

Скендер САИДИ¹, Живко ПОПОВ^{1,2}, Сашо ПАНОВ³

УЛОГАТА НА *p53* ВО МОЛЕКУЛАРНАТА ПАТОГЕНЕЗА НА МАЛИГНИТЕ НЕОПЛАЗМИ НА УРИНАРНИОТ ТРАКТ

Апстракт

Карциномот на мочниот меур е значаен здравствен проблем и четврто најчесто малигно заболување во западните земји. Карциномот на простатата е еден од најчестите малигни заболувања кај мажите. Инциденцата рапидно расте во последните години поради продолжувањето на животниот век и поради воведувањето на пософистицирани дијагностички методи.

Тумор-супресорскиот ген *p53* го кодира истоимениот протеин кој дејствува како транскрипциски фактор и се активира при различни типови клеточни стресови, вклучувајќи ги оштетувањето на DNA и онкогенската активација, поттикнувајќи каскада од молекуларни случувања кои доведуваат до прекин на клеточниот циклус, репарацијата на DNA и на апоптозата. Мутациите во генот *p53* се најчести генетски промени кај карциномите кај луѓето вклучувајќи го и карциномот на мочниот меур.

Во оваа студија беа анализирани ткивни примероци од 70 пациенти со хистопатолошки потврден, примарен уроепителен карцином на мочниот меур, како и од негативна контролна група која ја сочину-

¹ Универзитетска клиника за урологија, Клинички центар Скопје, ул. „Водњанска“ 17, 1000 Скопје, Република Северна Македонија

² Македонска академија на науките и уметностите, бул. „Крсте Мисирков“ бр. 2, 1000 Скопје, Република Северна Македонија

³ Одделение за молекуларна биологија и генетика, Институт за биологија, Природно-математички факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, ул. „Архимедова“ 3, 1000 Скопје, Република Северна Македонија

ваат примероци на хистолошки нормална мукоза од мочен меур на 40 пациенти со немалигни заболувања. Квантитативната детекција на протеинот p53 беше определена со имунофлуоресценција. Во студијата за карциномот на простатата се вклучени 83 пациенти, од кои испитуваната група се состои од 43 пациенти со хистопатолошки верификуван карцином на простата кај кои е направена радикална простатектомија, додека контролната група се состои од 40 пациенти со бенигна хиперплазија на простатата, кај кои е направена трансуретрална ресекција на простатата или трансвезикална простатектомија. Кај сите примероци, евалуирана е нуклеарната експресија на протеинот p53, со имунохисто-хемиска метода.

Кај примероците од карцином на мочниот меур, експресијата на протеинот p53 во хистолошките пресеци, изразена преку вредностите на коригираниот интензитет на флуоресценцијата, покажаа статистички високо сигнификантни разлики меѓу ниските и високите градуси и стадиуми, како и текот на болеста ($p < 0,01$). Кај карциномот на простатата, експресијата на протеинот p53 е во директна корелација со Глисон скорот (Gleason skor) ($p < 0,0001$), Глисон (Gleason) сумата ($p < 0,0001$), градусот на примарниот тумор ($p < 0,0001$), метастатските лимфни жлезди ($p < 0,0001$) и стадиумот на болеста ($p = 0,026$).

Резултатите од оваа студија индицираат дека протеинот p53 може да има практична употребна вредност во клиничко-патолошката евалуација и во прогностиката на пациентите со карцином на мочниот меур, како и малигниот потенцијал на туморот и прогнозата на карциномот на простатата.

Клучни зборови: карцином на мочниот меур, карцином на простата, протеин p53

Вовед

Карциномот на мочниот меур е значаен здравствен проблем и четврто најчесто малигно заболување во западните земји. Хистолошки,

карциномот на преодниот епител (Transitional cell carcinoma-ТСС) е најчестиот тип и претставува речиси 90 % од сите карциноми на мочниот меур (КММ). Карциномот на простатата (СаР) е еден од најчестите малигни заболувања кај мажите. Инциденцата рапидно расте во последните години поради продолжувањето на животниот век на мажите и поради воведувањето на софистицирани дијагностички методи.

Во текот на последниве триесетина години откриени се голем број генски промени (супституциски мутации, делеции, инсерции, транслокации, инверзии и слично), како и епигенетски промени во примероците од пациенти со малигни неоплазми на уринарниот тракт вклучувајќи ги мочниот меур и простатата.

Мутациите на туморсупресорниот ген *TP53* (познат и како *p53*) се најчести генетски варијации на карциномите кај луѓето вклучувајќи го и карциномот на мочниот меур (1). Протеинот P53 е продукт на истоимениот ген и има улога на транскрипциски фактор инволвиран во клеточната машинерија за заштита од оштетувања на геномот, а со тоа и од малигните алтерации. Од тие причини, овој протеин во литературата е познат и како „чувар“ на геномот (2). Името потекнува од молекуларната маса на протеинот од 53 kDa. Генот *TP53* е лоциран на краткиот крак на хромозомот 17p13.1 (3–5). Функцијата на протеинот p53 е да ги активира протеините кои ја репарираат ДНА, да го блокира клеточниот циклус во точката на проверка G1/S фаза од клеточниот циклус, сè додека репараторните протеини не ги поправат оштетувањата во ДНА-молекулата. Доколку репарацијата на ДНА е невозможна, протеинот p53 ја води клетката кон програмирана клеточна смрт – апоптоза.

