 (27,5)	12 (23,5)	0,0024
C-erbB-2-	23 (45,1)	2 (3,9)		23 (45,1)	2 (3,9)	

Таблица 9. Взаимосвязь экспрессии 3 маркеров с pT стадией и степенью злокачественности опухоли

Экспрессия 3 маркеров	Рак НСЗ, n (%)	Рак ВСЗ, n (%)	p	pTa, n (%)	pT1, n (%)	p
3 маркера+	7 (12,3)	10 (17,5)	0,0006	8 (14)	9 (15,8)	0,0049
3 маркера–	36 (60,4)	5 (8,7)		34 (59,7)	6 (10,5)	

и только в небольшом количестве опухолей НСЗ, а также при инвазии в собственную пластинку слизистой оболочки (табл. 9).

Обсуждение

Большинство опухолей МП (80 %) являются неинвазивными (стадия pTa), но 20 % имеют инвазию в собственную пластинку слизистой оболочки (pT1) на момент диагностики. Опухоли стадии Ta имеют высокий риск рецидива (50–75 %), но низкий риск прогрессии (5 %), а опухоли pT1 имеют высокий риск прогрессии [5–7]. Поэтому в диагностической работе необходимо четко разграничивать эти опухоли.

По нашим данным, папиллярный уротелиальный рак НСЗ и ВСЗ значительно различаются по уровню пролиферативной активности: средний уровень Ki-67 составил 13,1 и 50,7 % соответственно, что согласуется с данными других исследователей [7–10]. Причем в 24 из 42 опухолей НСЗ уровень Ki-67 составил 10 % и менее. Так, Н. Yin и соавт. показали, что уровень Ki-67 значительно выше при папиллярном уротелиальном раке ВСЗ, чем при НСЗ: 22,76 % против 68 % [10]. Но по их данным, более 70 % опухолей при папиллярном уротелиальном раке НСЗ имели уровень Ki-67 более 10 % (от 15 до 40 %).

А. Quintero и соавт. [7] оценили уровень Ki-67 в соответствии с классификацией ВОЗ-2004 в неинвазивных опухолях (папиллярного уротелиального рака НСЗ и ВСЗ – 34 и 15 случаев соответственно) и инвазивных – стадии T1 (58 наблюдений папиллярного уротелиального рака НСЗ и 26 – ВСЗ). Средний уровень Ki-67 значительно различался в опухолях НСЗ и ВСЗ: высокая пролиферативная активность (более 13 %) характерна для опухолей ВСЗ.

В нашей работе при Ta стадии средний уровень Ki-67 составил 15,1 %, а в группе T1 – 45 %. В рабо-

те С. Limas и соавт. при инвазивных опухолях Ki-67 также выше (18,6 %), чем при неинвазивных (5,04 %) [9]. Кроме того, нами отмечено, что в опухолях НСЗ пролиферирующие клетки располагаются в базальных слоях уротелиального пласта подобно нормальному уротелию [8], а при опухолях ВСЗ на всей его толще.

Многие исследования сфокусированы на изучении гена-супрессора p53 и его продукта онкопротеина p53 как возможных диагностических и прогностических маркеров. В нашем исследовании экспрессия протеина p53 была характерна для опухолей ВСЗ с наличием инвазии в собственную пластинку слизистой оболочки. Е. Comperat и соавт. проанализировали 158 случаев уротелиального рака (56 – pTa, 45 – pT1 и 57 – pT2 и выше) и выявили: при поверхностных папиллярных уротелиальных опухолях НСЗ маркеры p53 и Ki-67 показывают более низкую экспрессию по сравнению с опухолями ВСЗ [8]. А в работе Н. Yin и соавт. экспрессия p53 выявлена только в 3 случаях при НСЗ и 42 при ВСЗ [10].

Р. Dahse и соавт. проанализировали данные 54 пациентов (35 – с pTa и 19 – с pT1), из которых у 24 – карциномы НСЗ и у 30 пациентов – ВСЗ. У 7 из 54 пациентов выявили мутации p53 в первичной опухоли, причем все пациенты были с опухолями ВСЗ и pT1, и 1 мутация в папиллярной опухоли НСЗ [11].

В нормальной слизистой оболочке СК20 экспрессируется в терминально-дифференцированных поверхностных (зонтичных) клетках и иногда промежуточными клетками [10, 12, 13]. Патология уротелиальной дифференцировки сопровождается потерей этого ограничения, и экспрессия СК20 может быть в более глубоких слоях или во всей толще слоя [10]. В работе Н. Yin и соавт. около 2 / 3 опухолей НСЗ и все опухоли ВСЗ имели диффузное патологическое окрашивание [10], с чем согласуются наши

данные. Экспрессия СК20 в глубоких слоях уротелиального пласта не является патогномоничным признаком для карцином ВСЗ. В нашем исследовании потеря экспрессии СК20 так же не служит характерным признаком, на который можно опираться при разграничении опухолей по степени злокачественности, и отсутствует в большом проценте карцином НСЗ, т.е. зонтичный слой далеко не всегда сохраняется в этих опухолях. А вот наличие нормальной экспрессии СК20 только в зонтичных поверхностных клетках помогает идентифицировать опухоль НСЗ.

