

УДК 616.62-006.6:577.23+572.7 (476)

Т. И. НАБЕБИНА, А. И. РОЛЕВИЧ, А. Ч. ДУБРОВСКИЙ, С. Л. ПОЛЯКОВ, С. А. КРАСНЫЙ

**ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ
И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ
ПРИ ПЕРЕХОДНО-КЛЕТОЧНОМ НЕИНВАЗИВНОМ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ**

*Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии
им. Н. Н. Александрова, Минск, Беларусь, e-mail: nabebina.t@yandex.by, alexander.rolevich@gmail.com,
dubr@omr.med.by, s.polyakov@yahoo.com, sergeykrasny@tut.by*

Оценено прогностическое значение стандартных гистологических и молекулярно-биологических признаков при переходном-клеточном раке мочевого пузыря без мышечной инвазии в группе пациентов с высоким риском прогрессирования по критериям EORTC; определена группа лиц, которым показано выполнение ранней цистэктомии.

Ретроспективно изучены доступные данные о характере течения заболевания и последующем наблюдении 179 пациентов, пролеченных в 2004–2007 гг. посредством выполнения трансуретральной резекции (с/без последующей внутрипузырной терапии). С помощью световой микроскопии препаратов определены стандартные гистологические характеристики переходного-клеточного рака, в опухолевом материале с помощью иммуногистохимических методов установлены уровни экспрессии Ki67, p53, p63, CK 20, CK 18, CK 10/13 и CK 5/6. Проведена статистическая обработка результатов, изучена корреляция вышеуказанных параметров с показателем выживаемости без прогрессирования (PFS, определяемая как развитие инвазии мышечного слоя, метастазов или смерти от рака).

Установлено, что отношение рисков прогрессирования заболевания в течение 5 лет у пациентов, страдающих переходном-клеточным раком, с наличием в опухоли позитивной ядерной реакции с антителами к белку p53 в 50 % и более клеток опухоли и/или позитивной цитоплазматической реакции с антителами к CK 5/6 в 50 % и более клеток опухоли, по сравнению с пациентами, не имеющими указанных факторов негативного прогноза, составляет 3,97 (95 %-ный доверительный интервал 2,25–7,01) ($p < 0,001$).

Ключевые слова: рак мочевого пузыря без мышечной инвазии, вероятность прогрессирования, прогностическое значение стандартных гистологических и молекулярно-биологических признаков, гиперэкспрессия p53 и CK 5/6.

T. NABEBINA, A. ROLEVICH, A. DUBROUSKI, S. POLYAKOV, S. KRASNY

**PROGNOSTIC VALUE OF HISTOLOGICAL AND MOLECULAR-BIOLOGICAL CHARACTERISTICS
IN TRANSITIONAL-CELL NON-MUSCLE INVASIVE BLADDER CANCER**

*N. N. Alexandrov National Research Cancer Centre, Minsk, Belarus, e-mail: nabebina.t@yandex.by,
alexander.rolevich@gmail.com, dubr@omr.med.by, s.polyakov@yahoo.com, sergeykrasny@tut.by*

The prediction of disease progression in patients with high-risk transitional-cell non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) can help in the decision-making for patients eligible to early cystectomy. In this study we evaluated the association of different immunohistochemical tissue markers in patients with NMIBC at a high risk of disease progression.

179 patients with NMIBC that underwent complete TUR ± intravesical therapy between 2004 and 2007 and available follow-up were selected. Microscopic slides were reviewed: tumour stage, grade (WHO 1973 and 2004), the presence of carcinoma *in situ* and lymphovascular invasion was determined. Additionally, the expression of Ki67, p53, p63, CK 20, CK 18, CK 10/13 and CK 5/6 was determined after immunohistochemical staining of paraffin embedded tissue samples. The pathology results were correlated with the progression-free survival (PFS defined as the development of the muscle invasive disease, metastases or the death from cancer).

5-year PFS in patients with positive nuclear staining (≥ 50 %) with p53 antibodies and/or positive cytoplasm staining with CK 5/6 (≥ 50 %) was 55 % (95 % CI 39–70) compared to 84 % (95 % CI 77–90) in patients without the expression of these markers (HR 4.0, 95 % CI 2.2–7.0) ($p < 0.001$).

Keywords: non-muscle invasive bladder cancer, progression probability, prognostic value of histological and molecular characteristics, p53 and CK 5/6 over expression.

Введение. В Республике Беларусь в структуре всех злокачественных новообразований частота переходно-клеточного рака мочевого пузыря в 2014 г. составила 2,7 %; среди вновь заболевших мужчин его доля достигла 4,4 %, а среди женщин – 1,1 %. В 2004–2013 гг. отмечалось увеличение частоты выявления новых случаев рака мочевого пузыря – от 11,4 до 12,7 случая на 100 000 жителей. Заболеваемость женщин в среднем в 7 раз ниже, чем мужчин: 15,2 и 2,1 случая на 100 000 жителей соответствующего пола (стандартизованные показатели за 2009–2013 гг.) [1].

При первичной диагностике 75–85 % опухолей мочевого пузыря относятся к раку мочевого пузыря без инвазии в мышечный слой (РМПБМИ), который объединяет неинвазивный (pTa и карцинома *in situ*, соответственно 70 и 5–10 % всех случаев) и инвазирующий подслизистую соединительную ткань переходно-клеточный рак (pT1, 20–25 %) [2]. Это гетерогенная группа опухолей с различной частотой рецидивирования и дальнейшего прогрессирования с инвазией в мышечный слой: возможность рецидива в течение первого года после проведенного лечения составляет, по разным данным, от 15 до 70 %, вероятность прогрессирования в течение 5 лет от начала заболевания – от 7 до 40 % [2, 3]. По этой причине для выявления возможного рецидива и прогрессирования заболевания пациентов, страдающих РМПБМИ, регулярно обследуют, проводя цистоскопию и гистологическое исследование материала. Необходимость обеспечения непрерывного наблюдения и лечения пациентов с РМПБМИ делает это заболевание самым дорогостоящим (в расчете на одного пациента от момента постановки диагноза до смерти) [4, 5].