Мутираниот протеин p53 не е во состојба ефикасно да ги извршува овие функции за привремено запирање на клеточната делба, па тоа ги води клетките до неконтролирана делба и придонесува во малигната трансформација на клетката (6).

Познато е дека полуживотот на мутираниот протеин p53 е значајно подолг од оној на дивниот тип протеин p53 (7). Акумулацијата на мутираниот протеин p53 во јадрата на малигните клетки е главната причина за зголемената стапка на детекција со имунохистолошките методи вклучувајќи ја и имунофлуоресценцијата.

Досегашните студии покажуваат сигнификантна корелација на експресијата на протеинот p53 со КММ. Нуклеарната експресија кај карциномот на мочен меур, според Попов со сор., изнесува 22 % (8), додека Еке (Еске) и сор. (9), во својата студија изнесува податоци за мутација на TP53 од 44,6 % кај суперфицијалниот и 84,2 % инфилтративниот КММ.

Неколку досегашни испитувања покажаа дека и мутациите на генот p53 и имунохистохемиски детектираната експресија на p53 се независни прогностички биомаркери, укажувајќи дека стабилизацијата на p53, која не е кодирана од мутираниот ген, исто така, може да предизвика аберации во натамошните каскадни реакции на сигналните патишта, кои ја вклучуваат, но не се лимитирани, на експресијата на p21 (10).

Поради овие причини, сосем очекувано е што p53 и генот кој го кодира, се истражуваат екстензивно кај карциномот на мочен меур. Досега, заклучоците од многубројните студии се во насока да го дефинираат p53 како молекуларен маркер, со клинички, патолошки и предиктивни вредности кај оваа малигна неоплазма (8).

Мутацијата на протеинот p53 често се случува при раните фази на CaP која се манифестира со зголемување на клеточните онкопротеини. Квин (Quin) и соработниците проучувале 263 пациенти со CaP кај кои е направена RP. Тие утврдиле голема корелација помеѓу експресијата на протеинот p53 и прогнозата на пациентот. Кај сите шест пациенти умрени за време на студијата имало нуклеарна експресија на над 20 % од клетките со карцином. Исто така, оваа студија покажала висока корелација помеѓу нуклеарната експресија на протеинот p53 и релапсот на болеста (11). Исто така, и Лин (Lin), во својата студија во која биле вклучени 125 пациенти кај кои е направена RP, утврдил позитивна корелација помеѓу експресијата на протеинот p53 и PSA и екстензијата на туморот (12).

Материјал и методи

Во оваа статија, сублимирани се податоците од две студии спроведени врз примероци и податоци од независни групи на пациенти со

карцином на мочниот меур, на простатата и контролни групи на пациенти и за двете неоплазми.

Пациенти за истражувањето на карциномот на мочниот меур

Во студијата за КММ беа анализирани ткивни примероци добиени од вкупно 70 пациенти со хистопатолошки потврден примарен уроепителен карцином на мочниот меур, како и од негативна контролна група, која ја сочинувале примероци на хистолошки нормална мукоза од мочен меур на 40 пациенти со немалигни заболувања. Клиничко-патолошките параметри кои беа користени при статистичките анализи се следниве: хистопатолошкиот градус (I, II и III), стадиум (1. суперфицијален и 2. мускулно-инвазивен) и клиничкиот тек на болеста (во смисла на појавата на рецидиви, метастази или смрт, поврзана со карциномот во текот на 2-годишниот период на евалуација).

Пациенти за истражувањето на карциномот на простатата

Во студијата за карцином на простатата се вклучени 83 пациенти од кои испитуваната група се состои од 43 пациенти со хистопатолошки верификуван карцином на простата, кај кои е направена радикална простатектомија, додека контролната група се состои од 40 пациенти со бенигна хиперплазија на простатата кај кои е направена трансуретрална ресекција на простата или трансвезикална простатектомија. Кај сите примероци евалуирана е нуклеарната експресија на протеинот p53 со имунохистохемиска метода. За степенување на карциномот на простатата, во САД и во ЕУ се употребува Глисон-системот (Gleason). Глисон-системот се базира врз структурните карактеристики на туморот и се состои од пет степени: од градус I – добро диференциран, постепено до градус V – лошо диференциран. За попрецизен опис на малигните карактеристики се употребува Глисон-скорот (Gleason-скорот). При овој опис се употребуваат две карактеристики: примарна е карактеристиката на малигната клетка и секундарна е карактеристиката на зафатеноста на стромата. Врз основа на овој скор-систем, најнизок е 2 (1+1), кој е добро диференциран, а највисок 10 (5+5), кој е лошо диференциран.

