

© Е.С.Завьялова, А.С.Аль-Шукри, И.А.Корнеев, О.Д.Ягмуров, 2009  
УДК 616.62-006.6-036.8:616-097

*Е.С. Завьялова<sup>1</sup>, А.С. Аль-Шукри<sup>1</sup>, И.А. Корнеев<sup>1</sup>, О.Д. Ягмуров<sup>2</sup>*

## РОЛЬ АНТИГЕНОВ Ki-67, p53 и bcl-2 В ПРОГНОЗИРОВАНИИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ ПЕРЕХОДНО-КЛЕТОЧНОГО РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

*E.S. Zavialova, A.S. Al-Shukri, I.A. Korneev, O.D. Yagmurov*

## THE ROLE OF Ki-67, p53 and bcl-2 ANTIGENS IN THE PROGNOSIS OF CLINICAL COURSE OF TRANSITIONAL CELLULAR CANCER OF THE URINARY BLADDER

Кафедры <sup>1</sup>урологии и <sup>2</sup>патологической анатомии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова, Россия

### РЕФЕРАТ

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Целью настоящего исследования явилось изучение экспрессии антигенов Ki-67, p53 и bcl-2 и их связи с клинико-морфологическими характеристиками опухоли, а также клиническим течением болезни. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Ретроспективно изучены материалы клинического обследования 16 больных переходно-клеточным раком мочевого пузыря. Были проведены иммуногистохимические реакции с антителами к Ki-67, p53 и bcl-2. Полученные данные обзорного гистологического и иммуногистохимического исследования сопоставлялись с результатами диспансерного наблюдения за пациентами в течение 5 лет. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Высокой степени пролиферативной активности переходно-клеточных карцином соответствовала меньшая степень дифференцировки опухолевой ткани ( $r=0,70$ ;  $p=0,003$ ) и меньшая продолжительность безрецидивного периода ( $r=0,67$ ;  $p=0,078$ ). Для карцином с большим числом p53-позитивных ядер была характерна меньшая степень дифференцировки ( $r=0,47$ ;  $p=0,067$ ), быстрое наступление рецидива ( $r=72$ ;  $p=0,068$ ) и меньшая продолжительность жизни больных ( $r=0,72$ ;  $p=0,087$ ). Активность апоптоза увеличивалась с понижением степени дифференцировки опухоли ( $r=0,67$ ;  $p=0,04$ ). Выявлена положительная корреляционная связь между пролиферацией опухолевых клеток и нарушением в них апоптоза ( $r=0,67$ ;  $p=0,04$ ). **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** В результате проведенного исследования нами было установлено, что исследуемые антигены обладают прогностической ценностью, так как тесно связаны со степенью дифференцировки переходно-клеточных карцином. Кроме того, гиперэкспрессия белка p53 была взаимосвязана со скоростью рецидивирования опухолей и выживаемостью больных.

**Ключевые слова:** переходно-клеточный рак, прогноз, Ki-67, p53, bcl-2.

### ABSTRACT

**THE AIM.** The goal of present investigation was to study the expression of Ki-67, p53 and bcl-2 antigens and their connection with clinico-morphological characteristics of the tumor, and also the clinical flow of the disease. **PATIENTS AND METHODS.** The materials of the clinical investigation of 16 patients with transitional cellular carcinoma of the urinary bladder was retrospectively studied. Immunohistochemical reaction with Ki-67, p53 and bcl-2 antibodies took place. The received histological and immunohistochemical data was co-analyzed with the follow-up results after the patients during 5 years. **RESULTS.** The high level of proliferative activity of the transitional cell carcinoma correlated with the lower differentiation stage of the tumor tissue ( $r=0,70$ ;  $p=0,003$ ) and shorter period of recurrence absence ( $r=0,67$ ;  $p=0,078$ ). For the carcinomas with the higher number of p-53 positive nucleae was more characteristic the lower stage of the differentiation ( $r=0,47$ ;  $p=0,067$ ), faster recurrence ( $r=72$ ;  $p=0,068$ ) and lower life duration of the patients ( $r=0,72$ ;  $p=0,087$ ). The apoptosism activity increased with the decrease of the differentiation stage of the tumor ( $r=0,67$ ;  $p=0,04$ ). Was discovered a positive correlation between tumor cell proliferation and apoptosis failure ( $r=0,67$ ;  $p=0,04$ ). **CONCLUSION.** As a result of the conducted experiment we stated that investigated antigens have a prognostic value, as a result of their close connection with the stage differentiation of the transitional cell carcinoma. Besides that the hyper expression of p53 protein was interconnected with the speed of the tumor recurrence and survival of the patients.

