

РОЛЬ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ДИАГНОСТИКЕ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Г.Н. Маслякова – ГОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И.Разумовского Росздрава, начальник морфологического отдела НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии, профессор, доктор медицинских наук; **А.Н. Понукалин** – ГОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И.Разумовского Росздрава, старший научный сотрудник отдела реконструктивной уронефрологии НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии, доцент, кандидат медицинских наук; **Е.Н. Цмокалюк** – ГОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И.Разумовского Росздрава, научный сотрудник морфологического отдела НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии; **А.Б. Бучарская** – ГОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И.Разумовского Росздрава, научный сотрудник морфологического отдела НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии, кандидат биологических наук; **А.В. Медведева** – ГОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И.Разумовского Росздрава, научный сотрудник морфологического отдела НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии.

SIGNIFICANCE OF IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS IN DIAGNOSTICS OF URINARY BLADDER CANCER

G.N. Maslyakova – Saratov State Medical University n.a. V.I.Razumovskiy, Scientific Research Institute of Fundamental and Clinical Urology, Head of Morphological Department, Professor, Doctor of Medical Science; **A.N. Ponukalin** – Saratov State Medical University n.a. V.I.Razumovskiy, Scientific Research Institute of Fundamental and Clinical Urology, Department of Reconstructive Urology, Assistant Professor, Candidate of Medical Science; **E.N. Tsmokalyuk** – Saratov State Medical University n.a. V.I.Razumovskiy, Scientific Research Institute of Fundamental and Clinical Urology, Morphological Department, Associate Research Assistant; **A.B. Bucharskaya** – Saratov State Medical University n.a. V.I.Razumovskiy, Scientific Research Institute of Fundamental and Clinical Urology, Morphological Department, Research Assistant, Candidate of Biological Science; **A.V. Medvedeva** – Saratov State Medical University n.a. V.I.Razumovskiy, Scientific Research Institute of Fundamental and Clinical Urology, Morphological Department, Research Assistant, Candidate of Medical Science.

Дата поступления – 12.09.09 г.

Дата принятия в печать – 27.10.09 г.

Г.Н. Маслякова, А.Н. Понукалин, Е.Н. Цмокалюк и соавт. Роль иммуногистохимических маркеров в диагностике рака мочевого пузыря. Саратовский научно-медицинский журнал, 2009, том 5, № 4, с. 608-611.

На основании исследования операционного и биопсийного материала 106 пациентов с заболеваниями мочевого пузыря, проходивших лечение в НИИ «Фундаментальной и клинической уронефрологии» СГМУ была проведена оценка 13 иммуногистохимических маркеров: пролиферативной активности – Ki67, PCNA, p63; супрессора опухолевого роста – p53, маркеров апоптоза Bcl2, Bax; рецептора эпидермального фактора роста – EGFR; цитокератинового профиля (ЦК7, ЦК8, ЦК10/13, ЦК17, ЦК18, ЦК19) и дана их диагностическая оценка для постановки диагноза рака мочевого пузыря.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, иммуногистохимия, диагностические и прогностические факторы.

G.N. Maslyakova, A.N. Ponukalin, E.N. Tsmokalyuk et al. Significance Of Immunohistochemical Markers In Diagnostics Of Urinary Bladder Cancer. Saratov Journal of Medical Scientific Research, 2009, vol. 5, № 4, p. 608-611.

On the basis of surgical and biopsy material 106 patients with diseases of urinary bladder have been under study. They received treatment at Scientific Research Institute of Fundamental and Clinical Urology of Saratov State Medical University. 13 immunohistochemical markers have been evaluated: markers of proliferative activity – Ki-67, PCNA, p63, suppressor of tumor growth – p53, markers of apoptosis – Bcl-2, Bax, receptor of epidermal growth factors – EGFR, cytokeratin profile – (CK7, CK8, CK10/13, CK 17, CK18, CK19), as well as their diagnostic significance for identifying the urinary bladder cancer.

Key words: urinary bladder cancer, immunohistochemical markers, diagnostic and prognosis factors.