Дигитална квантитативна имунофлуоресцентна детекција на p53

Квантитативната детекција на протеинот p53 беше определена со имунофлуоресценција во хистолошките пресеци на ткивните примероци од пациентите со ТСС на мочниот меур. Анализите беа извршени на примероци, претходно фиксирани во формалин и вкалупени во парафин, користејќи ја имунофлуоресцентната сендвич-техника со двојни антитела. Хистолошките ткивни исечоци од пациентите беа добиени од Институтот за патологија при Медицинскиот факултет при УКИМ. Тие беа депарафинизирани со ксилол и рехидрирани. За пристапување кон скриените епитопи беше користен методот на преттретман, со загревање 4-пати по 5 минути, во цитратен пуфер, во микробранова печка, на 800 W. Блокирањето на неспецифичните епитопи се вршеше со 1 % BSA (говедски серум албумин), растворен во PBS, во времетраење од 30 минути. По блокирањето, исечоците беа инкубирани со примерно моноклонално анти-TP53 антитело (Sigma-Aldrich) разредено 150 пати во 1 % BSA во PBS, преку ноќ, на 4 °C. По инкубацијата, препаратите беа исплакнати двапати по 15 минути во HS-PBS (хипертоничен раствор на PBS) и двапати по 15 минути во PBS. Исплакнатите препарати беа инкубирани со секундарно антитело конјугирано со флуоресцин (anti-mouse IgG – FITC conjugate, Sigma-Aldrich), разредено 150 пати со 1 % BSA во PBS, во времетраење од 1 час и 30 минути, на собна температура, во темница. Потоа тие беа исплакнати двапати по 15 минути во HS-PBS и двапати по 15 минути во PBS.

Подготвените хистолошки исечоци беа анализирани со епифлуоресцентен микроскоп (Human, Germany), со филтерски сет за флуоресцин (екситациски максимум 450 nm/30 nm *bandpass*, емисионски максимум 540 nm/30 nm *bandpass*). Селектирани делови од исечоците беа фотографирани со дигитална камера (Canon) интегрирана на епифлуоресцентниот микроскоп.

Дигиталните слики беа снимани и анализирани со софтверот ImageJ v.1.46g. Од секој пациент беа анализирани најмалку 50 малигни клетки. Средните заднински вредности потоа беа одземени од средната вредност на интензитетот на p53-специфичната флуоресценција на малигните клеточни јадра со цел да се добијат коригираните просечни вредности на интензитетот на флуоресценцијата (CFI) за секој пациент

одделно. Како негативна контрола се користеа хистолошки нормални примероци од мукозата на мочниот меур, и слични анализи беа направени на јадрата од епителните клетки.

Статистички анализи

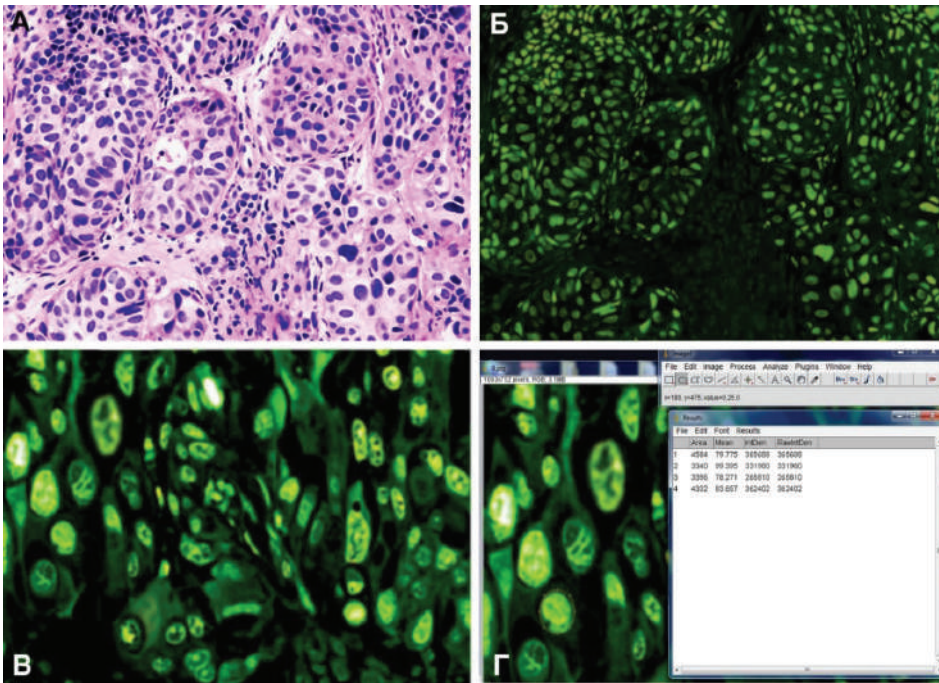
Компјутерската обработка беше направена со MS Office Excel 2016, со инсталиран софтверски додаток XLSTAT 2016. Основната обработка вклучуваше дескриптивни статистички анализи: дистрибуцијата на континуираните варијабли е прикажана со мерки на централна тенденција (средна вредност – mean, минимални и максимални вредности), како и вредност на варијабилноста (стандардна девијација – SD). Категоричките варијабли се прикажани како фреквенции (број и процент).

