

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПОВЕРХНОСТНОГО И ИНВАЗИВНОГО РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

УДК 572.7:616.62—006

Поступила 15.04.2009 г.



Н.Н. Проданец, к.б.н., научный сотрудник отдела морфологии¹;
Л.Б. Снопова, к.б.н., доцент, зав. отделом морфологии¹;
Л.В. Бунегина, студентка²

¹ ЦНИЛ НИИ ПФМ Нижегородской государственной медицинской академии, Н. Новгород;

² ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород

Представлены современные данные по изучению экспрессии молекулярно-генетических маркеров в опухолях мочевого пузыря и по применению их в дифференциальной диагностике рака мочевого пузыря.

Показано, что наибольшую трудность представляет оценка морфологических и молекулярных признаков различия в группе неинвазивных опухолей мочевого пузыря. Иммуногистохимических и молекулярных абсолютных критериев такого различия пока не описано. Все решается в каждом конкретном случае по совокупности признаков. Более точно прогнозировать течение заболевания и своевременно проводить коррекцию лечения возможно лишь при использовании сочетания нескольких тканевых маркеров наряду с такими известными и широко применяемыми в практике прогностическими факторами, как степень опухолевой инвазии, мультифокальность роста и степень анаплазии опухоли.

Ключевые слова: молекулярно-биологические маркеры, рак мочевого пузыря.

English

Molecular and biological markers of the urinary bladder superficial and invasive cancer

N.N. Prodanets, c.b.s., scientific worker of a morphology department¹;
L.B. Snopova, c.b.s., assistant professor, head of a morphology department¹;
L.V. Bunegina, student²

¹ AFM SRI CSRL of the Nizhny Novgorod state medical academy, N. Novgorod;

² N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod state university, N. Novgorod

The modern data on the molecular and genetic marker expression study in the urinary bladder tumors and their use in a differential diagnosis of the urinary bladder cancer is presented.

It is demonstrated, that the morphological and molecular sign assessment of difference in a group of the urinary bladder noninvasive tumors is of greatest difficulty. The immunohistochemical and molecular absolute criteria of such difference are not yet described. Everything is solved in each certain case according to the aggregate of signs. It is possible to prognose a disease flow more precisely and timely correct a treatment only at a use of combination of several tissue markers with such well-known and widely used in practice prognostic factors, as a degree of tumoral invasion, multifocality of growth and a tumor anaplasia degree.

Key words: molecular and biological markers, urinary bladder cancer.

Для информации: Проданец Наталья Николаевна, тел. раб. 8(831)465-41-92, тел. моб. +7 904-903-65-32; e-mail: nnp.71@mail.ru

Рак мочевого пузыря занимает второе место по распространенности среди онкоурологических заболеваний и третье — по смертности от них. Заболеваемость им постоянно растет. За последнее десятилетие прирост больных раком мочевого пузыря в России составил 58,6% [1]. Вместе с тем своевременная диагностика и лечение опухолей мочевого пузыря остаются сложными и актуальными проблемами современной онкологии.

В литературе хорошо освещено диагностическое применение маркеров при раке мочевого пузыря [2—10]. По функции маркеры делятся на опухолевые антигены, антигены групп крови, онкогены и продукты их экспрессии, регуляторы клеточного цикла, маркеры пролиферации, молекулы клеточной адгезии, протеазы внеклеточного матрикса и базальной мембраны, пептидные факторы роста и их рецепторы, маркеры апоптоза.

Опухолевые антигены представляют интерес в первую очередь как объекты, позволяющие при помощи моноклональных антител проводить диагностику злокачественной трансформации уротелия [11]. Несмотря на то, что в настоящее время изучается возможность применения целого ряда моноклональных антител, установлено, что лишь антиген Т-138 имеет прогностическое значение. Он представляет собой гликопротеин клеточной стенки и определяется в 15% поверхностных и 60% инвазивных опухолей мочевого пузыря. У 80% больных с опухолями T_a и T₁, имеющими экспрессию Т-138, отмечается прогрессия заболевания [12], кроме того, этот признак является независимым фактором риска метастазирования рака.

