

ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И МЕЖКЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ У ПАЦИЕНТОВ С ПОВЕРХНОСТНЫМ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

А.В. Люлько¹, Р.Н. Молчанов¹, И.С. Шпонька²

*ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины»
Кафедра урологии, оперативной хирургии и топографической анатомии¹
Кафедра патологической анатомии и судебной медицины²*

Рак мочевого пузыря является вторым по частоте злокачественным заболеванием органов мочевыделительной системы. Наиболее часто диагностируемым гистологическим типом рака мочевого пузыря является переходноклеточный рак [1]. В 75% случаев рак мочевого пузыря диагностируют в ранней стадии, для которой стандартными методами лечения являются трансуретральная резекция мочевого пузыря с последующей адьювантной внутрипузырной химио- или иммунной терапией. Частые рецидивы и связанная с ними прогрессия, которые наблюдаются при поверхностном раке мочевого пузыря в 60-70% и 15% соответственно, требуют пожизненного наблюдения и лечения [2].

Развитие злокачественных изменений уротелия, приводящих к возникновению рака мочевого пузыря и его рецидивов, являются многостадийным процессом. В основе постепенно наступающих изменений лежит ряд явлений, происходящих на генетическом уровне, включающих активацию онкогенов, инактивацию генов-супрессоров образования опухолей и нарушение генов, кодирующих процесс апоптоза [3].

Одним из механизмов индукции апоптоза является система рецептора смерти Fas (Apo1/CD95) и Fas лиганда (FasL). Fas-рецептор (Apo-1, CD95+) связывает Fas-лиганд – трансмембранный протеин, представляющий семейство фактора некроза опухоли (ФНО). Их взаимодействие приводит к формированию сигнального комплекса, содержащего каспазы, который запускает механизм апоптоза [4]. Повреждение Fas гена может приводить к снижению его функции апоптоза и служить одним из патогенетических звеньев развития рака мочевого пузыря [5].

Важным звеном регуляции клеточного цикла, выполняющим функцию супрессора образования злокачественных опухолей, является транскрипционный фактор p53. Возникновение мутаций гена p53 является наиболее частым генетическим повреждением, наблюдающимся в раковых опухолях человека [6].

В регуляции апоптоза участвует семейство протеинов Bcl-2, в котором различают проапоптозные и антиапоптозные белки. Нарушение их баланса, связанное с мутациями и изменениями экспрессии соответствующих генов, играет важную роль в канцерогенезе [7].

Ki-67 является ядерным протеином, связанным с пролиферацией клеток и транскрипцией рибосомальной РНК. Он обнаруживается во всех активных фазах клеточного цикла [8]. Увеличение фракции Ki-67+ опухолевых клеток связано с ухудшением прогноза течения ряда опухолей, в том числе и рака мочевого пузыря [9].

В последнее время объектом исследования являются кадгерин-катениновые комплексы, определяющие способность к межклеточной адгезии. Кадгеринины представляют собой трансмембранные протеины, регулирующие кальций зависимую межклеточную адгезию и посредством внутриклеточных протеинов – катенинов – связаны с цитоскелетом [10]. Е-кадгерин представлен во многих типах эпителиальных клеток. При большинстве человеческих раков дисфункция Е-кадгерин-катенинового комплекса связана со снижением клеточной и тканевой дифференцировки, большей инвазивностью и метастатическим потенциалом [11].

Изучение указанных маркеров, определяющих поведение опухолевых клеток, а также

исследования их взаимной связи и зависимости от клинико-патологических особенностей опухолей является актуальным с точки зрения оценки воздействия различных факторов риска на протекание опухолевого процесса.

Целью исследования явилось установление наличия связи экспрессии маркеров CD95, p53, Ki-67, Bcl-2, BAX, E-кадгерина и β -катенина с клинико-патологическими характеристиками поверхностного рака мочевого пузыря и наличием сопутствующего воспалительного процесса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследовали биопсийный материал, полученный у 44 пациентов с поверхностным переходноклеточным (Ta-T1) раком мочевого пузыря умеренного и высокого уровня дифференцировки. Пациенты разделены на 2 группы по 22 человека в соответствии с отсутствием (I группа) или наличием (II группа) сопутствующей инфекции мочевых путей. Контрольная группа представлена 8 пациентами в возрасте 58-72 лет (средний возраст 65,8 года) с доброкачественной гиперплазией предстательной железы, у которых биоптаты получены во время трансуретральной резекции предстательной железы из области шейки мочевого пузыря.

Биоптаты для исследования получали при трансуретральной (39) или открытой (5) резекции мочевого пузыря на границе опухоли и интактной ткани стенки мочевого пузыря на глубину мышечного слоя.

