

ID: 2013-04-1276-A-2726

Оригинальная статья

Цмокалюк Е.Н., Маслякова Г.Н.

## Иммуногистохимические маркеры прогноза развития рецидива неинвазивных уротелиальных карцином

*ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И.Разумовского Минздрава России, НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии*

Tsmokalyuk E.N., Maslyakova G.N.

### Immunohistochemical markers of the noninvasive urothelial carcinomas relapse prognosis

*Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Scientific Research Institute of Fundamental and Clinical Urology*

#### Резюме

Проведенный анализ результатов иммуногистохимического исследования 13 моноклональных антител в биопсийном материале 34 больных с раком мочевого пузыря позволяет выявить наиболее значимые иммуногистохимические маркеры предрасположенности к рецидивированию у пациентов с поверхностной формой рака мочевого пузыря.

**Ключевые слова:** рак мочевого пузыря, моноклональные антитела, маркеры рецидива

#### Введение

Несмотря на постоянное усовершенствование методов диагностики и лечения поверхностных форм уротелиальной карциномы к сожалению, не удается сколь нибудь значимо снизить процент рецидивов данных форм рака мочевого пузыря. По данным клинических рекомендаций Европейской ассоциации урологов (2010) прогрессирование опухоли при T<sub>a</sub> развивается в 6-20% случаев, при T<sub>1</sub> в 27- 48% при любой степени дифференцировки опухолевой ткани.

Большинство исследователей Американской и Европейской урологических ассоциаций, считают ТУР золотым стандартом лечения поверхностного рака мочевого пузыря [1, 9]. Однако, процент рецидивирования поверхностного РМП после выполнения только ТУР МП достаточно высок и составляет в среднем от 51% до 95% [27, Аль-Шукри С.Х. с соавт., 1997; Тарасов Н.И., 2000; Rajala P. et al., 1999; Tolley D.A. et al., 1996], при этом примерно 50% рецидивов возникают в течение 1-го года наблюдения.

Причинами частого рецидивирования поверхностных форм уротелиальной карциномы при органосохраняющей терапии большинство ученых считают следующие:

1. диффузный характер неопластических изменений слизистой оболочки и наличие невыявленных очагов T<sub>is</sub>, не верифицированных во время проведения оперативного вмешательства;
2. возможность имплантации опухолевых клеток во время эндовезикального вмешательства;
3. низкая дифференцировка опухоли.

Западными исследователями было доказано, что высокодифференцированные неинвазивные папиллярные карциномы (pT<sub>a</sub>) обладают меньшим потенциалом прогрессирования, чем низкодифференцированные с инвазией в субэпителиальную мышечную ткань (pT<sub>1</sub>). Вероятность мышечной инвазии в 2 раза меньше у pT<sub>a</sub>, чем у pT<sub>1</sub> опухолей и составляет 9% и 18% соответственно. Степень дифференцировки также является очень важной характеристикой опухоли. Доказано, что G1 опухоли прогрессируют в 6% случаев, в то время как у G2 опухолей потенциал прогрессирования больше в 5 раз и составляет 30% [22]. При наблюдении за больными в течение 20 лет риск прогрессирования для pT<sub>a</sub>G1 и pT<sub>1</sub>G3 был еще выше – 14% и 45% соответственно, при этом рецидивы выявлялись примерно в 50% случаев вне зависимости от степени злокачественности опухоли [19].

С данными результатами исследований согласны и отечественные ученые, которые также считают, что каждый последующий рецидив обладает большим потенциалом злокачественности, следовательно, имеет тенденцию к снижению дифференцировки и к инвазии в мышечный слой (Матвеев Б.П., 2001).

Хорошо известен тот факт, что течение заболевания, опухолевая прогрессия в виде возникновения рецидивов у пациентов с одной и той же клинической стадией и морфологической формой рака часто бывает различным. Поэтому, чтобы понять причины рецидивирования поверхностных форм уротелиального рака и с целью определения потенциала клеток, составляющих опухолевый рецидив, возникла необходимость в проведении дополнительного изучения с помощью иммуногистохимических маркеров.