**Key words:** transitional cell tumor, prognosis, Ki-67, p53, bcl-2.

### ВВЕДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря относится к распространенным злокачественным новообразованиям и составляет 2-5% от всех злокачественных опухолей

человека. В структуре онкологической заболеваемости он занимает 11-е место и достигает 10-15 случаев на 100 000 человек в год [1]. Выбор метода лечения больных переходно-клеточным раком мочевого пузыря в настоящее время базируется на традиционных прогностических факторах: глубине инвазии и степени дифференцировки. Известно,

Завьялова Е.С. 197022, С.-Петербург, ул. Л.Толстого, 17. Кафедра урологии СПб ГМУ им. акад. И.П.Павлова. E-mail: dr.zavialova@mail.ru

тно, что результаты лечения больных, принадлежащих к одной и той же классификационной подгруппе, существенно различаются, поэтому очевидно, что эти признаки не могут полноценно предсказать дальнейшее течение болезни. Поэтому исследователями ведется поиск клинико-морфологического критерия, который позволил бы получить дополнительную прогностическую информацию и точнее спрогнозировать биологическое поведение карцином. Несмотря на эти усилия, до сих пор вопрос остается открытым.

В настоящее время развитие рака мочевого пузыря рассматривается учеными с позиции концепции «опухолевого поля», согласно которой злокачественная трансформация эпителия является проявлением нестабильности эпителия. В результате генетической нестабильности возможно появление множественных новообразований и их частое рецидивирование. Типичными для рака мочевого пузыря изменениями генома являются мутации генов, отвечающих за пролиферативную активность, запуск апоптоза, контроль клеточного цикла. Наиболее изученными и часто применяемыми маркерами рака мочевого пузыря являются индекс пролиферации Ki-67, белки p53 и bcl-2, однако, до сих пор однозначно сделать вывод об их ценности нельзя.

Роль протеина Ki-67 как индикатора пролиферативной активности клеток была изучена для различных локализаций рака, в том числе в отношении рака мочевого пузыря. Учеными, исследовавшими активность Ki-67 в переходно-клеточных карциномах, установлено, что экспрессия этого белка ассоциирована со степенью дифференцировки опухоли, ее инвазией в кровеносные и лимфатические сосуды и глубиной инфильтрации новообразований [2]. Независимая ценность этого маркера для прогнозирования рецидивирования, прогрессии, выживаемости и эффективности иммунотерапии поверхностных переходно-клеточных карцином мочевого пузыря подтверждается многими исследователями [3, 4, 5, 6]. Несмотря на это, некоторые ученые не обнаружили связи Ki-67 с прогнозом заболевания [7].

Мутации гена p53 – самые часто встречающиеся в опухолях человека [8]. Ген кодирует ядерный фосфопротеин, участвующий в регуляции клеточного цикла. Функция этого белка состоит в остановке транскрипции в случае повреждения ДНК для ее репарации, либо индуцирует апоптоз при невозможности ее починки [9]. Прогностическую ценность гиперэкспрессии гена p53 изучало значительное количество авторов [10,11]. Ученые обнаружили, что гиперэкспрессия p53 связана с повы-

шенным риском рецидивирования рака мочевого пузыря и низкой выживаемостью больных, что позволило им рекомендовать этот метод для прогнозирования течения рака мочевого пузыря. Более того, в отношении этих показателей показана независимая прогностическая ценность p53. Другие авторы отметили связь с показателями выживаемости, но не обнаружили данные в пользу независимой ценности этого маркера [12, 13]. В связи с этим возникает необходимость проведения исследования, посвященного изучению прогностических возможностей этого метода.