Для проведения морфологического исследования использовали парафиновые блоки операционного и биопсийного материала. После проведения тщательного рутинного патогистологического исследования, срезы толщиной 4-6 мкм наносили на адгезивные предметные стекла SuperFrost Plus, затем депарафинизировали согласно принятым стандартам. После депарафинизации, для восстановления антигенных свойств ткани – проводили тепловую индукцию эпитопного (антигенного) восстановления (HIER – heat induction of epitope retrieval) путем нагревания в цитратном буфере с pH=6,0 в автоклаве (8 минут при температуре +121°C).

С целью определения экспрессии маркеров, мы использовали спектр антител, который включал маркеры p53 (клон SP5), Ki-67 (клон SP6 (LabVision)), bcl-2 (клон 100/D5 (LabVision)),

Bax, CD95/Fas, β -Catenin, E-cadgerin (клон NCH-38).

Инкубацию срезов с первичными антителами проводили во влажных камерах при температуре 23-25°C в течение 30 минут. Титр антител подбирался индивидуально для каждого маркера. Следующий этап иммуногистохимического (ИГХ) исследования проводили с использованием систем визуализации UltraVision Quanto и UltraVision LP (LabVision), идентификация реакций проводилась с помощью хромогена DAB под контролем микроскопа на протяжении от 20 секунд до 3 минут.

Для дифференцирования структур тканей срезы дополнительно окрашивали гематоксилином Майера.

Количественные и качественные показатели экспрессии маркеров изучали как минимум на 10 случайно выбранных полях зрения микроскопа гистологических срезов при увеличении $\times 100, \times 400$. Оценка экспрессии каждого маркера проводилась индивидуально в соответствии с рекомендациями других исследователей.

При оценке иммуногистохимической (ИГХ) окраски использовался полуколичественный метод, в соответствии с которым выделяли 4 категории: 0 – негативная реакция (окраска < 5% клеток), 1 – слабая окраска (позитивно окрашены отдельные клетки или слабая окраска всего эпителия), 2 – умеренно выраженная окраска (большая часть позитивно окрашенных клеток) и 3 – интенсивная окраска (практически все клетки эпителия позитивно окрашены).

Проведена сравнительная оценка экспрессии в срезах ткани опухоли маркеров апоптоза CD95+, p53, BAX, bcl-2 и пролиферации – Ki-67, а также маркеров клеточной адгезии β -катенина и E-кадгерина в группах пациентов с сопутствующим воспалением и без него. Характер изменений сравнивали с показателями, полученными в контрольной группе.

Для статистической оценки использовали стандартный описательный, непараметрические – для оценки различия групп (U-критерий Манна-Уитни), корреляционный (метод ранговой корреляции Спирмена) анализы. Выраженность корреляционной зависимости оценивали по следующим критериям: $r < 0,3$ – связь слабая; $0,3 < r < 0,5$ – связь умеренная; $0,5 < r < 0,7$ – связь средней силы, $0,7 < r < 0,9$ – связь сильная, $0,9 < r < 1,0$ – связь очень сильная. Достоверность статистической значимости различий, уровней

значимости и достоверность корреляционных коэффициентов принимались при $P < 0,05$. Обработка данных осуществлялась с использованием статистического пакета Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты полуколичественного исследования маркеров апоптоза, пролиферации и клеточной адгезии представлены в таблице 1. С целью обнаружения взаимных связей экспрессии

исследуемых маркеров, а также их связи с клинико-морфологическими характеристиками мы использовали корреляционный анализ Спирмена (Табл.2). В анализ также включены показатели экспрессии маркеров циклооксигеназы 2 типа (ЦОГ-2), эпителиальной и индуцибельной NO-синтетаз (eNOS, iNOS), результаты исследования которых опубликованы нами ранее [12].

Таблица 1

Показатели степени экспрессии исследованных ИГХ маркеров у пациентов с раком мочевого пузыря ($M \pm m$)[†]

| Маркер | I группа N=22 | II группа N=22 | Контроль N=8 |
|------------|------------------|-------------------|-----------------|
| CD95 | 1,23 ±0,43* | 1,09 ±0,29* | 1,75 ±0,46 |
| p53 | 0,36 ±0,49* | 0,32 ±0,47* | 0 |
| Ki67 (%) | 27,55 ±22,26* | 36,64 ±20,71* | 7,13 ±2,3 |
| bcl-2 | 0,68 ±0,89 | 0,59 ±0,73 | 0,25 ±0,46 |
| VAX | 1,36 ±0,49* | 1,73 ±0,7 | 2,38 ±0,74 |
| E-кадгерин | 0,68 ±0,84* | 0,64 ±0,66* | 1,63 ±0,52 |
| β-катенин | 2,09 ±0,68 | 1,77 ±0,81* | 2,5 ±0,53 |

* $p < 0,05$ – достоверное отличие от показателей контрольной группы; [†]M – медиана, m – стандартное отклонение.

