

## Экспрессия p53 в поверхностных уротелиальных карциномах мочевого пузыря – независимый фактор прогноза

М.В. Ковылина, Е.А. Прилепская, О.А. Цыбуля, Н.В. Тупикина, И.В. Рева

ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; Россия, 127473, Москва, ул. Десятская, 20, стр. 1

Контакты: Наталия Владимировна Тупикина tatatu@yandex.ru

**Введение.** Примерно 80 % первично диагностируемых уротелиальных карцином мочевого пузыря являются поверхностными. При этом у 10–20 % пациентов с первично выявляемым поверхностным уротелиальным раком впоследствии развивается мышечно-инвазивное и метастатическое поражение. В связи с этим важной является идентификация прогностических факторов, которые могли бы выделить группу поверхностных опухолей с более высоким потенциалом агрессивности.

**Цель исследования** – определение роли экспрессии p53 как фактора прогноза в развитии поверхностных уротелиальных карцином мочевого пузыря.

**Материалы и методы.** Ретроспективно проанализированы 72 истории болезни пациентов (11 женщин и 61 мужчины) с первично диагностированным поверхностным уротелиальным раком мочевого пузыря I и II степеней злокачественности. Всем пациентам была проведена повторная трансуретральная резекция через 6 нед после 1-й операции. При отсутствии остаточной опухоли пациентам выполняли цистоскопическое исследование каждые 3 мес в течение 1-го года после вмешательства и каждые 3–6 мес в последующем. Среднее время наблюдения составило 43,2 мес. Иммуногистохимическое исследование с онкопротеином p53 было проведено по стандартному протоколу на 72 срезах поверхностных зафиксированных формалином и залитых в парафин фрагментов опухоли. Экспрессия p53 также была определена в 10 гистологически неизмененных фрагментах слизистой оболочки мочевого пузыря.

**Результаты.** В зависимости от процента ядер с экспрессией p53 были выделены 2 группы: 1-ю составили 40 (55,5 %) образцов опухоли с экспрессией p53 < 20 % и 17 (23,6 %) образцов без экспрессии p53; 2-ю – 15 (20,9 %) образцов с экспрессией p53 > 20 % (4 пациента – 20–40 %, 8 – 40–60 %, 3 – 60–80 %). В нормальной ткани мочевого пузыря во всех 10 образцах экспрессия p53 не определялась. За время наблюдения у 1 из 57 пациентов 1-й группы было отмечено прогрессирование заболевания, во 2-й группе их число достигало 13 из 15. Пациенты групп сравнения одинаковы по клиническим характеристикам. Среднее время до прогрессирования заболевания составило 17,3 мес.

**Заключение.** Результаты настоящего исследования доказывают, что онкомаркер p53 является фактором прогноза в развитии поверхностных уротелиальных карцином мочевого пузыря.

**Ключевые слова:** поверхностный рак мочевого пузыря, прогноз, рецидив, маркеры, ген p53, экспрессия, иммуногистохимическое исследование

DOI: 10.17650/1726-9776-2016-12-2-36-39

### The role of p53 immunohistochemical marker in development of superficial urothelial bladder carcinoma

M.V. Kovylyna, E.A. Prilepskaya, O.A. Tsybulya, N.V. Tupikina, I.V. Reva

A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Ministry of Health of Russia; Build. 1, 20 Delegatskaya St., Moscow, 127473, Russia

**Purpose.** Determination the role of the p53 expression as a prognostic factor in the development of superficial urothelial bladder carcinoma.

**Materials and methods.** Medical histories of 72 patients (11 women and 61 men) with diagnosed primary superficial urothelial carcinoma of the bladder I and II grade were retrospectively analyzed. All patients were undergone a repeated transurethral resection was performed in 6 weeks after the first operation. In the case of the absence of residual tumor, cystoscopy was performed every 3 months during the first year then every 3–6 months during next 5 years. The average time of follow-up was 43.2 months. According to the standard protocol an immunohistochemical study with detection of p53 was carried out on 72 sections of formalin-fixed and paraffin-embedded tumor fragments. p53 expression was also determined in 10 histologically unchanged fragments of the bladder mucosa.