Протеин bcl-2 является антиапоптотическим белком. РК Lirponen и соавт. опубликовали данные обследования 158 больных переходно-клеточным раком мочевого пузыря, по результатам которых была выявлена связь между экспрессией bcl-2 и глубиной инвазии и степенью дифференцировки карцином, митотическим индексом, площадью ядер, а также наличием отдаленных метастазов и скоростью наступления рецидива [14]. Другие авторы отмечали связь гиперэкспрессии bcl-2 с неблагоприятным прогнозом заболевания [15, 16]. Тем не менее, до настоящего времени роль bcl-2 в злокачественном потенциале рака мочевого пузыря до конца не изучена и требует продолжения исследований.

Несмотря на большое количество исследований, подтверждающих прогностическую ценность этих биомаркеров, некоторое количество публикаций отрицают возможность определения исхода заболевания с их помощью. Учитывая невозможность точного определения исхода заболевания, используя отдельные показатели, перспективным направлением поисков нам представляется совокупная оценка нескольких, наиболее хорошо изученных характеристик новообразований. Нами было проведено комплексное исследование аспектов, с различных сторон характеризующих опухолевый процесс: пролиферацию клеток карцином, нарушение апоптоза, нарушение контроля клеточного цикла. Подобных работ, посвященных переходно-клеточному раку мочевого пузыря, в отечественной литературе мы не обнаружили.

Целью настоящего исследования явилось изучение экспрессии антигенов Ki-67, p53 и bcl-2 и их связи с клинико-морфологическими характеристиками опухоли, а также клиническим течением болезни.

#### ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Ретроспективно изучены материалы клинического обследования 16 больных переходно-клеточным раком мочевого пузыря, проходивших лечение в урологических клиниках СПбГМУ им. акад.

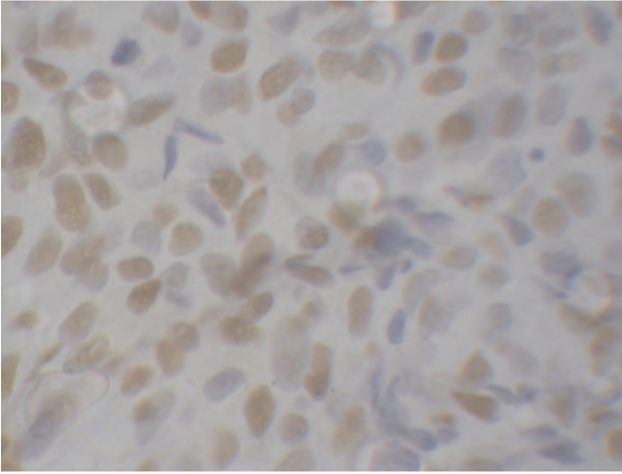


Рис. 1. Микрофотография. Окраска гематоксилин-эозин и иммуногистохимическая окраска к белку Ki-67, увеличение  $\times 600$ . Переходно-клеточный рак мочевого пузыря, контрастированы ядра клеток.

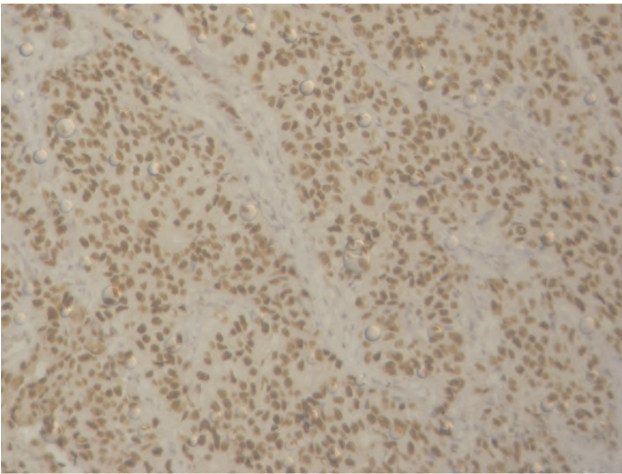


Рис. 2. Микрофотография. Окраска гематоксилин-эозин и иммуногистохимическая окраска к белку p53, увеличение  $\times 400$ . Переходно-клеточный рак мочевого пузыря, контрастированы ядра клеток.