Основным способом лечения пациентов, страдающих переходно-клеточным РМПБМИ, является органосохраняющий: выполнение трансуретральной резекции с/без последующей внутривезикулярной терапии (вакцина БЦЖ, химиотерапия). У некоторых пациентов после проведенного лечения заболевание прогрессирует с развитием инвазии мышечного слоя и метастазирования. Самый известный способ оценки вероятности прогрессирования заболевания предложен EORTC (Европейская организация по изучению и лечению рака) [3]. Для средневзвешенной оценки используют 6 переменных: степень злокачественности (ВОЗ, 1973 (G1, G2, G3)), степень местной распространенности (pTa, pT1), наличие карциномы *in situ* (CIS), множественность (единичная опухоль, от 2 до 7, 8 и более опухолей) и размеры опухоли (до 3 см, 3 см и более), число предшествующих рецидивов (первичная опухоль, не более 1 рецидива в год, более 1 рецидива в год). Различные сочетания вышеуказанных параметров позволяют вычислить индекс риска прогрессирования с развитием мышечной инвазии в баллах – от 0 (самый благоприятный прогноз) до 23 (самый неблагоприятный прогноз). Наиболее важными переменными для прогнозирования прогрессирования заболевания являются степень злокачественности опухоли, степень местной распространенности и наличие CIS. На основании вычисленного индекса пациентов разделяют на три группы – с низким, промежуточным и высоким риском прогрессирования. В группе лиц с высоким риском вероятность развития прогрессирования в течение 5 лет составляет 45 % (95 %-ный доверительный интервал (ДИ) 35–55). В случае развития инвазии мышечного слоя и/или метастазирования раково-специфическая выживаемость, несмотря проводимое на агрессивное лечение, составляет всего 35 % [6, 7]. Цистэктомия может предотвратить прогрессирование опухолевого процесса и связанное с этим резкое ухудшение прогноза заболевания [8]. Однако даже в группе пациентов с высоким риском прогрессирования рекомендуемая ранняя цистэктомия может оказаться избыточным травматичным вмешательством в 45–65 % случаев [3, 6–9]. Это определяет необходимость поиска дополнительных характеристик опухоли, определяющих неблагоприятное течение заболевания.

Цель нашего исследования – изучить прогностическое значение стандартных гистологических и молекулярно-биологических признаков при раке мочевого пузыря без инвазии в мышечный слой у лиц с высоким риском прогрессирования по критериям EORTC и определить подгруппу пациентов, которым показано выполнение ранней цистэктомии.

Материалы и методы исследования. Работа основана на ретроспективном анализе данных медицинской документации, архивных микропрепаратов, опухолевого материала пациентов с патологическими процессами мочевого пузыря, пролеченных в онкоурологическом отделении РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова в 2004–2007 гг. Проанализированы доступные данные о характере течения заболевания и последующем наблюдении 375 пациентов с гистологически верифи-

цированным переходно-клеточным раком. У всех пациентов указанной группы определен риск развития прогрессирования заболевания согласно критериям EORTC. В дальнейшее исследование включена группа из 179 пациентов, имевших индекс риска развития прогрессирования в мышечную инвазию от 7 до 15 баллов, т. е. высокий риск прогрессирования. Клинические характеристики пациентов приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Клиническая характеристика пациентов

Показатель	К-во пациентов	
	абс.	отн.
Пол:		
женский	41	22,9
мужской	138	77,1
Возраст, лет:		
< 50	17	9,5
50–59	45	25,1
60–69	49	27,4
70–79	57	31,8
80 и старше	11	6,1
Медиана возраста (min–max), лет	65 (29–92)	
Статус рецидивирования:		
первичные	114	63,7
1 рецидив и менее в год	43	24
более 1 рецидива в год	22	12,3
Количество опухолей:		
одиночная	44	24,6
2–7	100	55,9
8 и более	35	19,6
Медиана количества опухолей (min–max)	3 (1–21)	
Изменения слизистой:		
нет	150	83,8
есть	29	16,2
Размер опухоли в наибольшем измерении, см:		
до 3	96	53,6
3 и более	78	43,6
нет данных	5	2,8
Медиана размера опухоли (min–max), см	2,2 (0,1–9)	
Адьювантная внутрипузырная терапия:		
нет	107	59,8
иммунотерапия БЦЖ	70	39,1
внутрипузырная химиотерапия	2	1,1
Повторная ТУР:		
нет	175	97,8
да	4	2,2

Патологоанатомы, участвовавшие в исследовании, не имели доступа к данным о результатах последующего наблюдения за пациентом и характере течения заболевания.

Посредством световой микроскопии оценены гистологические характеристики переходно-клеточного рака в микропрепаратах, окрашенных гематоксилином–эозином. Определение степени злокачественности переходно-клеточного рака проведено по классификационным системам, принятыми ВОЗ в 1973 г. и 2004 гг., с применением диагностического алгоритма для переходно-клеточных новообразований мочевого пузыря [10–13]. Если в опухоли наблюдалась более чем одна степень дифференцировки, то степень злокачественности опухоли определяли по самому низкодифференцированному компоненту, при условии, что данный компонент составлял 5 %

и более опухолевой ткани. Внутриэпителиальный рак характеризовался максимальной выраженностью признаков клеточной и тканевой атипии в пределах переходного эпителия [14].

