

Prognostická a prediktívna hodnota E-kadherínu a Ki-67 v porovnaní so štandardným histopatologickým vyšetrením pri povrchových nádoroch močového mechúra

MUDr. Štefan Harsányi¹

(patologická anatómia a súdne lekárstvo)

Spoluautori: Stanislav Žiaran², Zuzana Varchulová Nováková¹, Katarína Bevizová³

Školiteľ: doc. RNDr. Ľuboš Danišovič, PhD.¹

¹ Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN v Bratislave, Slovensko

² Urologická klinika LF UK, SZU a UN v Bratislave, Slovensko

³ Anatomický ústav LF UK v Bratislave, Slovensko

Úvod

Rakovina močového mechúra je deviate najčastejšie zhubné ochorenie na svete. Odhadovaný výskyt v roku 2018 v Európskej únii bol 197 105 prípadov a úmrtnosť dosiahla 64 996 prípadov. Incidencia má stúpajúcu tendenciu (1). Vyskytuje sa u oboch pohlaví, ale muži bývajú postihnutí častejšie v pomere 3,2 ku 0,9. Vysoká prevalencia s tendenciou k recidívam a progresii napriek lokálnej terapii vedie k značnému ekonomickému zaťaženiu. Leal et al. odhadujú túto čiastku až na 4,9 miliardy EUR ročne (2). Väčšina diagnostikovaných prípadov predstavujú povrchové (svalovo neinvazívne) nádory močového mechúra (NMIBC – non-muscle invasive bladder cancer) v štádiách Ta alebo T1. Aj neinvazívne tumory môžu časom progredovať do svalovo invazívnych typov s rýchlym vývojom metastáz a extrémne zlou prognózou (3). Prognóza je komplikovaná významnou interpersonálnou variabilitou choroby, preto sú potrebné biomarkery ako E-kadherín a Ki-67, ktoré slúžia na presnejšiu diagnostiku a prognózu pri nádorových ochoreniach.

E-kadherín je transmembránový glykoproteín, ktorý má zásadnú úlohu pri udržiavaní integrity a homeostázy urotelového tkaniva. Strata expresie E-kadherínu je spojená s vysokým stupňom a pokročilým štádiom NMIBC a predpovedá zlú prognózu (4). Ki-67 je jadrový proteín spojený s ribozomálnou RNA transkripciou a proliferáciou buniek. Hladina expresie Ki-67 významne koreluje s mierou recidívy a histopatologickou diferenciáciou nádoru (5, 6).

Hlavným cieľom tejto štúdie bolo analyzovať prognostickú hodnotu imunohistochemickej expresie E-kadherínu a Ki-67 u pacientov s NMIBC a korelovať ich hladiny expresie s inými klinicko-patologickými premennými (stage, grade, recidíva).

Materiál a metódy

Študovanú skupinu tvorilo 342 pacientov s diagnózou NMIBC v štádiu Ta a T1. Stredný vek bol 68 rokov (rozmedzie 34 až 98 rokov). Medián času sledovania bol 84,5 mesiaca (rozsah 1 - 179 mesiacov). Pacienti podstúpili transuretrálnu resekciu nádoru močového mechúra (TURBT) na Urologickej klinike LF UK v rokoch 2005 až 2019. Po resekcii boli sekcie nádorov histopatologicky analyzované na Ústave súdneho lekárstva LF UK. Túto štúdiu schválila miestna etická komisia. Všetky vzorky boli odobraté v súlade s Helsinskou deklaráciou.

Imunohistochemická analýza: Nádorové tkanivo bolo klasifikované podľa klasifikácie WHO z roku 1998 a hodnotenie klinického štádia bolo založené na šiestom vydaní klasifikácie TNM. Tkanivové mikročipy boli pripravené z formalínom fixovaných parafínových bločkov tkaniva, ktorých reprezentatívnosť bola dokázaná histopatologickým porovnaním s pôvodnými rezmi celého nádoru. Rezy veľkosti 4 μm boli pripravené mikrotómom a následne umiestnené na sklíčka potiahnuté poly L-lyzínom. Imunohistochemická analýza bola vykonaná na pripravených vzorkách tkanív použitím imunostainera Leica ST 5050 podľa pokynov výrobcu. Mikroskopické hodnotenie imunohistochemického farbenia E-kadherínu a Ki-67 bolo uskutočnené pomocou primárnych protilátok (E-kadherín: klon NCH38: DAKO, Glostrup, Dánsko; 1: 100 a Ki-67: myšia monoklonálna látka MIB-1, DAKO, Hamburg, Nemecko) s riedením uskutočneným pomocou štandardných postupov farbenia.