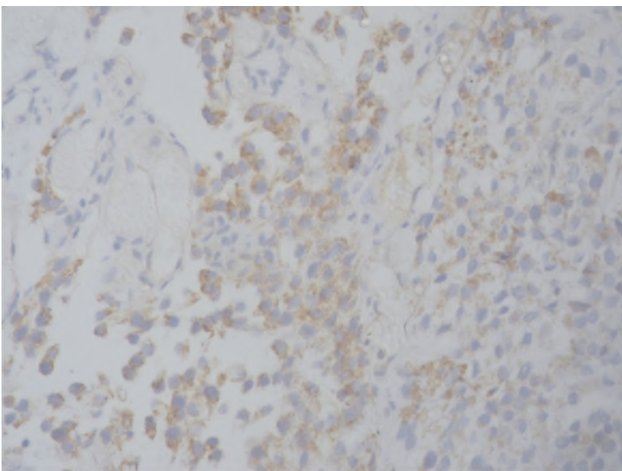


Рис. 3. Микрофотография. Окраска гематоксилин-эозин и иммуногистохимическая окраска к белку bcl-2, увеличение  $\times 400$ . Переходно-клеточный рак мочевого пузыря, контрастирована цитоплазма клеток.

И.П. Павлова и ВМА им. С.М. Кирова и находившихся на диспансерном наблюдении. 10 (62%) пациентам была произведена трансуретральная резекция, 3 (19%) выполнена радикальная цистэктомия, у 3 (19%) больных опухоль мочевого пузыря была неоперабельной. Соотношение мужчин и женщин было 15:1, средний возраст пациентов составил  $66 \pm 9$  лет. Минимальный размер опухоли был 1 см, максимальный – 8 см, средние размеры составили  $2,8 \pm 2,6$  см. У половины больных карциномы были одиночные, другая половина имела множественные опухоли. У 3 (19%) пациентов оперативные вмешательства были выполнены по поводу рецидивных карцином, у 13 (81%) опухоли были первичными.

Из операционного биопсийного материала приготавливались гистологические срезы толщиной 5 – 7 мкм, которые окрашивались гематоксилином и эозином. Затем при увеличении  $\times 600$  проводилось обзорное гистологическое исследование изучаемых структур с выявлением глубины инвазии и степени дифференцировки рака. При обзорном гистологическом исследовании препаратов было выявлено, что глубина инвазии рака Tis, Ta, T1, T2, T3 T4 и Tх была выявлена в 1 (6%), 2 (13%), 1 (6%), 6 (36%), 2 (13%), 2 (13%), 2 (13%) случаях соответственно, а степень дифференцировки G1, G2 и G3 – в 6 (36%), 6 (36%) и 4 (28%) соответственно.

Иммуногистохимические реакции проводились с антителами к Ki-67, p53 и bcl-2 фирмы «Дако», Дания. Подсчет позитивных клеток производился полуколичественным методом при увеличении  $\times 600$ . Положительным результатом считалось интенсивно-коричневое окрашивание ядер в случае Ki-67 и p53 и коричневое окрашивание цитоплазмы и/или ядерной оболочки в случае bcl-2.

Полученные данные обзорного гистологического и иммуногистохимического исследования сопоставлялись с результатами диспансерного наблюдения за пациентами в течение 5 лет. Средний срок наблюдения составил  $51 \pm 32$  месяца. За время наблюдения рецидивы были выявлены у 7 (44%) больных, средний срок безрецидивного промежутка составил  $7 \pm 6$  месяцев, 7 (44%) пациентов умерло вследствие опухолевой прогрессии и рецидивирования.

