

CONTINUOUS SPATIAL MODELING OF ENVIRONMENTAL EPIDEMIOLOGICAL INDICATORS IN ZONES OF GEO-ECOLOGICAL PECULIARITIES

¹ S.A.Laptyonok, ¹ G.I.Morzak, ¹ S.A.Khoreva, ¹ L.N.Gordeeva, ² A.V.Osipov

¹ Belarusian National Technical University, Minsk, Belarus

² SIA on Fuel and Gasification "Beltopgas", Minsk, Belarus

A continuous spatial modeling in distribution of values on intensive incidence rate aimed at identifying trends in cancer incidence rate among the population of Volozhin and Stolbtsy districts and at assessing

the effect of geophysical and geo-environmental factors on this process, was carried out per each year during the period 01.01.1956 – 31.12.2003. Similarly, a continuous spatial modeling in distribution of values on intensive incidence rate for each year out of the five sub-periods, stratified in such a way that the conventional middle of each of them was a year of the next census (1959, 1970, 1979, 1989 and 1999), was conducted. Based on these outcomes it was supposed that geophysical factors and a factor of ¹³⁷Cs contamination of areas might influence on cancer incidence of the population.

Поступила 23.10.2012 г.

ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ВНУТРИПУЗЫРНОЙ ИНСТИЛЛЯЦИИ ПРОБИОТИКА AEROCOCCUS VIRIDANS 167 У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ С УЧЕТОМ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

Р.Н.Молчанов, И.С.Шпонька

ГУ «Днепропетровская медицинская академия Министерства здравоохранения Украины», г. Днепропетровск, Украина

Представлены результаты исследования воздействия однократной внутрипузырной инстилляцией пробиотика Aerococcus viridans 167 на тканевые характеристики опухоли мочевого пузыря. Установлено наличие положительной связи экспрессии маркеров пролиферации и апоптоза и маркеров оксидативного стресса и воспаления (COX-2, iNOS). На фоне применения пробиотика наблюдается более низкий уровень экспрессии iNOS в ткани опухоли мочевого пузыря, что свидетельствует в пользу снижения тканевой воспалительной реакции и может быть одним из механизмов противорецидивного эффекта препарата.

Рак мочевого пузыря – второе по частоте злокачественное заболевание органов мочевыделительной системы. До 75% случаев рака мочевого пузыря диагностируются в ранней стадии, для которой стандартными методами лечения являются трансуретральная резекция мочевого пузыря с последующей адьювантной внутрипузырной химио- или иммунной терапией. Частые рецидивы и связанная с ними прогрессия, которые наблюдаются при поверхностном раке мочевого пузыря в 60–70 и 15% соответственно, требуют пожизненного наблюдения и лечения [1].

В поисках способов профилактики рецидивов важное место отводится препаратам для внутрипузырной иммунотерапии, среди которых БЦЖ счита-

ется наиболее эффективным. На основании длительного опыта использования БЦЖ-терапии установлено наличие ряда выраженных побочных эффектов, наиболее частый из которых (до 90% случаев) – цистит, реже – гипертермия, гематурия, сепсис и даже смертельные исходы. В связи с небезопасным профилем побочных эффектов, данный вид лечения рекомендован для поверхностных опухолей высокого риска. Кроме того, установлено, что у пациентов с низким риском рецидивирования и прогрессии БЦЖ-терапия не влияет на течение заболевания, в связи с чем ее применение у данной группы больных не показано [2].

Учитывая агрессивность и потенциальную небезопасность данного метода лечения, ведутся

поиски других средств для иммунобиологического воздействия на опухолевый процесс в мочевом пузыре.

Одним из перспективных направлений иммунотерапии является использование бактерий-пробиотиков. Наиболее часто применяемые в лечебной практике пробиотики – лактобактерии, используемые для лечения воспалительных процессов различных локализаций и дисбактериозов. Получены данные о сравнимой с эффектом БЦЖ противоопухолевой активности некоторых штаммов лактобактерий в отношении уротелиального рака, что предполагает возможность их использования в качестве альтернативы [3].

