

# ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ И ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА У ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

*Р.Н. Молчанов<sup>1</sup>, И.С. Шпонька<sup>2</sup>*

*Государственное учреждение «Днепропетровская медицинская академия  
Министерства охраны здоровья Украины»*

*Кафедра урологии, оперативной хирургии и топографической анатомии<sup>1</sup>  
Кафедра патологической анатомии и судебной медицины<sup>2</sup>*

Одним из важных звеньев канцерогенеза считается циклооксигеназа (COX) – фермент, участвующий в синтезе простаноидов, в том числе простагландинов, простациклина. В настоящее время известно 3 изоэнзима циклооксигеназы: COX-1, COX-2, COX-3. Последний является вариантом COX-1, являющегося результатом сплайсинга кодирующего его гена [1].

COX-1 обнаруживается в большинстве клеток млекопитающих, в то время как COX-2 – отсутствует. COX-2 является индуцированным ферментом и синтезируется в активных макрофагах и других клетках в очагах воспаления. Простагландины, продуцируемые COX-2, стимулируют опухолевый рост путем стимуляции клеточной пролиферации, ангиогенеза и подавления апоптоза и иммунной защиты [2,3].

Фактом в пользу важной роли COX-2 в канцерогенезе является наличие у ингибиторов COX противоопухолевого эффекта как в эксперименте на культурах клеток и *in vivo*, так и в клинических исследованиях [4,5]. Данный эффект авторы связывают с противовоспалительным, антипролиферативным и антиоксидантным эффектом препарата [6].

В воспалительной теории канцерогенеза ведущая роль отводится оксидативному стрессу. Он является причиной повреждения ДНК кислородными радикалами, эндогенными источниками которых являются воспалительные клетки, такие как нейтрофилы, макрофаги и эозинофилы. Признаком оксидативного стресса также является изменение уровней оксида азота и его синтетаз. Оксид азота NO является свободнорадикальным газом, который синтезируется из L-аргинина при воздействии семейства изоэнзимов – NO-синтетаз (NOS), и играет важную роль в расслаблении гладкомышечной мускулатуры, в росте

опухоли и ангиогенезе. Существует 3 изоформы NOS – нейрональная, эндотелиальная и индуцированная (nNOS, eNOS and iNOS, соответственно). NO индуцирует апоптоз в высоких концентрациях путем S-нитрозирования протеинов. Обзор литературы показывает, что невозможность поддерживать высокую концентрацию NO является общим свойством многих раков. При раке мочевого пузыря, почки и простаты причиной недостатка уровня NO является снижение уровня аргинина в результате повышенной продукции аргиназы. Аргиназа конкурирует с iNOS за аргинин, катализируя его гидролиз в орнитин и мочевины [7].

Для комплексной оценки процессов, происходящих при раке мочевого пузыря, мы провели исследование экспрессии циклооксигеназы 2 типа, эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы в ткани опухоли мочевого пузыря.

**Целью исследования** явилось установление наличия связи экспрессии указанных маркеров с клинико-патологическими характеристиками 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<sup>0</sup>C).

С целью установления экспрессии маркеров мы использовали спектр антител, который включал маркеры Nitric Oxide Synthase inducible (iNOS), Nitric Oxide Synthase endothelial (eNOS), COX-2.

Инкубацию срезов с первичными антителами проводили во влажных камерах при температуре 23-25<sup>0</sup>C в течение 30 минут. Титр антител подбирали 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 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).

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

При оценке клинико-патологических критериев в I и II группах мы не выявили достоверных различий в сравниваемых группах по таким параметрам как возраст, пол, уровень дифференцировки опухоли, стадия или частота рецидива. У пациентов с сопутствующим воспалением в ряде случаев наблюдалась плоскоклеточная метаплазия.

Образцы опухоли и подлежащей ткани, полученные у пациентов II группы, идентифицировались достаточно четко по наличию инфильтрации ткани полиморфноядерными лейкоцитами.

Мы не выявили достоверных различий ( $P > 0,05$ ) иммуногистохимической реакции COX-2 в I и II группах –  $2,5 \pm 1,0$  и  $2,5 \pm 0,7$  соответственно (Табл.1). При наличии воспалительного процесса экспрессия COX-2 наблюдалась как в эпителии, так и в стромальном компоненте, в то время как при опухоли мочевого пузыря без воспалительного процесса позитивная реакция наблюдалась только в эпителии (Рис.).

