

M. Babjuk¹, V. Soukup¹, J. Mareš²,
J. Dušková³, Z. Sedláček², M. Trková²,
J. Dvořáček¹, T. Hanuš³, J. Novák¹, C. Povýšil³

¹Urologická klinika Všeobecné fakultní nemocnice a katedra urologie IPVZ 1. LF UK, Praha

přednosta prof. MUDr. J. Dvořáček, DrSc.

²Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK, Praha
přednosta prof. MUDr. P. Goetz, CSc.

³Patologický ústav Všeobecné fakultní nemocnice
a katedra patologie IPVZ 1. LF UK, Praha
přednosta prof. MUDr. C. Povýšil, DrSc.

EXPRESE GENŮ PAX5 A Shb, ANALÝZA MUTACÍ GENU p53 A EXPRESE PROTEINU p53 VE TKÁNI POVRCHOVÝCH NÁDORŮ MOČOVÉHO MĚCHÝŘE

KLÍČOVÁ SLOVA

Povrchové nádory močového měchýře
Expresce genu *PAX5*
Expresce genu *Shb*
Imunohistochemické vyšetření *p53*
HSCORE
Analýza mutací genu *p53*

SOUHRN

Cíl práce: Zhodnotit přítomnost exprese genů *PAX5* a *Shb* ve tkáni povrchových uroteliálních karcinomů močového měchýře, posoudit její korelaci s patologií genu *p53* a uvážit prognostický význam jednotlivých faktorů.

Pacienti a metodika: Do studie bylo zahrnuto 61 pacientů s histologicky prokázaným povrchovým uroteliálním karcinomem močového měchýře. Expresce mRNA genů *PAX5* a *Shb* ve tkáni nádoru byla detekována pomocí reverzní polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) a výsledek byl vyjádřen semikvantitativně. Přítomnost mutací *p53* byla zachycena pomocí SSCP (*single strand conformation polymorphism*) a potvrzena sekvenováním. K imunohistochemickému vyšetření *p53* byla použita protilátka DO1, k vyjádření výsledku bylo použito semikvantitativní hodnocení pomocí HSCORE (HS). Kontrolní skupinu pro posouzení *PAX5* a *Shb* exprese tvořilo 8 mužů, u kterých byl vzorek urotelu odebrán během operace pro benigní hyperplazii prostaty.

Výsledky: Přítomnost exprese *PAX5* a *Shb* byla prokázána u 50, respektive 52 pacientů s uroteliálním nádorem, ale u žádného z kontrolní skupiny. Mutace *p53* byla zachycena u jediného pacienta s tumorem pTaG2 a byla lokalizována v exonu 5 (delece prolinu 128). Jaderná imunoreaktivita *p53* byla přítomna u většiny pacientů, při použití prahové hodnoty HS 200 mělo 56,9 % nemocných pozitivní nález. Kvantita imunohistochemické positivity *p53* nekorelovala s kvantitou exprese *PAX5*. Při použití prahových hodnot HS 200 pro *p53* a 0,2 pro *PAX5* mělo z 8 progrediujících pacientů 7 nadprahovou hodnotu HS a 4 nadprahovou hodnotu *PAX5*.

Závěr: Expresce genu *PAX5* je častým nálezem u povrchových uroteliálních karcinomů močového měchýře.

KEY WORDS

Superficial urinary bladder cancers
PAX5 gene expression
Shb gene expression
Immunohistochemical examination of *p53*
HSCORE
p53 gene mutations analysis

SUMMARY

PAX 5 AND SHB EXPRESSION, P53 MUTATION ANALYSIS AND P53 EXPRESSION
IN SUPERFICIAL BLADDER CANCER

The objective of the work: To evaluate the presence of the *PAX5* and *Shb* genes expression in the tissue of superficial urotelial urinary bladder cancers, to judge its correlation with the *p53* gene pathology and to consider the prognostic value of individual factors.

Patients and Method: 61 patients with histologically proven superficial urotelial bladder cancer were included into the study. The mRNA expression of *PAX5* and *Shb* genes in the cancer tissue was detected by the reverse polymerase chain reaction (RT-PCR) and the result was expressed semiquantitatively. The presence of *p53* mutations was recorded by SSCP (single strand conformation polymorphism) and confirmed by sequencing.

The immunohistological examination of *p53* was made by using DO1 antibody and the result was expressed using semiquantitative evaluation by HSCORE (HS). 8 men created the control group for *PAX5* and *Shb* expression evaluation. Their urotel sample was withdrawn during the operation of benign prostate hyperplasia.

Results: The presence of *PAX5* and *Shb* expression was proven in 50, let us say in 52 patients with urotelial cancer, but it was not proven in anybody of the control group. *p53* mutation was recorded in one patient with pTaG2 tumour and it was localised in 5 exon (proline 128 deletion). Nuclear immunoreactivity of *p53* was present in the majority of patients, 56,9% of patients had positive finding using the threshold value HS 200.