**Results.** Depending on the percent of nuclei with p53 expression, two groups were identified. The first group included 40 tumor samples (55.5 %) with p53 expression less than 20 % and 17 tumor samples (23.6 %) without p53 expression. The second group included 15 tumor samples (20.9 %) with p53 expression more than 20 % (4 patients – 20–40 %, 8 patients – 40–60 %, 3 patients – 60–80 %). p53 expression was not determined in the all 10 samples of normal bladder tissue. During follow-up period 1 of 57 patients of the first group has a disease progression comparing with 13 of 15 patients in the second group. Patients of the both group were similar in respect with clinical characteristics. The mean time to disease progression was 17.3 months.

**Conclusion.** Results of the current study shows that p53 immunohistochemical marker is a prognostic factor in the development of superficial urothelial bladder carcinoma.

**Key words:** superficial bladder cancer, prognosis, recurrence, markers, p53 gene, expression, immunohistochemical study

## Введение

Рак мочевого пузыря (РМП) является актуальной проблемой современной урологии. В мире РМП занимает 7-е место в структуре онкологической заболеваемости, при этом каждый год диагностируется около 340 тыс. новых случаев и встречается в 6 раз чаще в развитых странах по сравнению с развивающимися [1, 2]. Для РМП характерен рост заболеваемости с возрастом. Опухоли мочевого пузыря почти не развиваются у людей моложе 35 лет, однако после 65 лет вероятность возникновения РМП резко увеличивается. Мужчины болеют РМП в 2–6 раз чаще женщин. У пациентов с РМП летальный исход, связанный с основным диагнозом, отмечается в 20–25 % случаев. В подавляющем большинстве морфологически РМП проявляется в виде переходноклеточной (уротелиальной) карциномы.

Примерно в 80 % случаев первично диагностируемый РМП является немышечно-инвазивным [3]. После трансуретральной резекции у 70–80 % пациентов развивается рецидив в течение 6–12 мес, и 20 % рецидивных опухолей имеют более высокую степень злокачественности. По данным литературы, у 10–20 % пациентов с первично диагностируемым немышечно-инвазивным уротелиальным раком впоследствии развивается мышечно-инвазивное и метастатическое заболевание [4, 5]. Прогноз мышечно-инвазивных и метастатических опухолей хуже по сравнению с поверхностными поражениями [6]. В связи с этим важной является идентификация прогностических факторов, которые могли бы выделить группу немышечно-инвазивных опухолей с более высоким потенциалом агрессивности.

Известно, что ген *p53* локализуется на хромосоме 17p и основная его функция заключается в супрессии образования злокачественных опухолей. Мутация гена *p53* определяется в большом спектре злокачественных новообразований, таких как рак толстой кишки, рак молочной железы, РМП, рак предстательной железы и др. [4]. Выявление экспрессии этого гена возможно с помощью иммуногистохимического исследования. Учитывая вышеперечисленное, **целью** настоящего **исследования** явилось определение роли экспрессии *p53* как фактора прогноза в развитии поверхностного уротелиального РМП.

## Материалы и методы

Нами ретроспективно были проанализированы 72 истории болезни пациентов (11 женщин и 61 мужчины) с первично диагностированным немышечно-инвазивным уротелиальным РМП. Средний возраст пациентов составил 69,3 (36–82) года. Во всех случаях опухоли были классифицированы по системе TNM как T1. Все опухоли согласно гистологическому заключению соответствовали I и II степеням злокаче-

ственности. Из исследования были исключены пациенты с сопутствующей карциномой *in situ*.