Корелациите меѓу молекуларните параметри добиени од определувањето на имунофлуоресцентната детекција на протеинот p53 во однос на хистопатолошкиот градус и стадиум, како и во однос на појавата на рецидиви, метастази и на смрт, поврзана со болеста, во текот на две години по добивањето на ткивото беа споредувани со користење параметарските и непараметриските анализи: Студентов *t*-тест и квадрат-тестот (со Yates-ова корекција).

Вредностите за *p* помали од 0,05 се сметаа за статистички значајни, а помалите од 0,01 за статистички високозначајни.

Резултати

Дигиталната анализа на јадрениот интензитет на флуоресценција во хистолошките пресеци на ткивните примероци од пациентите со КММ е презентирана на **слика 1**.



Слика 1 – Приказ на квантитативната дигитална анализа на застапеноста на p53 во хистолошки примероци на КММ. Заради ориентација и споредба, користени се стандардни хистолошки препарати обоени со хематоксин-еозин и анализирани под светлосен микроскоп (А). Дигитална фотографија од истиот регион на хистолошки пресек со имунофлуоресцентната визуализација на p53 под флуоресцентен микроскоп (објективно зголемување: 100 X) (Б). Поголемо зголемување на претходниот регион (објективно зголемување: 400 X) (В). Софтверска анализа на дигитална слика од имунофлуоресцентно прикажаниот p53 при која се мери интензитетот на флуоресценцијата на јадрата на малигните клетки (Г). Имунофлуоресценцијата беше дифузна и речиси униформна во јадрата на малигните клетки од испитаните ткивни примероци на сите испитани случаи.

Резултатите од статистичките анализи на споредбата на јадрениот интензитет на флуоресцентна детекција на p53 во хистолошките пресеци во однос на основните клиничко-патолошки параметри на КММ се прикажани во **табелите 1–3**.

Табела 1

Дистрибуција на флуоресцентниот интензитет на детектираниот p53 во јадрата на клетките во однос на градусите на КММ и контролната група

Параметри	КММ градус			Контролна група
	1	2	3	
Градус	1	2	3	0
n	5	42	23	40
Средна вредност	47,11	54,00	104,21	0,92
Стандардна грешка (SE)	6,11	1,74	2,45	0,07
t-тест (I и II)	0,330645769		/	/
t-тест (II и III)	/	1,26139 x10⁻²⁰		/
t-тест (I и III)	0,0002			/

Табела 2

Дистрибуција на флуоресцентниот интензитет на детектираниот p53 во јадрата на клетките во однос на стадиумите на КММ и контролната група

Параметри	КММ стадиум		Контролна група
	Супер-фицијален	Мускулно-инвазивен	
Стадиум			0
n	53	17	40
Средна вредност	60,68	96,67	0,92
Стандардна грешка (SE)	3,04	4,28	0,07
t-тест (суперф. и муск. иназивен)	1,4009 x10⁻⁸		/
t-тест (суперф. и контрол. гр.)	1,7775 x10⁻²⁵		
t-тест (муск. иназивен и контрол. гр.)	/	1,0333 x10⁻¹³	

Табела 3

Дистрибуција на флуоресцентниот интензитет на детектираниот p53 во јадрата на клетките во однос на текот на болеста на КММ и контролната група

Параметри	Тек на болеста		Контролна група
	Без рецидиви, метастази или смрт во текот на 2 години	Рецидиви, метастази или смрт во текот на 2 години	
Тек на болеста			0
n	44	26	40
Средна вредност	0,93	2,37	0,58
Стандардна грешка (SE)	0,20	0,54	0,03
t-тест (без и со рецидиви)	0,0046		/
t-тест (без и контрол. гр.)	0,1055		
t-тест (рецидиви и контрол. гр.)	/	0,0001	

Од прикажаните резултати е евидентно дека разликите на протеинската експресија на p53 се разликуваат со статистички висока значајност ($p < 0,01$) меѓу нискиот и високиот градус на диференцијација на КММ, суперфицијалниот и мускулно-инвазивниот стадиум, како и клиничкиот тек на болеста (појавата на рецидиви и метастази во текот на 2-годишниот евалуациски период).

Имунохистохемиското боење на препаратите со CaP покажа дека нуклеарната експресија на p53 протеинот е забележена кај 28 %, додека кај контролната група, односно примероците со бенигна хиперплазија на простата, резултатите се негативни.