The quantity of *p53* immunohistochemical positivity did not correlate with the quantity of *PAX5* expression. Using the threshold values of HS 200 for *p53* and 0,2 for *PAX5* the 7 of 8 progressing patients had supra-threshold HS value and 4 of them had supra-threshold *PAX5* value.

Conclusion: The *PAX5* gene expression is an often finding in superficial urotelial urinary bladder cancers.

ÚVOD

Zhruba 70 – 80 % uroteliálních karcinomů močového měchýře je tvořeno tzv. povrchovými nádory, mezi které zařazujeme tumory klasifikované jako Ta, T1 a Tis dle TNM klasifikace. Jejich typickým znakem jsou časté recidivy, které pozorujeme až u 80 % nemocných [1]. V případě recidivy se můžeme setkat dokonce i s progresí, kdy opakovaně vzniklý nádor infiltruje svalovinu detruzoru. Toto riziko kolísá mezi 2 % a 50 % dle typu primárního nádoru [shrnutí viz 2].

Mimořádný význam pro volbu dalšího postupu je přisuzován prognostickým faktorům schopným předpovědět budoucí chování malignity [3]. Rutinně jsou využívány informace, které získáme pečlivou endoskopií a histologickým vyšetřením odstraněné tkáně. Patří sem hlavně rozlišení nádorů na Ta a T1, určení histologické diference, plošné velikosti a četnosti nádoru, respektive stanovení předchozí frekvence recidiv. Na základě zmíněných prognostických faktorů lze definovat skupiny s různým rizikem recidivy, respektive progresi onemocnění, individuální a přesná předpověď budoucího chování malignity však možná není.

V posledním desetiletí je věnována velká pozornost molekulárním prognostickým faktorům vycházejícím z nejnovějších poznatků o genetické podstatě nádorového růstu.

V naší práci jsme se zaměřili na potenciální onkogenní aktivitu genu *PAX5*, který je za fyziologických okolností významným regulátorem vývoje centrálního nervového systému a B-lymfocytů [4,5] a jehož zvýšená exprese byla prokázána u některých lidských malignit, jako jsou astrocytomy, meduloblastomy, non-Hodgkinské lymfomy a také uroteliální karcinomy [6-8]. Současně jsme studovali i možnou onkogenní aktivitu genu *Shb*, který jsme zvolili pro lokalizaci jeho lokusu v těsné blízkosti lokusu genu *PAX5* [9].

Cílem naší práce je posoudit četnost a intenzitu exprese genů *PAX5* a *Shb* ve tkáni povrchových nádorů močového měchýře. Nález jsme korelovali s patologií genu *p53*, TNM i histologickou klasifikací nádoru i dalším klinickým průběhem onemocnění.

PACIENTI A METODIKA

Do studie bylo prospektivně zařazeno 61 pacientů (13 žen, 48 mužů) ve věku 36 – 89 let (průměrný věk 69,1 roku), u kterých byla v období od ledna 2000 do ledna 2002 provedena trans-uretrální resekce (TUR) pro primární [31] nebo recidivující [30] povrchový uroteliální karcinom močového měchýře. Jako kontrolní skupinu pro posouzení *PAX5* a *Shb* exprese jsme použili 8 mužů ve věku 56 – 78 let (průměrný věk 70,1 roku), u kterých byl vzorek urotelu měchýře získán biopsií během transuretrální resekce prostaty pro benigní hyperplazii. Ve všech těchto vzorcích byla standardním histologickým vyšetřením potvrzena přítomnost nenádorového urotelu. Studie byla schválena etickou komisí naší nemocnice.

Transuretrální resekce nádoru byla provedena obvyklým způsobem, kdy byla odstraněna veškerá viditelná nádorová tkáň. Vzorky byly okamžitě po odebrání zamrazeny v tekutém dusíku a uchovávány při -70 °C až do extrakce DNA a RNA, která proběhla dle standardních protokolů jak v případě nádorových, tak kontrolních vzorků. Zbytek tkáně byl fixován ve formalinu a odeslán na rutinní histologické a imunohistochemické vyšetření. Histologické vyšetření bylo provedeno jedním zkušeným patologem (JD).

Nádory byly klasifikovány dle TNM klasifikace [10] jako pTa ve 40 a pT1 ve 21 případech. Histologická diference nádoru byla stanovena dle WHO, přičemž u 21 pacientů se jednalo o nádor G1, u 35 o GII a u 5 o nádor GIII.

