
ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ КІ-67, ММР-9 И КОЛЛАГЕНА IV У БОЛЬНЫХ ПАПИЛЛЯРНЫМ УРОТЕЛИАЛЬНЫМ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ*

В.П. Авдошин, Е.В. Котельникова

Кафедра урологии и оперативной нефрологии
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

И.И. Бабиченко

Кафедра патологической анатомии
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

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

Ключевые слова: иммуногистохимическое исследование, рак мочевого пузыря, прогностические маркеры.

Заболеваемость раком мочевого пузыря (РМП) постоянно увеличивается: за последние 10 лет прирост составил 16%, при среднегодовом его темпе 1,5% [1, 2]. Уротелиальные опухоли занимают седьмое—десятое место в структуре злокачественных новообразований [3, 4]. Высокая смертность от РМП свидетельствует о неэффективности хирургического вмешательства и диктует необходимость исследования молекулярных механизмов опухолевой прогрессии. В последние годы для изучения рака мочевого пузыря на клеточном, молекулярно-генетическом уровнях используют новые диагностические технологии (иммуногистохимия), способные прогнозировать возникновение рецидивов или прогрессирование опухолевого процесса. В настоящей работе мы провели с помощью иммуногистохимической методики (ИГХ) изучение экспрессии матриксной металлопротеиназы-9 (ММР-9) в клетках уротелия при различных видах их опухолевой трансформации.

Высокая экспрессия опухолевыми клетками матриксных металлопротеиназ может лежать в основе опухолевой прогрессии и метастазирования раковых опухолей различного генеза за счет способности протеолитических ферментов расплавлять различные компоненты внеклеточного матрикса, и даже базальные мембраны эпителия [5, 6, 7].

* Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 2009—2013 гг.

Цель исследования: определить прогностическое значение экспрессии Ki-67, ММР-9, коллагена IV в различных уротелиальных опухолях мочевого пузыря.

Материалы и методы исследования. Исследования проводились в иммуногистохимической лаборатории кафедры патологической анатомии РУДН. Для работы был использован операционный материал 43 пациентов, в том числе 16 (27%) женщины и 27 (67%) мужчин (средний возраст больных составил $66 \pm 1,5$ года), находившихся на лечении в урологических отделениях ГКБ № 64 и ГКБ № 29, которые являются клиническими базами кафедры урологии и оперативной нефрологии РУДН. При подозрении на рак мочевого пузыря в первую очередь принято проводить необходимые исследования: общий анализ мочи, УЗИ мочевого пузыря, цистоскопия. Однако ни один из этих методов не позволяет достоверно выявить рак и степень поражения мочевого пузыря.

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

Жалобы на боли над лоном и в области мочевого пузыря выявлены у 38 пациентов (92%), наличие примеси крови — у 43 (100%), наличие сгустков крови в моче — у 38 (92%), задержку мочеиспускания — у 7 (17%), частые и болезненные позывы к мочеиспусканию — у 38 (92%). Анализ результатов инструментального и сонографического исследования показал, что при ультразвуковом обследовании при поступлении в стационар наличие опухоли мочевого пузыря выявлено у 32 пациентов (74%), у 11 пациентов (26%) выявление опухоли было невозможным из-за наличия сгустков в просвете пузыря или гемотампонады. 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. При этом были выявлены 17 неинвазивных уротелиальных опухолей, в том числе 7 папиллом (16%), 10 опухолей низкого злокачественного потенциала (ОНЗП) (23%) и 26 инвазивных уротелиальных карцином (61%). В группе T1 карцином инфильтрирующих субэпителиальную соединительную ткань в 18/43 (42%) случаев выявлен инвазивный рак, шесть случаев (14%) отнесены в группу T2 карцином, инфильтрирующих мышечную оболочку мочевого пузыря, и 2 новообразования отнесены к группе T3 (5%).