Резултатите од статистичките анализи во однос на истражувањето на протеинската експресија на p53 кај карциномот на простатата со t-тестот се прикажани во **табелите 4–6**.

Табела 4

Дистрибуцијата на имунохистохемиската детекција на p53 протеинот во однос на Gleason скорот

p53 протеин	Gleason-скор										Вкупно	p
	2+2	2+3	3+2	3+3	3+4	4+3	4+4	4+5	5+4	5+5		
Негативен	0	1	0	5	19	3	3	0	0	0	31	<0,00001
Позитивен	0	1	0	2	7	1	1	0	0	0	12	
Вкупно	0	2	0	7	26	4	4	0	0	0	43	

Табела 5

Дистрибуцијата на имунохистохемиската детекција на p53 протеинот во однос на Gleason-сумата

p53 протеин	Gleason-сума							Вкупно	p
	4	5	6	7	8	9	10		
Негативен	0	1	5	22	3	0	0	31	<0,00001
Позитивен	0	1	2	8	1	0	0	12	
Вкупно	0	2	7	30	4	0	0	43	

Табела 6

Дистрибуцијата на имунохистохемиската детекција на p53 протеинот во однос на Gleason-градусот

p53 протеин	Gleason-градус				Вкупно	p
	1	2	3	4		
Негативен		1	24	6	31	<0,00001
Позитивен		1	9	2	12	
Вкупно		2	33	8	43	

Прикажаните резултати индицираат дека дистрибуцијата на вредностите на Gleason скорот, сумата и градусот зависат статистички високосигнификантно од експресијата на p53 протеинот ($p < 0,00001$).

Дискусија

Имунохистохемиските испитувања фокусирани на евалуација на експресијата на p53 и јадрената акумулација кај примероци од карцином на мочен меур се опишани одамна (13, 14). Всушност, генот p53 и неговиот протеински продукт p53 се најчесто истражувани молекуларни маркери кај ракот на мочниот меур (15).

Иако поранешните истражувања покажаа дека p53 се детектира кај повисоките стадиуми и градуси на КММ (13, 14), други истражувања доведоа до различни заклучоци кои се делумно контрадикторни. Тие разлики меѓу истражувањата можат да се должат на разликите во популациите на пациентите, во различниот дизајн на студиите и на други фактори (16). Освен тоа, методолошкиот пристап употребен во различните студии може да биде барем делумно одговорен за разликите и слабата репродуктабилност на резултатите. Голем број фактори, вклучувајќи го, но не исклучиво, изборот на антителата, немањето стандардизиран метод за имунолошка детекција во хистолошките препарати, како и субјективноста при евалуацијата и интерпретацијата на резултатите од боењето, сè уште претставуваат проблем.

Повеќето претходни истражувања кај кои се проценувала експресијата на p53 во ткивни примероци се базирани на имунохистохемиска детекција преку создавање на обоен продукт од реакцијата ензим-супстрат. Во тие случаи, квантитативната евалуација се сведува со броење на клетките или јадрата кои биле позитивни на специфичното боење.

Во ова истражување користевме пообјективна и порепродуктабилна методологија заснована на квантитативно мерење на флуоресцентниот сигнал од индивидуалните јадра на флуоресцентен микроскоп. Дигиталните податоци беа анализирани со посебен софтвер за анализирање на слики. Она што е значајно, заднинскиот сигнал-шум што претставува резултат од неспецифичното врзување на антителата и автофлуоресценцијата на ткивото беа одземени од секоја анали-

зирана индивидуална дигитална слика со цел да се намали непостојаноста која се должи на варијации во интензитетот на осветлувањето и оптичките несовершености на микроскопот и на препаратот. Овој методолошки пристап од неодамна е во употреба за квантитативна детекција на p53 и други протеини поврзани со карциноми (17) и е пософистициран и далеку пообјективен од наширокораспространетиот скоринг.

Во нашето истражување откривме дека средната вредност на коригираниот интензитет на флуоресценцијата значајно се разликува меѓу повисоките градуси на КММ (2 и 3), како и меѓу градусите 1 и 2. Освен тоа, најдовме статистички значајна разлика меѓу вредностите на флуоресценцијата на секој поединечен градус (1, 2 и 3) и вредностите CFI на негативната контролна група (хистолошки нормална мукоза на мочен меур). Анализата на нашите резултати покажа висока корелација на вредностите на интензитетот на флуоресценцијата на јадрениот p53 меѓу примероците од суперфицијален со тие од мускулно-инфилтративен КММ. Ваквите големи разлики во експресијата на p53 не се невообичаени. Имено, хистопатолошките и генетските испитувања доведоа до концептот дека површинските папиларни и инвазивни карциноми на мочниот меур имаат различен тек на болеста и прогноза. Општо е познато дека поголемиот број инфилтративни КММ немаат позната папиларна прекурсорна лезија (18). Овие резултати упатуваат на податокот дека генетските промени кои доведуваат до преголема експресија или акумулација на јадрениот p53 може да се појават релативно доцна во текот на процесот на малигна трансформација.