При статистической обработке результатов учитывались параметры распределения. Анализировались корреляционные связи между признаками с использованием коэффициента корреляции Пирсона, непараметрического rs-теста, Н-критерия Краскала-Уоллеса и однофакторного дисперсионного анализа, а сравнение средних величин – с помощью t-критерия Стьюдента и непараметрического U-теста Манна-Уитни.



## РЕЗУЛЬТАТЫ

Зависимость между глубиной инвазии рака и степенью экспрессии Ki-67, p53 и bcl-2 в исследованных образцах удаленной опухолевой ткани оказалась ниже порога достоверности ( $p > 0,2$ ).

Высокой степени пролиферативной активности переходно-клеточных карцином соответствовала меньшая степень дифференцировки опухолевой ткани ( $r=0,70$ ;  $p=0,003$ ;  $rs=0,69$ ;  $p=0,003$ ;  $F=6,86$ ;  $p=0,009$ ) и меньшая продолжительность безрецидивного периода ( $r=0,67$ ;  $p=0,078$ ; рис. 1). Среди подгрупп с различной степенью дифференцировки экспрессия Ki-67 была менее значительной в образцах ткани с G1 при сравнении с G2 и G3 ( $t=2,53$ ;  $p=0,030$ ;  $U=6,0$ ;  $p=0,050$ ;  $t=6,93$ ;  $p < 0,0001$ ;  $U=6,0$ ;  $p=0,011$  соответственно).

Для карцином с большим числом p53-позитивных ядер была характерна меньшая степень дифференцировки ( $r=0,47$ ;  $p=0,067$ ;  $rs=0,51$ ;  $p=0,042$ ), быстрое наступление рецидива ( $r=0,72$ ;  $p=0,068$ ) и меньшая продолжительность жизни больных ( $r=0,72$ ;  $p=0,087$ ; рис. 2). Низкодифференцированные опухоли демонстрировали большее количество клеток с потерей контроля над клеточным циклом по сравнению с высокодифференцированными новообразованиями ( $U=2,0$ ;  $p=0,033$ ).

Активность апоптоза увеличивалась с понижением степени дифференцировки опухоли ( $r=0,67$ ;  $p=0,04$ ;  $rs=0,70$ ;  $p=0,003$ ;  $F=9,69$ ;  $p=0,03$ ), по сравнению с высоко- и умереннодифференцированными карциномами опухоли со степенью дифференцировки G3 имели более высокую степень экспрессии bcl-2 ( $t=2,96$ ;  $p=0,018$ ;  $U=2,00$ ;  $p=0,033$ ;  $t=2,94$ ;  $p=0,019$ ;  $U=0,00$ ;  $p=0,011$  соответственно; рис. 3, 4).

При анализе результатов исследования обнаружена взаимосвязь некоторых опухолевых антигенов. Так, выявлена положительная корреляционная связь между пролиферацией опухолевых клеток и нарушением в них апоптоза: экспрессия Ki-67

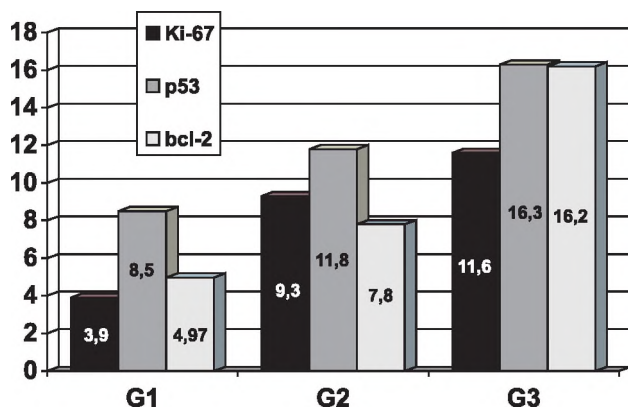


Рис. 4. Изменение индекса пролиферации Ki-67, экспрессии белков p53 и bcl-2 в зависимости от степени дифференцировки новообразований.