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

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы STATISTICA 6.0, приведены средние значения $M \pm s$, где s — среднее квадратичное отклонение. Учитывая ненормальное распределение полученных статистических показателей, сравнение двух независимых групп осуществляли непараметрическим методом при помощи U-критерия Манна—Уитни. Достоверным считали различия средних при уровне статистической значимости $p < 0,05$. Корре-

ляционные взаимоотношения между стадией опухоли, степенью злокачественности, индексом пролиферации клеток, выраженностью экспрессии ММР-9 и коллагена IV оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение. При гистологическом исследовании неизменной слизистой оболочки мочевого пузыря (она — складчатая) переходный эпителий состоит из базального, промежуточного и поверхностного слоя зонтичных клеток. Толщина эпителиального пласта составляет 5—6 клеточных слоев. Признаков воспаления и атипии не выявлено. Определение злокачественного потенциала и инвазивных свойств уротелиальных опухолей МП возможно на основе клинических макроскопических признаков, гистологического строения, а также иммуноморфологических особенностей опухолей.

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 — карцинома T1 ($p < 0,01$); опухолями стадии T1-T2 ($p = 0,04$) и T2-T3 ($p = 0,04$).

При изучении степени злокачественности опухолевых образований были выявлены следующие закономерности: в папилломах и ОНЗП индекс пролиферации 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 Та-НСЗ и НСЗ-ВСЗ ($p < 0,01$).

Таким образом, пролиферативная активность уротелиальных опухолей, определяемая с помощью моноклональных антител Ki-67, является 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 матричной металлопротеиназы-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 ДАБ реакции. Оценку интенсивности иммуногистохимической 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. Результаты

полуколичественного анализа распределения ММР-9 в различных опухолевых образованиях мочевого пузыря показали, что наименьший уровень экспрессии ММР-9 отмечен в папилломах мочевого 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 (Т1, Т2, Т3) мочевого пузыря уровень экспрессии ММР-9 увеличился более чем в 2,5 раза и достоверно отличался от аналогичного показателя в папилломах и ОНЗП ($p < 0,01$). 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. При этом получены достоверные различия по показателю ММР-9 между доброкачественными (Тa) и злокачественными (Т1, Т2) опухолями мочевого пузыря ($p = 0,02$). Кроме того, по экспрессии ММР-9 достоверно различаются уротелиальные карциномы низкой и высокой степени злокачественности ($p < 0,01$).

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 образований: от папилломы до карциномы высокой степени злокачественности. Коллаген IV выявлялся вдоль базальной мембраны эпителиальных клеток в виде тонкой коричневой полоски различной интенсивности. Коллаген IV мелких артериол соединительнотканной стромы, как правило окрашивает стенку сосудов в интенсивный коричневый цвет. В связи с этим мы проводили оценку интенсивности иммуногистохимической реакции с коллагеном IV в базальной мембране различных опухолевых образований полуколичественным методом по следующим показателям: 0 — отсутствие коллагена вдоль базальной мембраны, 1 — наличие тонкой полоски коллагена, 2 — толстая полоска коллагена вдоль базальной мембраны, сравнивая по толщине и интенсивности окрашивания стенки сосудов с подслизистой оболочкой мочевого пузыря.

Было исследовано распределение коллагена IV в базальной мембране опухолей в зависимости от их степени злокачественного потенциала. Проведенные исследования показали, что существуют достоверные различия по распределению коллагена IV в базальной мембране при доброкачественных (Тa — $1,4 \pm 0,5$ у.е.) и злокачественных (Т1 — $0,5 \pm 0,6$ у.е., Т2 — $0,3 \pm 0,5$ у.е.) опухолях мочевого пузыря ($p < 0,01$). По интенсивности окрашивания коллагена IV в базальной мембране опухолей достоверно различаются уротелиальные карциномы низкой ($0,8 \pm 0,6$ у.е.) и высокой (0) степени злокачественности ($p < 0,01$).

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.

Изучение молекулярных особенностей онкогенеза открывает новые возможности диагностики и лечения уротелиальных опухолей мочевого пузыря, помогает в определении инвазивных свойств и биологического потенциала опухолей. В таблице представлены корреляционные взаимоотношения между морфологическими характеристиками опухолей мочевого пузыря и исследованными их иммуногистохимическими 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 таблицы, 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 матриксной металлопротеиназы-9 (0,655) и отрицательно — с распределением в базальной мембране коллагена IV (–0,654). При этом следует отметить, более высокий уровень положительной корреляции экспрессии матриксной металлопротеиназы-9 в клетках со степенью злокачественности опухоли (0,761) и высокую отрицательную корреляцию между этим показателем и распределением коллагена IV вдоль базальной мембраны опухоли (–0,796).