Ежегодно в мире раком мочевого пузыря заболевает 335,8 тысяч человек, в России – 12,5. На долю мочевого пузыря по данным разных авторов приходится от 2,7% до 4% всех опухолей. По темпам абсолютного прироста среди онкоурологических заболеваний РМП выходит на 4-е место, уступая лишь раку предстательной железы, почки и яичка [1]. Сегодня в России под динамическим наблюдением находятся около 60 тысяч больных РМП, и только у 45% болезнь диагностируется на ранних стадиях развития [2]. Все эти обстоятельства создают предпосылки для поиска новых методов диагностики ранних форм рака и маркеров прогноза заболевания. В настоящее время хорошо известны и широко применяются такие морфологические критерии, как глубина инвазии, степень дифференцировки клеток, митотическая активность и т.д. [3]. Последнее время большое количество работ посвящено исследованию новых иммуногистохимических маркеров, позволяющих диагностировать ранние признаки инвазии и рецидива рака мочевого пузыря. Однако опубликованные све-

дения отличаются противоречивостью выводов и не позволяют однозначно рекомендовать какой-либо маркер в качестве универсального диагностического и прогностического критерия.

Целью исследования явилось определение диагностической значимости иммуногистохимических маркеров для ранней диагностики рака мочевого пузыря.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужил операционный и биопсийный материал 106 пациентов с заболеваниями мочевого пузыря, проходивших лечение в НИИ «Фундаментальной и клинической уронефрологии» ГОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И.Разумовского Росздрава. Операционный и биопсийный материал фиксировался в 10% растворе нейтрального формалина и заливался в парафин. Срезы толщиной 5-7 мкм, окрашенные гематоксилин-эозином, подвергались обзорному морфологическому анализу, при котором стадию рака определяли в соответствии с классификацией TNM, а степень дифференцировки опухолевых клеток оценивали в соответствии с рекомендациями ВОЗ (2002).

Иммуногистохимические реакции ставили на серийных парафиновых срезах (5мкм), используя стрептавидин-биотиновый метод. В качестве детек-

Ответственный автор: **Маслякова Галина Никифоровна**
410012, г. Саратов, ул. Большая Казачья, 112,
ГОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Росздрава,
кафедра патологической анатомии,
тел. (8452) 669751.
E-mail gmaslyakova@yandex.ru

ционной системы применяли систему LSAB2 System, HRP, K0675, Dako, в качестве хромогена – диаминобензидин (Dako).

Для иммуногистохимического исследования были использованы 13 коммерческих моноклональных антител, разделенных на группы по функциональной значимости:

- маркеры пролиферативной активности –Ki67, PCNA, p63;
- супрессор опухолевого роста – p53;
- маркер апоптоза Bcl2, Bax;
- рецептор эпидермального фактора роста – EGFR;
- цитокератиновый профиль – ЦК7, ЦК8, ЦК10/13, ЦК17, ЦК18, ЦК19.

Интенсивность реакций, локализованных в цитоплазме (цитокератины 7,8,13, 17,18,19), Bax 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, bcl2) оценивали, подсчитывая количество окрашенных ядер на 100 ядер в 3 полях зрения и выражая полученные результаты в процентах. Маркеры пролиферативной активности расценивались следующим образом:

1) 0% - 20% – низкая пролиферативная активность;

2) 21% - 50% – умеренная пролиферативная активность;

3) 51% - 100% – высокая пролиферативная активность.

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

С помощью обзорных методов окрашивания диагноз уротелиального рака был поставлен 94 пациентам. Остальные 12 пациентов составили группу контроля. Иммуногистохимическое исследование 13 маркеров было проведено на биопсийном материале 66 пациентов, в связи с ограниченным количеством материала. Распределение больных по группам в данном случае проводилось с учетом гистологической картины заболевания (табл. 1).

Результаты исследования. При анализе показателей экспрессии иммуногистохимических маркеров, имеющих ядерную локализацию, в различных группах больных с раком мочевого пузыря были получены следующие результаты (табл. 2).