Выявлено отсутствие экспрессии COX-2 с незначительными участками позитивной реакции в нормальной ткани мочевого пузыря, полученной при биопсии у пациентов контрольной группы. Аналогичные результаты получены Hammam O. et al. (2008), установившим отсутствие COX-2 в нормальной ткани мочевого пузыря.

Незначительно выраженная экспрессия СОХ-2, возможно, связана с участками локального воспаления при хроническом цистите в местах

дисплазии и плоскоклеточной метаплазии, что объясняется его синтезом в активных макрофагах и других клетках в очагах воспаления [8,9].

Таблица 1

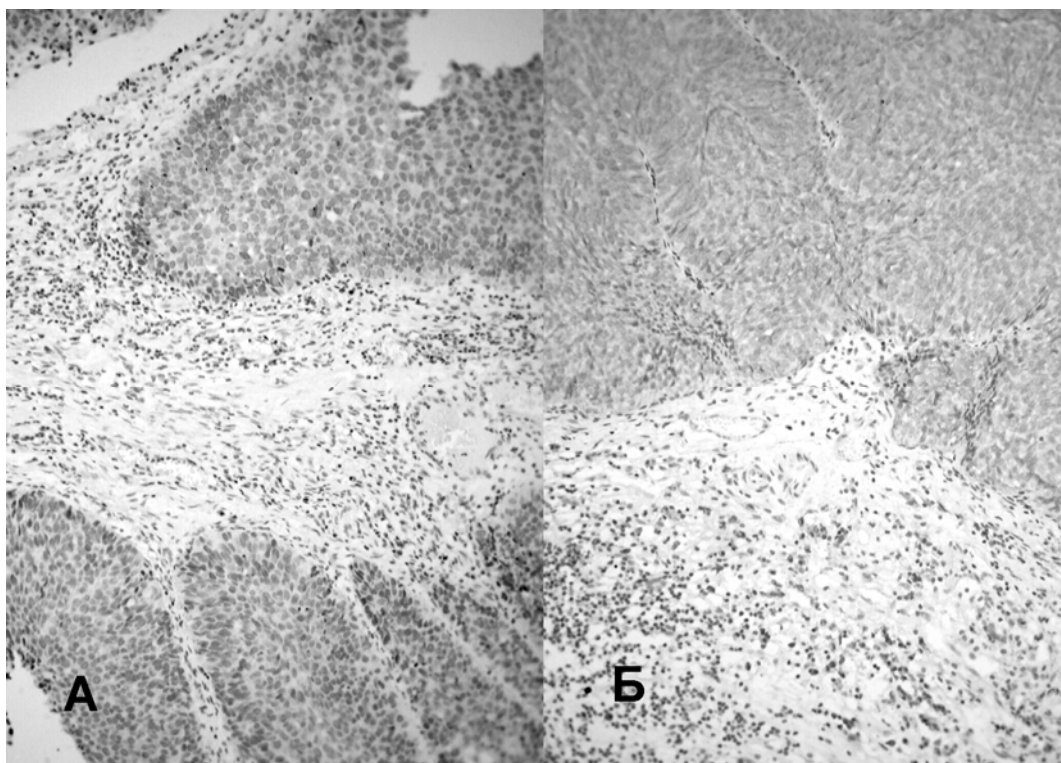
Показатели степени иммуногистохимической реакции опухоли у пациентов с раком мочевого пузыря (M±m)

Показатель	I группа (n=22)	II группа (n=22)	U-критерий Манна-Уитни	P
СОХ-2	2,5±1,0*	2,5±0,7*	235,0	0,86
iNOS	2,0±0,9 <sup>†</sup> *	2,9±0,5 <sup>†</sup> *	104,0	0,0004
eNOS	1,9±0,7	2,0±0,5	214,0	0,43

\* p<0,05 – достоверное отличие от показателей контрольной группы † p<0,05 – достоверное отличие в группах сравнения

Выявленное нами увеличение экспрессии СОХ-2 в опухолевой ткани и увеличение ее при наличии сопутствующего воспалительного процесса, как в эпителиальном секторе, так и в межучной ткани – объясняется тем, что циклооксигеназа 2 типа абберантно экспрессирована во многих опухолях, включая рак мочевого пу-

зыря и связана с улучшением роста, устойчивостью к апоптозу, инвазией и неоангиогенезом [9]. Эти же данные подтверждены другими исследованиями. Так, значительное повышение СОХ-2 отмечено во всех злокачественных гистологических типах рака мочевого пузыря [8].