В отечественной и зарубежной литературе существует много публикаций, в которых единодушно указывается, что уровень экспрессии генов-супрессоров, антигенов пролиферативной активности прямо коррелирует с опухолевой прогрессией и рецидивированием (7, 13). Однако, индексы экспрессии других групп маркеров в мышечнонеинвазивных формах рака (маркеры апоптоза, цитокератины и др.) среди исследователей имеют очень противоречивые результаты.(10)

Следует указать и тот факт, что своевременная молекулярная характеристика рецидивирующей опухоли позволяла бы отбирать больных не только для органосохранного лечения, но и проводить своевременную радикальную цистэктомию пациентам с высоким потенциалом рецидивирования, продлевая им тем самым жизнь.

Все вышесказанное определило цель нашего исследования.

**Цель исследования:** Выявить наиболее значимые иммуногистохимические маркеры предрасположенности к рецидивированию у пациентов с поверхностной формой рака мочевого пузыря.

#### Материалы и методы

Материалом для исследования послужили операционный и биопсийный материал 106 пациентов с новообразованиями мочевого пузыря, проходивших лечение в НИИ «Фундаментальной и клинической уронефрологии» ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И.Разумовского Минздрава России. С помощью обзорных методов окрашивания диагноз уротелиального рака был поставлен 94 пациентам. Остальные 12 пациентов составили группу сравнения. Операционный и биопсийный материал фиксировали в 10%-м

растворе нейтрального формалина и заливали в парафин. Срезы толщиной 5-7 мкм, окрашенные гематоксилин-эозином, были подвергнуты обзорному морфологическому анализу, при котором стадию рака определяли в соответствии с классификацией TNM, а степень дифференцировки опухолевых клеток оценивали в соответствии с рекомендациями ВОЗ, 2004. Микроскопическое изучение препаратов было проведено с применением бинокулярного микроскопа «Micros MC100» при 400-кратном увеличении.

Иммуногистохимические реакции проводили на серийных парафиновых срезах (5мкм), используя стрептавидин-биотиновый метод. В качестве детекционной системы применяли систему LSAB2 System, HRP (K0675), Dako, в качестве хромогена – диаминобензидин (Dako).

Иммуногистохимическое исследование 13 маркеров было проведено на биопсийном и операционном материале. Все используемые моноклональные антитела были разделены на группы по функциональной значимости:

- маркеры пролиферативной активности - Ki67, PCNA, p63
- супрессор опухолевого роста - p53,
- маркер апоптоза - Bcl2,
- рецептор эпидермального фактора роста - EGFR,
- цитокератиновый профиль – CK7, CK8, CK10/13, CK17, CK18, CK19.

Интенсивность реакций с антигенами, локализованными в цитоплазме (цитокератины 7,8,13,17,18,19) и на мембранах клеток (EGFR), оценивали полуколичественным способом по балльной шкале от 0 до 3, учитывая выраженность реакции и ее локализацию: 0 – отсутствие реакции, 1 – слабая реакция, 2 – умеренная реакция, 3 – сильная реакция.

Результаты реакций с антигенами, имеющими ядерную локализацию (PCNA, Ki67, p53, p63, bcl-2), оценивали по системе подсчета histochemical score. Система подсчета включает в себя интенсивность иммуногистохимической окраски по 3-балльной шкале и долю (%) окрашенных клеток и представляет собой сумму произведений процентов, отражающих долю клеток с различной интенсивностью окраски на балл, соответствующий интенсивности реакции. Интенсивность окраски 0 – нет окрашивания, 1 – слабое окрашивание, 2 – умеренное окрашивание, 3 – сильное окрашивание.

Формула подсчета следующая:  $\text{histochemical score} = \sum P(i) \times I$ , где  $I$  – интенсивность окрашивания, выраженная в баллах от 0 до 3;  $P(i)$  – процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью. Максимальное значение гистосчета должно соответствовать 300.

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ статистической обработки результатов SSPS 13.0 for Windows.

