

# ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ P53 И BCL-2 У БОЛЬНЫХ ГЕРМИНОГЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ ЯИЧКА В ДИНАМИКЕ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

*А.В. Сакало<sup>1</sup>, С.В. Базалицкая<sup>1</sup>, Ю.М. Бондаренко<sup>1</sup>, В.В. Мрачковский<sup>2</sup>,  
Л.М. Захарцева<sup>2</sup>, В.С. Недельчев<sup>1</sup>, С.В. Черемуха<sup>1</sup>*

*Государственное учреждение «Институт урологии НАМН Украины»<sup>1</sup>  
Киевский городской клинический онкологический центр<sup>2</sup>*

К основным свойствам всех злокачественных опухолей относят повышенную способность к пролиферации, утрату способности к полной дифференцировке и апоптической гибели, инвазивный рост и метастазирование. При росте злокачественной опухоли в трансформированных клетках возникает устойчивость к индукции апоптоза. В результате снижается способность к активации программы апоптоза, что может стать причиной лекарственной устойчивости. Как известно, одну из ведущих ролей в реализации апоптоза играет генно-супрессор p53 и кодируемый им ядерный белок p53. P53 супрессирует развитие опухоли через механизм стимуляции апоптоза.

Bcl-2 является одним из основных компонентов защиты клетки против факторов, индуцирующих апоптоз. Повышение экспрессии проонкогена bcl-2 может блокировать p53 – индуцированный апоптоз.

Герминогенные опухоли яичка (ГОЯ) делятся на две основные группы: семиномы и несеминомы, такие как эмбриональный рак (ЭР), зрелая и незрелая тератомы, хориокарцинома и опухоль желточного мешка (ОЖМ). Существуют различные системы стадирования ГОЯ. Большинство из них основано на локализации опухоли только в яичке (I ст.), вовлечении регионарных лимфоузлов (II ст.) и наличии отдаленных метастазов (III ст.).

**Целью исследования** было изучение экспрессии p53 и bcl-2 у больных ГОЯ в зависимости от стадии заболевания и эффективности химиотерапии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Лечение во всех случаях начинали с высокой орхифуникулэктомии. В первичной опухоли исследовали наличие опухолевой инвазии в сосуды, некрозов. Проведено сопоставление всех параметров с патологической стадией, размером опухоли и процентом эмбрионального рака в несеминозной опухоли яичка. 28 пациентов с наличием забрюшинных и/или легочных метастазов получали химиотерапевтическое лечение (ХТ) по схеме РЕВ (или РЕ для семинозных опухолей) на базе КГКОЦ (ежедневное введение эпопозида в дозе 100 мг/м<sup>2</sup> 5 дней, цисплатина – 20 мг/м<sup>2</sup> 5 дней, блеомицина 30 мг болюсно в/в в 1, 8, 15-й дни цикла, интервал между курсами – 3 недели). Количество курсов колебалось от 3 до 6, в зависимости от распространенности процесса. Результаты лечения оценивали через 4 недели после последнего курса ХТ по данным УЗИ и/или КТ и определения уровня опухолевых маркеров (ОМ): полная ремиссия (ПР), частичная ремиссия (ЧР) – для пациентов с резидуальной опухолью < 3,0 см при семинозных и до 1,0 см при несеминозных опухолях при нормальном уровне ОМ. При отсутствии динамики уменьшения в размерах забрюшинных метастазов более 50% от исходного объема или увеличения их размеров – результат оценивали как прогрессирование. Пациентам с частичной ремиссией и наличием резидуальной опухоли в забрюшинном пространстве проводили забрюшинную лимфаденэктомию (ЗЛАЭ). В случае обнаружения фиб-

роза, некроза или зрелой тератомы проводили тактику только наблюдения.

Для исследования отобраны стекла гистопрепаратов 40 больных после односторонней орхиектомии по поводу ГОЯ из архивов ГУ «Институт урологии НАМН Украины» и Киевского городского клинического онкологического центра за период с 2006 по 2010гг.

После пересмотра стекол гистопрепаратов, окрашенных гематоксилин-эозином, отобраны наиболее показательные области опухоли для иммуногистохимического исследования на p53 и

bcl-2. Клиническую стадию определяли на основании УЗИ, КТ грудной, брюшной полости и органов малого таза, определения уровня опухолевых маркеров (альфафетопротеина (АФП) и хорионического гонадотропина (ХГТ)). Определяли наличие или отсутствие сосудистой инвазии и некрозов, размер опухоли, гистологический тип опухоли, процентное содержание каждой опухоли в смешанных новообразованиях. Распределение больных по стадиям представлено в таблице.