В результате исследования пробиотика аэрококка (*Aerococcus viridans* 167), входящего в состав препарата А-бактерин, установлено наличие у аэрококков способности к подавлению роста переходноклеточного рака мочевого пузыря и других опухолей [4].

Наличие у пробиотиков антагонистического действия в отношении опухолевых клеток свидетельствует о возможности их эффективного использования при лечении больных раком мочевого пузыря.

Известно, что развитие злокачественных изменений уротелия, приводящих к развитию рака мочевого пузыря и его рецидивов, – многостадийный процесс. В основе постепенно наступающих изменений лежит ряд явлений, происходящих на генетическом уровне, включающих активацию онкогенов, инактивацию генов-супрессоров образования опухолей и нарушение генов, кодирующих процесс апоптоза. Изучение маркеров апоптоза, пролиферации, воспаления, оксидативного стресса и межклеточной адгезии, определяющих поведение опухолевых клеток, а также исследования их взаимной связи и зависимости от клинико-патологических особенностей опухолей являются актуальными с точки зрения оценки влияния воздействия факторов риска и эффективности различных лечебных стратегий на протекание опухолевого процесса.

С целью определения характера воздействия пробиотика *Aerococcus viridans* 167 на клеточные характеристики переходноклеточного рака нами исследовано воздействие однократной инстилляцией в мочевой пузырь А-бактерина у пациентов с поверхностным раком мочевого пузыря на состояние экспрессии маркеров CD95, p53, Ki-67, Bcl-2, VAX, E-кадгерина, β-катенина, ЦОГ-2 и NO-синтаз в опухолевой ткани.

Материалы и методы

Проведено иммуногистохимическое исследование биоптатов опухоли, полученных при транс-

уретральной резекции мочевого пузыря у 20 пациентов (I группа) (18 мужчин и 2 женщины) в возрасте 47–70 лет (средний возраст – 59,5 лет) с диагнозом рак мочевого пузыря. Из них 16 с первичным, 4 – с рецидивным умеренно дифференцированным переходноклеточным раком в стадии T₁N₀M₀ (19) и T₂N₀M₀ (1). У 10 пациентов выявлены признаки инфекции мочевых путей.

Инстилляцию 10 мл препарата А-бактерин, содержащего 10⁸ бактерий/мл *Aerococcus viridans* 167 осуществляли по катетеру, введенному в мочевой пузырь однократно за 3–5 суток до оперативного вмешательства. В дальнейшем пациенты получали стандартную терапию, регламентированную утвержденными протоколами лечения пациентов, страдающих раком мочевого пузыря. Исследование проведено в рамках протокола, разработанного в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации и утвержденного этическим комитетом. Все пациенты были детально ознакомлены с целью и особенностями проведения процедуры, после чего ими было подписано информированное согласие.

Для сравнения использовали показатели, полученные при исследовании биоптатов 44 пациентов аналогичной возрастной категории с поверхностным переходноклеточным раком мочевого пузыря умеренного и высокого уровня дифференцировки, разделенных на группы по 22 человека в соответствии с отсутствием (II группа) или наличием (III группа) сопутствующей инфекции мочевых путей. Контрольная группа (IV) представлена 8 пациентами в возрасте 58–72 лет (средний возраст – 65,8 лет) с доброкачественной гиперплазией предстательной железы, у которых биоптаты получены во время трансуретральной резекции предстательной железы из области шейки мочевого пузыря.

Биоптаты для исследования получали при трансуретральной резекции мочевого пузыря на границе опухоли и интактной ткани стенки мочевого пузыря на глубину мышечного слоя.

Для проведения морфологического исследования использовали парафиновые блоки операционного и биопсийного материала. После проведения тщательного рутинного патогистологического исследования, срезы толщиной 4–6 мкм наносили на адгезивные предметные стекла SuperFrost Plus, затем депарафинизировали согласно принятым стандартам. После депарафинизации для восстановления антигенных свойств ткани проводили тепловую индукцию эпитопного (антигенного) восстановления (HIER – heat induction of epitope retrieval) путем нагревания в

цитратном буфере с pH=6,0 в автоклаве (8 минут при температуре +121°C).