Антигены групп крови ABO(H) в норме определяются на поверхности клеток переходного эпителия и могут быть утрачены в процессе опухолевой трансформации. В 80-х гг. XX в. существовало мнение, что степень их выраженности может служить прогностическим критерием. Более поздние исследования, выполненные на большом количестве больных, не подтвердили первичных обнадеживающих результатов, и в настоящее время лишь антигены Lewis могут быть применены в качестве диагностических маркеров [13].

Для уротелиальных раков дифференциально-диагностическое и прогностическое значение имеет характерная потеря антигенов групп крови ABO(H). Нормальный уротелий и раки *in situ* позитивно окрашиваются на эти антигены, в то время как почти все инвазивные опухоли негативны [14, 15].

Т-антиген (Томсена—Фриденрайха) присутствует в зрелых папилломах, но отсутствует в высокодифференцированных уротелиальных раках, что может использоваться для дифференциальной диагностики этих состояний [14].

Онкогены содержатся в геноме нормальной соматической клетки и кодируют выработку ферментов — киназ, факторов роста и их рецепторов, таким образом регулируя клеточную пролиферацию. Транслокация, амплификации или точечная мутация онкогена могут привести к развитию рака. Наиболее важными онкогенами, приводящими к злокачественной

трансформации уротелия мочевого пузыря, являются *c-H-ras*, *C-erb-B2*, *EGF/EGFR*, *c-myc* и *mdm-2*. Доказано, что повышенная экспрессия онкогена *c-H-ras* соответствует раннему рецидивированию поверхностного рака мочевого пузыря [16], а *c-myc* связан со степенью дифференцировки опухоли и не является прогностическим фактором [17]. *C-erb-B2* обнаруживают в низкодифференцированных новообразованиях у больных с низкой выживаемостью и более вероятным метастазированием [18], однако он не дает дополнительной прогностической информации при известной глубине инвазии и степени дифференцировки [19]. Амплификация гена *mdm-2* при раке мочевого пузыря встречается редко и в сочетании с мутацией гена-супрессора *p53* является независимым прогностическим фактором развития заболевания и низкой выживаемости больных [20].

Наиболее изученным геном, вовлеченным в **регуляцию клеточного цикла**, является белок *p53*, который экспрессируется во всех клетках организма и при отсутствии повреждений генетического аппарата находится в неактивном состоянии. Белок *p53* — это транскрипционный фактор и в немутированном состоянии выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей. Мутация *p53* связана со стадией и степенью дифференцировки рака мочевого пузыря и является прогностически неблагоприятным фактором, характерным для высокого риска опухолевой прогрессии [21]. Нет единства мнений в отношении прогностической ценности белка *p53* при определении глубины инвазии и степени анаплазии новообразований. J.P. Stein и соавт. [22] и D. Esrig и соавт. [23] считают, что этот белок является единственным независимым, превосходящим по значимости глубину инвазии и степень дифференцировки фактором, прогнозирующим прогрессирование. При этом Р.К. Lipponen [24] и другие исследователи [25] не смогли воспроизвести эти результаты. Повышенная экспрессия мутантного белка *p53* выявлялась в 38% случаев карциномы *in situ* и в 74% исследованных случаев инвазивного рака [26].

Пролиферативная активность клетки может быть исследована с помощью белков, регулирующих клеточный цикл. К таким белкам принадлежит Ki-67, синтез которого начинается в G₁-фазе и увеличивается в S- и G₂-фазе клеточного цикла. Г.А. Франк с соавт. выявили низкую пролиферативную активность Ki-67 (10%) при дисплазии и увеличение ее до 45% при возникновении рака *in situ* [26]. V. Margulis и соавт. [27] в своих исследованиях показали, что усиление экспрессии Ki-67 в уротелиальной карциноме добавляет независимую информацию к стандартному патоморфологическому исследованию, что способствует более точному предсказанию клинических результатов после радикальной цистэктомии. Прогностическая ценность при поверхностном раке мочевого пузыря доказана для Ki-67 и другими авторами [28—31].