В контрольной группе мы выявили умеренно выраженную ИГХ окраску CD95+ эпителия (1,75 ±0,46). В биоптатах пациентов с опухолями мочевого пузыря окраска была менее интенсивной, определялись островки опухолевых клеток без окрашивания. Показатели интенсивности окраски CD95+ в I и II группах исследованных пациентов были достоверно ($P < 0,05$) менее интенсивными и составили 1,23 ±0,43 и 1,09 ±0,29 соответственно. Полной потери окрашивания ткани на предмет маркера CD95+ мы не наблюдали ни у одного пациента. В то же время мы не наблюдали достоверного различия данного показателя в исследованных группах пациентов ($P > 0,05$).

В современных публикациях описано снижение экспрессии CD95+ в клетках рака мочевого пузыря по сравнению с нормальным уротелием. В инвазивных стадиях она наблюдается в ограниченном числе клеток, либо отсутствует вообще. Связь данного показателя с градацией опухоли выявлена только в некоторых публикациях [13,14]. Таким образом, наличие снижения интенсивности ИГХ CD95+ реакции при отсутствии полного исчезновения окрашивания в исследованных нами биоптатах можно объяс-

нить тем, что большинство было представлено поверхностными опухолями, в то время как полное отсутствие экспрессии CD95+ обычно наблюдается, главным образом, при инвазивных опухолях.

При анализе полученных данных мы не выявили статистически значимой связи между экспрессией CD95+ и клинико-патологическими характеристиками опухоли. В группе пациентов с опухолями на фоне воспалительного процесса выявлена умеренная прямая корреляция CD95+ и eNOS ($R = 0,45$, $p = 0,035605$). Повышение экспрессии эндотелиальной (e)NOS при воспалительном процессе отражает ее роль в раннем воспалительном ответе мочевого пузыря [15]. В то же время, в доступной литературе не удалось найти данных о влиянии воспаления на экспрессию CD95+ в уротелии.

При изучении уровня экспрессии мутантного онкопротеина p53 мы получили негативную реакцию во всех образцах контрольной группы. Во всех исследованных опухолях мы отметили позитивное окрашивание. При исследовании экспрессии p53 в опухолевой ткани в группах I и II мы не выявили достоверного различия интенсивности позитивного окрашива-

ния, которая составила $0,36 \pm 0,49$ и $0,32 \pm 0,47$ соответственно ($P > 0,05$).

По данным литературы, уровень экспрессии p53 повышен в клетках переходноклеточного рака, по сравнению с нормальным уротелием [16]. Повышение уровня экспрессии p53 в эпителии мочевого пузыря, по сравнению с нормой, выявлено при специфическом (шистома-тозном) и неспецифическом хронических циститах [3]. Таким образом, как опухоль, так и воспалительный процесс в мочевом пузыре может способствовать повышению экспрессии p53.

В исследованных биоптатах нам не удалось выявить достоверной корреляции экспрес-

сии p53 со стадией, градацией и рецидивированием опухоли. Данные в отношении подобных корреляций имеют противоречивый характер. Так, установлено наличие корреляции между p53 и величиной экспериментальной опухоли у крыс [17], градацией и уровнем мышечной инвазии [18], частотой рецидивов опухоли мочевого пузыря в стадии T1 [7] и сокращением безрецидивного периода переходноклеточного рака [19]. В то же время, анализ опухолей мочевого пузыря (папиллома, pT_a-pT₂), проведенный Bollmann D. и соавт. (2009), показал, что p53 не обладал ни диагностической, ни прогностической ценностью [20].

Таблица 2

Корреляции показателей экспрессии ИГХ маркеров у пациентов с раком мочевого пузыря

| Показатели | Группа I (N=22) | | Группа II (N=22) | |
|-----------------------------|-----------------|----------|------------------|----------|
| | Spearman (R) | p | Spearman (R) | p |
| Дифференцировка & Ki67 | —* | — | 0,633913 | 0,001536 |
| Дифференцировка & β-катенин | — | — | 0,479651 | 0,023887 |
| Метаплазия & Ki67 | — | — | 0,597206 | 0,003340 |
| Метаплазия & bcl-2 | — | — | 0,546952 | 0,008433 |
| Метаплазия & β-катенин | — | — | 0,438004 | 0,041467 |
| P53 & Ki67 | 0,835001 | 0,000001 | — | — |
| P53 & β-катенин | 0,462481 | 0,030219 | — | — |
| P53 & E-кадгерин | -0,659543 | 0,000840 | — | — |
| P53 & iNOS | -0,443203 | 0,038841 | 0,570669 | 0,005545 |
| bcl-2 & COX-2 | -0,454474 | 0,033594 | — | — |
| bcl-2 & E-кадгерин | -0,549291 | 0,008102 | — | — |
| bcl-2 & BAX | 0,857110 | 0,000000 | 0,709115 | 0,000220 |
| E-кадгерин & BAX | -0,659543 | 0,000840 | — | — |
| E-кадгерин & eNOS | 0,699206 | 0,000294 | — | — |
| BAX & iNOS | 0,443203 | 0,038841 | — | — |
| COX-2 & E-кадгерин | — | — | -0,440316 | 0,040282 |
| CD-95 & eNOS | — | — | 0,450000 | 0,035605 |
| Ki67 & bcl-2 | — | — | 0,890845 | 0,000000 |
| Ki67 & β-катенин | — | — | 0,589619 | 0,003878 |
| Ki67 & BAX | — | — | 0,645866 | 0,001167 |
| bcl-2 & β-катенин | — | — | 0,726008 | 0,000131 |
| bcl-2 & eNOS | — | — | 0,527889 | 0,011566 |
| COX-2 & BAX | — | — | 0,677384 | 0,000534 |
| eNOS & β-катенин | — | — | 0,455826 | 0,033004 |

* – в таблице опущены статистически недостоверные данные.