### Результаты

Из 104 человек с диагнозом уротелиального рака были отобраны больные у которых РМП имел рецидивирующее течение – 34 человека.

При сравнительной характеристике клинических групп Та и Т1 необходимо отметить, что процент рецидивирующих опухолей резко возрастает с 34% в группе Та до 73% в группе Т1. Практически в половине процентов случаев (44%) рецидивы наблюдались у пациентов, первичная опухоль которых имела мультицентрический характер поражения слизистой мочевого пузыря.

В группе Та все 100% опухолей, которые рецидивировали в последующем, были высокодифференцированными (G1). Разнообразная картина наблюдается среди пациентов группы Т1: преобладали опухоли с высокой степенью злокачественности (G2,3), высокодифференцированные первичные опухоли (G1) наблюдались в 2,5 раза реже.

При анализе показателей экспрессии иммуногистохимических маркеров, имеющих ядерное окрашивание (Ki67, P53, P63, PCNA), в группе пациентов Та практически не отличалось от уровня экспрессии пациентов, которые не имели рецидива в последующем. Однако, необходимо отметить пациента, который в анамнезе имел несколько рецидивов (R2): уровень экспрессии всех ядерных маркеров были выше остальных пациентов данной клинической группы.

В группе пациентов Т1 среди больных с рецидивирующими опухолями отмечается существенный рост процента клеток с положительной экспрессией по сравнению с группой Та: среднее количество клеток с положительной экспрессией Ki67 в Та – 4%, в Т1 – 17,5%. Кроме того, необходимо отметить, что раковые клетки с интенсивной иммуногистохимической реакцией маркера Ki67 и p53 появляются только в тех случаях, когда уротелиальная карцинома имела в последующем рецидив. Аналогичная тенденция наблюдается в показателях положительной экспрессии и у остальных ядерных маркеров.

Необходимо отметить особенности экспрессии P53 среди пациентов группы Т1: позитивная экспрессия наблюдалась только у больных в первичной опухоли с рецидивами.

PCNA в обеих группах показал высокий процент экспрессии без существенных различий среди пациентов с рецидивами и без рецидивов.

При иммуногистохимической реакции на антигены, локализованные в цитоплазме, было установлено, что их экспрессия во всех исследованных группах больных является положительной. Достоверно значимых различий между группами больных по показателям иммуногистохимических реакций с цитокератинами (CK7, CK8, CK10/13, CK17, CK18, CK19) и рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) не установлено.

Маркер Bcl2 не показал достоверной разницы в экспрессии ни в одной из изучаемых групп.

### Выводы

Таким образом, проведенные исследования 13 моноклональных иммуногистохимических антител позволили сделать следующие выводы:

1. Опухоли, относящиеся к группе Т1, четко дают экспрессию с моноклональным антителом P53 только в случаях возникновения рецидива, в безрецидивных опухолях – экспрессия отрицательная.
2. Появление интенсивноокрашенных ядер с маркерами P53 и Ki67 при иммуногистохимическом окрашивании в группах больных Та и Т1 имели высокую зависимость с возникновением в дальнейшем рецидива опухоли.