Молекулы клеточной адгезии. Клетки поддерживают связь друг с другом и с внеклеточным матриксом посредством специальных структур, компонентами

которых являются иммуноглобулиноподобные молекулы клеточной адгезии (например, CD44v6), кадгерин, интегрины, селектины, а также десмосомы и полудесмосомы. Эти молекулы обеспечивают различные функции клетки, среди которых межклеточное взаимодействие, эмбриогенез, реакции воспаления, иммунный ответ, а также апоптоз. Молекулы клеточной адгезии могут способствовать инвазии опухоли и метастазированию.

Для уротелиального рака установлено, что снижение экспрессии E-кадгерина связано с глубиной инвазии и степенью дифференцировки опухолевых клеток, а также с вероятностью рецидивирования и метастазирования [32]. Несмотря на то, что этот показатель коррелирует с выживаемостью больных, при многофакторном анализе не определено независимого прогностического значения и преимуществ его перед оценкой глубины инвазии и степени дифференцировки [33].

К.А. Iszkowski с соавт. выявили усиление экспрессии трансмембранного гликопротеина CD44v6 в уротелиальных карциномах на 60%, что позволило провести дифференциальную диагностику между мелкоклеточной карциномой, имеющей нейроэндокринное происхождение, и карциномой уротелиальной природы.

Протеиназы внеклеточного матрикса и базальной мембраны. Ламинин P1 — протеолитический фрагмент ламинина, основного белка базальной мембраны. Увеличение концентрации ламинина P1 в сыворотке свидетельствует о разрушении базальной мембраны и связано с размером и количеством опухолей, но не со степенью их дифференцировки. Установлено, что у больных раком мочевого пузыря с высокими уровнями ламинина P1 чаще наблюдается рецидивирование после первичного лечения [36]. Потеря протеазы катепсина D также является прогностически неблагоприятным признаком [37].

Рецепторы факторов роста. Рецептор эпидермального фактора роста (РЭФР) — трансмембранный гликопротеин, после активации которого под действием внутриклеточных тирозиновых киназ происходит деление клетки. Эти рецепторы в норме располагаются вдоль базальной мембраны уротелия, но при раке определяются во всех его слоях. При этом установлено, что избыток РЭФР является прогностически неблагоприятным маркером при раке мочевого пузыря, так как связан со стадией, степенью дифференцировки и плоидностью опухолевых клеток [38]. При многофакторном анализе экспрессия РЭФР имеет независимое прогностическое значение в отношении выживаемости больных [39].

Пептидные факторы роста. Факторы роста обеспечивают пролиферацию клетки и ее дифференцировку, а также регуляцию ангиогенеза и апоптоза. Установлено, что основные представители семейства пептидных факторов роста: эпидермальный фактор роста, фактор роста фибробластов, трансформирующий фактор роста, фактор роста эндотелия сосудов — играют роль в развитии опухоли и ее прогрессии. Сведения о связи этих показателей с выживаемостью больных

раком мочевого пузыря противоречивы, поэтому в настоящее время они не могут быть рекомендованы в качестве прогностических маркеров.

Маркеры апоптоза. Апоптоз регулируется семействами протеинов, к которым относятся системы bcl-2 и bax. P. Gazzaniga и соавт. [40] обнаружили связь между их количеством и рецидивированием опухолей мочевого пузыря, не зависящую от глубины инвазии и степени дифференцировки опухоли. Другой системой, регулирующей апоптоз, является комплекс Fas, который представлен трансмембранными белками и относится к рецепторам фактора некроза опухоли. Активация цитотоксических Т-лимфоцитов и натуральных киллеров приводит к активации лигандов Fas на поверхности клетки. Установлено, что альтерации гена Fas могут приводить к утрате способности клетки к апоптозу и являться прогностически неблагоприятным признаком [41].