Následná adjuvantní intravezikální terapie byla indikována dle obvyklých kritérií. Intravezikální imunoterapie BCG vakcínou byla použita u nemocných s nádory GIII, případně mnohočetnými nebo recidivujícími nádory GII a intravezikální chemoterapie mitomycinem C (MMC) u pacientů s recidivujícími a mnohočetnými nádory GI. Celkem byla BCG podána u 11 a MMC u 5 nemocných.

Všichni pacienti s nádory měchýře byli dále sledováni pomocí pravidelných cystoskopických a cytologických kontrol, z nichž první proběhla 3 měsíce po TUR. Jejich další frekvence závisela na TNM klasifikaci a histologické diferenciaci primárního tumoru. V případě podezřelého nálezu při cystoskopii následovala biopsie a histologické vyšetření suspektního ložiska. Recidiva, případně progresie nádoru do invazivní formy byly vždy potvrzeny histologicky.

Izolace RNA a semikvantitativní analýza *PAX5* a *Shb* pomocí reverzní polymerázové řetězové reakce (RT-PCR)

K izolaci mRNA byla použita souprava *Oligotex Direct mRNA Midi Kit* firmy Qiagen dle návodu výrobce. U každého vzorku bylo analyzováno 100 pg mRNA pomocí soupravy *Qiagen OneStep RT-PCR Kit*. Kromě toho byly všechny vzorky nádorové tkáně vyšetřeny též postupem polymerázové řetězové reakce (PCR), avšak bez kroku s reverzní transkriptázou k získání negativně slepých pokusů. Při analýze genů *PAX5*, *SHB* a *GAPDH* se protokol PCR skládal z reverzní transkripce po dobu 30 minut při 50 °C, z aktivčního startovacího kroku PCR po dobu 15 minut při 95 °C, z 35 cyklů denaturace 1 minutu při 94 °C, z hybridizace primerů 1 minutu při 65 °C a extenze 1 minutu při 72 °C a z finální extenze po dobu 10 minut při 72 °C. Použité primery a velikosti produktů byly následující: *PAX5* (500 bp), 5'-CCCTGGAGGAAGAGAGGAAG-3' a 5'-GACGACATGAAGGCCAATCT-3', *SHB* (200 bp), 5'-GAGACATGCAGTGGTGTGCT-3' a 5'-CAAGAGCAAAGCAGGAAAGG-3' a *GAPDH* (300 bp), 5'-TGTGGTCATGATCCTTCCA-3' a 5'-CGATGATCCCTCCAAATCAA-3'. K ověření, že bylo použito stejné množství RNA, byly všechny vzorky testovány na přítomnost provozního genu glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázy (*GAPDH*). Produkty PCR byly následně elektroforeticky rozděleny na 2% agarózovém gelu. Gely byly obarveny pomocí etidiumbromidu a množství produktu bylo kvantifikováno pomocí programu *Kodak Digital Science ID*.

Analýza mutací genu *p53*

Genomová DNA byla izolována ze zamrazených tkáňových vzorků pomocí soupravy *QIAamp DNA Mini Kit* firmy Qiagen. Ve všech 61 zkoumaných vzorcích byly analyzovány exony 5-8 genu *p53* pomocí metody SSCP (*single strand conformation polymorphism*). Náhodně nebo na základě výsledků metody SSCP vybrané vzorky byly sekvenovány přístrojem *ABI 310 Prism*; primery a podmínky PCR k amplifikaci DNA byly popsány již dříve [11]. K analýze SSCP byly sekvence jednotlivých exonů amplifikovány s primery uvedenými výše v kombinaci s dalšími primery: e5B 5'-TCAGTGAGGAATCAGAGGCTG-3', e6F 5'-CCTCTGATTCCTCACTGATTGC-3' a e8B 5'-TAAGTGCACCTTGGTCTCTC-3'. Alikvoty produktů PCR se denaturovaly po přidání nanášecího pufru obsahujícího formamid a separovaly se pomocí soupravy *GeneGel Excel 12,5/24 Kit* a elektroforetického zařízení *GenePhor* za podmínek doporučených dodavatelem (AP Biotech). Gely se barvily pomocí soupravy *PlusOne DNA Silver Staining Kit* (AP Biotech).

Imunohistochemické vyšetření *p53*

K analýze jaderné exprese proteinu *p53* byla použita monoklonální protilátka DO-1, přičemž preparát byl zpracován již dříve popsanou metodikou [12]. Výsledek byl vyjádřen semikvantita-

tivním způsobem pomocí tzv. HSCORE [13]. Tato metoda, jejíž přesný postup byl popsán v pilotní studii [12], bere v potaz kromě počtu pozitivních jader rovněž intenzitu jejich zbarvení. Výsledná hodnota se pohybuje mezi HS 100 při úplné absenci jaderné pozitivivity a HS 400 u vzorků se silnou pozitivitou všech jader.

