

Прогнозирование пятилетней выживаемости с помощью онкомаркера пролиферативной активности Ki 67 у больных раком мочевого пузыря

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, онкомаркер

Введение

Рак мочевого пузыря (РМП) является самым частым онкологическим заболеванием мочевыделительной системы. В 2011 году в Российской Федерации диагностировано 13784 случая РМП, при этом прирост этого заболевания за последние 10 лет составил 15,26%. Летальность от РМП на первом году с момента установления диагноза составляет 19,5% [1, 2], поэтому диагностика и лечение больных раком мочевого пузыря (РМП) является одной из актуальных проблем урологии.

По клиническому течению выделяют мышечноинвазивный (Tis, Ta, T1), мышечноинвазивный (T2-T4) и метастатический РМП. Поверхностные и мышечноинвазивные опухоли мочевого пузыря в 90-95% представлены уротелиальной карциномой, но отличаются по целому ряду молекулярно-генетических, морфологических и иммуно-гистохимических признаков.

Мышечноинвазивный рак мочевого пузыря (МИРМП) - потенциально смертельное заболевание, так как без лечения больные погибают в течение 24 месяцев. У 50% больных МИРМП, оперированных радикально, развивается рецидив, что связано с морфологической стадией развития первичной опухоли и состоянием регионарных лимфатических узлов. Наиболее распространенная локализация метастазов уротелиального рака - регионарные лимфатические узлы (78%), печень (38%), легкие(36%), кости (27%), надпочечники (21%) и кишечник (13%), реже (1%- 8%) развиваются метастазы в сердце, головном мозге, почках, селезенке, поджелудочной железе, мозговых оболочках, матке, яичниках, простате и яичках[3,4,5]. Следует отметить, что в течение первого года развития заболевания группу МИРМП пополняют еще 15-30% больных с поверхностным РМП, у которых возникает рецидив опухоли с мышечной инвазией [6].

В России в 2011 году среди зарегистрированных впервые выявленных больных в 45,8% случаев диагностируются I - II, в 37,6% - III и в 16,6% -IV стадии РМП. В большинстве случаев органосохраняющее лечение удается провести только в T1-T2 стадиях заболевания. В T3-T4 стадиях выполняется цистэктомия или паллиативное лечение. Правильно выбранная тактика лечения является принципиальным моментом для дальнейшей жизни больного. Так, после удаления мочевого пузыря качество жизни больных значительно снижается, и им устанавливается 1 - 2 группы инвалидности. В то же время неоправданно длительное консервативное лечение может привести к гибели больных [7].

Сегодня изучено влияние на течение РМП более 30 прогностических факторов и установлено, что независимыми факторами, влияющими на общую выживаемость, являются только стадия опухоли и поражение метастазами регионарных лимфатических узлов (EAU-2009).

Результаты лечения РМП непосредственно связаны со стадией заболевания. Так, пятилетняя выживаемость в T1 стадии составляет 90-80%, в T2 - 70-63%, в T3 - 53-32% и в T4 - 28-5% [8]. Вместе с тем частота ошибок в предоперационном периоде при определении стадии рака мочевого пузыря достигает 73% [9]. Даже морфологическое исследование может давать ошибку в определении глубины инвазии опухоли в 20-50% [10].

Дооперационная диагностика метастазов в регионарных лимфатических узлах является неудовлетворительной. Компьютерная томография позволяет выявить только 35-40% метастатически пораженных лимфатических узлов, а тонкоигольная аспирационная биопсия лишь незначительно улучшает диагностику, так как ее чувствительность не превышает 60%, а выполняется эта процедура лишь при увеличенных лимфоузлах [11].

