

И.И. Яковцова, Е.В. Титов, И.В. Ивахно, О.В. Долгая, С.В. Данилюк

Значение экспрессии коллагена IV типа, Ki-67 и MMP-9 в мышечно-неинвазивном уротелиальном раке мочевого пузыря для прогноза течения заболевания

Харьковская медицинская академия последипломного образования

Получено 14.02.2019

Принято в печать 04.04.2019

DOI: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.38.22293

Рак мочевого пузыря (РМП) в 70–80% случаев диагностируют на мышечно-неинвазивной стадии, при этом рецидивы возникают у порядка 70% пациентов. В рутинной диагностике неинвазивного уротелиального рака мочевого пузыря (НУРМП) (стадии T1) иммуногистохимическое исследование может дать объективную оценку биологическому поведению опухоли, а также служить критерием прогноза течения заболевания. Цель исследования — изучение экспрессии маркеров Ki-67, матриксной металлопротеиназы-9 (matrix metalloproteinase-9 — MMP-9) и коллагена IV типа в НУРМП для выявления критериев прогноза рецидивирования и прогрессии заболевания. Объект и методы. Сформированы две группы исследования: НУРМП без рецидивирования — I группа (14 случаев), первичные НУРМП с рецидивированием без прогрессии — II группа (14 случаев) и первичные НУРМП с рецидивированием и прогрессией во вторичной опухоли в виде инвазии в мышечный слой стенки — III группа (14 случаев). Иммуногистохимическое исследование проводилось с использованием первичных моноклональных антител фирмы DAKO к коллагену IV типа, MMP-9 и Ki-67. Показатели экспрессии маркеров, связанных с иммунным ответом, изучали в трех полях зрения микроскопа на гистологических срезах с наиболее выраженной экспрессией при увеличении $\times 400$. Подсчет количества экспрессирующих маркеры клеток проводился на микроскопе Primo Star с фотокамерой при увеличении объектива $\times 400$ раз с помощью программы Adobe Photoshop CS6. Площадь тестирования составила $0,057 \text{ мм}^2$ ($57\,000 \text{ мкм}^2$). Для оценки иммуногистохимической реакции использовали полуколичественную шкалу от 0 до 3 с учетом процента экспрессирующих маркер клеток в поле зрения. Реакция на Ki-67: 1 балл — до 20% опухолевых клеток в поле зрения, 2 балла — 20–50% опухолевых клеток, 3 балла — более 50% опухолевых клеток. Реакция на коллаген IV типа: 0 — отсутствие реакции или экспрессия в менее 5% площади опухоли, 1 балл — слабая, прерывистая экспрессия маркера, 2 балла — непрерывное четкое окрашивание базальных мембран. Реакция на MMP-9: 1 балл — до 50% опухолевых клеток, 2 балла — более 50% опухолевых клеток различной степени интенсивности, 3 балла — интенсивная экспрессия 100% опухолевых клеток. Результаты и их обсуждение. Для НУРМП высокой степени злокачественности характерна экспрессия Ki-67 более 20% опухолевых клеток ($p < 0,0001$), выраженная экспрессия MMP-9 ($p < 0,05$) и отсутствие реакции на коллаген IV типа ($p < 0,01$), что определяет эти маркеры как критерии злокачественности НУРМП. В I группе НУРМП экспрессия Ki-67 и MMP-9 ниже, чем в III ($p < 0,01$ и $p < 0,03$ соответственно). Слабая экспрессия MMP-9 и Ki-67 (до 20% опухолевых клеток) характерна для I группы ($p < 0,03$ и $p < 0,005$ соответственно), выраженная экспрессия Ki-67 (более 50% опухолевых клеток) — для III группы ($p < 0,03$). Прослежена прямая корреляционная зависимость между экспрессией Ki-67 и MMP-9 ($p < 0,01$) и обратная зависимость между экспрессией Ki-67 и коллагена IV типа ($p < 0,01$), MMP-9 и коллагена IV типа, что характеризует взаимосвязь процессов повышения пролиферативной активности раковых клеток с возрастанием их способности к продуцированию металлопротеиназ и разрушению экстрацеллюлярного матрикса, и коллагена IV типа в частности. Эти изменения приводят к более агрессивному биологическому поведению опухоли и могут служить критериями прогноза заболевания.

Ключевые слова: неинвазивный уротелиальный рак мочевого пузыря; иммуногистохимия; Ki-67; MMP-9; коллаген IV типа; рецидив; прогрессия.

42

Рак мочевого пузыря (РМП) является наиболее частым злокачественным новообразованием мочевыводящих путей [1, 2]. В 70–80% случаев РМП диагностируют на мышечно-неинвазивной стадии, при этом рецидивы возникают у порядка 70% пациентов [3]. Для прогноза рецидивирования и прогрессии неинвазивного уротелиального РМП (НУРМП) (стадии T1) одним из основных критериев является дифференцировка опухоли. Однако этот критерий не всегда отображает характер клинического поведения опухоли и относится к субъективным признакам, то есть зависит от интерпретации данных патоморфологом. Иммуногистохимическое исследование может служить более надежным методом прогноза заболевания. Среди онкомаркеров, используемых для диагностики РМП, представляют интерес индекс пролиферации Ki-67, определяющий активность опухолевого роста, матриксная металлопротеиназа-9 (matrix metalloproteinase-9 — MMP-9), свидетельствующая об инвазивном потенциале опухоли, ее способности разрушать компоненты экстрацеллюлярного матрикса, в том числе базальную мембрану [4, 5], и коллаген IV типа, в норме являющийся компонентом базальных мем-

бран, потеря экспрессии которого связана с характером роста, инвазией, утратой способности опухоли к формированию дифференцированных структур [6].