С целью определения экспрессии маркеров, нами использован спектр антител, который включал маркеры p53 (клон SP5), Ki-67 (клон SP6 (LabVision)), bcl-2 (клон 100/D5 (LabVision)), Bax, CD95/Fas, Nitric Oxide Synthase inducible (iNOS), Nitric Oxide Synthase endothelial (eNOS), β -Catenin, E-cadgerin (клоны NCH-38), COX-2.

Инкубацию срезов с первичными антителами проводили во влажных камерах при температуре 23–25°C в течение 30 минут. Титр антител подбирали индивидуально для каждого маркера. Следующий этап иммуногистохимического (ИГХ) исследования проводили с использованием систем визуализации UltraVision Quanto и UltraVision LP (LabVision), идентификация реакций проводилась с помощью хромогена DAB под контролем микроскопа на протяжении от 20 секунд до 3 минут.

Для дифференцирования структур тканей срезы дополнительно окрашивали гематоксилином Майера.

Количественные и качественные показатели экспрессии маркеров изучали как минимум на 10 случайно выбранных полях зрения микроскопа гистологических срезов при увеличении $\times 100, \times 400$. Оценка экспрессии каждого маркера проводилась индивидуально в соответствии с рекомендациями других исследователей.

При оценке ИГХ окраски использовался полуколичественный метод, в соответствии с которым выделяли 4 категории: 0 – негативная реакция (окраска <5% клеток), 1 – слабая окраска (позитивно окрашены отдельные клетки или слабая окраска

всего эпителия), 2 – умеренно выраженная окраска (большая часть позитивно окрашенных клеток) и 3 – интенсивная окраска (практически все клетки эпителия позитивно окрашены).

Для статистической оценки использовали стандартный описательный, непараметрические для оценки различия групп (U-критерий Манна-Уитни), корреляционный (метод ранговой корреляции Спирмена) анализы. Выраженность корреляционной зависимости оценивали по следующим критериям: $r < 0,3$ – связь слабая; $0,3 < r < 0,5$ – связь умеренная; $0,5 < r < 0,7$ – связь средней силы, $0,7 < r < 0,9$ – связь сильная, $0,9 < r < 1,0$ – связь очень сильная. Достоверность статистической значимости различий, уровней значимости и достоверность корреляционных коэффициентов принимались при $P < 0,05$. Обработка данных осуществлялась с использованием статистического пакета Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение

При оценке клинко-патологических критериев в группах сравнения нами не выявлены достоверные различия в сравниваемых группах по таким параметрам, как возраст, пол, уровень дифференцировки опухоли, стадия или частота рецидива. У пациентов с сопутствующим воспалением в ряде случаев наблюдалась плоскоклеточная метаплазия.

Образцы опухоли и подлежащей ткани, полученные у пациентов с сопутствующей инфекцией мочевых путей, идентифицировались достаточно четко по наличию инфильтрации ткани полиморфноядерными лейкоцитами.

Результаты ИГХ-полуколичественного исследования маркеров апоптоза, пролиферации и клеточной адгезии представлены в табл. 1.

Таблица 1

Показатели степени экспрессии исследованных ИГХ маркеров у пациентов с раком мочевого пузыря (M \pm m)[†]