Hladiny expresie reprezentované úrovňami zafarbenia sa hodnotili semikvantitatívne po 5% krokoch s použitím modifikovanej verzie v minulosti použitého skórovacieho systému (7). Výsledky vyšetrenia E-kadherínu boli rozdelené na tri intervaly: "nízky", keď jadrové farbenie nádorových buniek bolo $\leq 50\%$; „Stredné alebo heterogénne“, keď jadrové zafarbenie nádorových buniek bolo vyššie ako 50% a nižšie ako 75% a „vysoké“, nad 75%. Výsledky vyšetrenia Ki-67 boli rozdelené na dva intervaly: „nízke“, keď jadrové farbenie nádorových buniek bolo $\leq 15\%$ a „vysoké“, ak zafarbenie presiahlo 15%.

Štatistická analýza: Štatistická analýza sa uskutočňovala pomocou SPSS v.25.0 (IBM Corp. Armonk, NY). Pearsonov chí-kvadrát test (χ^2) bol použitý na analýzu vzťahu medzi distribúciou frekvencií úrovní zafarbenia a stagingom, gradingom a recidívou nádorov. Prežívanie bolo analyzované pomocou Kaplan-Meierovej analýzy prežívania s použitím času sledovania počítaného v mesiacoch od počiatočného histopatologického vyšetrenia alebo

začiatku liečby, po smrť pacienta alebo posledné opakované vyšetrenie. Na identifikáciu štatistických rozdielov sa použil Log-rank test. Výsledky štatistických testov sa považovali za významné, ak p-hodnota bola nižšia ako 0,05.

Výsledky

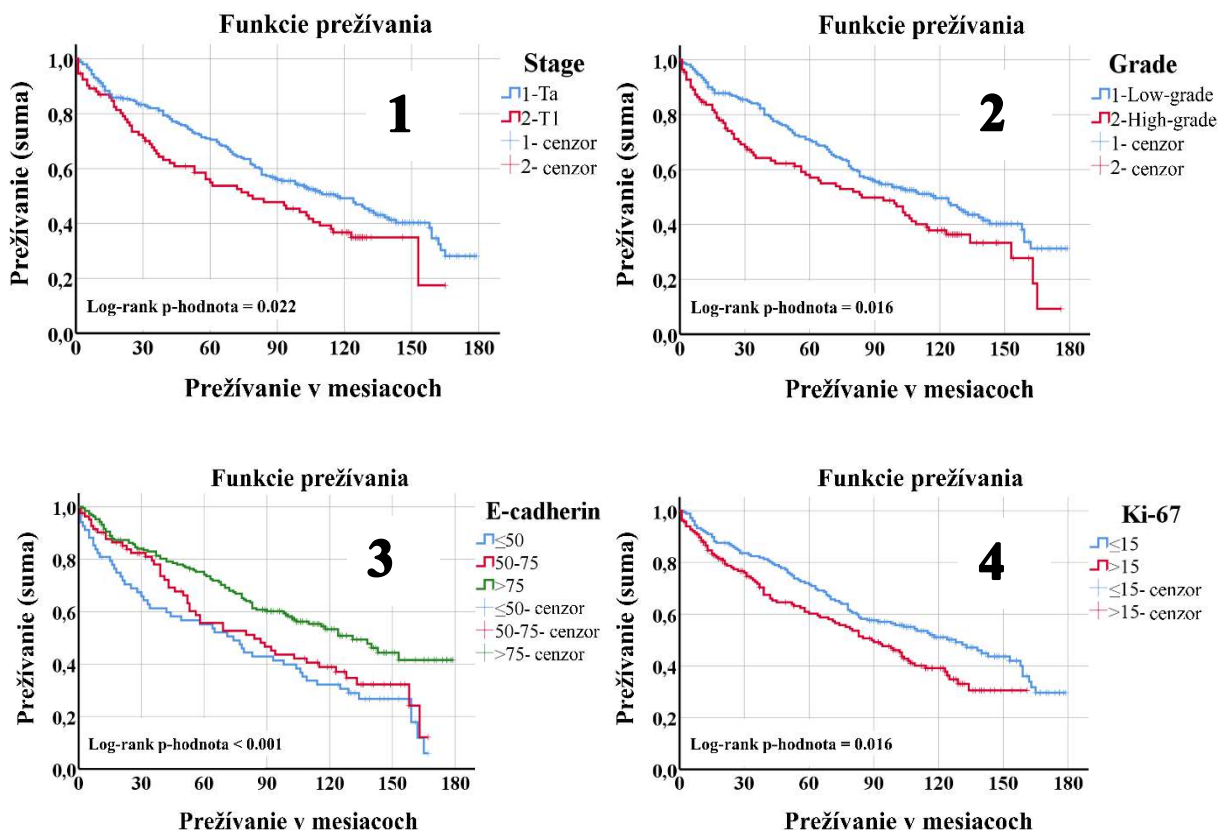
Počiatkové štádium Ta bolo diagnostikovaná u 249 pacientov (72,8%) a T1 u 93 (27,2%) pacientov. 231 (67,5%) nádorov bolo Low-grade a 111 (32,5%) bolo High-grade. U 122 (35,7%) pacientov došlo k recidíve a v 220 (64,3%) prípadoch boli nádory novo diagnostikované. Papilárne nádory predstavovali 316 (92,4%) prípadov, solídne a zmiešané 14 (4,1%) a 12 (3,5%). Smrť nastala v 189 (55,3%) prípadoch.