Таблица

Корреляционные взаимоотношения между иммуногистохимическими и морфологическими характеристиками опухолей мочевого пузыря

Маркер	Показатель	TNM	G	Ki-67	MMP 9	Col IV
TNM	коэф. корр.	1,000	0,872	0,850	0,655	–0,654
	<i>p</i>		0,01	0,01	0,01	0,01
	<i>N</i>	43	43	43	43	43
G	коэф. корр.	0,872	1,000	0,866	0,761	–0,796
	<i>p</i>	0,01		0,01	0,01	0,01
	<i>N</i>	43	43	43	43	43
Ki-67	коэф. корр.	0,850	0,866	1,000	0,671	–0,671
	<i>p</i>	0,01	0,01		0,01	0,01
	<i>N</i>	43	43	43	43	43
MMP-9	коэф. корр.	0,655	0,761	0,671	1,000	–0,602
	<i>p</i>	0,01	0,01	0,01		0,01
	<i>N</i>	43	43	43	43	43
Col IV	коэф. корр.	–0,654	–0,796	–0,671	–0,602	1,000
	<i>p</i>	0,01	0,01	0,01	0,01	
	<i>N</i>	43	43	43	43	43

Скорее всего эти данные можно объяснить наличием умеренной положительной корреляционной связи между индексом пролиферации клеток по показателю Ki-67 и экспрессией в клетках матриксной металлопротеиназы-9 (0,671). В свою очередь экспрессия в клетках матриксной металлопротеиназы-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 матриксной металлопротеиназы-9, которая разрушает коллаген IV базальной мембраны уротелия и активизирует инвазию опухолевых клеток в подлежащие ткани.

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

Все вышеизложенное позволяет предположить о выраженной степени инвазии опухоли при высокой экспрессии ММР-9, в связи с чем возникает необходимость тщательного динамического наблюдения за данной категорией пациентов с обязательными общеклиническим и эндоскопическим обследованием с целью выявления возможного развития метастазов.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Чиссов В.И., Старинский В.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2009 г. — М., 2010.
- [2] Alsheikh A., Mohamedali Z., Jones E. et al. Comparison of the WHO/ISUP classification and cytokeratin 20 expression in predicting the behavior of low-grade papillary urothelial tumors. World/Health Organization / International Society of Urologic Pathology // Mod. Pathol. — 2001. — Vol. 14. — Issue 4. — P. 267—272.
- [3] 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. Part I. — 1996. — Vol. 1. — P. 1—39.
- [4] Cameron K.M., Lupton C.H. Inverted papilloma of the lower urinary tract // Br. J. Urol. — 1976. — Vol. 48. — P. 567—577.
- [5] 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. — Vol. 22. — Issue 12. — P. 1435—1448.
- [6] Kunze E., Schauer A., Schmitt M. Histology and histogenesis of two different types of inverted urothelial papillomas // Cancer. — 1983. — Vol. 51. — P. 348—358.
- [7] 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. — Vol. 102. — P. 109—114.

DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC IMPORTANCE OF KI-67, MMP-9 AND COLLAGEN IV IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS IN BLADDER TUMORS

V.P. Avdoshin, E.V. Kotelnikova

Department of Urology
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

I.I. Babichenko

Department of Pathological Anatomy
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

The prognostic value of the expression Ki-67, MMP-9 and collagen IV in urotelial bladder tumors were estimated. The biopsy and surgery samples from 43 patients (27 males and 16 females) aged from 42 till 87 years (average age $66 \pm 1,5$ years) who received combined therapy for urotelial tumors were analyzed. It has been found that Ki-67, MMP-9 and collagen IV are important prognostic markers of urotelial invasive bladder carcinoma (BC).

Key words: bladder carcinoma, prognostic markers, immunohistochemical markers.