Субстадирование категории T1 проведено по системе, которая различает T1-микроинвазивную (T1m – единичный очаг инвазии собственной пластинки 0,5 мм и менее (в пределах одного поля зрения, $\times 400$)) и T1-широкоинвазивную (T1e – очаг инвазии собственной пластинки более 0,5 мм либо множественные микроинвазивные поля) опухоли [15]. Оценено наличие инвазии опухоли в просвет сосудов.

Молекулярно-биологические характеристики опухоли определяли путем выполнения иммуногистохимического исследования по общепринятой методике. Использованы следующие клоны первичных антител: Ki67 – клон MIB-1, готовые к употреблению (RTU), p53 – клон DO-7 (рабочее разведение 1:300), p63 – клон 4A4 (рабочее разведение 1:300), CK 5/6 – клон DS/16B4 (рабочее разведение 1:50), CK 10/13 – клон DE-K13 (рабочее разведение 1:200), CK 20 – клон Ks20.8 (рабочее разведение 1:100), CK 18 – клон DC10 (рабочее разведение 1:300). В качестве визуализирующей использована система Dako En Vision + Dual Link System-HRP, pH демаскировочного буфера 9,0.

Результаты иммуногистохимической реакции оценены при помощи световой микроскопии с учетом характера экспрессии (позитивная окраска ядра опухолевой клетки – для p53, Ki-67, p63, позитивная окраска цитоплазмы клеток – для цитокератинов CK 5/6, CK 10/13, CK 18, CK 20). Количество позитивно окрашенных клеток оценивали в 5 различных полях зрения при 400-кратном увеличении (окуляр $\times 10$, объектив $\times 40$). Для подсчета выбирали поля зрения, демонстрирующие различную частоту окраски ядер или цитоплазмы опухолевых клеток, обязательно включающие поле зрения с максимальным количеством позитивных клеток. При определении фенотипа опухоли учитывали, что при «базальноклеточном» фенотипе имеется позитивная реакция с антителами к CK 5/6 в 50 % и более клеток опухоли, а при «люминальном» уровень экспрессии CK 20 в опухолевых клетках составляет 50 % и более.

Степень связи между анализируемыми показателями определяли по величине критерия χ^2 Пирсона (χ^2 -тест). Данные об отдаленных результатах лечения получены из медицинской документации и канцер-регистра Республики Беларусь. Выживаемость без прогрессирования (определяемая как развитие инвазии мышечного слоя, метастазирования или смерти от рака), безрецидивную, скорректированную и общую выживаемость пациентов рассчитывали моментным методом Каплана–Мейера. Моно- и мультивариантные анализы факторов прогноза в отношении выживаемости без прогрессирования проведены с использованием модели пропорциональных рисков Кокса. Прогностическое значение исследуемых характеристик оценивали, анализируя показатель выживаемости по Каплану–Мейеру и логарифмический ранговый критерий (log-rank). При всех видах статистического анализа различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Статистический анализ полученных данных проведен с помощью пакета прикладных программ для медико-биологических исследований IBM SPSS Statistics for Windows v.21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, США, 2012), STATISTICA v.7.0 (Stat Soft, Inc., 2004).

Результаты и их обсуждение. При световой микроскопии архивных микропрепаратов, окрашенных гематоксилином–эозином, степень злокачественности опухоли по системе ВОЗ, 1973 определена как высокодифференцированный рак (grade I) в 51 (28,4 %) случае, умеренно дифференцированный (grade II) – в 96 (53,6 %), низкодифференцированный (grade III) – в 32 (17,8 %). При определении степени злокачественности по системе ВОЗ, 2004 в 27 (15,1 %) случаях установлена папиллярная переходно-клеточная опухоль с низким злокачественным потенциалом, в 79 (44,1 %) случаях выявлен папиллярный переходно-клеточный рак низкой степени злокачественности, в 73 (40,8 %) – папиллярный переходно-клеточный рак высокой степени злокачественности. Степень местной распространенности pT1 (наличие инвазии базальной мембраны) установлена у 98 пациентов: pT1m – у 31 (17,3 %), pT1e – у 54 (30,2 %). В 13 (7,3 %) случаях степень местной распространенности определена как \geq pT1e. В данном случае опухоль вызывала выраженный стромальный фиброзный ответ в подслизистом слое и не имела достоверных гистологических признаков инвазии в мышечный слой стенки мочевого пузыря. В 81 (45,2 %) случае инвазия подслизистого слоя (pTa) отсутствовала. В 23 (12,8 %) случаях клеточная и тканевая

атипия в пределах переходного эпителия имели максимальную выраженность, эти изменения охарактеризованы как переходно-клеточный рак *in situ*. Лимфососудистая инвазия выявлена в 11 (6,1 %) случаях.

Результаты иммуногистохимического определения молекулярно-биологических характеристик опухоли приведены в табл. 2. Переходно-клеточный рак мочевого пузыря пациентов исследуемой группы характеризовался низкой пролиферативной активностью (измерена посредством определения уровня экспрессии Ki67) – в 104 (58,1 %) случаях менее 10 % опухолевых клеток демонстрировали позитивную ядерную окраску. Опухоли с высоким уровнем экспрессии (более 30 % опухолевых клеток) определены у 12 (6,7 %) пациентов. Высокий уровень экспрессии p63 (более 30 % позитивных клеток) отмечен у 132 (73,7 %) человек, экспрессия p53 более чем в 30 % клеток опухоли – у 49 (27,3 %). Базальный фенотип определен у 6 (3,4 %) пациентов, уровень экспрессии СК 10/13 более чем в 30 % клеток опухоли – у 44,1 %. Люминальный фенотип обнаружен у 40 (22,3 %) человек.