Ke statistické analýze byl použit software SAS (*Statistical Analysis System*) pro Windows, verze 8.2 (SAS Inc., Cary, NC, USA).

VÝSLEDKY

Expresí genů PAX5 a Shb

Analýzu exprese genu *PAX5*, respektive *Shb* se podařilo provést u 60 pacientů, u 1 nemocného s nádorem pTaG1 zabránilo vyšetření nedostatečné množství dostupné nádorové tkáně.

Přítomnost exprese *PAX5* byla potvrzena u 50 pacientů s nádory močového měchýře (83,3 %), v 10 případech (16,7 %) nebyla exprese přítomna. Všechny *PAX5* negativní vzorky se objevily pouze u nádorů GI nebo GII (tab. 1).

Pozitivita exprese genu *Shb* byla s 52 případy (86,7 %) dokonce ještě častější, v tomto případě se však negativní výsledky objevily u nádorů všech stupňů diferenciaci. U žádného z 8 pacientů z kontrolní skupiny nebyla prokázána přítomnost exprese *PAX5* ani *Shb*.

Analýza mutací genu p53

Analýza mutací *p53* byla provedena u 60 pacientů. U 1 nemocného s nádorem pTaG1 se nepodařilo vyšetření provést pro nedostatečné množství dostupné nádorové tkáně. Mutace *p53* (exon 5, delece prolinu 128) byla potvrzena u jediného pacienta (1,7 %) s tumorem klasifikovaným jako pTaG2. Prokázána byla současně intenzivní exprese proteinu *p53* (HS 325,25), ale i genu *PAX5* (0,33), respektive *Shb* (0,42). U pacienta došlo během 12 měsíců k progresi onemocnění do nádoru infiltrujícího svalovinu detruzoru.

Imunohistochemické vyšetření p53

Hodnota HS byla spolehlivě posouzena u 58 pacientů. U 3 nemocných (1krát pTaG1, 2krát pTaG2) se objevily v preparátu mechanické artefakty způsobující nespecifickou pozitivitu, případně byl k dispozici malý objem vzorku, který byl spotřebován na rutinní histopatologické vyšetření.

Pouze u 3 pacientů nebyla přítomna žádná jaderná imunoreaktivita. U ostatních 55 nemocných se objevil pozitivní výsledek v rozsahu od HS 102 do HS 344. Nebyla zaznamenána souvislost mezi kvantitou exprese *PAX5* a proteinu *p53* (*Spearman correlation coefficient* 0,065, $p < 0,64$).

Prognostický význam PAX5, Shb a p53

Během průměrné doby sledování 21,2 měsíců (9 – 34 měsíců) došlo u 37 (60,7 %) pacientů k 1 nebo více recidivám a 8 (13,1 %) nádorů progredovalo do invazivní formy onemocnění.

U pacientů s budoucí recidivou byly průměrné hodnoty *PAX5* a *HS* vyšší než u pacientů, kteří nerecidivovali, rozdíl byl však statisticky významný pouze v případě *HS*. Obdobný rozdíl jsme zaznamenali rovněž ve skupinách s progresí a bez progresi nádoru, zde však rozdíly nedosáhly statistické významnosti (tab. 2).

V případě genu *Shb* byly průměrné hodnoty ve skupinách s recidivou, respektive progresí onemocnění dokonce nepatrně nižší než u nemocných, u kterých se recidiva, respektive progresi neobjevily (tab. 2).

Pro praktické využití exprese *PAX5* a proteinu *p53* k prognostickým účelům jsme se pokusili doporučit prahové hodnoty. Jako

optimální se jeví prahová hodnota 0,2 pro *PAX5*, respektive *HS* 200 pro *p53*. Při použití těchto hodnot mělo v případech *PAX5* 16 nemocných (26,7 %) a v případech *p53* 33 (56,9 %) nemocných pozitivní nález. Vztah takto hodnoceného nálezu a dalšího průběhu malignity vyplývá z tab. 3. Za pozornost stojí skutečnost, že z celkového počtu 8 progredujících pacientů mělo 7 nadprahovou hodnotu *HS* a 4 nadprahovou hodnotu *PAX5*. Statistické hodnocení však neprokázalo signifikantní prognostický význam ani v případech *PAX5* ani *p53*.

DISKUSE

Podstatou nádorového růstu je buněčná proliferace, která se vymkla zákonitostem zdravých tkání. Dle současných představ se jedná o složitý a několikastupňový proces, na kterém se zřejmě významnou měrou uplatňuje porucha funkce genů regulujících průběh buněčného cyklu.