Поражение регионарных лимфатических узлов при инвазивном раке мочевого пузыря является крайне неблагоприятным прогностическим фактором. Показано, что после цистэктомии 50% больных умирают в течение 12 месяцев с регионарными метастазами в лимфатические узлы и 87% в течение 24 месяцев; пятилетняя выживаемость составляет менее 7%. Расширенная лимфодиссекция и системная химиотерапия достоверно улучшает выживаемость этих больных, поэтому дооперационная диагностика метастазирования в лимфоузлы может существенно повлиять на выбор тактики лечения в этой группе больных [12].

Кроме глубины инвазии опухоли и метастатического поражения лимфатических узлов, на прогноз МИРМП влияет степень злокачественности переходно-клеточной карциномы. Однако при мышечно-инвазивном РМП, как правило, не встречаются уротелиальные опухоли с низким злокачественным потенциалом или высокодифференцированные (G1) карциномы. Во всех случаях определяется уротелиальный рак высокой степени злокачественности (G2 или G3 по классификации ВОЗ, 1973). В связи с этим дальнейшая дифференциация МИРМП не несет никакой прогностической информации [13].

Ошибки в стадировании заболевания на основании клинических и рутинных гистологических исследований стимулировали интерес к иммуногистохимии, позволяющей прогнозировать характер течения болезни у каждого конкретного больного на основании изучения молекулярных маркеров. Наиболее изученными генами, вовлеченными в регуляцию клеточного цикла, являются гены-супрессоры опухоли p53 и p21. Ген p53 регулирует клеточный цикл и апоптоз, контролирует целостность генома. Активируясь в ответ на самые разные неблагоприятные воздействия, p53 осуществляет на транскрипционном уровне одновременно и активацию гена bax, и супрессию гена bcl-2, отвечающих за апоптоз. При развитии неоплазий, в том числе и переходно-клеточных карцином, часто отмечаются соматические мутации гена p53. Мутации P53 при карциномах уротелия выявляют в 29-53% случаях, однако мнения авторов о прогностической ценности этого показателя противоречивы [14].

Прролиферативная активность клетки может быть оценена при помощи различных методик. К ним относится подсчет количества митозов Ki-67-позитивных клеток, выявление антигена ядра пролиферирующей клетки (PCNA), P63. Антитела к Ki-67 применяют для оценки пролиферативной активности многих новообразований. Его прогностическая ценность доказана при поверхностном раке мочевого пузыря[15]. Исследование Ki-67 позволяет прогнозировать темп роста опухоли и реакцию опухоли

на проводимую химиотерапию. Ki-67 так же является независимым прогностическим фактором в отношении рецидивирования у больных с поверхностными формами РМП, имеющих высокий риск [6]. Сведения о влиянии Ki-67 на прогноз у больных с МИРМП противоречивые и изучены недостаточно.

Цель исследования: провести сравнительную оценку эффективности различных иммуногистохимических маркеров в определении стадии и прогнозе мышечно-инвазивного РМП.

Материалом для исследования послужил операционный материал 80 пациентов с новообразованиями мочевого пузыря, проходивших лечение в НИИ клинической и фундаментальной уронефрологии СГМУ и группе контроля (таб.1).

Операционный и биопсийный материалы были фиксированы в 10% –ном растворе нейтрального формалина и залиты в парафин. Срезы толщиной 5-7 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином, были подвергнуты обзорному морфологическому анализу, при котором стадию рака определяли в соответствии с классификацией TNM, а степень дифференцировки опухолевых клеток оценивали в соответствии с рекомендациями ВОЗ, 2004. Изучение препаратов было проведено с применением бинокулярного микроскопа «Micros MC100» при 600-кратном увеличении (объектив - 40х, бинокулярная насадка - 1,5х, окуляры - 10х). Материал был разделен по группам с учетом клинической стадии рака. Всего было исследовано 94 образца.

Исследовано 3120 срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, и на 12 различных маркеров.

Для иммуногистохимического исследования были использованы 12 коммерческих моноклональных антител, разделенных на группы по функциональной значимости:

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

Методика иммуногистохимического окрашивания

Иммуногистохимические реакции ставили на серийных парафиновых срезах (5мкм), используя стрептавидин-биотиновый метод. В качестве детекционной системы применяли систему LSAB2 System, HRP (K0675), Dako, в качестве хромогена – диаминобензидин (Dako).