В I группе пациентов с опухолями без сопутствующего воспалительного процесса выявлена прямая сильная связь экспрессии p53 и маркера пролиферации Ki-67, отражающего пролиферативные процессы ($R = 0,835001$, $p = 0,000001$), прямая умеренная связь с экспрессией β -катенина ($R = 0,462481$, $p = 0,030219$), обратная связь средней силы с экспрессией Е-кадгерина ($R = -0,659543$, $p = 0,000817$), обратная умеренная связь с экспрессией iNOS ($R = -0,443203$, $p = 0,038841$). Во II группе пациентов обнаружена прямая связь средней силы с экспрессией iNOS ($R = 0,570669$, $p = 0,005545$).

Выявлено повышение среднего значения bcl-2 в ткани опухоли I ($0,68 \pm 0,89$) и II ($0,59 \pm 0,73$) групп по сравнению с контрольными образцами ($0,25 \pm 0,46$), хотя различие не было статистически достоверным ($P > 0,05$).

Показатель экспрессии Вах в биоптатах I группы пациентов ($1,36 \pm 0,49$) достоверно ($P < 0,05$) отличался в сторону снижения по сравнению с контрольной группой ($2,38 \pm 0,74$). Во II группе он достоверно не отличался от группы контроля ($1,73 \pm 0,7$).

Мы не выявили достоверного отличия интенсивности иммуногистохимической реакции bcl-2 и Вах в биоптатах, содержащих опухоль с воспалением и без воспаления.

Исследования корреляции экспрессии bcl-2 показало наличие умеренной обратной связи с экспрессией ЦОГ-2 ($R = -0,454474$, $p = 0,033594$), обратной связи средней силы с экспрессией Е-кадгерина ($R = -0,549291$, $p = 0,008102$) в I группе пациентов; умеренной обратной связи с метаплазией ($R = 0,546952$, $p = 0,008433$), сильной прямой связи с экспрессией Ki-67 ($R = 0,890845$, $p < 0,000001$), сильной прямой связи с экспрессией β -катенина ($R = 0,726008$, $p = 0,000131$), прямой связи средней силы с экспрессией eNOS ($R = 0,527889$, $p = 0,011566$) во II группе пациентов.

В I группе установлено наличие обратной связи средней силы экспрессии Вах и Е-кадгерина ($R = -0,659543$, $p = 0,00084$) и прямой умеренной связи экспрессии Вах и iNOS ($R = 0,443203$, $p = 0,038841$). Во II группе прямой связи средней силы с Ki67 ($R = 0,645866$, $p = 0,001167$) и ЦОГ-2 ($R = 0,677384$, $p = 0,000534$). В обеих группах наблюдалась сильная связь экспрессии bcl-2 и Вах ($R = 0,857110$ и $0,709115$, $p < 0,000001$ и $p = 0,00022$).

Согласно данным литературы, при цистите наблюдается повышение экспрессии bcl-2, при

этом достоверного различия не наблюдается при специфическом (шистосоматозном) и неспецифическом цистите. В то же время, в опухоли, возникшей на фоне шистосомоза, наблюдается более выраженная экспрессия этого маркера [3]. Повышенная экспрессия bcl-2 коррелирует с повышением градации опухоли [21].

Известно, что Вах окрашивание значительно слабее в клетках переходноклеточного рака по сравнению с нормальной тканью мочевого пузыря. Снижение экспрессии Вах играет важную роль в развитии переходноклеточного рака [22]. В исследованиях Giannopoulou и соавт. (2002) установлено, что Вах является независимым прогностическим фактором благоприятного прогноза при уротелиальных опухолях, но не связан с интенсивностью апоптоза [23].

Противоречат общей тенденции данные, полученные Karamitopoulou E. и соавт. (2009), исследовавших 179 образцов опухоли мочевого пузыря после цистэктомии. При этом установлено, что экспрессия Вах чаще наблюдается среди опухолей высокой градации и мышечно-инвазивной стадии [18].

Выраженность экспрессии Вах может служить прогностическим фактором течения заболевания. Выявлена корреляция Вах и патологической стадии рака мочевого пузыря. Отсутствие экспрессии Вах было связано с уменьшенной выживаемостью пациентов [21,24]. Вах является достоверным прогностическим фактором длительности безрецидивного периода у пациентов с уротелиальными опухолями T2-T4 [25]. В то же время, Вах не являлся прогностическим критерием длительности безрецидивного периода при поверхностном раке мочевого пузыря высокого риска pT1 G3 [7].