Рак мочевого пузыря. СОХ-2+ клетки в строме и эпителии опухоли при отсутствии (а) и наличии (б) сопутствующего воспаления. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера (x 100)

Повышение выработки СОХ-2 при наличии воспалительного процесса, отмеченное нами, фигурирует в работах других исследователей.

Так, его экспрессия более выражена при шистосомоз-ассоциированном переходноклеточном раке мочевого пузыря, чем при обычном пере-

ходноклеточном раке [8]. Сосуществование воспалительного и опухолевого процессов является неблагоприятным фактором протекания заболевания. В ответ на повышение выработки COX-2 в мочевом пузыре повышается интенсивность воспалительного ответа и происходит индукция пролиферации клеток [10].

Мы не выявили достоверной связи экспрессии COX-2 с клинико-патоморфологическими характеристиками опухолей (градацией, рецидивами, стадией) в исследованных группах пациентов ( $P > 0,05$ ). Существующие сведения о связи экспрессии COX-2 клетками переходноклеточного рака мочевого пузыря с его характеристиками – достаточно противоречивы. По данным Aziz et al. (2008), повышенная экспрессия COX-2 в клетках переходноклеточного рака мочевого пузыря не связана со стадией опухоли, ее градацией и наличием метастазирования в лимфатические узлы [11]. В то же время, по данным Karamitropoulou et al. (2009), повышенная экспрессия COX-2 более часто наблюдается при раке мочевого пузыря высокой градации и в поздних стадиях [12]. Повышенную экспрессию COX-2 связывают с градацией, прогнозом и рецидивами переходноклеточного рака мочевого пузыря [13,14].

Исследование эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы показало, что экспрессия eNOS наблюдалась как в эпителии биоптатов контрольной группы ( $1,7 \pm 0,6$ ), так и в опухолевых клетках ( $1,9 \pm 0,7$ ). Мы не выявили достоверного различия экспрессии данного маркера при сравнении как с контрольной группой, так и в группах исследования ( $P > 0,05$ ). Полученные результаты соответствуют данным Lin et al. (2003), которые также установили наличие экспрессии eNOS как в нормальной эндотелии мочевого пузыря, так и в клетках рака мочевого пузыря [15].

Экспрессия iNOS выявлена в I и II группах, в то время как в биоптатах контрольной группы пациентов данный маркер не выявлен. Мы установили, что при наличии воспалительного процесса усиливается экспрессия iNOS: выявлен достоверно более высокий показатель во II группе по сравнению с I ( $2,0 \pm 0,9$  и  $2,9 \pm 0,5$ ) ( $P < 0,05$ ).

Известно, что индуцированная NOS экспрессируется в клетках, представляющих и окружающих опухоль мочевого пузыря. Она преимущественно локализуется в воспалительных клет-

ках, но также определяется в отдельных опухолевых клетках. Sandes et al. (2005) установили наличие экспрессии iNOS у 50% пациентов с раком мочевого пузыря, как в опухолевых образцах, так и в интактном уротелии. Предполагается, что высокий уровень NO в моче пациентов с раком мочевого пузыря может быть обусловлен активностью iNOS не только в опухолевой, но и в нормальной ткани мочевого пузыря. Гетерогенное окрашивание iNOS обнаружено в опухолевых клетках поверхностных и инвазивных опухолей, в то время как оно не было явным в нормальном уротелии мочевого пузыря [16].

Экспрессия iNOS связана с воспалительной реакцией слизистой мочевого пузыря различного генеза. Так, она значительно повышается в слизистой и подслизистой мочевого пузыря у крыс с циклофосфамидным циститом [17]. Установлена корреляция между шистосомозом и возросшим уровнем оксидативного стресса, сопровождающегося постоянным повреждением и восстановлением ДНК в раке мочевого пузыря, эти изменения коррелируют с повышенным уровнем iNOS [18].

Анализируя полученные результаты, мы не обнаружили зависимости экспрессии iNOS и eNOS от градации, статуса рецидивности, стадии опухоли ( $P > 0,05$ ). Исследование корреляций показало наличие средней силы ( $R = 0,630126$ ,  $p = 0,001671$ ) и умеренной связи ( $R = 0,478257$ ,  $p = 0,024358$ ) между показателями экспрессии COX-2 и iNOS в I и II группах соответственно (Табл.2).

Полученные коррелятивные связи отражают повышение экспрессии как COX-2, так и индуцибельной NOS при наличии опухоли мочевого пузыря, как на фоне воспалительного процесса, так и без него.