Маркер	I группа N=20	II группа N=22	III группа N=22	Контроль N=8
Возраст	59,4 \pm 8,8	61,7 \pm 10,8	64,2 \pm 9,4	65,7 \pm 4,9
CD95	1,15 \pm 0,37*	1,23 \pm 0,43*	1,09 \pm 0,29*	1,75 \pm 0,46
P53	0,55 \pm 0,51*	0,36 \pm 0,49*	0,32 \pm 0,48*	0
bcl-2	0,95 \pm 0,83*	0,68 \pm 0,89	0,59 \pm 0,73	0,25 \pm 0,46
BAX	1,2 \pm 0,62 ^{‡*}	1,36 \pm 0,49*	1,73 \pm 0,7 [‡]	2,38 \pm 0,74
Ki67 (в процентах)	27,55 \pm 17,95*	27,55 \pm 22,26*	36,64 \pm 20,71*	7,13 \pm 2,29
E-кадгерин	0,7 \pm 0,73*	0,68 \pm 0,84*	0,64 \pm 0,66*	1,63 \pm 0,52
β -катенин	1,95 \pm 0,6*	2,09 \pm 0,68	1,77 \pm 0,81*	2,5 \pm 0,53
COX-2	1,55 \pm 0,89*	1,55 \pm 1,01*	1,55 \pm 0,73*	0
iNOS	1,4 \pm 0,82 ^{‡*}	1,0 \pm 0,87 ^{‡*}	1,95 \pm 0,57 ^{‡*}	0
eNOS	1,15 \pm 0,67	0,95 \pm 0,65	1,05 \pm 0,49	1,37 \pm 0,51

*p<0,05 – достоверное отличие от показателей контрольной группы;

[‡] p<0,05 – достоверное отличие показателей I от II и III групп

[†] p<0,05 – достоверное отличие показателей II и III групп

[†]M – медиана, m – стандартное отклонение.

У части больных, получавших инстилляции А-бактерина, выявлена сопутствующая инфекция мочевых путей, в связи с чем мы изучили внутригрупповые различия исследованных показателей, разделив I группу на подгруппы Ia – без сопутствующей мочевой инфекции (n=10) и Ib – с сопутствующей мочевой инфекцией (n=10). Результаты, полученные с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (табл. 2), свидетельствуют об отсутствии достоверных отличий показателей в подгруппах (P>0,05). По сравнению с контрольной группой выявлено наличие достоверных различий по большинству показателей, за исключением bcl-2, β-катенина и CD95 (для Ib подгруппы). При сравнении с показателями группы больных II и III, выявлены достоверные различия для показателя VAX при сравнении группы III с подгруппой Ib с сопутствующей инфекцией и подгруппой Ia (без сопутствующей инфекции).

В контрольной группе выявлена умеренно выраженная ИГХ окраска CD95+ эпителия (1,75±0,46). В биоптатах, полученных в группах I, II и III, окраска была менее интенсивной, определялись островки опухолевых клеток без окрашивания. Полной потери окрашивания ткани не наблюдалось ни в одном случае. Показатель интенсивности окраски CD95+ в биоптатах больных с опухолями мочевого пузыря, получавших А-бактерин (группа I) – 1,15±0,37 – достоверно не отличался от аналогичных показателей, полученных во II и III группах (1,23±0,43 и 1,09±0,29 соответственно; P>0,05). В то же время, во всех трех группах интенсивность ИГХ окраски CD95+ эпителия была достоверно ниже, чем в контрольной группе (P<0,05).

При анализе полученных данных не выявлена статистически значимая связь между экспрессией CD95+ и других исследованных маркеров, а также клинико-патологическими характеристиками опухоли.

Выявленное нами снижение экспрессии CD95+ во всех исследованных группах больных с раком мочевого пузыря по сравнению с контрольной соответствует современным представлениям о роли данного рецептора Fas-лиганда в развитии опухолевого процесса. Известно, что система рецептора смерти Fas (Apo1/CD95) и Fas-лиганда (FasL) является одним из механизмов индукции апоптоза. Снижение экспрессии CD95+ может приводить к снижению его функции апоптоза и служить одним из патогенетических звеньев развития рака мочевого пузыря [5]. В доступной литературе не удалось найти данных о влиянии воспаления на экспрессию CD95+ в уротелии.

