

ХІРУРГІЯ

© Бойко С.О., Возіанов С.О., Романенко А.М., 2010

УДК 616.62-002.2-074:[57.083.3.086]:614.876(477)

ЕКСПРЕСІЯ ПРОТЕЇНА p53 КЛІТИНАМИ УРОТЕЛІЇ СЕЧОВОГО МІХУРА ПРИ ХРОНІЧНОМУ ЦИСТИТІ У ХВОРИХ, ЯКІ ПРОЖИВАЮТЬ НА РАДІОАКТИВНО ЗАБРУДНЕНИХ ТЕРИТОРІЯХ УКРАЇНИ

¹Бойко С.О., ²Возіанов С.О., ²Романенко А.М.

¹Ужгородський національний університет, медичний факультет, кафедра хірургічних хвороб, м.Ужгород; ²Інститут урології АМН України, м.Київ

РЕЗЮМЕ: біопсії сечового міхура від 220 хворих на хронічний цистит, які проживають на радіоактивно забруднених територіях України, були досліджені морфологічним методом та імуногістохімічним на визначення експресії протеїну p53. Гістологічне дослідження продемонструвало, що у 86,4% випадків уротелій сечового міхура зазнає передпухлинних змін I, II та III ступенів. У результаті імуногістохімічного дослідження, у 90% випадків була отримана позитивна експресія протеїну p53 клітинами уротелію сечового міхура. Висока експресія p53 (6,9 бала) спостерігалася у 44,1% випадків. Одержані результати демонструють нові, раніше невідомі зміни уротелію сечового міхура, які відбулися в результаті довготривалої дії низьких доз іонізуючого випромінювання.

Ключові слова: хронічний цистит, імуногістохімія, p53, радіоактивно забруднені території

Вступ. На сьогодні територія України справедливо вважається зоною екологічного лиха по багатьох показниках. Одним із суттєвих несприятливих чинників є радіоактивне забруднення території внаслідок аварії на Чорнобильській атомній електростанції у 1986 році. В той час, як гостре зовнішнє опромінення організму людини та його наслідки є добре вивченими [7] і не викликають сумніву у світової спільноті, існують різні думки стосовно довготривалого впливу на організм людини низьких доз іонізуючого випромінювання, особливо стосовно можливої ініціації канцерогенезу, зокрема зумовленої цезієм-137 [3, 5].

Дуже добре обґрунтованою є роль гена *p 53* та онкопротеїна p53 на пухлинах різної локалізації, в тому числі на різних формах уротеліального раку. Онкопротеїн *p 53* є супресором пухлинного росту і відіграє важливу роль у регуляції клітинного циклу, зокрема, у переході клітини з фази G₁ у фазу S, чи може виступати у ролі тригера апоптозу. Окрім того, стабільність клітинного генома також є залежною від p53, який бере участь у регуляції репарації ДНК [6]. Тому, враховуючи вищенаведені дані, актуальним є вивчення довготривалої дії низьких доз іонізуючого випромінювання на уротелій сечового міхура як однієї із можливих ланок канцерогенезу сечового міхура.

Мета дослідження. Виявити накопичення онкопротеїна p53 у клітинах уротелію сечового міхура при хронічному циститі у хворих, які про-

живають на радіоактивно забруднених територіях України.

Матеріали та методи. Проведено обстеження 220 хворих віком від 24 до 89 років (201 – чоловіка, 19 – жінок), які знаходилися на лікуванні в Інституті урології НАМН України в 1992-2005 р.р. Усі хворі проживали на радіоактивно забруднених цезієм-137 територіях України, які виділені в окремий регіон [4]. Пацієнти лікувалися з приводу: доброякісної гіперплазії передміхурової залози (основний контингент); хронічного циститу; лейкоплакії; каменів сечового міхура; склерозу передміхурової залози; раку передміхурової залози – що становило незначну кількість випадків. Усім пацієнтам в процесі обстеження та лікування здійснювалась відкрита чи ендоскопічна множинна біопсія слизової оболонки сечового міхура. Із отриманого біопсійного матеріалу, після фіксації у формаліні, готували парафінові блоки, із яких у наступному готували зрізи і піддавали їх фарбуванню гематоксиліном та еозином (для наступного гістологічного дослідження) і імуногістохімічному (ІГХ) фарбуванню (для дослідження експресії p53). Результати гістологічного дослідження були оброблені за запропонованою нами шкалою [2].