Што се однесува на корелацијата на вредностите на интензитетот на флуоресценцијата на јадрениот p53 со исходот кај пациентите, кај 44 од 70-те анализирани пациенти, не се појавија рецидив на туморот, далечни метастази или смрт поврзана со карциномот во текот на две години следење по добивањето на ткивниот примерок. Кај преостанатите 26 пациенти се појави локален рецидив на туморот, или метастаза или смрт од причини забележани во периодот на следење. Двете подгрупи пациенти не корелираа сигнификантно со нивните CFI-вредности ($p > 0,05$). Од друга страна, постои статистички значајна разлика помеѓу вредностите кај секоја од овие подгрупи и вредностите на CFI кај контролната група ($p < 0,001$).

Јасно е дека овие резултати не ја потврдија предиктивната вредност на јадрената акумулација на p53 кај ТСС во смисла на појавата на рецидиви, метастази или смрт поврзана со карцином, барем не во релативно кусиот период на следење од 2 години. Овој заклучок е сличен со многу претходни студии (19). Од друга страна, некои автори откриле дека p53 е значаен предиктор на прогресијата на ракот кај мочниот меур (13), а други заклучиле дека p53-имунохистохемијата се чини дека е предиктивна, но само кај високиот градус на ТСС (14). Значајно е да се потенцира дека корелацијата меѓу експресијата на p53 и прогнозата кај карциномот на мочниот меур била испитувана и публикувана во над 200 трудови (20). Подобрената и релативно новата методологија, како и краткиот период на евалуација на пациентите во нашата студија, може се значаен фактор што треба да се земе предвид кога се споредува со други слични студии.

Оттаму, со оглед на релативно малиот број и хетерогеноста на нашите пациенти, потребни се поопсежни испитувања за да се покаже клиничко-патолошката вредност на дигиталната квантитативна имунофлуоресцентна детекција на нуклеарниот p53 во примероци од ТСС.

Нашите резултати од имунохистохемиското боење на препаратите со CaP покажаа дека нуклеарната експресија на p53 протеинот е забележена кај 28 %, додека кај контролната група, т. е. примероците со бенигна хиперплазија на простатата, резултатите се негативни. Ова покажува цврста корелација на експресијата на протеинот p53 со клетките на CaP. Многу студии не даваат податок дали има експресија на протеинот p53 во бенигните клетки. Баскар (Bhaskar) случајно забележал p53 нуклеарно боење кај нормалните, т. е. кај бенигните базални клетки во близината на туморот (21). Во друга студија, Дермер (Dermer) ја проучувал појавата на експресијата на протеинот p53 во бенигната хиперплазија на простатата (22). Фокалната експресија во базалните клетки ја поврзал со премалигна лезија која ѝ дава на клетката предност во растењето.

Една од целите на оваа студија е да утврди дали експресијата на протеинот p53 би ја зголемила сигурноста во определувањето на стадиумот на примарниот тумор, т. е. дали болеста е ограничена на органот или не. Статистичката анализа со χ^2 –тестот покажа дека експресијата на p53 протеинот статистички не колерира со органската

ограниченост на примарниот тумор ($p=0,647$), т. е. нема статистичка разлика помеѓу експресијата на протеинот p53 во групата „organ confine“ (T1 и T2) и „organ nonconfine“ (T3 и T4). Овој резултат покажува дека одредувањето на протеинот p53 не ја зголемува сигурноста во клиничкиот стадиум (*staging*) на болеста, т. е. во определувањето на градусот на примарниот тумор. Во студијата направена е и корелација на нуклеарната експресија на протеинот p53 со неколку варијабли од клиничкиот и патолошкиот стадиум (*staging*).

Томас (Thomas) со соработниците и Шурбаџи (Shurbaji) со соработниците, во одвоени студии, направиле имунохистохемиска евалуација на протеинот p53 кај CaP и на неговата вредност како прогностички фактор (23, 24). Резултатите покажале директна корелација со агресивноста на CaP. Падопулос (Papadopoulos) со соработниците, во студијата со примероци од CaP, кај пациенти третирани со RP, ги компарирале лабораториските резултати од биолошките маркери (p53, Ki-S5, плоидниот статус), со клиничките и хистопатолошките параметри од RP (25). Резултатите покажале дека високите вредности на протеинот p53 се наоѓаат во директна корелација со малигниот потенцијал на карциномот и со прогнозата на болеста.