При ИГХ исследовании ядерного протеина Ki-67 установлено, что средний процент позитивно окрашенных клеток достоверно отличался в сторону повышения у пациентов с опухолью мочевого пузыря по сравнению с показателями в контрольной группе ($7,13 \pm 2,3\%$) ($P < 0,05$). Вследствие выраженного разброса данных не удалось установить достоверного различия экспрессии Ki-67 в опухолях при наличии сопутствующего воспалительного процесса (II группа) – $36,64 \pm 20,71\%$, и в I группе, где установлен показатель $27,55 \pm 22,26\%$ ($P > 0,05$). Установлено наличие корреляции экспрессии Ki-67 и p53 (прямая сильная связь) в I группе. Во второй группе наблюдали связь средней силы Ki-67 с

дифференцировкой опухоли ($R = 0,633913$, $p = 0,001536$), наличием метаплазии ($R = 0,597206$, $p = 0,00334$), VAX ($R = 0,645866$, $p = 0,001167$); β -катенином ($R = 0,589619$, $p = 0,003878$), прямую сильную связь с экспрессией bcl-2 ($R = 0,890845$, $p < 0,000001$).

Известно, что Ki-67 является прогностическим фактором при различных видах лечения рака мочевого пузыря. Более низкая выживаемость пациентов с раком мочевого пузыря наблюдается после проведенной комбинированной терапии у Ki-67 положительных пациентов [26,27]. Ki-67 статус является независимым прогностическим фактором продолжительности безрецидивного периода [28]. Кроме того, повышенная экспрессия Ki-67 коррелирует с опухолевой градацией, лимфоваскулярной инвазией, TNM стадией и регионарными и отдаленными метастазами [29,30]. Повышение экспрессии Ki-67 по сравнению с нормой выявлено при специфическом (шистоматозном) и неспецифическом циститах (без значимых различий в пределах группы сравнения). В то же время, не выявлено различия экспрессии Ki-67 у пациентов с раком мочевого пузыря, протекающим на фоне шистосомоза и обычного рака мочевого пузыря [3].

Исследованы молекулы адгезии E-кадгерин, β -катенин, являющиеся основными медиаторами клеточного взаимодействия в эпителиальной ткани. Установлено, что в контрольной группе наблюдалась выраженная иммуногистохимическая реакция клеточных мембран как в отношении E-кадгерина – $1,63 \pm 0,52$, так и бета-катенина – $2,5 \pm 0,53$. В биоптатах с опухолями мы выявили снижение данных показателей: E-кадгерин – $0,68 \pm 0,84$ и $0,64 \pm 0,66$; β -катенин $2,09 \pm 0,68$ и $1,77 \pm 0,81$ в I и II группах соответственно, которое достигало статистической значимости ($P < 0,05$) по сравнению с группой контроля (кроме показателя β -катенина в I группе). При сравнении показателей между исследованными группами достоверного различия не установлено ($P > 0,05$).

Анализ корреляций в I группе пациентов показал наличие обратной связи средней силы показателя интенсивности ИГХ окраски E-кадгерина с P53, bcl-2, VAX, прямой умеренной связи β -катенина с P53 (значения R и p приведены выше), прямой связи средней силы E-кадгерина с eNOS ($R = 0,699206$, $p = 0,000294$). Во II группе установлено наличие прямой связи умеренной силы экспрессии β -катенина с уров-

нем дифференцировки и метаплазией ($R = 0,479651$ и $0,438004$, $p = 0,023887$ и $0,041467$), eNOS ($R = 0,455826$, $p = 0,033004$), обратной связи умеренной силы E-кадгерина с COX-2 ($R = -0,440316$, $p = 0,040282$), прямой связи средней силы β -катенина с Ki-67 и прямой сильной связи с bcl-2 (значения R и p приведены выше).

По данным литературы, в нормальном уротелии наблюдается выраженная мембранная экспрессия E-кадгерина, подверженная индивидуальным вариациям [31]. Потеря мембранной E-кадгерин иммунореактивности коррелирует с высокой градацией, развитой стадией и плохим прогнозом рака мочевого пузыря и других опухолей [32,33]. Установлено, что снижение β -катенина является фактором риска прогрессии опухоли [34]. В другом исследовании установлено отсутствие достоверного различия экспрессии бета-катенина в нормальном уротелии и клеточных линиях опухолей мочевого пузыря [35]. Потеря межклеточной адгезии способствует инвазии опухоли. В опухолях T1 выявлена связь ненормального уровня E-кадгерина и снижения уровня бета катенина [36]. Нарушение комплексов E-кадгерин/ β -катенин в уротелии мочевого пузыря может играть важную роль в канцерогенезе рака мочевого пузыря у людей, подвергнутых длительному воздействию малых доз радиации [10]. Отмечено снижение экспрессии E-кадгерина в уротелии при наличии интерстициального цистита [37].