Т а б л и ц а 2. Распределение пациентов в зависимости от уровня экспрессии молекулярно-биологических маркеров

Показатель	Уровень экспрессии опухолевых клеток			
	< 10 %	10–30 %	31–49 %	≥ 50 %
Ki67	104 (58,1 %)	69 (35,2 %)	8 (4,5 %)	4 (2,2 %)
p53	87 (48,6 %)	43 (24,0 %)	11 (6,1 %)	38 (21,2 %)
p63	21 (11,7 %)	26 (14,5 %)	19 (10,6 %)	113 (63,1 %)
СК 5/6	157 (87,7 %)	14 (7,8 %)	2 (1,1 %)	6 (3,4 %)
СК 10/13	71 (39,7 %)	29 (16,2 %)	5 (2,8 %)	74 (41,3 %)
СК 18	44 (24,6 %)	46 (25,7 %)	6 (3,4 %)	83 (46,6 %)
СК 20	104 (58,1 %)	29 (16,2 %)	7 (3,9 %)	39 (21,6 %)

Для оценки биологической значимости изучаемых иммуногистохимических показателей проведен тщательный анализ их связи со стандартными гистологическими факторами прогноза биологической агрессивности опухоли (степенью злокачественности, степенью местной распространенности, наличием внутриуротелиального рака). Результаты этого анализа отражены в табл. 3, 4. Уровни экспрессии Ki67, p53 и СК 20 статистически значимо коррелировали со степенью злокачественности и степенью местной распространенности опухоли. Определено снижение уровня экспрессии p63 при нарастании клеточной и тканевой атипии в переходно-клеточном раке (не более 30 %, $p = 0,003$). Не отмечено прямой корреляционной зависимости ни с одним из стандартных гистологических параметров таких показателей, как кератины СК 5/6, СК 10/13, СК 18 и кератиновые фенотипы опухолей (люминальный и базальноклеточный).

Т а б л и ц а 3. Распределение иммуногистохимических показателей у пациентов в зависимости от степени злокачественности

Показатель	К-во пациентов							
	Степень злокачественности согласно ВОЗ, 1973			<i>p</i>	Степень злокачественности согласно ВОЗ, 2004			<i>p</i>
	G1	G2	G3		PUNLMP	LGPUC	HGPUC	
p63:								
<10 %	6 (11,8 %)	8 (8,3 %)	7 (21,9 %)	0,038	1 (3,7 %)	7 (8,9 %)	13 (17,8 %)	0,18
10–30 %	6 (11,8 %)	11 (11,5 %)	9 (28,1 %)		5 (18,5 %)	11 (13,9 %)	10 (13,7 %)	
31–49 %	4 (7,8 %)	11 (11,5 %)	4 (12,5 %)		2 (7,4 %)	6 (7,6 %)	11 (15,1 %)	
≥50 %	35 (68,6 %)	66 (68,8 %)	12 (37,5 %)		19 (70,4 %)	55 (69,6 %)	39 (53,4 %)	
Ki67:								
<10 %	44 (86,3 %)	48 (50 %)	12 (37,5 %)	<0,001	25 (92,6 %)	51 (64,6 %)	28 (38,4 %)	<0,001
10–30 %	6 (11,8 %)	45 (46,9 %)	12 (37,5 %)		2 (7,4 %)	26 (32,9 %)	35 (47,9 %)	
31–49 %	0 (0 %)	2 (2,1 %)	6 (18,8 %)		0 (0 %)	1 (1,3 %)	7 (9,6 %)	
≥50 %	1 (2 %)	1 (1 %)	2 (6,3 %)		0 (0 %)	1 (1,3 %)	3 (4,1 %)	

Показатель	К-во пациентов							
	Степень злокачественности согласно ВОЗ, 1973			p	Степень злокачественности согласно ВОЗ, 2004			p
	G1	G2	G3		PUNLMP	LGPUC	HGPUC	
p53:								
<10 %	31 (60,8 %)	49 (51 %)	7 (21,9 %)	0,009	19 (70,4 %)	42 (53,2 %)	26 (35,6 %)	0,039
10–30 %	9 (17,6 %)	25 (26 %)	9 (28,1 %)		5 (18,5 %)	17 (21,5 %)	21 (28,8 %)	
31–49 %	3 (5,9 %)	6 (6,3 %)	2 (6,3 %)		2 (7,4 %)	3 (3,8 %)	6 (8,2 %)	
≥50 %	8 (15,7 %)	16 (16,7 %)	14 (43,8 %)		1 (3,7 %)	17 (21,5 %)	20 (27,4 %)	
CK 20:								
<10 %	36 (70,6 %)	55 (57,3 %)	13 (40,6 %)	0,002	20 (74,1 %)	53 (67,1 %)	31 (42,5 %)	0,018
10–30 %	6 (11,8 %)	10 (10,4 %)	13 (40,6 %)		4 (14,8 %)	7 (8,9 %)	18 (24,7 %)	
31–49 %	1 (2 %)	5 (5,2 %)	1 (3,1 %)		0 (0 %)	3 (3,8 %)	4 (5,5 %)	
≥50 %	8 (15,7 %)	26 (27,1 %)	5 (15,6 %)		3 (11,1 %)	16 (20,3 %)	20 (27,4 %)	
CK 18:								
<10 %	17 (33,3 %)	20 (20,8 %)	7 (21,9 %)	0,068	9 (33,3 %)	21 (26,6 %)	14 (19,2 %)	0,67
10–30 %	13 (25,5 %)	20 (20,8 %)	13 (40,6 %)		8 (29,6 %)	18 (22,8 %)	20 (27,4 %)	
31–49 %	0 (0 %)	4 (4,2 %)	2 (6,3 %)		0 (0 %)	3 (3,8 %)	3 (4,1 %)	
≥50 %	21 (41,2 %)	52 (54,2 %)	10 (31,3 %)		10 (37 %)	37 (46,8 %)	36 (49,3 %)	
CK 10/13:								
<10 %	16 (31,4 %)	32 (33,3 %)	23 (71,9 %)	0,002	7 (25,9 %)	28 (35,4 %)	36 (49,3 %)	0,40
10–30 %	6 (11,8 %)	20 (20,8 %)	3 (9,4 %)		5 (18,5 %)	13 (16,5 %)	11 (15,1 %)	
31–49 %	2 (3,9 %)	2 (2,1 %)	1 (3,1 %)		1 (3,7 %)	3 (3,8 %)	1 (1,4 %)	
≥50 %	27 (52,9 %)	42 (43,8 %)	5 (15,6 %)		14 (51,9 %)	35 (44,3 %)	25 (34,2 %)	
CK 5/6:								
<10 %	43 (84,3 %)	84 (87,5 %)	30 (93,8 %)	0,68	26 (96,3 %)	65 (82,3 %)	66 (90,4 %)	0,37
10–30 %	6 (11,8 %)	7 (7,3 %)	1 (3,1 %)		1 (3,7 %)	9 (11,4 %)	4 (5,5 %)	
31–49 %	0 (0 %)	2 (2,1 %)	0 (0 %)		0 (0 %)	2 (2,5 %)	0 (0 %)	
≥50 %	2 (3,9 %)	3 (3,1 %)	1 (3,1 %)		0 (0 %)	3 (3,8 %)	3 (4,1 %)	
Люминальный фенотип:								
да	8 (15,7 %)	27 (28,1 %)	5 (15,6 %)	0,13	3 (11,1 %)	17 (21,5 %)	20 (27,4 %)	0,22
нет	43 (84,3 %)	69 (71,9 %)	27 (84,4 %)		24 (88,9 %)	62 (78,5 %)	53 (72,6 %)	
Базальноклеточный фенотип:								
да	2 (3,9 %)	3 (3,1 %)	1 (3,1 %)	0,97	0 (0 %)	3 (3,8 %)	3 (4,1 %)	0,57
нет	49 (96,1 %)	93 (96,9 %)	31 (96,9 %)		27 (100 %)	76 (96,2 %)	70 (95,9 %)	