Skupina *PAX* genů je tvořena 9 členy kódujícími jaderné transkripční faktory. Patří mezi tzv. vývojové regulační geny, které ovlivňují za fyziologických okolností průběh buněčného cyklu v určité fázi embryonálního vývoje. Vzhledem k jejich expresi v mitoticky vysoce aktivních nediferencovaných buňkách jsou považovány za možné kandidáty protoonkogenů a jejich onkogenní potenciál byl prokázán i v pokusech na myších [14]. Předpokládáme, že patologická exprese *PAX* genů v nádorové tkáni může podporovat dediferenciaci terminálně diferencovaných buněk, což by představovalo jakýsi opak jejich fyziologické embryonální funkce.

Námi studovaný gen *PAX5* se uplatňuje při tvorbě CNS a je vyjádřen v časných stádiích vývoje B-lymfocytů. Jeho exprese se však prudce snižuje před dosažením terminální diferenciaci [4,5]. Jeho patologická exprese byla popsána u malignit souvisejících s těmito systémy, jako jsou astrocytomy, meduloblastomy nebo non-Hodgkinské lymfomy.

Zájem o gen *PAX5* u nádorů měchýře je podporován skutečností, že chromozom 9, na kterém je jeho lokus uložen (konkrétně 9p13), je nejčastějším místem genetických anomálií popisovaných v souvislosti s touto malignitou. Ztráta heterozygosity na chromozomu 9 byla pozorována u více než 70 % uroteliálních karcinomů měchýře, přičemž se objevuje u nádorů všech stadií i gradů [15,16,17]. Na chromozomu 9 předpokládáme existenci nejméně dvou lokusů nesoucích nádorové supresorové geny, z nichž jeden je lokalizován na 9p21-22, tedy v blízkosti lokusu genu *PAX5* [15].

Přítomnost exprese RNA genu *PAX5* byla již dříve prokázána *in vitro* u 3 uroteliálních buněčných linií (MGH-U1, HT-1376 a RT112) a ve tkáni 79 % uroteliálních nádorů měchýře [8]. Naše výsledky tato pozorování potvrzují, když byla exprese mRNA *PAX5* nalezena u 83 % povrchových nádorů močového měchýře.

U nádorů mozku byla popsána přímá signifikantní závislost exprese *PAX5* na stoupající agresivitě malignity a podobný vztah byl pozorován i u nádorů měchýře, i když zde nebyl tak výrazný [6,7,8]. V naší studii jsme zaznamenali absenci negativních výsledků u nádorů G3, jednoznačná závislost na TNM, respektive histologické klasifikaci však nalezena nebyla.

Vysoký počet *PAX5* pozitivních nálezu u dobře diferencovaných povrchových nádorů měchýře naznačuje, že se patologická exprese genu *PAX5* uplatňuje spíše v počátečních fázích vývoje uroteliálních tumorů.

Málo je známo o konkrétním mechanismu uplatnění genu *PAX5* v procesu kancerogeneze, případně o jeho vztahu k jiným genům. Jeho již zmíněná lokalizace na krátkém raménku chromo-

zomu 9 (9p) sice svádí k diskusím o možném vztahu k nádorovému supresorovému genu na 9p21-22, tyto úvahy však nepřekročily rámec spekulací a blíže studovány nebyly [8]. V případě astrocytomů byla pozorována koincidence *PAX5* exprese s expresí receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), u nádorů měchýře však tato skutečnost rovněž studována nebyla [6].

Zajímavá byla pozorování nepřímé závislosti mezi expresí *PAX5* a expresí proteinu *p53* u astrocytomů [18]. Následné *in vitro* experimenty prokázaly schopnost proteinu *PAX5* vázat se na určitou sekvenci v 5' regulační oblasti lidského genu *p53* s následným snížením jeho aktivity [18]. V našem souboru jsme negativní závislost mezi kvantitou exprese *PAX5* a proteinu *p53* nepozorovali. V této souvislosti je však nutno zdůraznit, že ani průkazy přinesené Stuartem nejsou jednoznačné [18]. Absence imunohistochemické positivity *p53* totiž nemůže rozlišit mezi situací fyziologickou, spojenou s přítomností normálního, tzv. *wild-type p53*, a situací spojenou s patologickým potlačením *p53* aktivity. Považujeme-li navíc gen *PAX5* za onkogen, nezdá se být přímá závislost funkce těchto genů ani teoreticky příliš pravděpodobná.

Lokus genu *Shb* je lokalizován na 9p v těsné blízkosti lokusu genu *PAX5*. Jím kódovaný protein *Shb* se uplatňuje při přenosu signálu do jádra buňky a gen tedy můžeme zařadit mezi potenciální onkogeny. Funkce a význam patologie *Shb* byl doposud studován zvláště v souvislosti s endokrinní aktivitou β -buněk pankreatu, kde byla prokázána jeho role při buněčné diferenciaci a indukci apoptózy [9]. Naše výsledky ukazují přítomnost jeho exprese ve tkáni většiny hodnocených nádorů, nepozorovali jsme však žádnou souvislost mezi její kvantitou a klasifikací nebo prognózou malignity.