Дека експресијата на протеинот p53 е во корелација со прогнозата на болеста потврдува и Шер (Scher) со соработниците во студијата со 46 пациенти кои се лекувале со радиотерапија (26). Во студијата ги евалуирале двата клучни регулатори на апоптозата bcl-2 и p53, со имунохистохемско боење на примероците добиени со иглена биопсија кај 46 пациенти со CaP. Резултатите покажале дека примероците со експресија на bcl-2 и протеинот p53 асоцираат со слабата ефикасност на радиотерапијата, т. е. со преттерапиското одредување на овие два параметра би помогнале да се определи ефикасноста на дефинитивната радиотерапија.

Студијата на Навон (Navone) од Институтот за канцер „Андерсон“ во Тексас (Anderson Cancer Institute, Texas) наведува дека експресијата на протеинот p53 е во корелација со стадиумот на примарниот тумор и хистолошкиот градус (27). Тој, исто така, утврдил јака корелација помеѓу експресијата на протеинот p53 и случаите со лошо диференцирани карциноми и хормон-независни тумори. Зголемувањето на андрогените рецептори асоцира со андрогената резистентност на CaP.

Алимира, Ф. (Alimirah, F.), во објавената студија, изнесува податоци дека намалувањето на функцијата на p53 супресор генот резултира со експресија на андрогените рецептори со што се објаснува хормоналната резистентност на CaP (28).

Заклучок

Резултатите од нашите студии индицираат дека експресијата на протеинот p53 може да има практична употребна вредност во клиничко-патолошката евалуација и во прогностиката кај пациентите со карцином на мочниот меур, како и за евалуација на малигниот потенцијал и во прогнозата на карциномот на простатата. Потребни се дополнителни истражувања со вклучување на поголем број испитаници, валидација на постојните и воведување нови молекуларни методи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ecke, T. H., Schlechte, H. H., Schulze, G., Lenk, S. V., Loening, S. A. (2005). *Four tumour markers for urinary bladder cancer--tissue polypeptide antigen (TPA), HER-2/neu (ERB B2), urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) and TP53 mutation*. *Anticancer Res.*; 25(1B): 635–41.
2. Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A. J. (2000). *Surfing the p53 network*. *Nature.*; 408(6810): 307–10.
3. Matlashewski, G., Lamb, P., Pim, D., Peacock, J., Crawford, L., Benchimol, S. (1984). *Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene*. *EMBO J.*;3(13): 3257–62.
4. Isobe, M., Emanuel, B. S., Givol, D., Oren, M., Croce, C. M. (1986). *Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13*. *Nature.*;320(6057): 84–5.
5. Kern, S. E., Kinzler, K. W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., Vogelstein, B. (1991). *Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein*. *Science.*;252 (5013): 708–11.
6. Konstantakou, E. G., Voutsinas, G. E., Karkoulis, P. K., Aravantinos, G., Margaritis, L. H., Starvopodis, D. J. (2009). *Human bladder cancer cells undergo cisplatin-induced apoptosis that is associated with p53-dependent and p53-independent responses*. *Int J Oncol.*;35; 401–16.

7. Finlay, C. A., Hinds, P. W., Tan, T. H., Eliyahu, D., Oren, M., Levine, A. J. (1988). *Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life.* Mol Cell Biol.;8(2): 531–9.
8. Popov, Z., Hoznek, A., Colombel, M., Bastuji-Garin, S., Lefrere-Belda, M. A., Bellot, J., Abbou, C. C., Mazerolles, C., Chopin, D. K. (1997). *The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder.* Cancer.; 80(8): 1472–81.
9. Ecke, T. H., Schlechte, H. H., Gunia, S., Lenk, S. V., Loening, S. A. (2008). *Body mass index (BMI) and mutations of tumor suppressor gene p53 (TP53) in patients with urinary bladder cancer.* Urol Oncol.;26(5): 470–3.
10. George, B., Datar, R. H., Wu, L., Cai, J., Patten, N., Beil, S. J., Groshen, S., Stein, J., Skinner, D., Jones, P. A., Cote, R. J. (2007). *p53 gene and protein status: the role of p53 alterations in predicting outcome in patients with bladder cancer.* J Clin Oncol.;25(34): 5352–8.
11. Quin, D. I., Henshall, S. M., Head, D. R. et al. (2000). *Prognostic significance of p53 nuclear accumulation in localized prostate cancer treated with radical prostatectomy.* Cancer Res.; 60(6): 1585–94.
12. Lin, J. T., Wang, J. S., Jiann, B. P. et al. (2005). *Correlation of p53 protein accumulation and Bcl-2 overexpression with histopathological features in prostatic cancer.* J Formos Med Assoc.;104(11): 864–7.
13. Davidson, D., Bostwick, D. K., Qian, J. et al. (1995). *Prostatic intra-epithelial neoplasia is a risk factor for adenocarcinoma: predictive accuracy in needle biopsies.* J Urol; 154: 1295–9.
14. Sobin, L. H. (2002). *TNM classification of Malignant Tumours.* 6th ed. Sobin L. H., Wittekind C. H. (ad.); Wiley-Liss: New York pp. 184–7.
15. Office for national Statistics, Cancer Statistics registrations: Registrations of cancer diagnosed in 2002, England.series MB1 no.33. 2005, Nacional statistics: London.
16. Forman, D., Stockton, D., Moller, H. et al. (2003). *Cancer prevalence in the UK; results from the EUROPREVAL study.* Ann Oncol 2003; 14: 648–54.
17. Bray, F., Sankila, R., Ferlay, J. et al. (2002). *Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995.* Eur J Cancer.; 38: 99–166.
18. Black, R. J., Bray, F., Ferlay, J. et al. (1997). *Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990.* Eur J Cancer.; 33: 1075–107.
19. Sandblom, G., Dufmats, M., Nordenskjöld, K. et al. (2000). *Prostate carcinoma trends in three counties in Sweden 1987-1996: Results from a population based national cancer register.* South-East Region Prostate Cancer Group. Cancer.; 88: 1445–53.