Tabuľka 1 predstavuje distribúciu frekvencií v študovanej skupine, kde boli úrovne expresie biomarkerov analyzované v spojení so stagingom, gradingom a recidívou. Tieto výsledky ukazujú významnú asociáciu E-kadherínu a Ki-67 v súvislosti so stage a grade ($p < 0,001$), avšak, asociácia s recidívou sa ukázala ako štatisticky nevýznamná. Analýza distribúcie ukázala, že „vysoká“ expresná skupina E-kadherínu a „nízka“ expresná skupina Ki-67 obsahovala vyššie (štatisticky významné) množstvo nádorov s nižším rizikom. Táto skutočnosť ukazuje, že E-kadherín a Ki-67 nielen replikujú výsledky štandardného histopatologického vyšetrenia, ale ho rozširujú a môžu pomôcť pri stratifikácii rizika u týchto pacientov.

Tabuľka 1. Distribúcia frekvencií v študovanej skupine. E-kadherín and Ki-67 v asociácii so stagingom, gradingom a recidívou.

| Premenné | | E-kadherín (%) | | | Ki-67 (%) | |
|----------|--------------------|----------------|-------|-----|-----------|-----|
| | | ≤50 | 50-75 | >75 | ≤15 | >15 |
| Stage | pTa | 26 | 54 | 169 | 142 | 107 |
| | pT1 | 35 | 27 | 31 | 31 | 62 |
| | χ^2 p-hodnota | <0.001 | | | <0.001 | |
| Grade | LG | 19 | 50 | 162 | 140 | 91 |
| | HG | 42 | 31 | 38 | 33 | 78 |
| | χ^2 p-hodnota | <0.001 | | | <0.001 | |
| Recidíva | Áno | 25 | 28 | 69 | 56 | 66 |
| | Nie | 36 | 53 | 131 | 117 | 103 |
| | χ^2 p-hodnota | 0.634 | | | 0.197 | |

Kaplan-Meierova analýza - obrázky 1. - 4. prezentujú asociácie vybraných premenných (stage, grade, E-kadherín, Ki-67) s celkovým prežívaním pacientov v študovanej skupine. Výsledky ukazujú, že všetky vybrané premenné sú významne asociované s prežívaním. Pacienti so štádiom Ta a/alebo Low-grade spolu s neaberrantnými hladinami expresie biomarkerov majú oveľa vyššiu mieru prežívania ako pacienti s aberrantnou expresiou alebo horším histopatologickým výsledkom. Nízke hladiny expresie Ki-67 pozitívne ovplyvňujú prežívanie pacientov, zatiaľ čo vysoká expresia predstavuje horšiu prognózu. Pacienti s vysokou úrovňou expresie E-kadherínu prežívali dlhšie ako pacienti so strednou alebo nízkou expresiou.



Diskusia

Svalovo neinvazívne nádory močového mechúra s častými recidívami a väčšinou nepredvídateľnou progresiou patria medzi veľmi heterogénne a variabilné ochorenia. Klinickí lekári a vedci zaznamenávajú prípady, keď aj po predchádzajúcej úspešnej liečbe nemožno vylúčiť možnosť recidívy.

Na základe predchádzajúcich výskumov sme uskutočnili našu štúdiu hladín expresie E-kadherínu a Ki-67, pretože vykazujú veľmi nádejny, ale nie dôkladne preštudovaný diagnostický potenciál pre pacientov s NMIBC. Naše výsledky potvrdzujú prognostickú

hodnotu týchto biomarkerov a ukazujú značnú súvislosť s prognózou, kde aberantné hladiny expresie negatívne ovplyvňovali prežívanie pacientov. Naša štúdia však nevysvetlila recidívu týchto nádorov. Problematika recidívy je celosvetovo problematická téma pre vedcov, pri ktorej sa stretávame s prevažne nejednotnými výsledkami. Recidíva súvisí s početnosťou, recidívami v minulosti a so všeobecnou komplianciou pacientov (8).