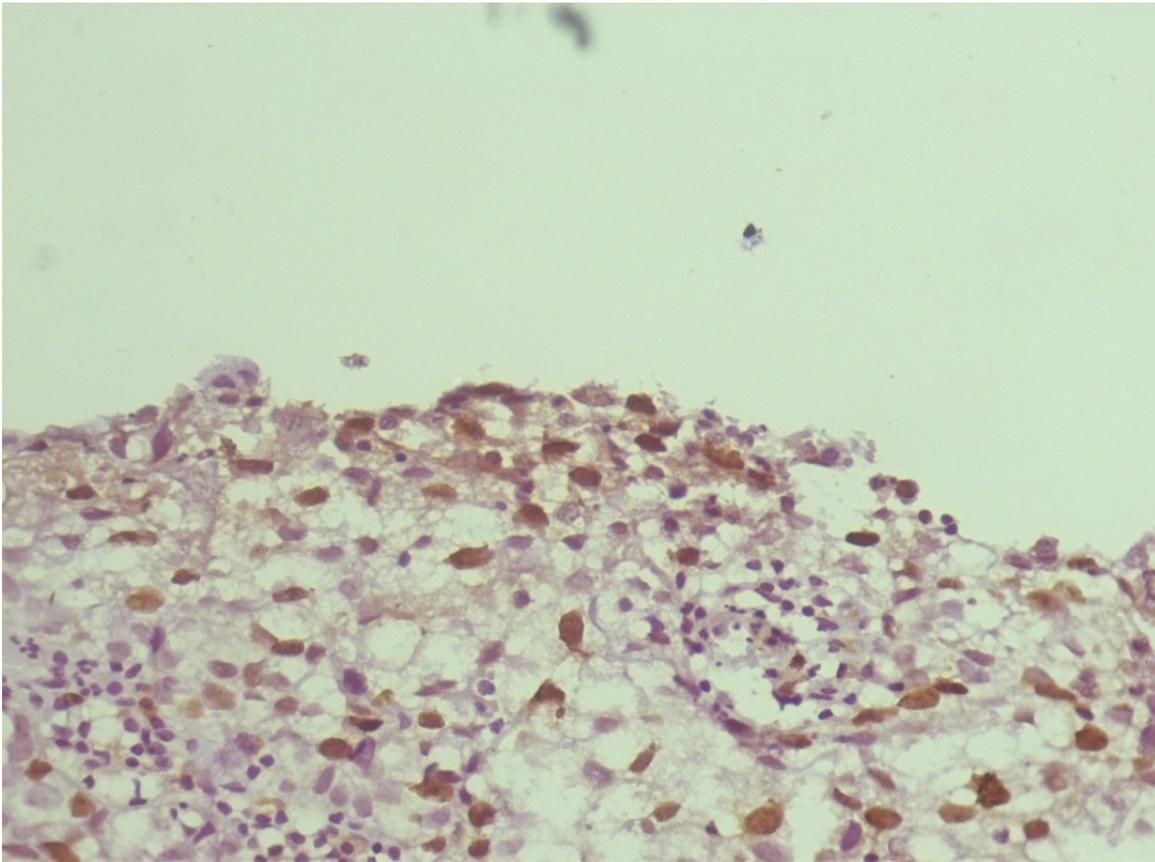


Рис. 1. Уротелиальный рак с инвазией в собственную пластинку слизистой оболочки мочевого пузыря. Умеренная и высокая экспрессия Ki-67 в ядрах уротелия.