Интенсивность реакций, локализованных в цитоплазме (цитокератины 7,8,13, 17,18,19) и на мембранах клеток (EGFR) оценивали полуколичественным способом по балльной шкале от 0 до 3 с помощью светового бинокулярного микроскопа «MicrosMC100», учитывая выраженность реакции и ее локализацию: 0 – отсутствие реакции, 1 – слабая реакция, 2 – умеренная реакция, 3 – сильная реакция.

Результаты реакций с антигенами, имеющими ядерную локализацию (PCNA, Ki67, p53, p63, bcl2), оценивали, подсчитывая количество окрашенных ядер на 100 ядер в 3 полях зрения, выражая полученные результаты в процентах.

Таблица 1. Характеристика исследуемых больных

Показатель	Количество больных	
	Абс.	%
Общее число РМП	80	100
Средний возраст, годы	63+-0,5	
Мужчин	68	85
Женщин	12	15
Стадия заболевания		
TONOMO – группа сравнения	14	17,5
TaNOMO	15	18,7
T1NOMO	9	11,2
T2NOMO	23	28,7
T3aNOMO	6	7,5
T3bN1M0	2	2,5
T4aNOMO	7	7,5
T4a-bN1M0	2	2,5
T4a-bN1M1	2	2,5
Гистологический диагноз		
Переходно-клеточный рак	66	82,5
Цистит	14	17,5
Гистологическая степень злокачественности у 66 больных РМП		
G- 1	24	36,3
G- 2	22	33,3
G- 3	20	30,4

Таблица 2. Сравнительная оценка эффективности иммуногистохимических маркеров при мышечно-неинвазивном и мышечноинвазивном РМП

Исследуемые группы	Иммуногистохимические маркеры			
	p53	Ki-67	p63	EGFR
Группа сравнения ToNoMo, n=14	0	0	0	0
МНРМП Та-1NoMo, n=24	3 (12,5%)	12 (50%)	7 (29%)	1 (4,1%)
МИРМП Т2-4N0-1M0-1, n=42	19 (45,2%)	32 (76,1%)	23 (54,7%)	7 (16,6%)

Таблица 3. Показатели экспрессии иммуногистохимических маркеров РМП у больных в зависимости от стадии заболевания

Маркер Стадия	Количество больных в группе	Положительный результат				
		p53	Ki-67	PCNA	p63	EGFR
TONOMO	14	0	0	9 (64,2%)	0	0
TaNOMO	15	13%	46,6%	13%	13%	0
T1NOMO	9	11%	55,5%	11%	55%	11,1%
T2NOMO	23	43%	56,5%	43%	52%	8,6%
T3N0-1M0	8	50%	100%	50%	75%	25%
T4N0-1M0-1	11	45%	100%	45%	45,4%	27,2%
Всего больных РМП	66	22	44	31	30	8

Таблица 4. Методы лечения у больных РМП с положительной экспрессией Ki 67

Значения Ki 67	Кол-во больных	Метод лечения			Выживаемость	
		Резекция МП, ТУР+Х.Т.	Цистэктомия	Паллиативное лечение	Умерли в течение 2-х лет	Живы 5 лет и более
Ki 67 ≤ 30% (ср.14,1%)	11 (40,7%)	5 (45,4%)	6 (54,6%)	-	3 (27,2%)	8 (72,8%)
Ki 67 ≥ 30% (ср.48,6%)	16 (59,3%)	6 (37,5%)	7 (43,7%)	3(18,7%)	13 (81,2%)	3 (18,8%)
Всего	27 (100%)	11 (40,7%)	13 (48,1%)	3 (11,1%)	16 (59,2%)	11 (40,8%)

Результаты реакций с антигенами, имеющими ядерную локализацию (PCNA, Ki67, p53, p63, bcl2) оценивали по системе подсчета histochemicalscore. Система подсчета включает в себя интенсивность иммуногистохимической окраски по 3-х бальной шкале и долю (%) окрашенных клеток и представляет собой сумму произведений процентов, отражающих долю клеток с различной интенсивностью окраски на балл, соответствующий интенсивности реакции. Интенсивность окраски 0 – нет окрашивания, 1 – слабое окрашивание, 2- умеренное окрашивание, 3 – сильное окрашивание.