Примечание. PUNLMP – папиллярная переходно-клеточная опухоль с низким злокачественным потенциалом; LGPUC – папиллярный переходно-клеточный рак низкой степени злокачественности; HGPUC – папиллярный переходно-клеточный рак высокой степени злокачественности.

Таблица 4. Распределение иммуногистохимических показателей у пациентов в зависимости от категории pT

Показатель	К-во пациентов		
	pTа/pT1m	pT1e/не менее pT1e	p
p63:			
<10 %	13 (11,6 %)	8 (7,1 %)	0,79
10–30 %	14 (12,5 %)	12 (10,7 %)	
31–49 %	12 (10,7 %)	7 (6,3 %)	
≥50 %	73 (65,2 %)	40 (35,7 %)	
Ki67:			
<10 %	74 (66,1 %)	30 (26,8 %)	0,004
10–30 %	35 (31,3 %)	28 (25,0 %)	
31–49 %	1 (0,9 %)	7 (6,3 %)	
≥50 %	2 (1,8 %)	2 (1,8 %)	

Показатель	К-во пациентов		
	pTa/pT1m	pT1e/не менее pT1e	<i>p</i>
p53:			
<10 %	64 (57,1 %)	23 (20,5 %)	0,019
10–30 %	25 (22,3 %)	18 (16,1 %)	
31–49 %	5 (4,5 %)	6 (5,4 %)	
≥50 %	18 (16,1 %)	20 (17,9 %)	
СК 20:			
<10 %	72 (64,3 %)	32 (28,6 %)	0,021
10–30 %	11 (9,8 %)	18 (16,1 %)	
31–49 %	5 (4,5 %)	2 (1,8 %)	
≥50 %	24 (21,4 %)	15 (13,4 %)	
СК 18:			
<10 %	31 (27,7 %)	13 (11,6 %)	0,58
10–30 %	26 (23,2 %)	20 (17,9 %)	
31–49 %	4 (3,6 %)	2 (1,8 %)	
≥50 %	51 (45,5 %)	32 (28,6 %)	
СК 10/13:			
<10 %	41 (36,6 %)	30 (26,8 %)	0,65
10–30 %	19 (17,0 %)	10 (8,9 %)	
31–49 %	4 (3,6 %)	1 (0,9 %)	
≥50 %	48 (42,9 %)	26 (23,2 %)	
СК 5/6:			
< 10 %	99 (88,4 %)	58 (51,8 %)	0,62
10–30 %	8 (7,1 %)	6 (5,4 %)	
31–49 %	2 (1,8 %)	0	
≥ 50 %	3 (2,7 %)	3 (2,7 %)	
Люминальный фенотип:			
да	25 (22,3 %)	15 (13,4 %)	0,99
нет	87 (77,7 %)	52 (46,4 %)	
Базальноклеточный фенотип:			
да	3 (2,7 %)	3 (2,7 %)	0,83
нет	109 (97,3 %)	64 (57,1 %)	

Изучены отдаленные результаты лечения пациентов. Медиана времени наблюдения в исследовании составила 80,0 мес. (95 % ДИ 75,7–84,3), время наблюдения колебалось от 9 до 102 мес. За этот период рецидивирование заболевания зарегистрировано у 81 (45,3 %) пациента, у 26 (14,5 %) человек заболевание прогрессировало с развитием инвазии мышечного слоя мочевого пузыря и/или метастазов опухоли, 62 (34,5 %) пациента умерли в течение периода наблюдения, в том числе 33 (18,4 %) – от рака мочевого пузыря. Пятилетние показатели кумулятивной безрецидивной выживаемости составили 53,6 % (95 % ДИ 46,0–61,2), выживаемости без прогрессирования – 77,6 % (95 % ДИ 71,3–83,9), скорректированной выживаемости – 86,6 % (95 % ДИ 81,3–91,9) и общей выживаемости – 74,7 % (95 % ДИ 68,2–81,2).