Для большинства исследованных маркеров не выявили статистически достоверных коррелятивных связей с клинико-морфологическими характеристиками исследованных опухолей. Данный факт, по-видимому, связан с тем, что объектом исследований являются поверхностные опухоли умеренной и высокой степени дифференцировки с основным отличием – наличием сопутствующего воспалительного процесса. Приведенные выше литературные данные свидетельствуют о том, что подобные связи обычно выявляются при исследовании опухолей высокой градации в инвазивных стадиях и характерными для них клиническими особенностями (метастизирование, выживаемость и т.д.).

ВЫВОДЫ

1. В биоптатах опухолевой ткани пациентов с поверхностным раком мочевого пузыря отмечается статистически достоверное повышение маркеров p53, Ki-67 и снижение CD95, VAX, E-кадгерина, β -катенина по сравнению с кон-

трольной группой, что свидетельствует о снижении активности апоптоза, повышении пролиферации и снижении адгезивных свойств уротелия.

2. Мы не выявили достоверных различий экспрессии исследованных маркеров при сравнении групп пациентов с поверхностным раком мочевого пузыря, протекающим на фоне воспалительного процесса и без него.

3. Наличие прямой сильной связи между экспрессией ИГХ маркеров p53 и Ki-67, bcl-2 и BAX

($P \leq 0,000001$) в биоптатах пациентов I группы и Ki-67 и bcl-2 ($P < 0,000001$), bcl-2 и BAX ($P = 0,000220$), bcl-2 и β -катенина ($P = 0,000131$) в биоптатах пациентов II группы может свидетельствовать об изменении характера взаимодействия исследованных факторов на фоне воспалительного процесса и быть причиной изменения характера протекания опухолевого процесса.

Список литературы

1. *Cancer statistics* / [Jemal A., Siegel R., Ward E. et al.]. – *CA Cancer J Clin.*, 2009. – Jul-Aug. – 59:225-49.
2. *Bever R. Role of urothelial cells in BCG immunotherapy for superficial bladder cancer* / R. Bevers, K. Kurth, D. Schamhart. – *Br J Cancer.*, 2004. – Aug. – 16: 91:607-12.
3. *Tumor markers of bladder cancer: the schistosomal bladder tumors versus non-schistosomal bladder tumors* / [Abdulmir A., Hafidh R., Kadhim H., Abubakar F.]. – *J Exp Clin Cancer Res.*, 2009. – 28:27.
4. *Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm*. *Science* / H. Wajant, 2002. – May 31. – 296:1635-6.
5. *Detection of cell apoptosis induced with anti-Fas antibody in bladder carcinoma cell line by single cell gel electrophoresis* / [Li HJ., Wang QE., Yu LZ. et al.]. – *Ai Zheng.*, 2002. – Jan: 21:45-9.
6. *Ruddon RW. Cancer biology* / RW. Ruddon. – Oxford. – New York: Oxford University Press, 2007. – 4th edn.
7. *Prognostic value of p53, p21/WAF1, Bcl-2, Bax, Bak and Ki-67 immunoreactivity in pT1 G3 urothelial bladder carcinomas* / [Wolf HK., Stober C., Hohenfellner R., Leissner J.]. – *Tumour Biol.*, 2001. – Sep-Oct. – 22:328-36.
8. *Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells* / [Bullwinkel J., Baron-Luhr B., Ludemann A. et al.]. – *J Cell Physiol.*, 2006. – Mar. – 206:624-35.
9. *Scholzen T. The Ki-67 protein: from the known and the unknown* / T. Scholzen, J. Gerdes. – *J Cell Physiol.*, 2000. – Mar: 182:311-22.
10. *Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in association with transforming growth factor-beta1 in urinary bladder lesions in humans after the Chernobyl accident* / [Romanenko A., Morimura K., Kinoshita A. et al.]. – *Cancer science*, 2006. – Jan. – 97:45-50.
11. *Reduced E-cadherin and alpha-catenin expressions have no prognostic role in bladder carcinoma* / [Koksai IT., Ates M., Danisman A. et al.]. – *Pathol Oncol Res.*, 2006. – 12:13-9.
12. *Молчанов Р.Н. Экспрессия маркеров воспаления и оксидативного стресса у пациентов с раком мочевого пузыря* / Р.Н. Молчанов, И.С. Шпонька. – *Урологія*, 2011. – 15:46-52.
13. *Decreased Fas expression in advanced-stage bladder cancer is not related to p53 status* / [Maas S., Warskulat U., Steinhoff C. et al.]. – *Urology*, 2004. – Feb. – 63:392-7.
14. *Prognostic impact of FAS/CD95/APO-1 in urothelial cancers: decreased expression of Fas is associated with disease progression* / [Yamana K., Bilim V., Hara N. et al.]. – *Br J Cancer*, 2005. – Sep. – 5: 93:544-51.
15. *Rapid up-regulation of endothelial nitric-oxide synthase in a mouse model of Escherichia coli lipopolysaccharide-induced bladder inflammation* / [Kang W., Tamarkin F., Wheeler M., Weiss R.]. – *J Pharmacol Exp Ther.*, 2004. – Aug. – 310:452-8.
16. *Yu DS. The expression of oncoproteins in transitional cell carcinoma: its correlation with pathological behavior, cell cycle and drug resistance* / DS. Yu, SY. Chang. – *Urol Int.*, 2002. – 69:46-50.
17. *DNA content analysis, expression of Ki-67 and p53 in rat urothelial lesions induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine and treated with mitomycin C and bacillus Calmette-Guerin* / [Oliveira P., Palmeira C., Colaco A.]. – *Anticancer Res.*, 2006. – Jul-Aug. – 26:2995-3004.