Продукт онкогена Нег-2 — трансмембранный онкопротеин C-erbB-2 — является членом семейства рецепторов эпидермального фактора роста. Он локализуется на клеточной мембране и действует посредством образования димеров с другими молекулами Нег-2 или Нег-1, Нег-3, Нег-4, его определяют ИГХ-методом, и часто выявляют при РМП [14]. L. Skagias и соавт. показали, что сверхэкспрессия Нег-2 наблюдается в 51,25 % случаев первичного уротелиального рака и связана с продвинутой стадией и степенью дифференцировки опухоли [15]. Итальянские исследователи S. Simonetti и соавт. [16] изучили 63 случая уротелиального РМП стадии Та, Т1 и Т2. ИГХ-анализ показал в 60,3 % уротелиальных опухолей сверхэкспрессию Нег-2 / neu и в 39,7 % опухолей отрицательный резуль-

тат. Экспрессия Нег-2 коррелирует со степенью дифференцировки опухоли [17].

В нашем исследовании экспрессия C-erbB-2 характерна для группы опухолей ВСЗ с наличием инвазии в собственную пластинку слизистой оболочки. Так как в рамках данной работы мы ограничились только ИГХ-исследованием C-erbB-2, без подтверждения методом FISH, группа опухолей, которые мы оценили как положительные (51 %), осталась разнородной и требует дальнейшего исследования.

Выводы

Для папиллярного уротелиального рака НСЗ характерны низкая пролиферативная активность (Ki-67 < 50 %, а у большинства — 10 % и менее), отсутствие экспрессии p53 и C-erbB-2, наличие окрашивания СК20 поверхностных зонтичных клеток. Для папиллярного уротелиального рака ВСЗ более характерны окрашивание СК20 более половины эпителиального пласта. Экспрессия p53 наблюдается при папиллярном уротелиальном раке ВСЗ с наличием инвазии в собственную пластинку слизистой оболочки. Наличие экспрессии C-erbB-2 в папиллярном уротелиальном раке ВСЗ свидетельствует о большой вероятности наличия инвазии. По полученным данным, наиболее значимыми для разграничения опухолей НСЗ и ВСЗ являются уровень Ki-67 и комбинация экспрессии 3 маркеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization classification of tumours. Pathology & Genetics: tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon, France: IARC Press, 2004.
2. Simon R., Bürger H., Brinkschmidt C. et al. Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. *J Pathol* 1998;185(4):345–51.
3. Клинические рекомендации Европейской ассоциации урологов. М., 2011.
4. Боровиков В.П., Боровиков И.П. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows. М., 1998. 592 с.
5. Lopez-Beltran A., Montironi R. Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification. *Eur Urol* 2004;46(2):170–6.
6. Holmäng S., Hedelin H., Anderström C. et al. Recurrence and progression in low grade papillary urothelial tumors. *J Urol* 1999; 162(3 Pt 1):702–7.
7. Quintero A., Alvarez-Kindelan J., Luque R.J. et al. Ki-67 MIB1 labelling index and the prognosis of primary TaT1 urothelial cell carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol* 2006;59(1):83–8.
8. Compérat E., Camparo P., Haus R. et al. Immunohistochemical expression of p63, p53 and MIB-1 in urinary bladder carcinoma. A tissue microarray study of 158 cases. *Virchows Arch* 2006;448(3):319–24.
9. Limas C., Bigler A., Bair R. et al. Proliferative activity of urothelial neoplasms: comparison of BrdU incorporation, Ki-67 expression, and nucleolar organiser regions. *J Clin Pathol* 1993;46(2):159–65.
10. Yin H., Leong A.S. Histologic grading of noninvasive papillary urothelial tumors: validation of the 1998 WHO/ISUP system by immunophenotyping and follow-up. *Am J Clin Pathol* 2004;121(5):679–87.
11. Dahse R., Utting M., Werner W. et al. TP53 alterations as a potential diagnostic marker in superficial bladder carcinoma and in patients serum, plasma and urine samples. *Int J Oncol* 2002;20(1):107–15.
12. Harnden P., Allam A., Joyce A.D. et al. Cytokeratin 20 expression by non-invasive transitional cell carcinomas: potential for distinguishing recurrent from non-recurrent disease. *Histopathology* 1995;27(2): 169–74.
13. Burger M., van der Aa M.N., van Oers J.M. et al. Prediction of progression of non-muscle-invasive bladder cancer by WHO 1973 and 2004 grading and by FGFR3 mutation status: A Prospective Study. *Eur Urol* 2008;54: 835–44.
14. Habuchi T., Marberger M., Droller M.J. et al. Prognostic markers for bladder cancer: international consensus panel on bladder tumor markers. *Urology* 2005;66:64–74.
15. Skagias L., Politi E., Karameris A. et al. Prognostic impact of HER2/neu protein in urothelial bladder cancer. Survival analysis of 80 cases and an overview of almost 20 years' research. *J BUON* 2009;14(3):457–62.
16. Simonetti S., Russo R., Ciancia G. et al. Role of polysomy 17 in transitional cell carcinoma of the bladder: immunohistochemical study of HER2/neu expression and fish analysis of c-erbB-2 gene and chromosome 17. *Int J Surg Pathol* 2009;17(3):198–205.
17. Jalali Nadoushan M.R., Taheri T., Jouian N., Zaeri F. Overexpression of HER-2/neu oncogene and transitional cell carcinoma of bladder. *Urol J* 2007;4(3):151–4.