20. Amling, C. L., Blute, M. L., Bergstralh, E. J. et al. (2000). *Long-term hazard of progression after radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer: continued risk of biochemical failure after 5 years*. J Urol. 164: 101–5.
21. Kallakury, B. V., Figge, J., Leibovich, B. et al. (1994). *Association of p53 Immunoreactivity With High Gleason Tumor Grade in Prostatic Adenocarcinoma*. Hum Pathol.; 25: 92–7.
22. Dermer, G. B. (1978). *Basal cell proliferation in benign prostatic hyperplasia*. Cancer.; 41: 1857–62.
23. Thomas, D. J., Robinson, M., King, P. et al. (1993). *p53 expression and clinical outcome in prostate cancer*. Br J Urol.; 72: 778–81.
24. Shurbaji, M. S., Brooks, S. K., Thurmond, T. S. et al. (1995). *Immunohistochemical detection of p53 protein as a prognostic indicator in prostate cancer*. Hum Pathol.; 26(1): 106–9.
25. Papadopoulos, I., Rudolph, P., Wirth, B. et al. (1996). *p53 expression, proliferation marker Ki-S5, DNA content and serum PSA: possible bio-potential markers in human prostatic cancer*. Urology.; 48: 261–8.
26. Scher, D. S., Vaughan, E. D., Wei, J. et al. (1999). *BCL-2 and p53 expression in localized prostate cancer predicts response to external beam radiotherapy*. J Urol.; 3: 119–27.
27. Navone, N. M., Troncoso, P., Pisters, L. L. et al. (1993). *p53 Accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma*. J Natl Cancer Inst.; 85: 1657–69.
28. Alimirah, F., Panchanathan, R., Chen, J. et al. (2007). *Expression of androgen receptor Is Negatively Regulated By p53*. Neoplasia.; 9(12): 1152–59.

Skender SAIDI, Zivko POPOV, Sasho PANOVA

THE ROLE OF P53 IN MOLECULAR PATHOGENESIS OF MALIGNANT NEOPLASMS OF THE URINARY TRACT

Abstract

Bladder cancer is a significant health problem and is the fourth most common malignancy in the Western world. Prostate cancer is among the most frequent malignant neoplasms in males. The incidence is rapidly growing in the recent years due to the prolonged life span and due to the introduction of more sophisticated diagnostic methods.

The tumor-suppressor gene *p53* encode the same-named protein which acts as a transcription factor that is activating under various types of cellular stress, including DNA damage and oncogene activation. In those cases, it induces a cascade of molecular events leading to cell-cycle arrest, DNA repair and apoptosis. Mutations in the *p53* gene are among the most frequent genetic alterations in human malignant neoplasms, including the urinary bladder cancer.

In this study we have investigated tissue samples of histopathologically confirmed cancer of the urinary bladder derived from 70 patients. Normal urinary bladder mucosa obtained from 40 patients with nonmalignant diseases was used as a negative control group. Quantitative immunofluorescent detection of p53 protein was used. Prostate cancer study included 83 patients, 43 of which underwent radical prostatectomy and a control group of 40 patients with benign hyperplasia of the prostate to which a transurethral resection or a transvesical prostatectomy was undertaken. The nuclear expression of p53 protein was evaluated using immunohistochemistry method.

In bladder cancer study, the detection of p53 protein in histological samples in the terms of the corrected fluorescence intensity values reveals statistically highly significant differences between the samples with low and high grades, stages and clinical outcome ($p < 0.01$). In prostate cancer study, the results have shown that the expression of the p53 protein is in direct correlation with the Gleason score ($p < 0.00001$), the Gleason sum (< 0.00001), primary tumor grade (< 0.00001), metastatic lymph nodes (< 0.00001) and the disease stadium ($p = 0.026$).

The result of this study indicates that p53 protein could have a considerable value in clinical and pathological evaluation and prognosis of patients with urinary bladder cancer. The p53 protein can also be used for determination of malignant potential of the tumor and prognosis of the prostate cancer.

Keywords: urinary bladder cancer, prostate cancer, p53 protein.