Распределение больных по стадиям

Стадия	Семинома		Несеминома	
	n	%	n	%
I	10	66,6	8	45
II	6	25,0	11	42,5
III	2	8,4	3	12,5
Итого	18	100	22	100

В иммуногистохимической оценке экспрессии p53 и bcl-2 использованы моноклональные антитела (в разведении 1:50 и 1:30; ДАКО соответственно).

В оценке маркера высчитывали процент положительно окрашенных клеток в общем числе окрашенных клеток (под увеличением  $\times 40$ ), степень иммунопозитивности оценивали полуквантитативно. Окрашенные ядра считали позитивными для p53. Оценку в баллах проводили следующим образом: 0 – отрицательная, 1-5% – слабо положительная (1), 6-25% – умеренно положительная (2), 26-50% – сильно положительная (3), 76-100% – интенсивное окрашивание.

Статистическая обработка проведена с использованием моно- и мультивариантного регрессионного анализа. Значимость различий между группами определяли с использованием критерия Крускала-Уоллиса.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Возраст больных был от 18 до 46 лет (средний  $28,5 \pm 0,8$  лет). Семиному правого яичка наблюдали у 10, левого – у 8 больных. У 12 пациентов опухоль несеминозного строения была справа, у 10 – слева. Средний диаметр опухоли семинозного строения составил  $6,2 \pm 0,9$ см, несеминозного –  $4,6 \pm 1,8$ см. Анализируя всю груп-

пу из 40 пациентов, установлено: позитивная p53-иммунореактивность (оценка 1-5) выявлена у 35 (87,5%), не выявлена иммунореактивность (оценка 0) в 5 образцах (2 – опухоли семинозного строения и 3 – тератомы разной степени зрелости).

P53 по степени интенсивности у больных семиномой была следующей: отрицательная – у 2, слабо положительная – у 4, умеренно положительная – у 7 и сильно положительная – у 5 больных. Общее количество иммунопозитивных реакций у 16 из 18 больных (86%).

Анализ p53 эксцессии при сеиноме в зависимости от стадии показал, что у всех больных I клинической стадии (100%) выявлено p53 окрашивание. Из 6 пациентов II стадии у 5 (82,5%) была положительная реакция на p53. У 1 из 2 в стадии III сеиномы выявлена положительная экспрессия p53.

У больных несеминозными опухолями экспрессия p53 была следующей: отрицательная – у 3, умеренно и слабо положительная – у 9 и сильно положительная – у 10. Общее количество иммунопозитивных больных 19 из 22 (86,3%). При сравнении общего количества иммунопозитивных реакций существенного отличия между степенью экспрессии p53 у больных несеминозными и семинозными опухолями яичка не

виявлено ( $p > 0,01$ ). Зависимости между стадиями опухоли несеминного строения и степенью экспрессии p53 не выявлено. Анализируя уровень иммунопозитивности ответов, – среди несеминных опухолей отмечен более высокий уровень экспрессии p53 в опухолях яичка с примесью ЭР, ОЖМ и хориокарциномы. При зрелой тератоме яичка экспрессия антигенов отсутствовала. Возможно со снижением уровня дифференцировки клеток и преобладанием незрелых элементов и, соответственно, увеличением потенциала злокачественности, имеет место снижение уровня апоптоза в первичной опухоли. При сравнении стадии процесса и экспрессии p53 не установлена коррелятивная связь между патологической стадией среди опухолей несеминного строения ( $p > 0,05$ ). У 22 пациентов с регионарными и отдаленными метастазами после ХТ (схемы РЕВ или РЕ с/без ЗЛАЭ) полную клиническую ремиссию наблюдали у 12 (54%), частичную ремиссию – 6 (27%), у 4 (19%) отмечена опухолевая прогрессия. Двое больных умерли за период наблюдения.

Из 40 пациентов у 9 (22,5%) выявили  $\geq 1\%$  положительных опухолевых клеток. Из них у 3 диагностировали семиному, у 2 – ЭР, у одного – тератому и у 3 – опухоли смешанного строения. P53 и bcl-2 экспрессию не выявили ни в одном случае доброкачественной опухоли яичка (6 наблюдений – 4 эпидермоидные кисты, 2 Лейдигомы), а также в нормальной ткани яичка, расположенной вне опухоли (11 больных).