Важное звено регуляции клеточного цикла, выполняющее функцию супрессора образования злокачественных опухолей, – транскрипционный фактор p53. Возникновение мутаций гена p53 является наиболее частым генетическим повреждением, наблюдающимся в раковых опухолях человека. Показатель интенсивности ИГХ окраски на предмет экспрессии мутантного онкопротеина p53 в группе I составил 0,55±0,51, достоверно не отличаясь от аналогичных показателей в группах II и III (0,36±0,49 и 0,32±0,47 соответственно; P>0,05). В контрольной группе образцов окраска была негативной. Полученные данные соответствуют современным данным о том, что как опухоль, так и воспалительный процесс в мочевом

Таблица 2

Показатели степени экспрессии исследованных ИГХ маркеров у больных с раком мочевого пузыря, получавших А-бактерин (M±m)[†]

Показатель	Ia подгруппа N=10	Ib подгруппа N=10	P
Возраст	61,8±7,7	57,1±9,7	0,226477
CD95	1,1±0,31*	1,2±0,42	0,705457
p53	0,6±0,52*	0,5±0,53*	0,705457
Ki67 (в процентах)	27,1±20,76*	28,0±15,77*	0,520523
bcl-2	0,9±0,87	1,0±0,81	0,791337
VAX	1,1±0,57* [†]	1,3±0,67*	0,496292
E-кадгерин	0,6±0,69*	0,8±0,79*	0,596702
β-катенин	1,9±0,57	2,0±0,67	0,762369
COX-2	1,4±0,84*	1,7±0,95*	0,496292
iNOS	1,3±0,95*	1,5±0,71*	0,762369
eNOS	1,1±0,7	1,2±0,63	0,791337

[†]P<0,05 – достоверное отличие показателей в подгруппах Ia и Ib

* – достоверное отличие от показателей контрольной группы

пузыре могут способствовать повышению экспрессии p53 [6].

В регуляции апоптоза участвует семейство протеинов bcl-2, в котором различают проапоптотические и антиапоптотические белки. Нарушения их баланса, связанные с мутациями и изменениями экспрессии соответствующих генов, играют важную роль в канцерогенезе.

Выявлено достоверное повышение интенсивности bcl-2 в биоптатах I группы ($0,95 \pm 0,83$) по сравнению с контрольными образцами ($0,25 \pm 0,46$; $P < 0,05$), в то время как по сравнению со II ($0,68 \pm 0,89$) и III ($0,59 \pm 0,73$) группами достоверных различий не выявлено ($P > 0,05$).

Показатель экспрессии Вах в биоптатах I группы пациентов ($1,2 \pm 0,62$) был достоверно ниже ($P < 0,05$) по сравнению с контрольной группой ($2,38 \pm 0,74$). При этом он был достоверно ниже и по сравнению с III группой ($1,73 \pm 0,7$). Дополнительное разделение группы I на подгруппы показало, что достоверность различия обусловлена низким показателем экспрессии Вах в III группе больных без сопутствующей инфекции мочевых путей ($1,1 \pm 0,57$). Полученные данные отражают общую тенденцию снижения антиапоптотического протеина Вах при уротелиальных опухолях, описанную в литературе [7].

При ИГХ исследовании экспрессии ядерного протеина Ki-67 установлено, что средний процент позитивно окрашенных клеток достоверно отличался в сторону повышения у пациентов с опухолью мочевого пузыря в группах I, II, III по сравнению с показателями в контрольной группе ($7,13 \pm 2,3\%$; $P < 0,05$). Вследствие выраженного разброса данных не удалось установить достоверного различия экспрессии Ki-67 в биоптатах больных I группы ($27,55 \pm 17,95\%$) и групп сравнения II ($27,55 \pm 22,26\%$) и III ($36,64 \pm 20,71\%$) ($P > 0,05$). Увеличение фракции ядерного протеина Ki-67 в опухолевых клетках связывают с ухудшением прогноза течения ряда опухолей, в том числе и рака мочевого пузыря. Кроме того, повышение экспрессии Ki-67 по сравнению с нормой описано при специфическом (шистоматозном) и неспецифическом циститах [8].