Умеренная прямая корреляция наблюдалась между экспрессией eNOS и плоскоклеточной метаплазией ( $R = 0,527350$ ,  $p = 0,011666$ ). Последняя наблюдалась в большинстве случаев во II группе пациентов с раком мочевого пузыря, протекающим на фоне воспаления. Данный факт подтверждается результатами исследований, показавших, что увеличение продукции NO при воспалении может быть связано не только с iNOS, но также с эндотелиальной (e)NOS, играющей роль в раннем воспалительном ответе мочевого пузыря [19].

Корреляции показателей экспрессии маркеров воспаления и оксидативного стресса у пациентов с раком мочевого пузыря

Показатели	Группа I (N=22)		Группа II (N=22)	
	Spearman (R)	p	Spearman (R)	p
COX-2 & iNOS	0,630126	0,001671	0,478257	0,024358
iNOS & eNOS	0,633553	0,001548	--	--
Метаплазия & eNOS	--*	--	0,527350	0,011666

\*В таблице опущены статистически недостоверные данные

Наличие прямой корреляции средней силы ( $R=0,633553$ ,  $p=0,001548$ ) между iNOS и eNOS в биоптатах, полученных у пациентов с опухолью мочевого пузыря I группы, может свидетельствовать о возможности роста уровня экспрессии обоих типов NO-синтаз на фоне опухолевого процесса, что, возможно, приводит к повышению выработки оксида азота и продуктов его окисления, нитрозированию аминов, содержащихся в моче и формированию потенциально канцерогенных нитрозаминов в мочевом пузыре.

### ВЫВОДЫ

1. У пациентов с раком мочевого пузыря отмечается повышение экспрессии COX-2 и iNOS, что создает условия, благоприятные для дальнейшего развития опухоли.
2. Экспрессия iNOS у пациентов с опухолями мочевого пузыря, достоверно возрастает на фоне воспалительного процесса, что может свидетельствовать в пользу негативного воздействия воспаления на течение опухолевого процесса.

### Список литературы

1. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression / [Chandrasekharan N., Dai H., Roos K. et al.]. – Proc Natl Acad Sci U S A, 2002 Oct 15. – 99:13926-31.
2. Cyclin-mediated G1 arrest by celecoxib differs in low-versus high-grade bladder cancer / [Gee J., Burmeister C., Havighurst T., Kim K.]. – Anticancer Res., 2009 Oct. – 29:3769-75.
3. Marks F. Tumor promotion as a target of cancer prevention / F. Marks, G. Furstenberger, K. Muller-Decker. – Recent Results Cancer Res., 2007. – 174:37-47.
4. In vitro and in vivo inhibitory effect evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitors, antisense cyclooxygenase-2 cDNA, and their combination on the growth of human bladder cancer cells / [Qin J., Yuan J., Li L. et al.]. – Biomed Pharmacother, 2009 Mar. – 63:241-8.
5. Effects of short-term celecoxib treatment in patients with invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder / [Dhawan D., Craig B., Cheng L. et al.]. – Mol Cancer Ther., 2009 May. – 9:1371-7.
6. Anti-inflammatory, anti-proliferative and antioxidant profiles of selective cyclooxygenase-2 inhibition as chemoprevention for rat bladder carcinogenesis / [Parada B., Sereno J., Reis F. et al.]. – Cancer Biol Ther., 2009 Sep. – 8:1615-22.
7. Heller A. Apoptosis-inducing high (.)NO concentrations are not sustained either in nascent or in developed cancers / A. Heller. – ChemMedChem, 2008 Oct. – 3:1493-9.
8. Possible role of cyclooxygenase-2 in schistosomal and non-schistosomal-associated bladder cancer / [Hammam O., Aziz A., Roshdy M., Abdel Hadi A.]. – Medscape J Med, 2008. – 10:60.
9. Forced COX-2 expression induces PGE(2) and invasion in immortalized urothelial cells / [Gee J., Lee I., Grossman H., Sabichi A.]. – Urol Oncol., 2008 Nov-Dec. – 26:641-5.
10. Overexpression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in the mouse urinary bladder induces the expression of immune- and cell proliferation-related genes / [Wang X., Colby J., Rengel R. et al.]. – Mol Carcinog, 2009 Jan. – 48:1-13.