Nádorový supresorový gen *p53* je klíčovým genem v kancerogenezi zodpovědným za kontrolu průběhu buněčného cyklu a ochranu integrity genomu [19]. Přesto, že je v posledním dese-

tileti nejčastěji studovaným genem u nádorů močového měchýře, nepodařilo se přesně a jednoznačně definovat jeho konkrétní roli při vzniku této malignity, ani prognostický význam jeho patologie.

Mutace genu *p53* jsou častou anomálií u mnoha malignit. Mutace mohou stabilizovat protein *p53* a způsobovat tak jeho jadernou akumulaci, což umožňuje imunohistochemickou detekci [20]. První studie zabývající se touto problematikou sice zaznamenaly vysokou korelaci mezi imunohistochemickým vyšetřením a průkazem mutací [21,22], novější práce však ukázaly, že jaderní imunoreaktivita nemusí být vždy spojena s přítomností mutace *p53* [23]. Mutace *p53* se uplatňují zřejmě až v souvislosti s progresí nádoru močového měchýře, pro což svědčí vyšší četnost mutací u nádorů invazivních. Naopak u povrchových nádorů je jejich výskyt poměrně vzácný, přičemž bývá spojený s agresivním průběhem onemocnění [24,25]. Naše výsledky to potvrzují, když jsme zachytili mutaci pouze v jediném případě z 60 nemocných. U tohoto pacienta došlo během několika měsíců k progresi malignity. Velmi nízká četnost mutací *p53* v našem souboru sice může být vysvětlena limitovanou senzitivitou metody SSCP, jejíž celková efektivita je odhadována na 70 – 95 %, je však nutno zdůraznit, že i jiní autoři pozorovali podobně řídký výskyt i na větších souborech pacientů [25,26]. Procento *p53* pozitivních nálezu při imunohistochemickém vyšetření se pohybuje v literatuře mezi 3 a 78 % [shrnutí viz 27]. Variabilita výsledků je jistě ovlivněna řadou faktorů, jako jsou rozdíly ve zpracování vzorku, typu použité protilátky, interpretaci imunohistochemického nálezu nebo ve složení studovaného souboru.

V naší studii jsme pracovali s protilátkou DO1, jejíž použití v předešlých studiích přineslo slibné výsledky [27]. K posouzení imunohistochemického nálezu jsme použili semikvantitativní hodnocení, které bere v úvahu rovněž intenzitu positivity v jednotlivých jádrech. Podobně jako jiní autoři se domníváme, že tento

Expresce <i>PAX5</i> a <i>Shb</i>	GI	GII	GIII	pTa	pT1	Celkově
<i>PAX5</i> pozitivní	17 (85 %)	28 (80 %)	5 (100 %)	31 (79,5 %)	19 (90,5 %)	50 (83,3 %)
<i>PAX5</i> negativní	3 (15 %)	7 (20 %)	0 (0 %)	8 (20,5 %)	2 (9,5 %)	10 (16,7 %)
<i>Shb</i> pozitivní	18 (90 %)	31 (88,6 %)	3 (60 %)	35 (89,7 %)	17 (81 %)	52 (86,7 %)
<i>Shb</i> negativní	2 (10%)	4 (11,4 %)	2 (40 %)	4 (10,3 %)	4 (19 %)	8 (13,3 %)

Tab. 1. Vztah TNM, respektive histologické klasifikace nádoru a přítomnosti exprese genu *PAX5* a *Shb*.

	Recidivy			Progrese		
	Ano	Ne		Ano	Ne	
<i>PAX5</i>	0,1317	0,0933	NS	0,1436	0,1114	NS
<i>Shb</i>	0,2005	0,2030	NS	0,1838	0,2043	NS
<i>p53</i> (HS)	226,27	194,40	P < 0,04	242,73	209,27	NS

Tab. 2. Vztah mezi dalším průběhem onemocnění a průměrnými hodnotami exprese *PAX5*, *Shb* a proteinu *p53* (HS).