Кадгеринины представляют собой трансмембранные протеины, регулирующие кальций-зависимую межклеточную адгезию, посредством внутриклеточных протеинов-катенинов связаны с цитоскелетом. Нами установлено, что в контрольной группе наблюдалась выраженная иммуногистохимическая реакция клеточных мембран как в отношении E-кадгерина – $1,63 \pm 0,52$, так и β -катенина – $2,5 \pm 0,53$. В биоптатах опухолей у больных

группы I выявлено достоверное снижение экспрессии E-кадгерина и β -катенина – $0,7 \pm 0,73$ и $1,95 \pm 0,6$ по сравнению с показателями контрольной группы. Такие же достоверно более низкие показатели наблюдали в группах II и III, в которых экспрессия E-кадгерина составила $0,68 \pm 0,84$ и $0,64 \pm 0,66$ и β -катенина $2,09 \pm 0,68$ и $1,77 \pm 0,81$ соответственно. Межгрупповых достоверных различий в исследованных группах не наблюдалось.

Выявленные изменения соответствуют данным других исследователей, установивших наличие снижения экспрессии E-кадгерина и β -катенина при уротелиальных опухолях, что является фактором риска прогрессии опухоли [9].

Одним из важных звеньев канцерогенеза считается циклооксигеназа – фермент, участвующий в синтезе простаноидов, в том числе простагландинов, простаглицлина. Простагландины, продуцируемые ЦОГ-2, стимулируют опухолевый рост путем стимуляции клеточной пролиферации, ангиогенеза и подавления апоптоза и иммунной защиты. Изучение ИГХ реакции ЦОГ-2 у больных I группы показало отсутствие достоверных различий по сравнению со II и III группами ($1,55 \pm 0,89$, $1,55 \pm 1,01$ и $1,55 \pm 0,73$ соответственно; $P > 0,05$). При наличии воспалительного процесса экспрессия ЦОГ-2 наблюдалась как в эпителии, так и в стромальном компоненте, в то время как при опухоли мочевого пузыря без воспалительного процесса позитивная реакция наблюдалась только в эпителии. Выявлено отсутствие экспрессии ЦОГ-2 с незначительными участками позитивной реакции в нормальной ткани мочевого пузыря, взятой при биопсии у пациентов контрольной группы. Полученные результаты соответствуют современным данным, согласно которым значительное повышение ЦОГ-2 отмечено во всех злокачественных гистологических типах рака мочевого пузыря, а также при наличии воспалительного процесса. В то же время результаты современных исследований влияния пробиотиков на экспрессию слизистыми ЦОГ-2 противоречивы [10].

В воспалительной теории канцерогенеза ведущая роль отводится оксидативному стрессу. Он является причиной повреждения ДНК кислородными радикалами, эндогенными источниками которых являются воспалительные клетки, такие как нейтрофилы, макрофаги и эозинофилы. Признаком оксидативного стресса также является изменение уровней оксида азота и его синтаз. Оксид азота (NO) – свободнорадикальный газ, синтезирующийся из L-аргинина при воздействии семейства изоэнзимов – NO-синтаз (NOS), который играет

важную роль в расслаблении гладкомышечной мускулатуры, росте опухоли и ангиогенезе. Исследование эпителиальной (eNOS) и индуцибельной NO-синтазы (iNOS) показало, что экспрессия eNOS наблюдалась как в эпителии биоптатов контрольной группы ($1,37 \pm 0,51$), так и в опухолевых клетках биоптатов I и II и III групп больных соответственно ($0,95 \pm 0,65$, $1,05 \pm 0,49$ и $1,15 \pm 0,67$). Нами не выявлено достоверного различия экспрессии данного маркера при сравнении как с контрольной группой, так и в группах исследования ($P > 0,05$).

Экспрессия iNOS, выявленная в I группе ($1,4 \pm 0,82$), была достоверно ниже по сравнению с III группой ($1,95 \pm 0,57$), в то же время по сравнению с данными II группы ($1,0 \pm 0,87$) достоверных различий не выявлено. Показатель в III группе по сравнению со II был также достоверно более высокий ($P < 0,05$). В биоптатах контрольной группы пациентов экспрессия данного маркера не выявлена.