Всем пациентам была проведена повторная трансуретральная резекция через 6 нед после 1-й операции. При отсутствии остаточной опухоли пациентам выполняли цистоскопическое исследование каждые 3 мес в течение 1-го года и каждые 3–6 мес в последующем. Среднее время наблюдения составило 43,2 (12–102) мес.

**Иммуногистохимическое исследование.** Иммуногистохимическая реакция с онкопротеином *p53* была проведена на срезах 72 фрагментов опухолей, зафиксированных нейтральным забуференным формалином и залитых в парафин. Экспрессия *p53* также была определена в 10 гистологически неизмененных фрагментах слизистой оболочки мочевого пузыря (рис. 1).

Иммуногистохимическую реакцию во всех случаях проводили по стандартному протоколу.

Демаскировку антигенов проводили в PT-Link Dako в растворе для демаскировки с высоким pH (EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH). Протокол включал предварительный нагрев до 65 °С, восстановление антигена в течение 20 мин при температуре 97 °С и дальнейшее охлаждение до 65 °С. Затем стекла промывали в течение 1–5 мин в TBS-буфере (Dako) (концентрация рабочего раствора 1:20) и помещали в автостейнер (Dako) для окрашивания в автоматическом режиме. Инкубация с антителом составила 20 мин. Для визуализации использовали систему детекции EnVision™ FLEX, High pH. Срезы докрашивали гематоксилином Майера, для заключения использовали бальзам Bio-Mount.

В зависимости от процента ядер с экспрессией *p53* опухоли были классифицированы на группы: без экспрессии – 0 баллов, с экспрессией < 20 % – 1 балл, 20–40 % – 2 балла, 40–60 % – 3 балла, 60–80 % – 4 балла и 80–100 % – 5 баллов (см. рис. 1, рис. 2). Экспрессию считали положительной только при яркой окраске ядра. Для получения статистически достоверного результата оценку выполняли на 3 срезах с каждой опухоли, подсчет проводили с помощью аппарата для гистосканирования и соответствующего программного обеспечения.

## Результаты

В зависимости от доли позитивных клеток были выделены 2 группы. В 40 (55,5 %) образцах опухолей экспрессия *p53* составила < 20 %, опухолевые клетки были объединены в маленькие группы. В нормальной ткани мочевого пузыря, во всех 10 образцах, экспрессия *p53* не определялась. Нормальные клетки соединительной ткани не экспрессировали *p53* во всех случаях.

За время наблюдения у 1 из 57 пациентов 1-й группы было отмечено прогрессирование заболевания, по сравнению с 13 пациентами 2-й группы. Медиана