	Recidivy		Progrese	
	Ano	Ne	Ano	Ne
<i>PAX5</i> < 0,2	24 (54,5 %)	20 (45,5 %)	4 (10 %)	40 (90 %)
<i>PAX5</i> > 0,2	12 (75 %)	4 (25 %)	4 (25 %)	12 (75 %)
HS < 200	12 (48 %)	13 (52 %)	1 (4 %)	24 (96 %)
HS > 200	24 (72,7 %)	9 (27,3 %)	7 (21,2 %)	26 (78,8 %)

Tab. 3. Vztah exprese *PAX5*, respektive proteinu *p53* a dalšího průběhu onemocnění při použití hraniční hodnoty 0,2 pro *PAX5*, respektive HS 200 pro *p53*. Hodnoceno bylo 60 pacientů u *PAX5* a 58 pacientů u *p53*.

způsob hodnocení nálezu umožní přesnější a objektivnější posouzení získaného obrazu [28]. Při použití prahové hodnoty HS 200 bylo 33 (56,9 %) vzorků pozitivních. Je tedy zřejmé, že imunohistochemická pozitivita *p53* se objevuje i u pacientů, kde nebyla mutace genu prokázána. Vysvětlení tohoto jevu není doposud zcela jasné. Pozitivní barvení je spojeno se stabilizací nebo poklesem degradace proteinu *p53*. Kromě mutace může být příčinou například delece nebo hypermetylace genu, porucha posttranslační modifikace nebo konformace, vazba virového onkogenu nebo chybná lokalizace proteinu v buňce. Vysvětlením však může být i defekt v dráze *p53*, který se netýká přímo studovaného proteinu [29].

I přes semikvantitativní způsob hodnocení imunohistochemického nálezu nevybočují naše výsledky z nejednoznačných a rozporuplných závěrů jiných prací při hodnocení vztahu mezi expresí *p53* a prognózou povrchových TCC močového měchýře [27,28,30-34]. Stejně tak nemůžeme jednoznačně posoudit ani prognostický význam exprese *PAX5*. Zdá se, že vysoká exprese *PAX5* i vysoké HS jsou spojeny s větší četností recidiv i progresí onemocnění, statisticky významný průkaz tohoto tvrzení však naše výsledky neposkytují. V této souvislosti si však jsme vědomi slabín naší studie daných limitovaným počtem vyšetřených pacientů, společným hodnocením různých typů povrchových nádorů i omezenou dobou sledování. Definitivní posouzení prognostického přínosu semikvantitativního hodnocení exprese *PAX5* i proteinu *p53* umožní až další studie zahrnující větší počet pacientů rozčleněných do podskupin dle TNM a histologické klasifikace, případně dle četnosti předchozích recidiv.

ZÁVĚR

Expresí genu *PAX5* je častým nálezem u povrchových uroteliálních nádorů močového měchýře, kde se objevuje u nádorů všech gradů. Mutace genu *p53* jsou naopak vzácné a jsou spojeny s agresivním chováním malignity. Imunohistochemická pozitivita *p53* se objevuje i u pacientů bez prokázané mutace, přičemž její kvantita nekoreluje s kvantitou exprese genu *PAX5*. Z prognostického hlediska se zdá, že vysoké exprese *PAX5* i *p53* jsou spojeny s větší četností recidiv i progresí onemocnění, jednoznačný statisticky významný průkaz tohoto tvrzení však naše výsledky neposkytují.

Poděkování

Práce byla podpořena grantem IGA MZ NC 5961-3.