Анализ эффективности ХТ в зависимости от уровня экспрессии генов p53 и bcl-2 выявил достоверную разницу между степенью экспрессии генов и результатами ХТ. Выявлена существенная разница между группой с полной и частичной клинической ремиссией ( $2,8 \pm 1,1$ ) и группой с прогрессированием процесса ( $0,8 \pm 0,2$ ) соответственно ( $p < 0,001$ ).

Средний период наблюдения составил 36,3 (3-96) мес. Общая выживаемость по Каплан-Мейеру показала, что у больных со степенью экспрессии p53  $> 4$  средняя выживаемость составила 52 (12-94) мес. по сравнению с 24 (3-72) мес. у больных, у которых в первичной опухоли степень экспрессии p53 была  $< 4$  ( $p = 0,05$ ). У пациентов с градацией bcl-2  $\geq 1$  средняя выживаемость составила 22 (6-96) мес. против 46 (3-94) мес. у больных со шкалой bcl-2  $< 1$  ( $p = 0,18$ ).

Самым важным фактором прогноза у больных ГОЯ является стадия процесса. Наличие

лимфоцитарной инфильтрации предполагает благоприятный прогноз у больных семиномой. Митотическая активность не столь важна в отношении прогноза у больных семиномой. При несеминных опухолях яичка наличие сосудистой инвазии, распространение опухоли за пределы яичка, вовлечение регионарных лимфоузлов, клеточный состав опухоли являются важными прогностическими критериями [1,2]. Гистологическая картина опухоли должна включать состояние опухоли в яичке, экстратекулярный характер роста опухоли, наличие лимфососудистой инвазии и процентное содержание каждой опухоли в смешанных опухолях.

Повышенная экспрессия гена p53 и bcl-2 доказана при многих опухолях, в том числе, при опухолях яичка [1-3]. Lewis DJ. и соавт. (1994) выявили экспрессию p53 в 90% семиноме и у 94% несеминных опухолей [4]. В исследовании авторов гиперэкспрессия p53 была выявлена у 100% больных с семиномой в I клинической стадии и 99% в I стадии несеминоме. С прогрессированием процесса процент гиперэкспрессии p53 снижался более заметно при семиноме (50% в III клинической стадии) и 88% в III клинической стадии несеминоме [4]. Экспрессию p53 наблюдали у всех компонентов семиномных и несеминных опухолей яичка, но выраженная корреляция с клинической стадией наблюдалась только при ЭР яичка. Авторами показано, что наличие сосудистой инвазии и процентное содержание ЭР в смешанных опухолях является более важными параметрами прогноза [4].

P53 и bcl-2 экспрессия не имела прогностического значения в исследовании Heidenreich A. и соавт. (1999) в 149 случаях несеминных опухолей яичка [5]. De Risse W. и соавт. (1997) выявили p53 экспрессию в I и II стадиях опухолей, выраженной корреляции между p53 экспрессией и некрозом, а также сосудистой инвазией не обнаружено [2].

Экспрессия p53 может служить предиктором наличия скрытых метастазов в I клинической стадии семиноме [6], а также имеет прогностическое значение в выживаемости больных [7].

Следует отметить, что феномен химио-резистентности опухолей полиэтиологичен и включает в себя первичную и вторичную индуцированную химиотерапией резистентность и является одной из ключевых проблем современной онкологии. Поскольку изучение марке-

ров апоптоза p53 и bcl-2 имеет непосредственное отношение к химиочувствительности опухолей, полученные результаты могут быть использованы при оптимизации лечебных схем и оценке прогноза у больных ГОЯ.

### ВЫВОДЫ

1. Уровень экспрессии p53 и bcl-2 в первичной опухоли яичка наряду с другими факторами (фенотип опухоли, наличие или отсутствие сосудистой инвазии, стадия процесса на момент начала лечения) может служить маркером в про-

гнозировании выживаемости и оптимизации схемы лечения.

2. У пациентов с отсутствием экспрессии p-53 и гиперэкспрессией bcl-2 при II-III стадиях существует высокий риск неудовлетворительного ответа на химиотерапию первой линии. В лечении пациентов данной группы должен быть использован более «агрессивный» подход – оправдано использование химиопрепаратов второй и третьей линии в комбинации с удалением резидуальной опухоли.