Антиген пролиферирующего клеточного ядра (PCNA) является мультифункциональным белком, который экспрессируется в делящихся клетках в конце G1-фазы и в первой трети S-фазы. В тканях с низкой пролиферативной активностью по данным литературы экспрессия антитела минимальна, однако результаты нашего исследования показали, что маркер пролиферирующего клеточного ядра (PCNA) дает положительную реакцию во всех исследуемых группах, в том числе и в группе сравнения, что де-

Таблица 1

Распределение больных по степени инвазии рака, полу и возрасту

Группы	Кол-во больных	Мужчины	Женщины	Средний возраст
Ta-неинвазивный	15	12	3	59
T1-с прорастанием в собственную пластинку слизистой	9	7	2	65
T2 – с прорастанием в мышечный слой	23	22	1	62
T3 – с прорастанием в паравезикальную клетчатку	8	7	1	65
T4 – с прорастанием в другие органы	11	10	1	61
T0 - группа сравнения	14	11	3	56

Таблица 2

Показатели ИГХ-реакций с антигенами, имеющими ядерную локализацию

Показатель	T0	Ta	T1	T2	T3	T4
PCNA(%)	20±7,6	30,33±10,2	55,83±13,5	73,86±6,1	35,25±14,7	46,25±16,5
PCNA int	1,75±0,25	1,5±0,27	2,6±0,25	2,43±0,2	1,75±0,25	1,67±0,33
Ki67(%)	0	2,33±1,7	28±9,9	24,44±8,2	40,75±12,7	49±8,4
Ki67 int	0	1	1,8±0,2	2,2±0,2	2,25±0,25	2,2±0,37
P53(%)	0	5,45±5,45	23,6±14	11,5±9,4	35±20,6	27±18,7
P53 int	0	1	2±0,6	1,67±0,7	2,5±0,5	2,5±0,5
P63(%)	0	37±8,67	13,3±7,7	31,43±13,7	0	7,5±7,5
P63 int	0	1,9±0,2	1,7±0,3	1,5±0,3	0	1

(%) - % экспрессирующих клеток, int – интенсивность экспрессии

дает его применение для ранней диагностики рака мочевого пузыря невозможной.

Было отмечено, что процент экспрессирующих клеток возрастал по мере увеличения глубины инвазии опухоли непосредственно в стенку мочевого пузыря (T 1, T 2). Как только опухоль начинала прорастать в паравезикальную клетчатку, процент экспрессирующих клеток уменьшался, что, возможно, связано с уменьшением дифференцировки клеток.

Ki67–антиген экспрессируется во всех фазах митотического цикла (G1, S, G2 В М-фазах), но отсутствует в фазе покоя (G0), что позволяет использовать Ki67 в качестве оптимального маркера пролиферации.

Как показали наши исследования, маркер Ki67 не дает экспрессии в группе сравнения, а также отмечается корреляционная зависимость высокой степени значимости между стадией рака мочевого пузыря, процентом экспрессирующих клеток и интенсивностью иммуногистохимической реакции. Практически в два раза повышается количество экспрессирующих клеток при стадиях заболевания T3 и T4, т.е. когда опухоль начинает прорастать за пределы стенки мочевого пузыря.

p53 является ядерным белком, который регулирует клеточный цикл и апоптоз, а также контролирует целостность генома. Экспрессия гена p53 выявляется во многих злокачественных новообразованиях, в том числе в переходноклеточных карциномах.

Установлено, что интенсивность экспрессии p53 возрастает в группах с увеличением глубины инвазии. Что касается количества экспрессирующих клеток, то более чем в четыре раза увеличивается процент экспрессирующих клеток в группе инвазивного рака, что является весьма обнадеживающим критерием при определении прогноза заболевания.

Несколько другая картина наблюдалась при использовании маркера p63. Преимущественным местом экспрессии белка p63 являются ядра пролиферирующего базального слоя клеток многослойного плоского и переходного эпителия. Исследования показали, что белок p63 не дает экспрессии в группе

сравнения, однако достоверных различий частоты и интенсивности экспрессии в группах больных с различной стадией заболевания не выявлено.

При иммуногистохимическом исследовании с антигенами, имеющими локализацию в цитоплазме, были получены следующие результаты (табл. 3).

Экспрессия цитокератинов во всех исследованных группах больных была положительной. Достоверно значимых различий между группами больных по показателям иммуногистохимических реакций с антигенами, имеющими локализацию в цитоплазме, не выявлено. Ни один из этих маркеров не продемонстрировал значимой корреляционной зависимости с клинической стадией заболевания.