LITERATURA

- Ondruš D et al. Nádory močového měchýře. Martin, Osveta 2000, 256 s.
- Kurth KH, Bouffieux C, Sylvester R, van der Meijden APM, Oosterlinck W et al. Treatment of superficial bladder tumors: achievements and needs. Eur Urol 2000; 37 (Suppl 3): 1-9.
- Pacik D, Vít V, Turjanica M. Úskalí intravezikální imunoterapie povrchového karcinomu močového měchýře BCG vakcínou. Rozhl Chir 1997; 76: 3-5.
- Urbánek P, Wang Z-Q, Fetka I, Wagner EF, Busslinger M. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. Cell 1994; 79: 901-912.
- Nutt L, Thevenin C, Busslinger M. Essential functions of Pax-5 (BSAP) in pro-B cell development. Immunobiol 1997; 198: 227-235.
- Stuart ET, Kioussi Ch, Aguzzi A, Gruss P. PAX5 expression correlates with increasing malignancy in human astrocytomas. Clinical Cancer Res 1995; 1: 207-214.
- Kozmik Z, Sure U, Rüedi D, Busslinger M, Aguzzi A. Deregulated expression of PAX5 in medulloblastoma. Proc Natl Acad Sci 1995; 92: 5709-5713.
- Adsheed JM, Ogden CW, Penny MA, Stuart ET, Kessling AM. The expression of PAX5 in human transitional cell carcinoma of the bladder: relationship with differentiation. British J Urol International 1999; 83: 1039-1044.
- Mareš J. Buněčná proliferace pankreatických b-buněk. Praha, Galén 2001, Edice Alma Mater, 100 s.
- Sobin LH, Wittekind C. UICC TNM classification of malignant tumours, 5th ed, New York, Wiley Liss 1997: 187-190.
- Sedláček Z, Kodet R, Kříž V, Seemanová E, Vodvarka P et al. Two Li-Fraumeni syndrome families with novel germline *p53* mutations: loss of the wild type allele in only 50% of tumours. Brit J Cancer 1998; 77: 1034-1039.
- Babjuk M, Dušková J, Dvořáček J et al. Prognostický význam imunohistochemického stanovení *p53* ve tkáni povrchových nádorů močového měchýře. Česká urologie 2000; 4: 20-25.
- Mc Carty KS jr, Miller LS, Cox EB, Konrath J, Mc Carty KS sr. Estrogen receptor analyses: Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. Arch Pathol Lab Med 1985; 109: 716-721.
- Maulbecker CC, Gruss P. The oncogenic potential of Pax genes. EMBO J 1993; 12: 2361-2397.
- Orlow I, Lianes P, Lacombe L, Dalbagni G, Reuter VE, Cordon-Cardo C. Chromosome 9 allelic losses and microsatellite alterations in human bladder tumors. Cancer Res 1994; 54: 2848-2851.
- Shigyo M, Sugano K, Fukayama N, Taniguchi T, Tobisu K et al. Allelic loss on chromosome 9 in bladder cancer tissues and urine samples detected by blunt-end single-strand DNA conformation polymorphism. Int J Cancer 1998; 78: 425-429.
- Cairns P, Shaw ME, Knowles MA. Initiation of bladder cancer may involve deletions of a tumor suppressor gene on chromosome 9. Oncogene 8, 1993: 1083-1085.
- Stuart ET, Haffner R, Oren M, Gruss P. Loss of *p53* function through PAX-mediated transcriptional repression. The EMBO J 14, 1995: 5638-5645.
- Levine AJ. *p53*, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 1997; 88: 323-331.
- Bártek J, Iggo R, Gannon J, Lane DP. Genetic and immunochemical analysis of mutant *p53* in human breast cancer cell lines. Oncogene 1990; 5: 893-899.
- Esrig D, Spruck CH, Nichols PW, Chaiwun B, Steven K et al. *p53* nuclear protein accumulation correlates with mutations in the *p53* gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. Am J Pathol 1993; 143: 1389-1397.
- Cordon-Cardo C, Dalbagni G, Saez GT, Oliva MR, Zhang Z-F et al. *p53* mutations in human bladder cancer: geotypic versus phenotypic patterns. Int J Cancer 1994; 56: 347-353.
- Abdel-Fattah R, Challen C, Griffiths TRL, Robinson MC, Neal DE et al. Alterations of TP53 in microdissected transitional cell carcinoma of the human urinary bladder: high frequency of TP53 accumulation in the absence of detected mutations is associated with poor prognosis. Br J Cancer 1998; 77: 2230-2238.
- Spruck CH, Ohneseit P, Gonzalez-Zulueta M, Esrig D, Miyao N et al. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. Cancer Res 1994; 54: 784-788.
- Berggren P, Steineck G, Adolfsson J, Hansson J, Jansson O et al. *p53* mutations in urinary bladder cancer. Br J Cancer 2001; 84: 1505-1511.
- Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. Nat Genet 1993; 5: 111-117.
- Schmitz-Dräger BJ, Goebell PJ, Ebert T, Fradet Y. *p53* immunohistochemistry as a prognostic marker in bladder cancer. Playground for urology scientists? Eur Urol 2000; 38: 691-700.
- Reiher F, Ozer O, Pins M, Jovanovic BD, Eggenet: et al. *p53* and microvessel density in primary resection specimens of superficial bladder cancer. J Urol 2002; 167: 1469-1474.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the *p53* network. Nature 2000; 408: 307-310.
- Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang Z-F, Sheinfeld J et al. Nuclear overexpression of *p53* protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. J Natl Cancer Inst 1993; 85: 53-59.
- Serth J, Kuczyk MA, Bokmeyer C, Hervatin C, Nafe R et al. *p53* immunohistochemistry as an independent prognostic factor for superficial transitional cell carcinoma of the bladder. Br J Cancer 1995; 71: 201-205.
- Gardiner RA, Walsh MD, Allen V, Rahman V, Samarasinghe MLTH et al. Immunohistological expression of *p53* in primary pT1 transitional cell bladder cancer in relation to tumour progression. Br J Urol 1993; 73: 526-532.
- Gontero P, Casetta G, Zitella A, Ballario R, Pacchioni D et al. Evaluation of *p53* protein overexpression, Ki67 proliferative activity and mitotic index as markers of tumour recurrence in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. Eur Urol 2000; 38: 287-296.
- Llopis J, Alcaraz A, Ribal MJ, Solé M, Ventura PJ et al. *p53* expression predicts progression and poor survival in T1 bladder tumours. Eur Urol 2000; 37: 644-653.

MUDr. Marek Babjuk
Urologická klinika VFN a 1. LF UK
Ke Karlovu 6
128 08 Praha 2