Уротелий демонстрирует уникальный цитокератиновый профиль: цитокератины 7, 8, 13 (только в базальном слое), цитокератины 18, 19, представленные во всех клеточных слоях, поверхностные зонтичные клетки отличаются специфическим окрашиванием на цитокератин 20. Эта комбинация цитокератинов редко встречается в других гистологических типах карцином и, таким образом, позволяет провести дифференциальную диагностику уротелиальной карциномы от простатической аденокарциномы и неороговевающей плоскоклеточной карциномы в случаях неизвестной первичной локализации опухоли [42].

В то же время исследование какого-либо одного маркера не обеспечивает необходимой базы для прогнозирования развития неоплазии [43]. Например, выявление мутантного белка p53 с повышенной частотой отмечается как в инвазивных опухолях [40], так и в карциномах *in situ* [44].

Многие авторы используют с прогностической целью сочетание определения экспрессии p53 и маркера клеточной пролиферации Ki-67 [45, 46], сравнение степени экспрессии Ki-67, p53, bcl-2 [27], BCL-2, HER2/neu и MIB-1 [47].

Однако наибольшую трудность представляет оценка морфологических и молекулярных признаков различия в группе неинвазивных опухолей мочевого пузыря. Иммуногистохимических и молекулярных абсолютных критериев такого различия пока не описано. Все решается в каждом конкретном случае по совокупности признаков. Так, aberrантная экспрессия цитокератина 20, появление p53, усиление пролиферации (по Ki-67) связаны с неопластическими изменениями и являются прогностическими признаками уротелиальной пролиферации, теряется антиген Томсена—Фриденрайха, исчезают ABO(H)-антигены группы крови. Иногда появляется белок гена HER1/c-erb-B1 [14, 48, 49].

Заключение. Использование тканевых маркеров наряду с хорошо известными и широко применяемыми в практике прогностическими факторами, такими как степень опухолевой инвазии, мультифокальность роста и степень анаплазии опухоли и т.д., позволяет

более точно проводить диагностику рака мочевого пузыря, прогнозировать течение заболевания и своевременно осуществлять коррекцию лечения.

Работа поддержана грантом №08-04097098 Российского фонда фундаментальных исследований, финансируемым министерством промышленности и инноваций Нижегородской области.