За допомогою ІГХ забарвлення оцінювалася канцерогенна активність уротелію. ІГХ дослідження експресії онкопротеїна p53 здійснювали з використанням стандартного авідин-біотин-пероксидазного комплексу та набору Vectastain ABC Elit kit (Vector Laboratories,

США), до складу якого входять вторинні біотинізовані антитіла коня проти миші у розведенні 1:50. Зрізи піддавали депарафінізації у ксилолі з наступною дегідратацією в батареї спиртів. Для блокади активності ендогенної пероксидази зрізи вміщували в 3 % розчин перекису водню (в якості розчинника використовували дистильовану воду) на 5 хвилин. Після цього зрізи промивали дистильованою водою і кип'ятили у мікрохвильовій печі при потужності 700 Вт 30 хвилин, з метою відновлення антигенів. Техніка кип'ятіння була наступною: у спеціальні стаканчики вміщували зрізи, на які нашаровували 0,1 М цитратний буфер рН 6,0; потім стаканчик перенесли в фаянсову посудину з кришкою, до якої попередньо було налито 800 мл дистильованої води. Прокип'ячені зрізи негайно охолоджували шляхом промивання в дистильованій воді. Зрізи обробляли 5% розчином сироватки коня в фосфатно-

буферному розчині 30 хвилин при кімнатній температурі. Для визначення експресії протеїну р53 використовували забарвлення моноклональними антитілами миші проти людини (DO-7, IgG2b; DAKO, Glostrup, Данія) в робочому розведенні 1:100. Інкубація проводилась 12 годин (впродовж ночі) при температурі 4°C. Кожний етап ІГХ фарбування закінчувався триразовим промиванням зрізів у розчині фосфатного буфера (рН 7,4). Для проявлення усіх реакцій застосовувався розчин 3,3'-діамінобензидину. Кожного разу використовували позитивний та негативний контроль реакції. Розповсюдженість і інтенсивність ІГХ реакцій оцінювали напівкількісним методом у балах від 0 до 3, а результат оцінювали за їх добутком, значення якого було в межах від 0 до 9. Шкали оцінки розповсюдженості та інтенсивності ІГХ реакцій представлені в таблицях 1-2.

Таблиця 1

Шкала оцінки розповсюдженості ІГХ реакції

Бал	Характеристика
0	Відсутність забарвлених ядер
1	Менше 10% забарвлених ядер
2	Більше 10%, але менше 50% забарвлених ядер
3	Гомогенне забарвлення більше 50% ядер

Таблиця 2

Шкала оцінки інтенсивності ІГХ реакції

Бал	Характеристика
0	Відсутність забарвлення ядер
1	Слабке забарвлення ядер
2	Помірне забарвлення ядер
3	Сильне забарвлення ядер

Наприклад, ІГХ зміни уротелію сечового міхура при хронічному циститі з кінцевим результатом 6 балів мали місце у випадку коли розповсюдженість охоплювала більше 10%, але менше 50% забарвлених ядер, які були сильно забарвлені ($2 \times 3 = 6$). Таким чином, кінцеві результати могли становити 0, 1, 2, 3, 4, 6 чи 9 балів.

У 119 хворих перед лікуванням і виконанням біопсій проводилося радіометричне вимірювання цезію-137 у добовій сечі з використанням стандартного γ -радіометра РУБ-01, методику ми описували раніше [1].

Результати досліджень та їх обговорення. Середня питома активність рівня цезію-137 у добовій сечі 119 пацієнтів становила $2,04 \pm 0,13$ Бк/л.

У результаті гістологічного дослідження було виявлено зміни уротелію слабого ступеня (1 бал) у 7 (3,2%) випадках, помірного ступеня (2-8 балів) – у 23 (10,5%) випадках, передпухлинні зміни уротелію I ступеня (9-13 балів) – у 52 (23,6%) випадках, передпухлинні зміни уротелію II ступеня

(14 балів) – у 105 (47,7%) випадках та передпухлинні зміни уротелію III ступеня (15-22 бали) – у 33 (15%) випадках.

Дослідження базальної мембрани та сполучної тканини *lamina propria* уротелію продемонструвало різні прояви вторинного запалення та судинної реакції. Позитивна запальна реакція у вигляді клітинної інфільтрації лімфоцитами, гістіоцитами, фібробластами та плазматичними клітинами спостерігалася у 95 (43,2%) випадках, тоді як у 125 (56,8%) випадках ознак вторинного запалення взагалі не виявили. Зовсім протилежними були прояви судинної реакції. Так, нормальні кровоносні судини спостерігалися лише у 6 (2,7%) випадках, тоді як у решті випадків було виявлено 1, 2 та 3 ступені ангиогенезу. Третій ступінь ангиогенезу спостерігався у 64 (29,1%) випадках, а 2 ступінь – у 78 (35,5%) випадках.