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) представляет собой трансмембранный гликопротеин, при активации которого под действием внутриклеточных тирозиновых киназ происходит деление клетки. Эти рецепторы в норме располагаются вдоль базальной мембраны уротелия, но при переходноклеточном раке определяются во всех его слоях. Проведенное исследование показало, что как в группе сравнения, так и группе со стадией Ta во всех случаях был получен отрицательный результат (рис. 1).

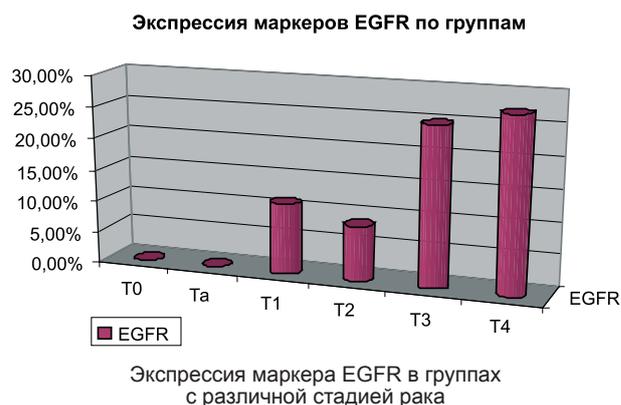


Таблица 3

Показатели ИГХ-реакций с антигенами, имеющими цитоплазменную локализацию

Маркер	T0	Ta	T1	T2	T3	T4
CK7(%)	79±4,6	83,5±4,6	88,6±2,8	90,9±3,1	91±3,3	86,3±2,4
CK7 int	2,2±0,4	2,3±0,2	2,9±0,14	2,83±0,17	3±0,2	3±0,21
CK8(%)	34±9,6	49±7,8	64,3±12,9	50±10,2	48,3±10,5	40±10,8
CK8 int	1±0,1	1,44±0,18	1,83±0,17±	1,5±0,19	1,33±0,2	1±0,1
CK13(%)	39,1±11,4	57,5±5,9	40,7±13,2	34,2±11,1	27,5±13	50±13,8
CK13 int	1,5±0,2	1,25±0,16	1,8±0,37	2,33±0,33	1,25±0,25	1,5±0,29
CK17(%)	25±11,7	44±11,3	30,6±12,1	34,6±11,7	43,5±18,7	20±16,8
CK17 int	1,25±0,25	2±0,22	1,8±0,49	1,38±0,18	2,2±0,37	1,2±0,42
CK18(%)	20±18,7	67,5±8,5	48,8±10,6	59,6±7,3	46±18	60±14,7
CK18 int	1,5±0,5	1,9±0,2	1,88±0,3	2,2±0,23	2,25±0,48	2,25±0,48
CK19(%)	52±11,6	62±6,5	66,9±6,9	64,6±6,8	34±17,2	35±14,4
CK19 int	1,2±0,2	1,7±0,2	1,88±0,35	2±0,27	1,67±0,33	1,33±0,33

(%) - % экспрессирующих клеток, int – интенсивность экспрессии

Данный маркер нецелесообразно использовать в качестве дифференциально диагностического признака между доброкачественными и злокачественными новообразованиями, однако для определения глубины инвазии и, следовательно, в качестве прогностического фактора использование данного маркера вполне допустимо. На возможность использовать рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) в качестве прогностического фактора указывают и другие авторы [4,5].

BCL-2 онкопротеин является блокатором апоптоза, находится на цитоплазматической стороне митохондриальной наружной мембраны, эндоплазматическом ретикулуме, на ядерной мембране. BCL-2 давал положительную экспрессию только в лимфоцитах, причем во всех случаях, где была выражена лимфоидная инфильтрация. Зависимости от локализации лимфоидных инфильтратов как в группах со злокачественными новообразованиями, так и при доброкачественных процессах установлено не было.

Маркер активации апоптоза Вах в нашем материале давал выраженную экспрессию в доброкачественных опухолях, и интенсивность экспрессии уменьшалась по мере увеличения степени анаплазии клеток опухоли.