18. Prognostic significance of apoptotic cell death in bladder cancer: a tissue microarray study on 179 urothelial carcinomas from cystectomy specimens / [Karamitopoulou E., Rentsch C., Markwalder R.]. – *Pathology*. – Jan. – 42:37-42.
19. Bilharzial related, organ confined, muscle invasive bladder cancer: prognostic value of apoptosis markers, proliferation markers, p53, E-cadherin, epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 / [Haitel A., Posch B., El-Baz M. et al.]. – *The Journal of urology*, 2001. – May. – 165:1481-7.
20. Quantitative molecular grading of bladder tumours: a tool for objective assessment of the biological potential of urothelial neoplasias / [Bollmann D, Bollmann M., Bankfalvi A. et al.]. – *Oncology reports*, 2009. – Jan. – 21:39-47.
21. BCL-2, TP53 and BAX protein expression in superficial urothelial bladder carcinoma / [Gonzalez-Campora R., Davalos-Casanova G., Beato-Moreno A. et al.]. – *Cancer Lett.*, 2007. – Jun 8. – 250:292-9.
22. Yang B. Expression of the bcl-2 and bax oncoprotein in TCC and its clinical significances/ B. Yang, F. Gu, X. Wang. – *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.*, 1997. – Oct. – 35:602-4.
23. Immunohistochemical study of pro-apoptotic factors Bax, Fas and CPP32 in urinary bladder cancer: prognostic implications [Giannopoulou I., Nakopoulou L., Zervas A. et al.]. – *Urol Res.*, 2002. – Oct. – 30:342-5.
24. Proapoptotic genes BAX and CD40L are predictors of survival in transitional cell carcinoma of the bladder / [Hussain S., Ganesan R., Hiller L. et al.]. – *Br J Cancer*, 2003. – Feb 24. – 88:586-92.
25. c-FLIP expression in bladder urothelial carcinomas: its role in resistance to Fas-mediated apoptosis and clinicopathologic correlations / [Korkolopoulou P., Goudopoulou A., Voutsinas G. et al.]. – *Urology*, 2004. – Jun. – 63:1198-204.
26. Bax to Bcl-2 ratio and Ki-67 index are useful predictors of neoadjuvant chemoradiation therapy in bladder cancer / [Matsumoto H., Wada T., Fukunaga K. et al.]. – *Jpn J Clin Oncol.*, 2004. – Mar. – 34:124-30.
27. Role of Ki-67, mutated gene-suppressor p53 and HER-2neu oncoprotein in the prognosis for the clinical course of bladder cancer / [Masliukova E., Pozharisskii K., Karelin M. et al.]. – *Vopr Onkol.*, 2006. – 52:643-8.
28. P27(Kip1) and Ki-67 expression analysis in transitional cell carcinoma of the bladder / [Dybowski B., Kupryjanczyk J., Rembiszewska A. et al.]. – *Urol Res.*, 2003. – Dec. – 31:397-401.
29. CK20 and Ki-67 as significant prognostic factors in human bladder carcinoma / [Ye YK., Bi XC., He HC. et al.]. – *Clin Exp Med.* – Sep. – 10:153-8.
30. Ki-67 is an independent predictor of bladder cancer outcome in patients treated with radical cystectomy for organ-confined disease / [Margulis V., Shariat SF., Ashfaq R. et al.]. – *Clin Cancer Res.*, 2006. – Dec 15. – 12:7369-73.
31. Distribution of lymphocytes of the alpha(E)beta(7) phenotype and E-cadherin in normal human urothelium and bladder carcinomas / [Cresswell J., Robertson H., Neal D.]. – *Clin Exp Immunol.*, 2001. – Dec. – 126:397-402.
32. Cadherin switching dictates the biology of transitional cell carcinoma of the bladder: ex vivo and in vitro studies / [Bryan R., Atherfold P., Yeo Y. et al.]. – *J Pathol.*, 2008. – Jun. – 215:184-94.
33. The prognostic value of E-cadherin, alpha-, beta-, and gamma-catenin in urothelial cancer of the upper urinary tract / [Kashibuchi K., Tomita K., Schalken J. et al.]. – *European urology*, 2006. – May. – 49:839-45. – discussion 45.
34. Adhesion molecules alpha, beta and gamma-catenin as prognostic factors of tumour progression in upper urinary tract urothelial tumours: the role of AKT-P/GSK-3beta/beta-catenin pathway / [Izquierdo L., Truan D., Petit A.]. – *BJU Int.*, 2009. – Jul. – 104:100-6.
35. E-cadherin involved in inactivation of WNT/beta-catenin signalling in urothelial carcinoma and normal urothelial cells / [Thievensen I., Seifert H., Swiatkowski S. et al.]. – *Br J Cancer*, 2003. – Jun 16. – 88:1932-8.
36. Expression of E-cadherin and alpha-, beta-, gamma-catenins in patients with bladder cancer: identification of gamma-catenin as a new prognostic marker of neoplastic progression in T1 superficial urothelial tumors / [Clairotte A., Lascombe I., Fauconnet S. et al.]. – *Am J Clin Pathol.*, 2006. – Jan. – 125:119-26.