Результати гістологічного дослідження продемонстрували, що уротелій сечового міхура при хронічному циститі у хворих, які проживають на радіоактивно забруднених територіях України

зазнає особливих змін, у вигляді передпухлинних – у 86,4% випадків, які супроводжуються нетиповими для класичного запалення проявами запальної та судинної реакції у базальній мембрані та сполучній тканині *lamina propria*. Спостерігається оберненопропорційна залежність між запальною та судинною реакцією, коли при відсутності ознак запалення у більшій половині

випадків (56,8%) чітко відстежується значне переважання (64,6%) 2 та 3 ступенів ангиогенезу.

Для більш поглибленого вивчення змін уротелію, перш за все тих, що віднесені нами до передпухлинних, ми вирішили дослідити цей уротелій на наявність у ньому онкопротеїна p53. Результати оцінки імуногістохімічного забарвлення на p53 зображені на рисунку 1.

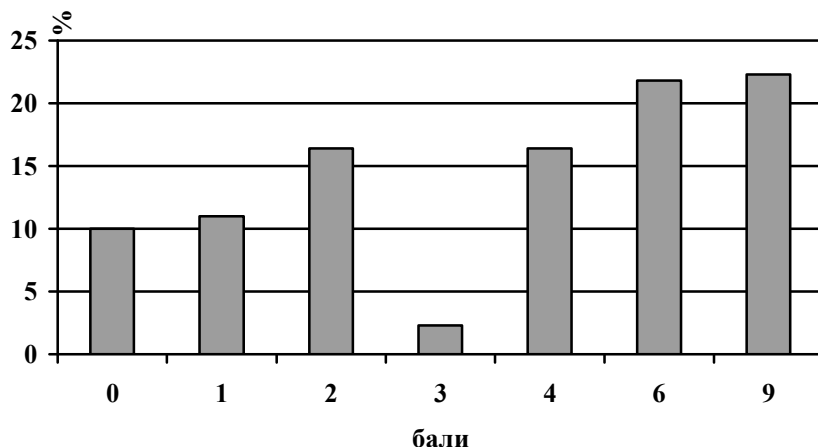


Рис. 1. Результати оцінки імуногістохімічного забарвлення на p53. Вісь ординат – % хворих з негативною та позитивною реакцією. Вісь абсцис – кінцевий результат оцінки імуногістохімічного забарвлення на p53 у балах.

Позитивне ІГХ забарвлення p53 спостерігалось у 198 (90%) випадках, коли в ядрах різних клітин уротелію ми виявили експресію p53. Більш сильна ядерна експресія p53 спостерігалась у базальних та проміжних клітинах уротелію, а в зонтичних клітинах вона мала виразний характер. Лише у 22 (10%) випадках ми не отримали позитивного забарвлення ядер уротелію. У 24 (11%) випадках результати ІГХ забарвлення були оцінені на 1 бал, коли кількість забарвлених ядер не перевищувала 10%, а інтенсивність їх забарвлення була слабкою. У 36 (16,4%) випадках ми спостерігали 2 варіанти розповсюдження та інтенсивності забарвлення: 1-ий варіант, коли кількість забарвлених ядер була вищою за 10%, але меншою 50% і супроводжувалася слабкою інтенсивністю їх забарвлення; та 2-ий варіант, коли кількість забарвлених ядер не перевищувала 10%, а інтенсивність їх забарвлення була помірною, що дозволило дані варіанти ІГХ забарвлення оцінити на 2 бали. Лише у 5 (2,3%) випадках зміни уротелію були оцінені на 3 бали. При цьому кількість забарвлених ядер перевищувала 50%, а інтенсивність їх забарвлення була слабкою. У 36 (16,4%) випадках зміни уротелію були оцінені на 4 бали, коли кількість забарвлених ядер була понад 10%, але менше, ніж 50% і супроводжувалася помірною інтенсивністю їх забарвлення. У 48 (21,8%) випадках ми знову спостерігали 2 варіанти розповсюдження та інтенсивності забарвлення: 1-ий варіант, коли кількість забарвлених ядер перевищувала 50%, а

інтенсивність їх забарвлення була помірною; та 2-ий варіант, коли кількість забарвлених ядер була вищою за 10%, але меншою 50% і супроводжувалася сильною, високою інтенсивністю їх забарвлення, що дозволило дані варіанти ІГХ забарвлення оцінити на 6 балів. У 49 (22,3%) випадках результати ІГХ забарвлення були оцінені на 9 балів. При цьому спостерігався тільки один варіант змін уротелію, коли кількість забарвлених ядер перевищувала 50%, а інтенсивність їх забарвлення була сильною (високою).