Литература

1. Аполихин О.И. Состояние оказания урологической помощи в России и задачи службы по реализации национального проекта «Здоровье». Пути улучшения образования уролога. М: Дипак; 2007; 32 с.
2. Dey P. Urinary markers of bladder carcinoma. Clin Chim Acta 2004; 340: 57—65.
3. Glas A.S., Roos D., Deutekom M. et al. Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. J Urol 2003; 169: 1975—1982.
4. Lorenzo Gomez M.F. El papel de los marcadores tumorales en la consulta de urologia para el screening, diagnostico y seguimiento del cancer de vejiga. Actas Urol Esp 2003; 27: 110—116.
5. Droller M.J. Current concepts of tumor markers in bladder cancer. Urol Clin North Am 2002; 29: 229—234.
6. Tiguert R., Fradet Y. New diagnostic and prognostic tools in bladder cancer. Curr Opin Urol 2002; 12: 239—243.
7. Ross J.S., Cohen M.B. Detecting recurrent bladder cancer: new methods and biomarkers. Expert Rev Mol Diagn 2001; 1: 39—52.
8. Zaher A., Sheridan T. Tumor markers in the detection of recurrent transitional cell carcinoma of the bladder: a brief review. Acta Cytol 2001; 45: 575—581.
9. Konety B.R., Getzenberg R.H. Urine based markers of urological malignancy. J Urol 2001; 165: 600—611.
10. Burchardt M., Burchardt T., Shabsigh A. et al. Current concepts in biomarker technology for bladder cancers. Clin Chem 2000; 46: 595—605.
11. Kausch I., Bohle A. Molecular aspects of bladder cancer II — molecular diagnosis of bladder cancer. Europ Urol 2001; 396: 498—506.
12. Ravery V., Colombel M., Popov Z. et al. Prognostic value of epidermal growth factor-receptor, T-138 and T43 expression in bladder cancer. Brit J Cancer 1995; 71: 196—200.
13. Gordon-Cardo C., Reuter V.E., Finstad C.L. et al. Blood group related antigens in human urothelium: enhanced expression of precursors, LeX and LeY determinants in urothelial carcinoma. Cancer Res 1988; 48: 4113—4120.
14. Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Издание 2-е. Казань; 2000.
15. Chihara Y., Sugano K., Kobayashi A. et al. Loss of group A antigen expression in cancer caused by allelic loss and/or methylation of the ABO gene. Lab Invest 2005; 85: с. 1051.
16. Fontana D., Bellina M., Scoffone C. et al. Evaluation of c-ras oncogene product (p21) in superficial bladder cancer. Europ Urol 1996; 29: 470—476.
17. Lipponen P.K. Expression of c-myc protein is related to cell proliferation and expression of growth factor receptors in transitional cell bladder cancer. J Pathol 1995; 175: 203—210.
18. Sato K., Moriyama M., Mori S. et al. An immunohistologic evaluation of c-erb-B2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma. Cancer 1992; 706: 2493—2498.
19. Mellon J.K., Lunec J., Wright C. et al. C-erb-B2 in bladder cancer: molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. J Urol 1996; 155: 321—326.
20. Lianes P., Orlow I., Zhang Z.F. et al. Altered patterns of mdm-2 and tp-53 expression in human bladder cancer. J Natl Cancer Inst 1994; 86: 1325—1330.
21. Queipo Zaragoza J.A., Ruiz Cerda J.L., Palmero Marti L. et al. Prognostic value for progression of the regulating proteins of the cellular cycle in pT1G3 bladder tumors. Actas Urol Esp 2005; 29(3): 261—268.
22. Stein J.P., Grossfeld G.D., Ginsberg D.A. et al. Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. J Urol 1998; 160: 645—659.
23. Esrig D., Elmajian D., Groshen S. et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. New Eng J Med 1994; 331: 1259—1264.
24. Lipponen P.K. Over expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional cell bladder cancer and its prognostic value. Int J Cancer 1993; 53: 365—370.
25. Liukkonen T., Lipponen P., Raitanen M. et al. Prognostic value of MIB-1 score, p53, EGFr, mitotic index and papillary status in primary superficial (stage pTa/T1) bladder cancer: a prospective comparative study. Europ Urol 1999; 36: 393—400.
26. Франк Г.А., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю. Иммуногистохимическая характеристика и степень дифференцировки рака мочевого пузыря. Арх патол 2002; 6: 16—18.
27. Margulis V., Shahrokh F. Shariat, Raheela Ashfaq, Arthur I. Sagalowsky, and Yair Lotan. Ki-67 is an independent predictor of bladder cancer outcome in patientstreated with radical cystectomy for organ-confined disease. Clin Cancer Res 2006; 12(24) December: 15.
28. Wu T.T., Chen J.H., Lee Y.H., Huang J.K. The role of bcl-2, p53, and Ki-67 index in predicting tumor recurrences for low grade superficial transitional cell bladder carcinoma. J Urol 2000; 163(3): 758—760.
29. Ong F., Moonen L.M., Gallee M.P. et al. Prognostic factor in transitional cell cancer of the bladder: an emerging role for bcl-2 and p53. Radioter Oncol 2001; 61(2): 169—175.
30. Amirghofran Z., Monabati A., Khezri A., Malek-Hosseini Z. Apoptosis in transitional cell carcinoma of bladder its relation to proliferation and expression of p53 and bcl-2. Pathol Oncol Res 2004; 10(3): 154—158.
31. Stavropoulos N.E., Filiadis I., Ioachim E. et al. Prognostic significance of p53, bcl-2 and Ki-67 in high risk superficial bladder cancer. Anticancer Res 2002; 22(6B): 3759—3764.
32. Otto T., Birchmeier W., Schmidt U. et al. Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expres-