При моновариантном анализе статистически значимая связь с риском прогрессирования отмечена для двух показателей: уровня экспрессии p53 не менее чем в 50 % клеток опухоли, базальноклеточного фенотипа опухоли. Практически достигали уровня статистической значимости такие показатели, как позитивная реакция с Ki67 ≥ 10 % клеток опухоли и уровень экспрессии СК 10/13 более чем в 30 % опухолевых клеток ($p = 0,055$ и $p = 0,068$ соответственно). Среди других исследуемых стандартных гистологических и иммуногистохимических признаков статистически значимых факторов прогноза выживаемости при РМПБМИ не выявлено (табл. 5). При последующем пошаговом мультивариантном анализе с включением потенциально значимых факторов прогноза в отношении выживаемости без прогрессирования ($p < 0,1$), определенных при моновариантном анализе, выявлено три признака, имеющих статистически значимую прогностическую

ценность: позитивная реакция с p53 не менее чем в 50 % клеток опухоли, базальноклеточный фенотип опухоли (уровень экспрессии СК 5/6 50 % и более), а также позитивная реакция с СК 10/13 более чем в 30 % опухолевых клеток. Включение данных показателей в мультивариантную модель с добавлением стандартных показателей риска, рекомендованных EORTC, подтвердило независимое прогностическое значение таких факторов, как p53 (отношение рисков (ОР) 3,63; 95 % ДИ 1,92–6,85; $p < 0,001$) и базальноклеточный фенотип опухоли (ОР 5,03; 95 % ДИ 1,30–19,41; $p = 0,019$).

Т а б л и ц а 5. Результаты моновариантного анализа связи гистологических и молекулярно-биологических факторов с риском прогрессирования

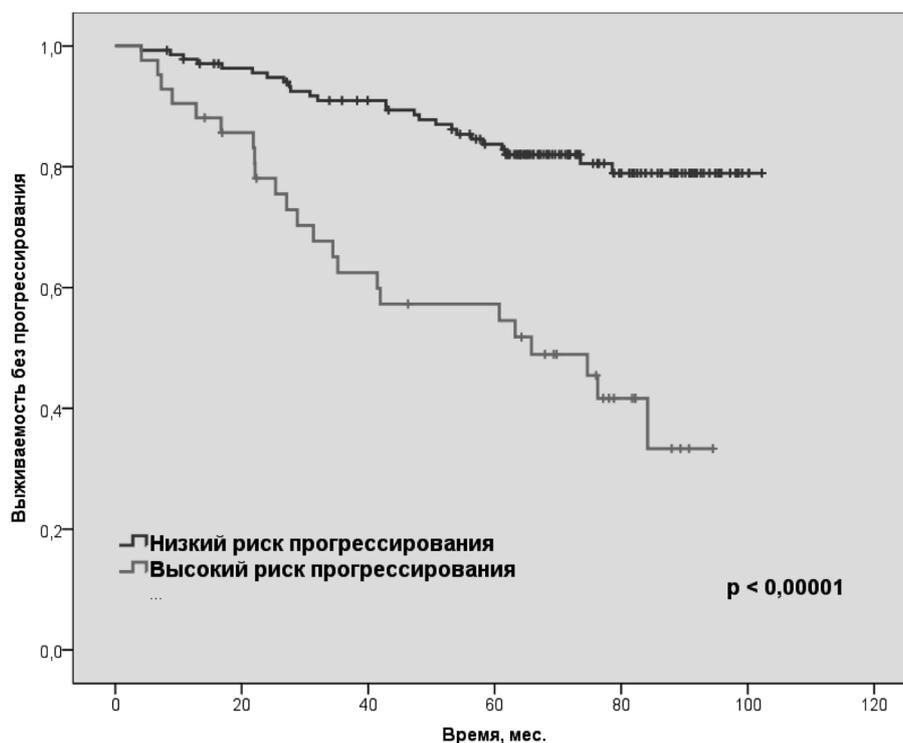
Показатель	ОР	95 % ДИ	p
Степень злокачественности согласно ВОЗ, 1973:			
G1	1,0	–	–
G2	1,35	0,67–2,74	0,40
G3	1,90	0,82–4,39	0,13
Степень злокачественности согласно ВОЗ, 2004:			
PUNLMP	–	–	–
LGPUC	1,90	0,65–5,54	0,24
HGPUC	2,59	0,90–7,50	0,079
Степень местной распространенности pT1e/Ta	1,03	0,57–1,84	0,93
Наличие рака <i>in situ</i>	1,40	0,63–3,13	0,41
Лимфососудистая инвазия:			
да	0,89	0,28–2,86	0,84
нет	6,55	0,67–64,4	0,11
p63: $\leq 30\% / > 30\%$	1,60	0,79–3,22	0,19
Ki67: $< 10\% / 10–30\%$	1,80	0,99–3,27	0,055
p53: $< 50\% / \geq 50\%$	3,73	2,11–6,61	$< 0,001$
СК 20: $\leq 30\% / > 30\%$	0,84	0,43–1,64	0,60
СК 18: $\leq 30\% / > 30\%$	1,21	0,68–2,13	0,52
СК 10/13: $\leq 30\% / > 30\%$	0,57	0,31–1,04	0,068
СК 5/6: $< 10\% / \geq 10\%$	1,46	0,68–3,12	0,33
Люминальный фенотип	1,02	0,52–2,01	0,94
Базальноклеточный фенотип	4,01	1,43–11,21	0,008

П р и м е ч а н и е. ОР – отношение рисков. Остальные обозначения как в табл. 3.