Формула подсчета следующая: $histochemicalscore = \sum P(i) \times i$, где i - интенсивность окрашивания, выраженная в баллах от 0 до 3. $P(i)$ – процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью. Максимальное значение гистосчета должно соответствовать 300.

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

Результаты

При иммуногистохимическом исследовании 12 онкомаркеров было установлено, что для установления стадии рака мочевого пузыря и прогноза заболевания рационально использовать только 4: маркеры пролиферативной активности Ki67, p63, супрессор опухолевого роста – p53 и рецептор эпидермального фактора роста – EGFR. В таблице 2 дана сравнительная оценка эффективности иммуногистохимических маркеров для определения стадии РМП.

Из таблицы 2 видно, что все эти маркеры не дают положительной экспрессии в группе сравнения, что может использоваться при дифференциальной диагностике

РМП и других неоплазий. Кроме этого, процент экспрессирующих клеток указанных маркеров позволяет судить о степени инвазии РМП, что является важным моментом для определения стадии заболевания, следовательно, и прогноза. Именно поэтому Ki 67 весьма перспективно можно использовать для дифференциальной диагностики между Т2 и Т3-Т4, что является весьма важным, так как выход опухоли за пределы органа свидетельствует о неблагоприятном прогнозе. Он может быть использован, как прогностический, способный повлиять на выбор тактики лечения у больных МИРМП.

При анализе показателей экспрессии маркеров в каждой из стадий РМП, представленной в таблице 3, установлено, что маркер Ki 67 показал 100% -ную экспрессию у пациентов со стадией РМП Т3 и Т4, в то время как в стадии Т2 его экспрессия составила только 56,5%, что является достоверным различием.

С целью изучения прогностической значимости были изучены отдаленные результаты лечения 27 больных РМП, чью судьбу удалось проследить на протяжении 5 лет. У всех пациентов при иммуногистохимическом исследовании ткани опухоли Ki 67 дал положительную экспрессию.

Из 27 больных РМП 11 пациентам выполнено органосохраняющее, комплексное лечение, включающее в себя трансуретральную электрорезекцию стенки мочевого пузыря вместе с опухолью и системную полихимиотерапию по схеме M-VAC (метотрексат, винбластин, доксорубин, цисплатин). У 13 больных произведена цистэктомия, а 6 пациентов признаны иноперабельными; им осуществляли только симптоматическую терапию.

Из таблицы 4 видно, что из 27 больных РМП – 16(59,2%) умерло. Из них 10 (62,5%) – в первый год. Из 10 умерших в первый год 9 (90%) пациентов имели экспрессию Ki 67 ≥ 30%. У всех 9 больных стадия заболевания была Т3b-Т4N0-1M0-1.

В то же время из 11 больных РМП, которые прожили более 5 лет, в 70% экспрессия Ki 67 составила < 30%. Стадия заболевания у выживших больных, была T1N0M0- 4; T2N0M0- 6; T3N0M0-1.

Таким образом, независимо от способа лечения с достоверностью в 81,2% Ki67 может предсказать неблагоприятный исход заболевания в течение 24 месяцев.

При мышечноинвазивном РМП T2N0M0-T3-4N0-1M0-1 (22 больных) в первые 24 месяца умерли 14(62%). Экспрессия Ki 67 у этих больных колебалась от 30 до 80%.