Обсуждение. Таким образом, исследования, проведенные на базе морфологического отдела НИИ «Фундаментальной и клинической уронефрологии», показали, что не во всех случаях рекомендации других авторов по использованию маркеров для ранней диагностики и прогноза рака мочевого пузыря являются универсальными. Так, результаты исследования маркера Ki67 показали, что его экспрессия имеет корреляционную зависимость высокой степени значимости между стадией рака мочевого пузыря и процентом клеток с положительной реакцией. Это отличается от результатов, полученных другими авторами [2], которые выявили практически одинаковый уровень экспрессии в группах больных как поверхностным, так и инвазивным раком мочевого пузыря.

Установленный нами факт о более выраженной экспрессии мутантного гена p53 в инвазивных опухолях согласуется с данными других авторов [6].

В отличие от данных литературы, в которой рекомендуется использовать цитокератины для дифференциальной диагностики новообразований мочевого пузыря [7, 8], наши исследования показали, что использование данных маркеров не является информативным для диагностики и установления клинической стадии заболевания.

По мнению некоторых авторов [2, 9, 10] экспрессия bcl-2 чаще встречается в инвазивных, низкодифференцированных опухолях. В проведенном исследовании мы не выявили значимых проявлений экспрессии, которые можно было бы использовать для диагностики переходноклеточного рака.

Выводы. Таким образом, преследуя различные цели морфологического исследования: либо для ранней диагностики, либо для прогноза забо-

левания, набор иммуногистохимических маркеров должен быть избирательным. Для ранней дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных новообразований целесообразно использование Ki 67, p63, p53, которые показали высокую степень корреляции с клинической стадией заболевания.

Для установления прогноза заболевания, который обусловлен глубиной инвазии и степенью дифференцировки клеток, рационально использование маркеров p53 и рецептора эпидермального фактора роста – EGFR.

Нерационально использование цитокератинового профиля ни для ранней диагностики, ни для прогноза заболевания, так как специфичности реагирования данных маркеров ни с нормальными клетками, ни с опухолевыми не установлено.

Не может для данных целей использоваться и маркер апоптоза bcl-2, так как исследования показали, что в клетках уротелия он дает крайне низкую экспрессию.

Библиографический список

1. Давыдов, М.И. Злокачественные образования в России и странах СНГ в 2001 г. / М.И. Давыдов, Е.М. Аксель. – М., 2003.
2. Магер, В.О. Прогностическое значение биологических маркеров у больных поверхностным и инвазивным раком мочевого пузыря / В.О. Магер, Н.В. Казанцева // Онкоурология. – 2006. – № 4. – С. 30-34.
3. Аль-Шукри, С.Х. Общие принципы лечения больных раком мочевого пузыря. Значение клинических, гистологических и биологических факторов прогноза для выбора лечения / С.Х. Аль-Шукри, И.А. Корнеев // Практическая онкология. 2004. – Т. 4. – № 4. – С. 204-211.
4. Messing, E.M. Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma / E.M. Messing // Cancer Res. – 1990. – Vol. 6. – P. 2530-2537.
5. Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumors / D. Neal, C. Marsch, M. Bennett et al // Lancet. – 1985. – Vol. 1. – P. 366-368.
6. Матвеев, Б.П. Рак мочевого пузыря / Б.П. Матвеев, К.М. Фигурин, О.Б. Карякин. – М., 2001.
7. Петров, С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / С.В. Петров, Н.Т. Райхлин. – Казань, 2004. – 456 с.
8. Опухолевые маркеры при скрининге и мониторинге больных раком мочевого пузыря / С.П. Даренко, Д.В. Перлин, В.Н. Паршина, И.В. Черняев // Онкоурология. – 2005. – № 3. – С. 51-54.
9. Prognostic factor in transitional cell cancer of the bladder: an emerging role for bcl-2 and p53 / F. Ong, I.V. Moonen, M.P. Gallee et al. // Radioter Oncol. – 2001. – 61(2). – P. 169-175.
10. The role of bcl-2, p53 and Ki-67 index in predicting tumor recurrences for low grade superficial transitional cell bladder carcinoma / T.T. Wu, Y.H. Chen, Y.Y. Lee Y.R. Huang // Y. Urol. – 200. – 163(3). – P. 758-760.