Анализ выживаемости без прогрессирования в зависимости от присутствия/отсутствия одного или более неблагоприятных факторов показал выраженные статистически значимые ($p < 0,0001$) различия. В группе пациентов, у которых в опухоли отмечалась позитивная ядерная реакция с антителами к p53 в 50 % клеток опухоли и более и/или позитивная цитоплазматическая реакция с антителами к СК 5/6 в 50 % клеток опухоли и более, 5-летняя выживаемость без прогрессирования составила 57,3 % (95 % ДИ 41,8–65,2), в группе пациентов, не имеющих дополнительных факторов негативного прогноза, – 83,7 % (95 % ДИ 77,2–87,0). Отношение рисков развития прогрессирования в данных группах составило 3,97 (95 % ДИ 2,25–7,01) (см. рисунок).

Точная стратификация пациентов, страдающих РМПБМИ, по степени риска прогрессирования представляет собой особую проблему для урологов. Постоянно предпринимаются попытки выделить подгруппу пациентов, у которых применение ранней цистэктомии было бы обоснованным [16–19].

Ряд исследований показал, что определение p53 может помочь стратифицировать гетерогенную популяцию пациентов, страдающих РМПБМИ, на группы риска и выбрать тактику лечения. Существуют противоречивые данные относительно того, что иммуногистохимическое определение p53 может надежно классифицировать пациентов с pT1 опухолями в различные группы риска неблагоприятного клинического исхода [20, 21]. Согласно анализу The International Study Initiative on Bladder Cancer (ISBC), который объединил результаты иммуногистохимического



Выживаемость без прогрессирования в зависимости от иммуногистохимических показателей (низкий риск – реакция с антителами к p53 и/или СК 5/6 менее чем в 50 % клеток опухоли, высокий риск – реакция с антителами к p53 и/или СК 5/6 в 50 % и более клеток опухоли)

окрашивания p53, проведенного в 26 различных исследованиях (929 пациентов с переходно-клеточным раком мочевого пузыря pT1), установлено независимое прогностическое значение p53 в многофакторном анализе в отношении прогрессии, но не общей выживаемости [22]. В то же время использование p53 до сих пор не является общепринятым, несмотря на более чем 100 исследований, оценивающих его полезность у пациентов с переходно-клеточным раком. Одна из причин этого приведена в мета-анализе 117 исследований с более чем 10 000 пациентов. Этот мета-анализ показал неоднозначную ценность определения p53, поскольку данный показатель имел самостоятельное прогностическое значение относительно рецидива, прогрессирования и смертности только в 26 % (9 из 34), 50 % (12 из 24) и 29 % (10 из 35) исследований соответственно [23].

Благодаря достижениям в области исследования генома рака мочевого пузыря были выделены молекулярные подтипы рака мочевого пузыря, что, по-видимому, позволит сформировать более эффективные стратегии лечения и наблюдения пациентов [24]. Так, G. Sjodahl и соавт. определили 5 основных молекулярных подтипов уротелиальной карциномы: уробазальный A, генетически нестабильный, уробазальный B, подобный плоскоклеточному раку и не относящийся к вышеуказанным. Для вышеперечисленных подтипов были характерны различные результаты выживаемости. Так, подтипы «уробазальный B» и «подобный плоскоклеточному раку» имели неблагоприятный прогноз. Молекулярные подтипы не коррелировали с патогистологическими характеристиками опухоли (стадией процесса и степенью злокачественности) [25, 26]. В исследовании предложена несложная схема определения молекулярного подтипа переходно-клеточного рака, которая может быть использована в клинике. Схема основана на гистологических признаках (степень злокачественности по системе ВОЗ, 1999 и «уротелий-подобное» строение) и иммуногистохимических характеристиках опухоли (уровень пролиферативной активности и экспрессии кератина 5). J. P. Volkmer и соавт. [27] классифицировали рак мочевого пузыря на три подтипа на основе их степени дифференцировки: базальный, промежуточный и дифференцированный. Они обнаружили, что наличие кератина 14 (*KRT14*) обозначает самую примитивную дифференцировку и, соответственно, связано с худшим прогнозом. Примечательно, что базальный подтип

имел сходство с подтипом «подобный плоскоклеточному раку» (исследование G. Sjodahl, 2012): *KRT14* гиперэкспрессировался в обоих подтипах. W. Choi и соавт. [28] описали три молекулярных подтипа мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря: базальный характеризовался активацией p53, плоскоклеточной дифференцировкой и более высокой стадией заболевания при первичной диагностике; в люминальном подтипе определялись активирующие мутации FGFR3 и потенциальная чувствительность ингибитора FGFR; p53-подобный рак был устойчив к неоадьювантной химиотерапии метотрексатом, винбластином, доксорубицином и цисплатином.

Результаты проведенного нами исследования согласуются с приведенными выше данными о неблагоприятном клиническом течении рака с базально-клеточным фенотипом (аналогично «подобный плоскоклеточному раку») и/или гиперэкспрессией p53. Уровни экспрессии p53 и СК 5/6 (базальноклеточный фенотип) определены путем выполнения иммуногистохимического исследования, используемого в рутинной клинической работе.

Заключение. В подгруппе пациентов, страдающих РМПБМИ с высоким риском прогрессирования, стандартные гистологические факторы прогноза выживаемости не имели статистической значимости. Анализ молекулярно-биологических характеристик опухоли выявил независимое прогностическое значение двух признаков: позитивной ядерной реакции с антителами к p53 и/или позитивной цитоплазматической реакции с антителами к СК 5/6 не менее чем в 50 % клеток опухоли. Пятилетняя выживаемость без прогрессирования у пациентов, у которых отмечались дополнительные негативные факторы прогноза, составила 57,3 % (95 % ДИ 41,8–65,2), в группе лиц, не имеющих указанных факторов, – 83,7 % (95 % ДИ 77,2–87,0) ($p < 0,0001$). Отношение рисков прогрессирования при наличии неблагоприятных факторов составило 3,97 (95 % ДИ 2,25–7,01).