При органосохраняющем лечении больных в стадии T1-T2 (11 пациентов) в первые два года умерло 5(45,4%) больных, у которых экспрессия Ki 67 составляла $\geq 30\%$. После цистэктомии (n=13) умерли 8(61,5%), у 7(87,5%) из них Ki 67 был >30%. Из 11, проживших 5 лет и более лет только в двух случаях Ki 67 было >30% (34 и 44), у остальных – 9 (82%) Ki67 был менее 30%.

Заключение

Проведенная сравнительная оценка эффективности различных иммуногистохимических маркеров в стадировании и прогнозе мышечно-инвазивного РМП показала, что наиболее эффективным маркером является маркер пролиферативной активности – Ki 67. Установлено, что при экспрессии

Ki 67 >30%, независимо от способа лечения, с достоверностью в 81, 2% возможны рецидив заболевания и летальный исход в течение 24 месяцев. В то же время при значениях Ki67 < 30% пятилетняя выживаемость составляет 70%.

Таким образом, маркер пролиферативной активности – Ki 67 может быть вспомогательным прогностическим фактором при выборе объема оперативного лечения (органосохраняющая операция или цистэктомия).

Литература

1. Анализ уронефрологической заболеваемости и смертности в Российской Федерации в 2010-2011 годах / О.И.Аполихин, А.В.Сивков, Н.Г. Москалева и соавт. // Экспериментальная и клиническая урология.- 2013.-№2.- С.10-17.
2. Metastases from transitional cell carcinoma of urinary bladder/ R.J. Babaian, D.E. Johnson, L. Llamas, A.G. Ayala// Urology. -1980.-16(2):142–144.
3. Biology and management of bladder cancer/ D. Raghavan, W.U. Shipley, M.B. Garnick, P.J. Russell, J.P.Richie. // N .Engl J Med. -1990.-322(16):1129–1138.
4. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients/ J.P. Stein, G. Lieskovsky, R. Cote et al.// J Clin Oncol.- 2001.-19(3):666–675.
5. Сафиуллин К.Н. Лечение неммышечно-инвазивного рака мочевого пузыря: автореф. дис... д-ра. мед. наук.- Обнинск, 2012.- 48 с.
6. Матвеев Б.П. Клиническая онкоурология. – /М.: 2011.- С.-934.
7. 8. Онкоурология: национальное руководство /под ред. акад. РАМН В.И. Чисова, проф.Б.Я.Алексеева, проф.И.Г.Русакова.- М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012.- 688 с.
8. Микич Д.Х. Органосохраняющее лечение при инвазивном раке мочевого пузыря// Онкоурология.- 2005, №2.-С.27-32.
9. Джером П. Рич Энтони В.Д. Амико Онкоурология/пер. с англ под ред. член-корр. РАМН, проф. О.Б.Лорана – М.: Изд-во БИНОМ, 2011.-896 с.
10. Limitations of computerized tomography in stagig invasive bladder cancer before radical cystectomy/ M.L.Paik, M.J.Scolieri, S.L. Brown et al. //J Urol 2000.- 163(6): 1693 – 6.
11. Лечение и прогноз больных переходноклеточным раком мочевого пузыря с метастазами в регионарные лимфоузлы / Р.В.Хабалов, В.Б.Матвеев, М.И.Волкова, Д.А.Носов //Онкоурология.-2007.-№4.- С.30-36.
12. Grading the invasive component of urothelial carcinoma of the bladder and its relationship with progressionfree survival/ R.E.Jimenez, E.Gheiler, P. S.L. Osranian et al.// Am J Surg Patohl 2000; 24(7):980-7.
13. Prognostic markers in muscle invasive bladder cancer / R,Tiguert A, Lessar A.So, Y.Fradet // Word J Urol 2002; 20: 190-5.
14. Prognostic significance of p53, bcl-2 and Ki-67 in high risk superficial bladder cancer / N.E.Stavropoulos, I. Filiadis, E. Ioachim et al. //Anticancer Res. 2002.-Vol.22(6B)- P.3759-64.