37. Shie JH. Higher levels of cell apoptosis and abnormal E-cadherin expression in the urothelium are associated with inflammation in patients with interstitial cystitis/painful bladder syndrome / JH. Shie, HC. Kuo. – BJU Int. – Jul. – 108:E136-41.

Реферат

ОЦІНКА ЕКСПРЕСІЇ МАРКЕРІВ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ І МІЖКЛІТИННОЇ АДГЕЗІЇ У ПАЦІЄНТІВ З ПОВЕРХНЕВИМ РАКОМ СЕЧОВОГО МІХУРА

О.В. Люлько, Р.М. Молчанов, И.С. Шпонька

Метою дослідження було встановлення наявності зв'язку експресії маркерів CD95, p53, Ki-67, Bcl-2, BAX, E-кадгерина і β-катеніна з клініко-патологічними характеристиками поверхневого раку сечового міхура і наявністю супутнього запального процесу.

Матеріали та методи досліджень. Використано імуногістохімічне дослідження вказаних маркерів у біоптатах, отриманих у 44 пацієнтів з поверхневим раком сечового міхура, які були розділені на 2 групи згідно наявності або відсутності супутньої інфекції сечових шляхів.

Результати та висновки. У біоптатах пухлинної тканини відзначається статистично достовірне підвищення маркерів p53, Ki-67 і зниження CD95, BAX, E-кадгерина, β-катеніна в порівнянні з контролем, що свідчить про зниження активності апоптозу, підвищення проліферації і зниження адгезивних властивостей уротелію.

Ми не виявили достовірних відмінностей експресії досліджених маркерів при порівнянні груп пацієнтів з поверхневим раком сечового міхура, що протікає на тлі запального процесу чи без нього.

Наявність прямого сильного зв'язку між експресією p53 і Ki-67, bcl-2 і BAX ($P \leq 0,000001$) у біоптатах пацієнтів I групи та Ki-67 і bcl-2 ($P < 0,000001$), bcl-2 і BAX ($P = 0,000220$), bcl-2 і β-катеніна ($P = 0,000131$) у біоптатах пацієнтів II групи може свідчити про зміну характеру взаємодії досліджених чинників на тлі запального процесу і бути причиною зміни характеру протікання пухлинного процесу.

Ключові слова: рак сечового міхура CD95, p53, Ki-67, Bcl-2, BAX, E-кадгерин і β-катенін.

Summary

EVALUATION OF CELL CYCLE AND INTERCELLULAR ADHESION MARKERS EXPRESSION IN BLADDER CANCER PATIENTS

O.V. Lyulko, R.N. Molchanov, I.S. Shpon'ka

Objective was to reveal the presence of relations between expression of CD95, p53, Ki-67, Bcl-2, BAX, E-cadherin and β-catenin markers and clinicopathological characteristics of superficial bladder cancer and presence of accompanying urinary tract infection.

Materials and methods. Immunohistochemical study of expression mentioned above markers in biopsies taken from 44 superficial bladder cancer patients who were divided into groups according to absence or presence of concomitant urinary tract infection.

Results and conclusions. Statistically significant increase of markers p53, Ki67 and decrease CD95, BAX, E-cadherin and β-catenin expression in tumor tissue as against the control was found. That testifies to decrease apoptotic activity and adhesive properties, increase of proliferation of urothelium.

We have not revealed statistically significant distinctions of the investigated markers expression at comparison of groups of bladder cancer patients with or without urinary tract infection.

Presence of direct strong connectivity between p53 and Ki-67, bcl-2 and BAX ($P \leq 0.000001$) expression in I group; Ki-67 and bcl-2 ($P < 0.000001$), bcl-2 and BAX ($P = 0.000220$), bcl-2 and β-catenin ($P = 0.000131$) expression in II group can testify about changing of the investigated factors' interaction and, perhaps, course of tumoral development against the background of inflammatory process.

Key words: bladder cancer, CD95, p53, Ki-67, Bcl-2, BAX, E-cadherin and β-catenin.