### Список литературы

1. Heidenreich A. Immunohistochemical expression of Ki-67 to predict lymph node involvement in clinical stage II nonseminomatous germ cell tumors / A.Heidenreich, N.Schonkman, LA.Sesterhern. – *J.Urol.*, 1997. – V.158. – P.620-625.
2. De Risse W. The clinical relevance of p53 expression in early stage nonseminomatous germ cell tumors / W. De Risse, A.Orazi, RS.Foster. – *J.Urol.*, 1997. – V.149. – P.311A.
3. The role of the bcl-2, p53, and Ki-67 index in predicting tumor recurrence for low grade superficial transitional cell bladder carcinoma / [TT. Wu, JH. Chen, YH. Lee et al.]. – *J.Urol.*, 2000. – V.163. – P.758-760.
4. Immunohistochemical expression of the p53 tumor suppressor gene protein in adult germ cell tumors / [DJ. Lewis, LA. Sesterhern, McCarthy et al.]. – *J.Urol.*, 1994. – V.152. – P.418-423.
5. Histopathologische und biologische prognose factoren nichtseminomatosez klimzelltumoren im kinischen stadium I / [A. Heidenreich, LA. Sesterhenn, FK. Mostofi et al.]. – *Urologe (A)*, 1999. – V.38. – P.168-178.
6. Gallegos I. Immunohistochemical expression of p53, Ki-67, CD30, CD117 and presence of clinical metastasis at diagnosis of testicular seminoma / I. Gallegos, J. Valdevenito, R. Miranda. – *AIMN Applied Immunohisto-chemistry and Molecular Morphology*, 2011. – V.19, N2. – P.147-152.
7. Pectasides D. Analysis of 7 immunohistochemical markers in male germ cell tumors demonstrates the prognostic significance of the p53 and MIB-1 / D. Pectasides, C. Papaxoinis, M. Nicolaou. – *Anticancer Res.*, 2009. – V.29. – P.737-744.

### Реферат

ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ p53 ТА bcl-2 У ХВОРИХ НА ГЕРМІНОГЕННІ ПУХЛИНИ ЯЄЧКА В ДИНАМІЦІ ПРОГРЕСУВАННЯ ЗАХВОРЮВАННЯ І ХІМІОТЕРАПЕВТИЧНОГО ЛІКУВАННЯ

А.В. Сакало, С.В. Базалицька,  
Ю.М. Бондаренко, В.В. Мрачковский,  
Л.М. Захарцева, В.С. Недельчев,  
С.В. Черемуха

Метою роботи було вивчення прогностичного значення маркерів апоптозу p53 і bcl-2 у хворих на герміногенні пухлини яєчка. У 40 хворих за допомогою імуногістохімії досліджували експресію молекулярних генів p53 і bcl-2 у первинній пухлині в залежності від стадії

### Summary

PROGNOSTIC VALUE OF p53 AND bcl-2 IN PATIENTS WITH GERM CELL TUMORS OF THE TESTIS IN THE DYNAMICS OF DISEASE PROGRESSION AND CHEMOTHERAPY

A.V. Sakalo, S.V. Bazalitskaya,  
Yu.M. Bondarenko, V.V. Mrachkovskiy,  
L.M. Zahartseva, V.S. Nedelchev,  
S.V. Cheremuha

The aim of the work was to study the predictive value of markers of apoptosis p53 and bcl-2 in patients with testicular germ cell tumors (GCT). The expression of molecular genes p53 and bcl-2 in primary tumor was investigated by immunohistochemistry in 40 patients with GCT depending on the stage, weight and phenotype of tumor as well

процесу, розмірів і фенотипу пухлини, а також результатів хіміотерапії. Підвищення експресії p53 виявлено у 35 (87,5%), bcl-2 – у 9 (22,5%) пацієнтів. Залежність між стадією процесу, розмірами пухлини і експресією досліджуваних генів не виявлена. Встановлена тісна залежність ( $p < 0,001$ ) між ступенем експресії p53 і відповіддю на хіміотерапію. Експресія онкогена p53 може бути використана для прогнозу ефективності хіміотерапії.

**Ключові слова:** герміногенні пухлини яєчка, імуногістохімія, p53, bcl-2, хіміотерапія.

as results of chemotherapy. The increased expression of p53 was found in 35 (87.5%), bcl-2 in 9 (22.5%) patients. Relationship were not detected between stage of the process, tumor size and expression of the studied genes. Close relationships ( $p < 0.001$ ) between the degree of expression of p53 can be used to predict the effectiveness of chemotherapy.

**Key words:** testicular germ cell tumors, immunohistochemistry, p53, bcl-2, chemotherapy.