и bcl-2 была взаимосвязана ( $r=0,67$ ;  $p=0,04$ ;  $rs=0,68$ ;  $p=0,003$ ). Также наблюдалась положительная тенденция во взаимоотношениях антигенов Ki-67 и p53 ( $r=0,44$ ;  $p=0,086$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время благодаря успехам молекулярной биологии, генетики и иммунологии стали возможны исследования биологических свойств опухолей и механизмов канцерогенеза. За последние два десятилетия было предложено большое количество молекулярных маркеров, потенциально обладающих прогностической ценностью в отношении выживаемости больных, вероятности рецидива опухоли, развития метастазов и т. д. Однако ни один из них широко не применяется на практике для прогнозирования течения рака мочевого пузыря вне рамок научных исследований. Многие ученые предлагают комбинировать несколько биомаркеров для более точного предсказания биологического поведения опухоли. В частности, в качестве эффективного сочетания было предложено подсчитывать комбинацию p53 и Ki-67, что позволило повысить точность прогноза заболевания [17]. По результатам проведенного исследования нами была выявлена связь между экспрессией антигенов Ki-67 и bcl-2, а также между белками Ki-67 и p53. Эти данные отражают многогранность происходящих в опухолевой ткани анапластических изменений.

В нашем исследовании было установлено, что экспрессия маркеров Ki-67 и bcl-2 тесно связана со степенью дифференцировки опухоли, тогда как антиген p53 оказался менее чувствительным в этом отношении. Также при сравнении между подгруппами по степени дифференцировки наблюдались достоверные различия в значениях Ki-67 между G1 и G2, bcl-2 – между G2 и G3, и все три показателя были эффективны при определении различий между высокодифференцированными и низкодифференцированными опухолями. При анализе прогностических возможностей Ki-67, p53 и bcl-2 была выявлена связь этих показателей с выживаемостью больных, а также скоростью рецидивирования карцином.

Таким образом, хотя самостоятельной прогностической ценности для исследуемых маркеров установлено не было, они дополнительно характеризуют злокачественный потенциал карцином мочевого пузыря, так как тесно связаны со степенью дифференцировки новообразований. Кроме того, гиперэкспрессия изученных биомаркеров позволяет количественно оценить степень злокачественности опухоли, а комбинация нескольких ан-

тигенов может повысить степень надежности результатов.

Одним из наиболее дискуссионных вопросов, касающихся рака мочевого пузыря, остается проблема определения степени дифференцировки переходно-клеточных опухолей мочевого пузыря. За последние 10 лет Европейская Ассоциация Урологов трижды меняла свои рекомендации по определению принадлежности карцином к той или иной гистологической группе. В настоящий момент принято деление переходно-клеточных опухолей мочевого пузыря на папиллярные новообразования с низким злокачественным потенциалом, высокодифференцированные и низкодифференцированные папиллярные карциномы уротелия. Однако, несмотря на это, единого мнения относительно используемой классификации у урологов нет. Причиной, по которой происходят изменения классификационных групп переходно-клеточных карцином, является вариабельность результатов вследствие субъективной оценки гистологом степени дифференцировки карцином. Разрешение этой проблемы – в количественных методах оценки степени анаплазии опухолевой ткани и стандартизации методик, реактивов и подходов к интерпретации результатов. Учитывая тесную взаимосвязь степени дифференцировки и гиперэкспрессии Ki-67, bcl-2 и менее выраженную зависимость с p53, можно сделать вывод, что эти показатели могли бы стать одним из критериев, которые позволили бы точнее определить гистологическую градацию новообразований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования нами было установлено, что антигены обладают прогностической ценностью, так как тесно связаны со степенью дифференцировки переходно-клеточных карцином. Кроме того, гиперэкспрессия белка p53 была взаимосвязана со скоростью рецидивирования опухолей и выживаемостью больных.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of major cancers in 1985. *Int J Cancer* 1993;54:594-606
2. Margulis V, Shariat SF, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Lotan Y. Ki-67 is an independent predictor of bladder cancer outcome

in patients treated with radical cystectomy for organ-confined disease. *Clin Cancer Res* 2006;12:7369-7373