По данным современных исследований, индуцированная NOS экспрессируется в клетках, окружающих опухоль мочевого пузыря. Она преимущественно локализуется в воспалительных клетках, но также определяется и в отдельных опухолевых клетках. Выявлено свойство некоторых пробиотиков, в частности *Lactobacillus rhamnosus* GG, стимулировать экспрессию iNOS. В то же время, при наличии воспалительного процесса пробиотики снижают экспрессию iNOS [11]. Таким образом, полученные нами данные, свидетельствующие о достоверно более низком уровне экспрессии iNOS в I группе по сравнению с III и более высоком по сравнению со II, могут свидетельствовать о способности А-бактерина к стимуляции экспрессии iNOS уротелием при отсутствии сопутствующего воспалительного процесса, в то время как при его наличии наблюдается подавление экспрессии iNOS.

В результате исследования не выявлено статистически достоверных коррелятивных связей с клинико-морфологическими характеристиками (градацией, рецидивами, стадией) исследованных опухолей. Данный факт, по-видимому, связан с тем, что объектом исследований являются поверхностные опухоли умеренной и высокой степени дифференцировки с основным отличием – наличием сопутствующего воспалительного процесса. Приведенные выше литературные данные свидетельствуют о том, что подобные связи обычно выявляются при исследовании опухолей высокой градации в инвазивных стадиях и с характерными для них клиническими особенностями (метастазирование, выживаемость и т.д.).

Установлено наличие прямой связи умеренной силы между экспрессией ЦОГ-2 и ядерного протеина Ki-67 ($R=0,454515$, $p=0,044080$). Кроме того, нами установлено наличие сильной положительной связи экспрессии p53 с экспрессией ядерного протеина Ki-67 ($R=0,706163$, $P=0,000502$) и iNOS ($R=0,715097$, $P=0,000394$), а также умеренной положительной связи с экспрессией bcl-2 ($R=0,452779$, $P=0,044997$) (табл. 3). Исследование корреляций экспрессии bcl-2 показало наличие сильной положительной связи с интенсивностью ИГХ окраски Ki67 ($R=0,772803$, $P=0,000065$), средней силы - iNOS ($R=0,772803$, $P=0,000065$).

Установлено наличие сильной положительной связи экспрессии Ki-67 и iNOS ($R=0,733772$, $p=0,000231$), а также прямой связи умеренной силы с экспрессией ЦОГ-2 ($R=0,454515$, $p=0,044080$).

Исследование корреляций показало наличие сильной связи iNOS с экспрессией ядерного протеина Ki-67 ($R=0,733772$, $p=0,000231$) и умеренной связи с экспрессией bcl-2 ($R=0,545141$, $p=0,012927$) и ЦОГ-2 ($R=0,512989$, $p=0,020720$).

Таблица 3

Корреляции показателей экспрессии ИГХ маркеров у пациентов с раком мочевого пузыря, получавших А-бактерин

Показатели	Spearman (R)	P
P53 : Ki67	0,706163	0,000502
P53 : bcl-2	0,452779	0,044997
P53 : iNOS	0,715097	0,000394
Ki67 : bcl-2	0,772803	0,000065
Ki67 : aiNOS	0,733772	0,000231
Ki67 : ЦОГ-2	0,454515	0,044080
bcl-2 : iNOS	0,545141	0,012927
ЦОГ-2 : iNOS	0,512989	0,020720

Выявленные положительные достоверные связи различной силы между ИГХ маркеров апоптоза и пролиферации (p53, bcl-2 и Ki67) отражают естественные биологические характеристики опухоли и неоднократно подтверждены данными литературы в отношении уротелиальных и других опухолей. Наличие связи указанных показателей с экспрессией маркеров оксидативного стресса и воспаления (ЦОГ-2, iNOS) может свидетельствовать в пользу отрицательного воздействия воспаления на протекание опухолевого процесса [12].

Выводы

1. Однократная внутривезикулярная инстилляция пробиотика *Aerococcus viridans* 167 у пациентов с раком мочевого пузыря не влияет на экспрессию маркеров p53, Ki-67, bcl-2, Вах, CD95+, β -катенина, Е-кадгерина, ЦОГ-2, eNOS в опухолевой ткани.

2. Более низкий уровень экспрессии iNOS в ткани опухоли мочевого пузыря у пациентов после инстилляции *Aerococcus viridans* 167 свидетельствует в пользу снижения воспалительного ответа и подтверждает ранее выявленный нами эффект понижения иммуноклеточной инфильтрации опухоли в результате воздействия пробиотика.