11. *Improved cancer specific-survival in patients with carcinoma invading bladder muscle expressing cyclo-oxygenase-2* / [Aziz A., Lessard A., Moore K. et al.]. – *BJU Int.*, Aug. – 108:531-7.
12. *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. et al.]. – *Pathology*, Jan. – 42:37-42.
13. *Expression of cyclooxygenase-2 in bladder transitional cell carcinoma and the significance thereof* / [Yu L., Chen XJ., Shi PQ. et al.]. – *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2008 Oct 21. – 88:2683-4.
14. *Sulforaphane down-regulates COX-2 expression by activating p38 and inhibiting NF-kappaB-DNA-binding activity in human bladder T24 cells* / [Shan Y., Wu K., Wang W. et al.]. – *Int J Oncol.*, 2009 Apr. – 34:1129-34.
15. *Nitric oxide synthase expression in human bladder cancer and its relation to angiogenesis* / [Lin Z., Chen S., Ye C., Zhu S.]. – *Urol Res.*, 2003 Aug. – 31:232-5.
16. *Inhibition of bacillus Calmette-Guerin-induced nitric oxide in bladder tumor cells may improve BCG treatment* / [Alvarez V., Lodillinsky C., Umerez S. et al.]. – *Int J Mol Med*, 2005 Oct. – 16:565-71.
17. *Expression of nitric oxide synthase and aquaporin-3 in cyclophosphamide treated rat bladder* / [Cho KH., Hyun JH., Chang YS. et al.]. – *Int Neurourol J.*, Oct. – 14:149-56.
18. *Elevated oxidative stress and DNA damage and repair levels in urinary bladder carcinomas associated with schistosomiasis* / [Salim EI., Morimura K., Menesi A. et al.]. – *Int J Cancer*, 2008 Aug 1. – 123:601-8.
19. *Rapid up-regulation of endothelial nitric-oxide synthase in a mouse model of Escherichia coli lipopolysaccharide-induced bladder inflammation* / [Kang WS., Tamarkin FJ., Wheeler MA., Weiss RM.]. – *J Pharmacol Exp Ther.*, 2004 Aug. – 310:452-8.
20. *Inducible nitric oxide synthase in the bladder of spinal cord injured patients with a chronic indwelling urinary catheter* / [Wall BM., Dmochowski RR., Malecha M., et al.]. – *The Journal of urology*, 2001 May. – 165:1457-61.

## Реферат

ЕКСПРЕСІЯ МАРКЕРІВ ЗАПАЛЕННЯ І ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ У ПАЦІЄНТІВ З РАКОМ СЕЧОВОГО МІХУРА

Р.М. Молчанов, І.С. Шпонька

Припускається, що супутня сечова інфекція може мати вплив на перебіг раку сечового міхура.

Метою дослідження було встановлення наявності зв'язку експресії циклооксигенази 2 типу (COX-2) ендотеліальної й індуцибельної NO-синтази (eNOS, iNOS) з клініко-патологічними характеристиками і наявністю супутнього запального процесу.

Виконано імуногістохімічне дослідження експресії маркерів COX-2, eNOS й iNOS в біоптатах, отриманих у 44 пацієнтів з поверхневим раком сечового міхура, які були розділені на групи згідно з відсутністю чи наявністю супутньої інфекції сечових шляхів.

Ми не виявили вірогідного зв'язку експресії досліджених маркерів з градацією, стадією і кількістю рецидивів раку сечового міхура. Встановлено, що у пацієнтів з раком сечового

## Summary

EXPRESSION OF INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS MARKERS IN PATIENTS WITH BLADDER CANCER

R.N. Molchanov, I.S. Shpon'ka

It is assumed that a concomitant urinary tract infection can have an influence of bladder cancer course.

A research aim was assessment of cyclooxygenase 2 (COX-2) endothelial and inducible NO synthase (eNOS, iNOS) expression connection with clinicopathologic features and concomitant inflammatory process.

Immunohistochemical research of COX-2, eNOS and iNOS expression in biopates taken from 44 patients with superficial bladder cancer that were divided into groups according to absence or presence of concomitant urinary tract infection.

We did not reveal connection of investigational markers expression with grade, stage and relaps status of bladder cancer. The increasing of expression of COX-2 and iNOS was observed in patients with bladder cancer, while the level of eNOS expression did not differ from an intact epithelium.

міхура спостерігалось підвищення експресії COX-2 й iNOS, тоді як рівень експресії eNOS не відрізнявся від інтактного епітелію. Експресія iNOS у пацієнтів з раком сечового міхура вірогідно зростає на тлі запального процесу, що може свідчити на користь негативної дії запалення на перебіг пухлинного процесу.

**Ключові слова:** рак сечового міхура, циклооксигеназа, NO-синтаза.

The increasing of iNOS expression in bladder cancer on a background an inflammatory process can testify the negative influence of inflammation on tumor course.

**Key words:** bladder cancer, cyclooxygenase, NO synthase.