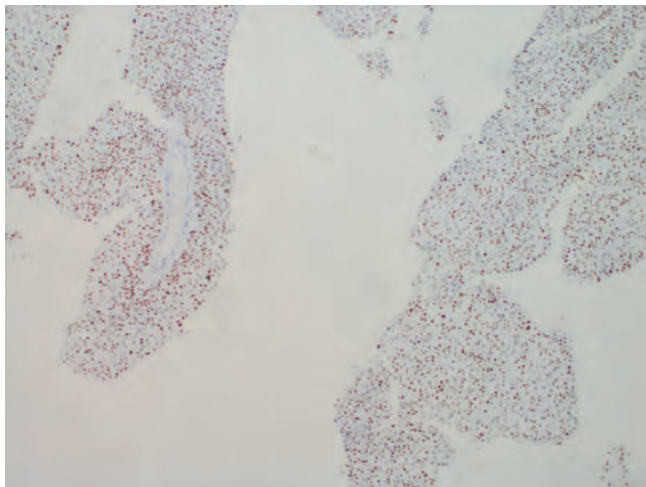


Рис. 1. Микропрепарат: экспрессия p53 5 баллов

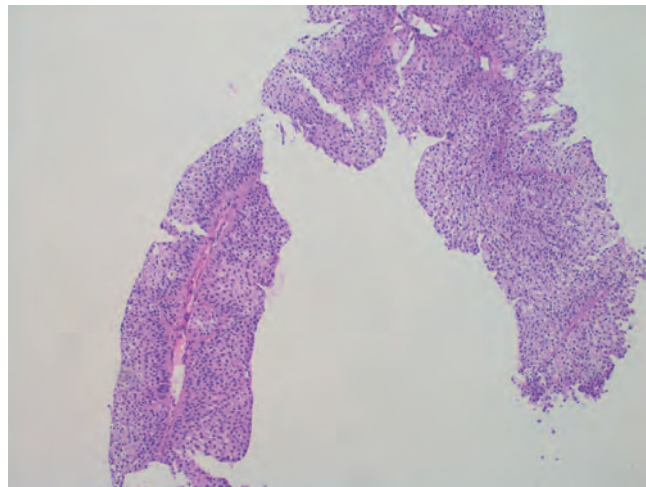


Рис. 2. Микропрепарат: папиллярный уротелиальный рак мочевого пузыря II степени клеточной атиплии. Окраска гематоксилином и эозином

Характеристика пациентов 2-й группы

Пол и возраст, лет	Прогрессирование	Время до прогрессирования, мес	Экспрессия p53, баллы
Мужской, 51	Нет	—	2
Мужской, 56	Да	6	2
Мужской, 62	Да	12	3
Мужской, 63	Да	8	4
Мужской, 66	Да	10	3
Мужской, 67	Да	24	3
Мужской, 68	Да	32	3
Мужской, 73	Да	36	2
Мужской, 75	Да	21	3
Мужской, 78	Да	13	3
Мужской, 80	Да	11	3
Мужской, 81	Нет	—	2
Мужской, 84	Да	9	4
Женский, 62	Да	26	3
Женский, 64	Да	18	4

времени до возникновения местных рецидивов немышечно-инвазивной уротелиальной карциномы, а также мышечно-инвазивных поражений (5 пациентов 2-й группы) составила 17,3 мес. Пациенты сравниваемых групп были одинаковы по клиническим характеристикам. Средний возраст в 1-й группе составил 69,4 года, во 2-й — 68,6 года. Ранее внутрипузырную терапию получали 15 (26,3 %) пациентов 1-й группы и 3 (20 %) пациента 2-й.

**Обсуждение**

Прогноз немышечно-инвазивного уротелиального РМП вариабелен. Согласно рекомендациям Европейской ассоциации урологов (2013) риски рецидивирования и прогрессирования могут быть рассчитаны для каждого пациента с помощью системы оценки Европейской организации по исследованию и лечению рака, которая включает 6 наиболее значимых клинических и морфологических факторов: количество

опухолей, степень дифференцировки, размер, наличие рецидивов в анамнезе, дифференцировка по системе TNM и сопутствующая карцинома *in situ* [7]. Используя эти характеристики, опухоли можно разделить на различные группы риска с разными подходами к оперативному лечению, химиотерапии, терапии бациллой Кальметта–Герена. Тем не менее точное определение группы пациентов с немышечно-инвазивным раком, который будет рецидивировать или прогрессировать, затруднено. На протяжении длительного времени различные исследователи предпринимали большое количество попыток найти факторы прогноза немышечно-инвазивного РМП, позволяющие выделить группу опухолей с более агрессивным течением, для которых, возможно, ранняя радикальная цистэктомия или более активная химиотерапия были бы методами выбора.

Выявление мутации *p53* иммуногистохимическим методом является простой и легко выполнимой технологией на залитых в парафин тканях.