- sion a prognostic factor in patients with bladder carcinomas. *Cancer Res* 1994; 54: 3120—3123.
33. Protheroe A.S., Banks R.F., Mziba M. et al. Urinary concentrations of the soluble adhesion molecule E-cadherin and total otein in protein in patients with bladder cancer. *Brit J Cancer* 1999; 80: 273—278.
 34. Iczkowski K.A., Shanks J.H., Allsbrook W.C. et al. Small cell carcinoma of urinary bladder is differentiated from urothelial carcinoma by chromogranin expression, absence of CD44 variant 6 expression, a unique pattern of cytokeratin expression, and more intense g-enolase expression. *Histopathology* 1999; 35: 150—156.
 35. Iczkowski K.A., Shanks J.H., Bostwick D.G. Loss of CD44 variant 6 expression differentiates small cell carcinoma of urinary bladder from urothelial (transitional cell) carcinoma. *Histopathology* 1998; 32: 322—327.
 36. Mungan U., Kirkali G., Celebi I., Kirkali Z. Significance of serum laminin P1 values in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 1996; 48: 496—500.
 37. Dickinson A.J., Fox S.B., Newcomb P.V. et al. An immunohistochemical and prognostic evaluation of cathepsin D expression in 105 bladder carcinomas. *J Urol* 1995; 154: 237—241.
 38. Messing E.M. Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res* 1990; 50: 2530—2537.
 39. Neal D.E., Marsch C., Bennett M.K. et al. Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumors. *Lancet* 1985; 1(8425): 366—368.
 40. Gazzaniga P., Gradilone A., Vercillo R. et al. Bcl-2/bax mRNA expression ratio as prognostic factor in low grade urinary bladder cancer. *Int J Cancer* 1996; 69: 100—104.
 41. Lee S.H., Lee J.Y., Park W.S. et al. Transitional cell carcinoma expresses high levels of Fas ligand in vivo. *B J U Int* 1999; 83: 698—702.
 42. Матвеев Б.П., Фигурин К.М., Карякин О.Б. Рак мочевого пузыря. М; 2001.
 43. Queipo Zaragoza J.A., Ruiz Cerda J.L., Palmero Marti L. et al. Prognostic value for progression of the regulating proteins of the cellular cycle in pT1G3 bladder tumors. *Actas Urol Esp* 2005; 29(3): 261—268.
 44. Anton H.N. Hopman, Miriam A.F. Kamps, Ernst J.M. Speel, Rene F.M. Schapers, Guido Sauter, Frans C.S. Ramaekers. Identification of chromosome 9 alterations and p53 accumulation in isolated carcinoma in situ of the urinary bladder versus carcinoma in situ associated with carcinoma. *American Journal of Pathology* 2002; c. 161.
 45. Tsuji M., Kojima K., Murakami Y., Kanayama H., Kaga S. Prognostic value of ki-67 antigen and p53 protein in urinary bladder cancer: immunohistochemical analysis of radical cystectomy specimens. *British Journal of Urology* 1997; 79: 367—372.
 46. Hui Yin, Anthony S.-Y. Leong. Histologic grading of non-invasive papillary urothelial tumors validation of the 1998 who/isup system by immunophenotyping and follow-up. *Am J Clin Pathol* 2004; 121: 679—687.
 47. Badr K.M., Nolen J.D., Derose P.B., Cohen C. Muscle invasive schistosomal squamous cell carcinoma of the urinary bladder: frequency and prognostic significance of p53, BCL-2, HER2/neu and proliferation (MIB-1). *Hum Pathol* 2004; 35(2): 184—189.
 48. Mallofre C., Castillo M., Morente V., Sole M. Immunohistochemical expression of CK20, p53, and Ki-67 as objective markers of urothelial dysplasia. *Mod Pathol* 2003; 16(3): 187—191.
 49. Broussard J.N., Tan P.H., Epstein J.I. Atypia in inverted urothelial papillomas: pathology and prognostic significance. *Hum Pathol* 2004; 35(12): 1499—1504.