Štúdie E-kadherínu majú často protichodné výsledky. Nízke hladiny expresie E-kadherínu boli spájané so zlou prognózou u pacientov s NMIBC, ale niektoré štúdie naznačujú, že neexistuje žiadna súvislosť medzi expresiou E-kadherínu a prognózou týchto pacientov (9-11). Stredne a menej diferencované rakovinové bunky vykazujú zníženú expresiu E-kadherínu, zatiaľ čo dobre diferencovaná bunková línia má vyššiu expresiu (12). Analýza prežívania ukázala významný rozdiel medzi normálnou a aberantnou expresiou E-kadherínu, čo môže byť dobrý prognostický marker (13). Medzi NMIBC (14, 15) bola zistená významná korelácia medzi hladinami expresie Ki-67 a progresiou, prežívaním a recidívami. Aberácie v expresii Ki-67 sú spojené s horšími histopatologickými a klinickými výsledkami u pacientov (16).

Na záver je možné na základe získaných výsledkov zdôrazniť, že nízke hladiny expresie Ki-67 a vysoké hladiny expresie E-kadherínu pozitívne ovplyvňujú prežívanie pacientov, zatiaľ čo aberantné expresie predstavujú horšiu prognózu.

Práca bola podporená grantom vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied č. VEGA 1/0207/16.

Referencie

1. <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/>
2. **Leal J, Luengo-Fernandez R, Sullivan R, Witjes JA.** Economic Burden of Bladder Cancer Across the European Union. *European Urology* 2016, 69, 438–447.
3. **Yun SJ, Kim WJ.** Role of the epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer: From prognosis to therapeutic target. *Korean J Urol* 54: 645-650, 2013
4. **Xie Y, Li P, Gao Y et al.** Reduced E-cadherin expression is correlated with poor prognosis in patients with bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(37):62489-62499
5. **Thakur B, Kishore S, Dutta K, Kaushik S, Bhardwaj A.** Role of p53 and Ki-67 immunomarkers in carcinoma of urinary bladder. *Indian J Pathol Microbiol*. 2017;60(4):505-9.

6. **Stec R, Cierniak S, Lubas A et al.** Intensity of Nuclear Staining for Ki-67, p53 and Survivin as a New Prognostic Factor in Non-muscle Invasive Bladder Cancer. *Pathol Oncol Res.* 2019.
7. **Rajcani J, Kajo K, Adamkov M et al.** Immunohistochemical characterization of urothelial carcinoma. *Bratisl Lek Listy.* 2013;114(8):431-8.
8. **van Rhijn BWG, Catto JW, Goebell PJ et al.** Molecular markers for urothelial bladder cancer prognosis: toward implementation in clinical practice. *Urol Oncol.* 2014;32(7):1078-87.
9. **Breyer J, Gierth M, Shalekenov S et al.** Epithelial-mesenchymal transformation markers E-cadherin and survivin predict progression of stage pTa urothelial bladder carcinoma. *World J Urol.* 2016;34(5):709-16.
10. **Otto W, Breyer J, Herdegen S et al.** WHO 1973 grade 3 and infiltrative growth pattern proved, aberrant E-cadherin expression tends to be of predictive value for progression in a series of stage T1 high-grade bladder cancer after organ-sparing approach. *Int Urol Nephrol.* 2017;49(3):431-7.
11. **Zhao J, Dong D, Sun L, Zhang G, Sun L.** Prognostic significance of the epithelial-to-mesenchymal transition markers e-cadherin, vimentin and twist in bladder cancer. *Int Braz J Urol.* 2014;40(2):179-89.
12. **Shariat SF, Matsumoto K, Casella R, Jian W, Lerner SP.** Urinary levels of soluble e-cadherin in the detection of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol.* 2005;48(1):69-76.
13. **Kashibuchi K, Tomita K, Schalken JA et al.** The prognostic value of E-cadherin, alpha-, beta-, and gamma-catenin in urothelial cancer of the upper urinary tract. *Eur Urol.* 2006;49(5):839-45; discussion 845.
14. **van Rhijn BWG, Liu L, Vis AN et al.** Prognostic value of molecular markers, sub-stage and European Organisation for the Research and Treatment of Cancer risk scores in primary T1 bladder cancer. *BJU Int.* 2012;110(8):1169-76.
15. **Ko K, Jeong CW, Kwak C, Kim HH, Ku JH.** Significance of Ki-67 in non-muscle invasive bladder cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(59):100614-30.
16. **Ding W, Gou Y, Sun C et al.** Ki-67 is an independent indicator in non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC); combination of EORTC risk scores and Ki-67 expression could improve the risk stratification of NMIBC. *Urol Oncol.* 2014;32(1):42.e13-19.