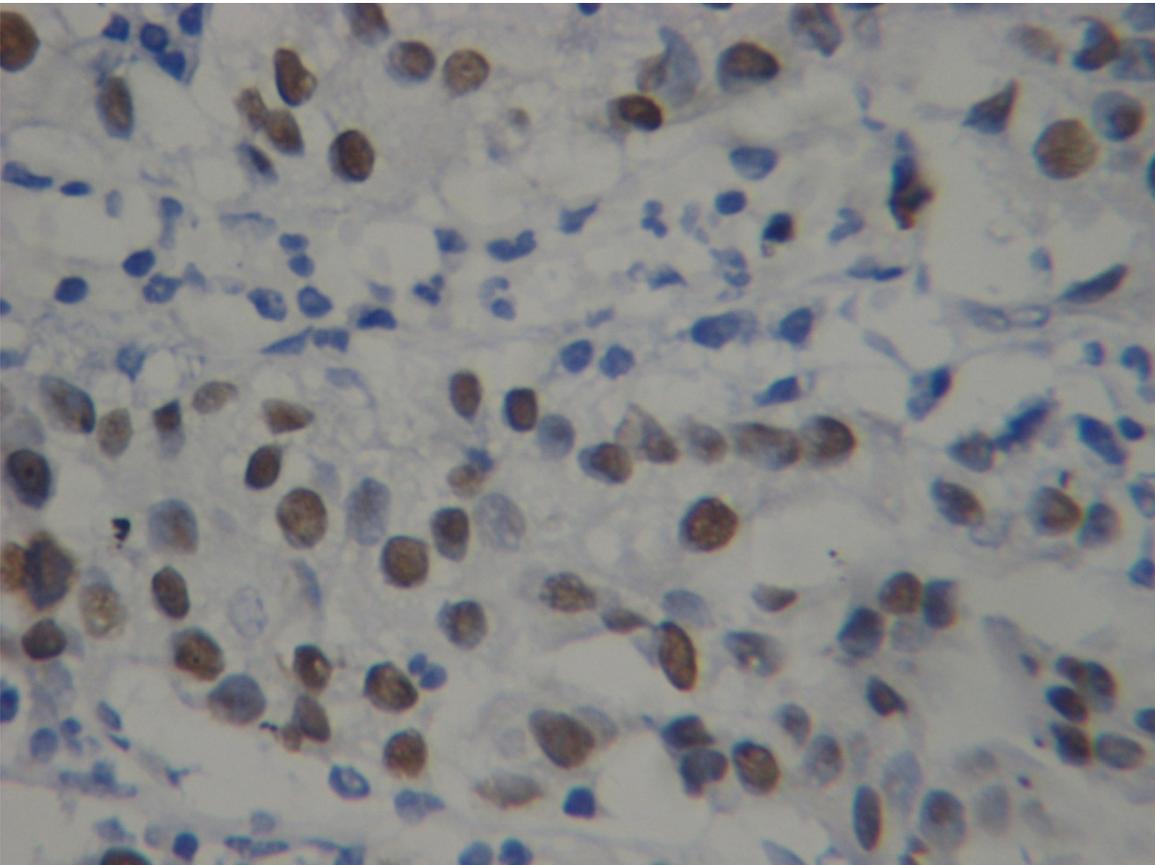


Рис. 2. Умеренная и выраженная экспрессия маркера P53 в клетках уротелиальной карциномы с инвазией в собственную пластинку слизистой мочевого пузыря.

**Литература**

1. Аполихин О.А., Какорина Е.П., Сивков А.В. и др. Состояние урологической заболеваемости в Российской Федерации по данным официальной статистики. Урология 2008; (3): 3, 5-7.
2. Давыдов М.И. Злокачественные образования в России и странах СНГ в 2001 г. / М.И.Давыдов, Е.М. Аксель. – М., 2003.
3. Кудрявцев Л.А. «Выбор метода оперативного лечения рака мочевого пузыря в зависимости от стадии и его локализации». Автореф. дисс. докт. мед. наук. Москва, 1976.
4. Лопаткин Н.А. Руководство по урологии. М.: Медицина, 1998. – Т.3. – 670 с.
5. Магер О.В., Казанцева Н.В. Прогностическое значение биологических маркеров у больных поверхностным и инвазивным раком мочевого пузыря//Онкоурология. – 2006. – №4. – С. 30-34.
6. Матвеев Б.П. Клиническая онкоурология. Москва, 2003, с.195-244.
7. Петров, С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / С.В. Петров, Н.Т. Райхлин. – Казань, 2004. – 456 с.
8. Франк Г.А., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю. Иммуногистохимическая характеристика и степень дифференцировки рака мочевого пузыря//Архив патологии. – 2002. - Т.64, № 6. - С.16-18.
9. Франк Г.А., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю. Иммуногистохимические факторы прогноза рака мочевого пузыря и легкого.//Материалы IV Всероссийского съезда онкологов, 2005, г.Ростов-на-Дону, с. 174-175.
10. Blasco-Olaetxea E., Belloso L., Garcia-Tamayo J. Superficial bladder cancer: study of the proliferative nuclear fraction as a prognostic factor // Europ. J. Cancer. – 1996. – Vol.32. – P. 444-446.
11. Rodel C., Grabenbauer G.G., Rodel F. et al. Apoptosis, p53, bcl-2, and Ki67 in invasive bladder carcinoma: Possible predictors for response to radiochemotherapy and successful bladder preservation // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 2000.– Vol.46. – P.1213-1221.