Експресія 0 балів вважається як негативна і свідчить про те, що ми маємо справу зі здоровою клітиною, яка не викликає занепокоєння стосовно майбутнього канцерогенного перетворення. Тоді як усі інші випадки позитивної експресії, а особливо оцінені у 6 та 9 балів вказують на те, що у гені *p53* відбулися серйозні порушення і він більше не спроможний контролювати програмовану клітинну смерть ушкоджених клітин. Такі клітини, в результаті порушення регуляції клітинного циклу, зазнають геномної нестабільності, що в свою чергу може викликати злоякісну трансформацію та розвиток раку. Є чітко доведеним, що мутації гена *p53* і в зв'язку з цим значне підвищення експресії протеїна p53 є причетними до виникнення поверхневих (в т.ч. рака *in situ*) та інвазивних форм раку сечового міхура [6].

Таким чином, виявлені нами передпухлинні зміни уротелію різного ступеня та позитивне ІГХ

забарвлення p53 з високими (6,9 бала) кінцевими результатами вказують на виникнення нової форми хронічного циститу, яка може бути причетною до однієї із ланок радіаційно індукованого канцерогенезу сечового міхура.

Висновки. У хворих на хронічний цистит, які проживають на радіоактивно забруднених територіях України уротелій сечового міхура зазнає передпухлинних змін у 86,4% випадків, а позитивна експресія протеїна p53 має місце у 90% випадків, причому високоінтенсивною (6,9 бала)

вона є у 44,1% випадків. Одержані результати на гістологічному та імуногістохімічному рівнях демонструють нові, раніше невідомі зміни уротелію сечового міхура, які відбулися в результаті довготривалої дії низьких доз іонізуючого випромінювання.

Перспективи. Планується провести імуногістохімічне дослідження експресії p53 у клітинах уротелію сечового міхура у хворих на хронічний цистит, які проживають на, так би мовити, “чистих” територіях України.

ЛІТЕРАТУРА

1. Возіанов С.О. Гістологічні зміни уротелію сечового міхура у пацієнтів із хронічною затримкою сечі, які проживають на радіоактивно забруднених територіях України / С.О. Возіанов, А.М. Романенко, С.О. Бойко // Наук. вісник Ужгородського ун-ту. Серія “Медицина”. — 2008. — Вип. 34. — С.89—92.
2. Возіанов С.О. Нова шкала оцінки гістологічних змін слизової оболонки сечового міхура при хронічному циститі / С.О. Возіанов, С.О. Бойко, А.М. Романенко // Наук. вісник Ужгородського ун-ту. Серія “Медицина”. — 2009. — Вип. 35. — С. 99—102.
3. Кузин А.М. Действие атомной радиации в малых дозах на биоту / А.М. Кузин // Радиобиология. — 1991. — Т. 31, вып. 2. — С. 175—179.
4. Особливості епідеміології гострого та хронічного циститу / О.Ф. Возіанов, С.П. Пасечніков, Л.П. Павлова [та ін.] // Урологія. — 1999. — №2. — С.3—7.
5. Специфические мутации гена p53 в уротелии мочевого пузыря у лиц, проживающих на загрязненных ¹³⁷Cs регионах Украины / А.Ф. Возіанов, А.М. Романенко, Ш. Ямамото, Ш. Фукушима // Журн. АМН України. — 1999. — Т. 5, №3. — С. 402—412.
6. Cordon-Cardo C. Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression / C. Cordon-Cardo // Scand. J. Urol. Nephrol. — 2008. — Vol. 42, Suppl. 218. — P. 154—165.
7. Hall P. Radiation-associated urinary bladder cancer / P. Hall // Scand. J. Urol. Nephrol. — 2008. — Vol. 42, Suppl. 218. — P. 85—88.

SUMMARY

P53 EXPRESSION OF BLADDER UROTHELIAL CELLS OF PATIENTS WITH CHRONIC CYSTITIS WHO LIVE ON RADIOCONTAMINATED AREAS OF UKRAINE

Boyko S.O., Vozianov S.O., Romanenko A.M.

Bladder urothelial biopsies from 220 patients with chronic cystitis who live on radiocontaminated areas of Ukraine were analyzed of morphological and immunohistochemical (p53 expression) methods. Histological examination was demonstrated of preneoplastic urothelial lesions of I, II and III degree of urinary bladder urothelium in 86,4% of cases. Positive p53 expression of bladder urothelium cells was detected immunohistochemically in 90% of cases. High p53 expression (6, 9 scores) was seen in 44,1% of cases. The received results demonstrate new, previously unknown urinary bladder urothelium lesions, which induced by persistent low-dose ionizing radiation.

Key words: chronic cystitis, immunohistochemistry, p53, radiocontaminated areas