3. Lebre T, Becette V, Herve JM. Prognostic value of MIB-1 antibody labeling index to predict response to Bacillus Calmette-Guerin therapy in a high-risk selected population of patients with stage T1 grade G3 bladder cancer. *Eur Urol* 2000;37:654-659

4. Pich A, Chiusa L, Formiconi A. Proliferative activity is the most significant predictor of recurrence in noninvasive papillary urothelial neoplasms of low malignant potential and grade 1 papillary carcinomas of the bladder. *Cancer* 2002;95:784-790

5. Santos L, Costa C, Pereira S, Koch M, Amaro T, Cardoso F, Guimaraes T, Bento MJ, Lobo F, Pinto S, Lopez C. Neovascularisation is a prognostic factor of early recurrence in T1/G2 urothelial bladder tumor. *Ann Oncol* 2003;14(9):1419-1424

6. Quintero A, Alvarez-Kindelan J, Luque RJ. Ki-67 MIB1 labeling index and the prognosis of primary TaT1 urothelial cell carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol* 2006;59:83-88

7. Zlotta AR, Noel JC, Fayt I, Drowart, Van Vooren JP, Huygen K, Simon J, Schulman CC. Correlation and prognostic significance of p53, p21WAF1/CIP1 and Ki-67 expression in patients with superficial bladder tumors treated with bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy. *J Urol* 1999;161(3):792-798

8. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49

9. Lane DP. Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15

10. Kuczyk MA, Bokemeyer C, Serth J, Hervatin C, Oelke M, Hofner K, Tan HK, Jonas U. P53 overexpression as a prognostic factor for advanced stage bladder cancer. *Eur J Cancer* 1995;31A(13-14):2243-2247

11. Rodriguez-Alonso A, Pita-Fernandez S, Gonzalez-Carrero J, Nogueira-March JL. P53 and Ki-67 expression as prognostic factors for cancer-related survival in stage T1 transitional cell bladder carcinoma. *Eur Urol* 2002;41(2):182-8; discussion 188-189

12. Lipponen PK. Overexpression of p53 nuclear oncoprotein in transitional cell bladder cancer and its prognostic value. *Int J Cancer* 1993;53(3):365-370

13. Shiina H, Igawa M, Nagami H, Yagi H, Urakami S, Yoneda T, Shirakawa H, Ishibe T, Kawanishi M. Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen, p53 protein and nm23 protein, and nuclear DNA content in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 1996;78(8):1762-1774

14. Lipponen PK, Aaltomaa S, Eskelinen M. Expression of the apoptosis suppressing bcl-2 protein in transitional cell bladder tumors. *Histopathology* 1996;28920:135-140

15. Ong F, Moonen LM, Gallee MP, ten Bosch C, Zerp SF, Hart AA, Barterlink H, Verheij M. Prognostic factors in transitional cell cancer of the bladder: an emerging role for bcl-2 and p53. *Radiother Oncol* 2001;61(2):169-175

16. Atug F, Turkeri L, Ozyurek M, Akdas A. Bcl-2 and p53 overexpression as risk factors in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int Urol Nephrol* 1998;30(4):455-461

17. Bol MGW, Baak JPA, van Diermen B, Buhr-Wildhagen S, Janssen EAM, Kjellevoid KH, Kruse AJ, Mestad O, OGREID P. Proliferation markers and DNA content analysis in urinary bladder TaT1 urothelial cell carcinomas: identification of subgroups with low and high stage progression risks. *J Clin Pathol* 2003;56(6):447-452

Поступила в редакцию 12.11.2008 г.

Принята в печать 10.02.2009 г.