3. Наличие положительной связи экспрессии маркеров пролиферации и апоптоза и маркеров оксидативного стресса и воспаления (ЦОГ-2, iNOS) может свидетельствовать в пользу отрицательного воздействия воспаления на протекание опухолевого процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Beyers, R.F.* Role of urothelial cells in BCG immunotherapy for superficial bladder cancer / R.F.Beyers, K.H.Kurth, D.H.Schamhart // Br. J. Cancer. – 2004. – Vol.91, No.16. – P.607–612.
2. *Babjuk, M.* EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder / M.Babjuk [et al.] // Eur. Urol. – 2008. – Vol.54, No.2. – P.303–314.
3. *Seow, S.W.* Lactobacillus species is more cytotoxic to human bladder cancer cells than Mycobacterium Bovis (bacillus Calmette-Guerin) / S.W.Seow [et al.] // J. Urol. – 2002. – Vol.168, No.5. – P.2236–2239.
4. *Риженко, С.А.* Дослідження дії пробіотичного штаму *A.viridans* 167 на перещеплювані культури клітин / С.А.Риженко, Г.М.Кременчуцький, М.О.Бредіхіна // Ан. інст. Мечнікова. – 2007. – №1. – С.19–22.
5. *Yamana, K.* Prognostic impact of FAS/CD95/APO-1 in urothelial cancers: decreased expression of Fas is associated with disease progression / K.Yamana [et al.] // Br. J. Cancer. – 2005. – Vol.93, No.5. – P.544–551.
7. *Yu, D.S.* The expression of oncoproteins in transitional cell carcinoma: its correlation with pathological behavior, cell cycle and drug resistance / D.S.Yu, S.Y.Chang // Urol. Int. – 2002. – Vol.69. – P.46–50.
8. *Scholzen, T.* The Ki-67 protein: from the known and the unknown / T.Scholzen, J.Gerdes // J. Cell Physiol. – 2000. – Vol.182. – P.311–322.
9. *Thievensen, I.* E-cadherin involved in inactivation of WNT/beta-catenin signalling in urothelial carcinoma and normal urothelial cells / I.Thievensen [et al.] // Br. J. Cancer. – 2003. – Vol.88. – P.1932–1938.
10. *Bassaganya-Riera, J.* Probiotic bacteria produce conjugated linoleic acid locally in the gut that targets macrophage PPAR gamma to suppress colitis / J.Bassaganya-Riera [et al.] // PloS One. – 2012. – Vol.7, No.2. – P.312–338.
11. *Hwang, J.H.* Idesolid inhibits the adipogenic differentiation of mesenchymal cells through the suppression of nitric oxide production / J.H.Hwang [et al.] // Eur. J. Pharmacol. – 2012. – Vol.685, No.1–3. – P.218–223.
12. *Karamitopoulou, E.* Prognostic significance of apoptotic cell death in bladder cancer: a tissue microarray study on 179 urothelial carcinomas from cystectomy specimens / E.Karamitopoulou [et al.] // Pathology. – 2010. – Vol.42. – P.37–42.

ASSESSING THE IMPACT OF INTRAVESICAL INSTILLATION OF PROBIOTIC AEROCOCCUS VIRIDANS 167 IN PATIENTS WITH BLADDER CANCER USING IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS

R.N.Molchanov, I.S.Shpon'ka

Dnepropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine, Dnepropetrovsk, Ukraine

Outcomes on the impact of a single intravesical instillation of probiotic *Aerococcus viridans* 167 on tissue characteristics of bladder cancer were presented. It was established that there was a positive correlation between the expression of proliferation and apoptosis markers as well as oxidative stress and inflammation (COX-2, iNOS) markers. The use of probiotic instillation resulted in lower iNOS expression in bladder cancer tissue, that was evidence of the reduction of tissue inflammatory reaction and can be one of the mechanisms of anti-relapse effect.

Поступила 15.01.2013 г.