При определении тактики лечения пациентов, страдающих РМПБМИ с высоким риском прогрессирования, следует учитывать дополнительные факторы негативного прогноза и рассматривать возможность выполнения ранней цистэктомии, если в их опухоли определена гиперэкспрессия p53 и СК 5/6.

Список использованной литературы

1. Статистика онкологических заболеваний / А. Е. Океанов [и др.]; под ред. О. Г. Суконого. – Минск: РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова, 2014. – С. 171–177.
2. Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy / Bas W. G. van Rhijn [et al.] // *Eur. Urol.* – 2009. – Vol. 56, N 3. – P. 430–442.
3. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials / Richard J. Sylvester [et al.] // *Eur. Urol.* – 2006. – Vol. 49, N 3. – P. 466–477.
4. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature / M. F. Botteman [et al.] // *Pharmacoeconomics.* – 2003. – Vol. 21, N 18. – P. 1315–1330.
5. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? / K. D. Sievert [et al.] // *World J. Urol.* – 2009. – Vol. 27, N 3. – P. 295–300.
6. Long-term cancer-specific survival in patients with high-risk, non-muscle-invasive bladder cancer and tumour progression: a systematic review / S. van den Bosch [et al.] // *Eur. Urol.* – 2011. – Vol. 60, N 3. – P. 493–500.
7. High-risk nonmuscle invasive bladder cancer / A. Orsola [et al.] // *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* – 2015. – Vol. 29, N 2. – P. 227–236.
8. Does early cystectomy improve the survival of patients with high risk superficial bladder tumors? / H. W. Herr [et al.] // *J. Urol.* – 2001. – Vol. 166, N 4. – P. 1296–1299.
9. Prognostic factors in patients with non-muscle-invasive bladder cancer treated with bacillus Calmette- Guérin: multivariate analysis of data from four randomized CUETO trials / J. Fernandez-Gomez [et al.] // *Eur. Urol.* – 2008. – Vol. 53, N 5. – P. 992–1002.
10. *Mostofi, F. K.* Histological typing of urinary bladder tumours. International Histological Classification of Tumors / F. K. Mostofi, L. H. Sobin, H. Torloni. – Geneva: World Health Organization, 1973. – Vol. 10.
11. *Eble, J. N.* World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs / J. N. Eble. – Lyon: IARC Press, 2004.
12. Diagnostic algorithm for papillary urothelial tumors in the urinary bladder / Jung-Weon Shim [et al.] // *Virchows Arch.* – 2008. – Vol. 452. – P. 353–362.
13. Histologic grading of urothelial carcinoma: a reappraisal / L. Cheng [et al.] // *Human Pathol.* – 2012. – Vol. 43. – P. 2097–2108.
14. An Approach to the Diagnosis of Flat Intraepithelial Lesions of the Urinary Bladder Using the World Health Organization International Society of Urological Pathology Consensus Classification System / Mahul B. Amin [et al.] // *Advances in Anatomic Pathol.* – 2002. – Vol. 9. – P. 222–232.

15. A New and Highly Prognostic System to Discern T1 Bladder Cancer Substage / Bas W. G. van Rhijn [et al.] // Eur. Urol. – 2012. – Vol. 61, N 6. – P. 378–384.
16. Prognostic factors and risk groups in T1G3 non-muscle-invasive bladder cancer patients initially treated with Bacillus Calmette-Guérin: results of a retrospective multicenter study of 2451 patients / P. Gontero [et al.] // Eur. Urol. – 2015. – Vol. 67, N 1. – P. 74–82.
17. Improving selection criteria for early cystectomy in high-grade T1 bladder cancer: a meta-analysis of 15,215 patients / W. Martin-Doyle [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2015. – Vol. 33, N 6. – P. 643–650.
18. Prognostic factors and outcome in patients with T1 high-grade bladder cancer: can we identify patients for early cystectomy? / R. Segal [et al.] // BJU Int. – 2012. – Vol. 109, N 7. – P. 1026–1030.
19. Reexamining treatment of high-grade T1 bladder cancer according to depth of lamina propria invasion: a prospective trial of 200 patients / A. Orsola [et al.] // Br. J. Cancer. – 2015. – Vol. 112, N 3. – P. 468–474.
20. The p53 pathway and outcome among patients with T1G3 bladder tumors / E. Lopez-Knowles [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2006. – Vol. 12, N 15. – P. 6029–6036.
21. Prognostic value of p53 for high risk superficial bladder cancer with long-term follow up / P. M. Moonen [et al.] // J. Urol. – 2007. – Vol. 177, N 1. – P. 80–83.
22. P53 as a prognostic marker for bladder cancer: a meta-analysis and review / N. Malats [et al.] // Lancet Oncol. – 2005. – Vol. 6, N 9. – P. 678–686.
23. P53 immunohistochemistry in bladder cancer: a new approach to an old question / P. J. Goebell [et al.] // Urol. Oncol. – 2010. – Vol. 28, N 4. – P. 377–388.
24. Biomarkers for bladder cancer management: present and future // Fei Ye [et al.] // Am. J. Clin. Exp. Urol. – 2014. – Vol. 2, N 1. – P. 1–14.
25. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma / G. Sjobahl [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2012. – Vol. 18, N 12. – P. 3377–3386.
26. A Molecular Pathologic Framework for Risk Stratification of Stage T1 Urothelial Carcinoma // O. Patschan [et al.] // Eur. Urol. – 2015. – Vol. 68, N 5. – P. 833–834.
27. Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes / J. P. Volkmer [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012. – Vol. 109, N 6. – P. 2078–2083.
28. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy / W. Choi [et al.] // Cancer Cell. – 2014. – Vol. 25, N 2. – P. 152–165.

Поступила в редакцию 17.03.2016