Основной белок — регулятор клеточного цикла *p53* играет ведущую роль в поддержании стабильности генома клетки. Неопластическая трансформация клетки часто сопровождается мутацией гена *p53* и превращением его из индуктора в ингибитор апоптоза. В норме при повреждении дезоксирибонуклеи-

новой кислоты клетки ген *p53* является активатором апоптоза, что вызывает запуск системы каспаз, приводящей к гибели клетки. Таким образом, ежедневно происходит элиминация десятков тысяч клеток, у которых в силу различных факторов развивается нестабильность генома. При возникновении мутаций в гене *p53* происходит накопление этого белка в клеточном ядре и превращение его из активатора в ингибитор апоптоза.

Имуногистохимические исследования подтверждают, что при РМП отмечается гиперэкспрессия *p53*, которая наиболее характерна для пациентов с низкодифференцированными и распространенными опухолями [8]. Более того, гиперэкспрессия *p53* коррелирует с митотическим индексом и сосудистой инвазией [9]. Также *p53* является потенциальным суррогатным маркером для пациентов, подвергающихся терапии бациллой Кальметта–Герена [10].

### Заключение

Результаты нашего исследования демонстрируют, что ген *p53*, супрессирующий опухоль, играет важную роль в развитии и прогрессировании РМП, а также является независимым фактором прогноза течения заболевания. Таким образом, пациентам с мутацией гена *p53* показана более агрессивная тактика лечения.

*Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ МК-6070.2015.7 «Клинико-морфологическая характеристика рака мочевого пузыря. Поиск биологических маркеров прогноза».*

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Chaux A., Karam S., Miller J.S. et al. High-grade papillary urothelial carcinoma of the urinary tract: a clinicopathologic analysis of a post-World Health Organization/International Society of Urological Pathology classification cohort from a single academic center. *Hum Pathol* 2012;43(1):115–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21820145>.
2. Cheng L., MacLennan G.T., Lopez-Beltran A. Histologic grading of urothelial carcinoma: a reappraisal. *Hum Pathol* 2012;43(12):2097–108. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Histologic+grading+of+urothelial+carcinoma%3A+a+reappraisal>.
3. Cheng L., Zhang S., MacLennan G.T. et al. Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice. *Hum Pathol* 2011;42(4):455–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bladder+cancer%3A+translating+molecular+genetic+insights+into+clinical+practice>.
4. Goebel P.J., Groshen S.G., Schmitz-Dräger B.J. p53 immunohistochemistry in bladder cancer — a new approach to an old question. *Urol Oncol* 2010;28(4):377–88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20610276>.
5. Matsushita K., Cha E.K., Matsumoto K. et al. Immunohistochemical biomarkers for bladder cancer prognosis. *Int J Urol* 2011;18(9):616–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21771101>.
6. Pan C.C., Chang Y.H., Chen K.K. et al. Prognostic significance of the 2004 WHO/ISUP classification for prediction of recurrence, progression, and cancer-specific mortality of non-muscle-invasive urothelial tumors of the urinary bladder: a clinicopathologic study of 1,515 cases. *Am J Clin Pathol* 2010;133(5):788–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Prognostic+significance+of+the+2004+WHO%2FISUP+classification+for+prediction+of+recurrence>.
7. Resnick M.J., Basset J.C., Clark P.E. Management of superficial and muscle-invasive urothelial cancers of the bladder. *Curr Opin Oncol* 2013;25(3):281–8.
8. Gontero P., Casetta G., Zitella A. et al. Evaluation of p53 protein overexpression, Ki67 proliferative activity and mitotic index as markers of tumor recurrence in superficial transitional cell carcinoma of bladder. *Eur Urol* 2000;38(3):287–96.
9. Jiang D.K., Ren W.N., Yao L. et al. Meta-analysis of association between TP53 Arg72Pro polymorphism and bladder cancer risk. *Urology* 2010;76(3):765.e1–7.
10. Oh J.J., Si S.H., Choi D.K. et al. A six-week course of bacillus Calmette-Guérin prophylaxis is insufficient to prevent tumor recurrence in nonmuscle invasive bladder cancer with strong positive expression of p53. *Oncology* 2010;79(5–6):440–6.