Целью исследования явилось изучение экспрессии иммуногистохимических маркеров Ki-67, MMP-9 и коллагена IV типа в НУРМП с целью выявления критериев прогноза рецидивирования и прогрессии заболевания.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследования явились оперативно удаленные в Харьковском областном клиническом центре урологии и нефрологии имени В.И. Шаповала 42 уротелиальных новообразования мочевого пузыря стадии T1, то есть без инвазии в мышечный слой стенки органа.

Сформированы три группы исследования: НУРМП без рецидивирования — I группа (14 случаев), НУРМП с рецидивированием без прогрессии — II группа (14 случаев) и НУРМП с рецидивированием и прогрессией в виде инвазии в мышечный слой стенки — III группа (14 случаев). В каждую из групп было включено равное число опухолей низкой степе-

ни злокачественности (НСЗ) — по 8 случаев и высокой степени злокачественности (ВСЗ) — по 6 случаев.

Иммуногистохимическое исследование проводилось с использованием первичных моноклональных антител фирмы ДАКО (Дания), Rady-to-Use к коллагену IV типа, ММР-9 и Ki-67. Показатели экспрессии маркеров, связанных с иммунным ответом, изучали в трех полях зрения микроскопа на гистологических срезах с наиболее выраженной экспрессией при увеличении $\times 400$. Подсчет количества экспрессирующих маркеры клеток проводился на микроскопе Primo Star с фотокамерой при увеличении объектива $\times 400$ с помощью программы Adobe Photoshop CS6. Площадь тестирования составила 0,057 мм² (57 000 мкм²). Для оценки иммуногистохимической реакции использовали полуколичественную шкалу от 0 до 3 с учетом процента экспрессирующих маркер клеток в поле зрения. Реакция на Ki-67: 1 балл — до 20% опухолевых клеток в поле зрения, 2 балла — 20–50% опухолевых клеток, 3 балла — более 50% опухолевых клеток. Реакция на коллаген IV типа: 0 — отсутствие реакции или экспрессия в менее 5% площади опухоли, 1 балл — слабая, прерывистая экспрессия маркера, 2 балла — непрерывное четкое окрашивание базальных мембран. Реакция на ММР-9: 1 балл — до 50% опухолевых клеток, 2 балла — более 50% опухолевых клеток различной степени интенсивности, 3 балла — интенсивная экспрессия 100% опухолевых клеток. Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета Statistica 6.0. Связь между признаками оценивалась по непараметрическому критерию χ^2 Пирсона и критерию Спирмана. Статистически значимым считалось значение $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследованные случаи НУРМП были представлены опухолями с различной гистоархитектоникой, дифференцировкой, особенностями инвазии. Как правило, новообразования имели папиллярную структуру с экзофитным ростом, сохраненной базальной мембраной, демонстрирующей хорошо выраженную экспрессию коллагена IV типа на границе со стромой. Такого рода папиллярные гистоструктуры, часто сливного характера, присутствовали в НУРМП НСЗ. Выраженные изменения гистоархитектоники сопровождалась уменьшением площади стромального компонента, участками солидного строения, зонами инвазии в подслизистую основу (lamina propria) и гетерогенной реакцией коллагена IV типа, исчезновение которой чаще было характерно для зон пальцевидной инвазии, но наблюдалось и при фронтальном росте опухоли. Реакция на коллаген IV типа зависела от дифференцировки НУРМП. Так, 42,9% (18/42) опухолей характеризовались отсутствием экспрессии коллагена IV типа в участках инвазии, при этом в НУРМП ВСЗ отсутствие коллагена IV типа было в 77,8% (14/18), а в НУРМП НСЗ — в 41,7% (10/24) случаев ($\chi^2=5,47$, $p < 0,01$).

Анализ экспрессии коллагена IV в группах исследования показал, что во II и III группах по сравнению с I отмечалось увеличение количества случаев с отрицательной экспрессией маркера, однако достоверных различий не выявлено (таблица).

Таблица. Распределение экспрессии коллагена IV типа, ММР-9, Ki-67 в НУРМП в зависимости от их принадлежности к группам исследования

Маркер, экспрессия	Группы			Достоверность, критерий χ^2
	I, n (%) n=14	II, n (%) n=14	III, n (%) n=14	
Коллаген IV типа	0 6 (42,9)	8 (57,1)	10 (71,4)	$\chi^2=2,33$; $p=0,31$
	1+ 8 (57,1)	6 (42,9)	4 (28,6)	
	2+ 0	0	0	($\chi^2_{crit}=5,99$)
Ki-67	0 0	0	0	$\chi^2=10,31$; $p=0,03$
	1+ 10 (71,4)	5 (35,7)	2 (14,3)	
	2+ 4 (28,6)	8 (57,1)	10 (71,4)	($\chi^2_{crit}=9,48$)
	3+ 0	1 (7,2)	2 (14,3)	
ММР-9	0 0	0	0	$\chi^2=7,5$; $p=0,11$
	1+ 8 (57,1)	4 (28,6)	2 (14,3)	
	2+ 4 (28,6)	4 (28,6)	4 (28,6)	($\chi^2_{crit}=9,48$)
	3+ 2 (14,3)	6 (42,8)	8 (57,1)	

НУРМП характеризовался различной пролиферативной активностью опухолевых клеток. Уровень экспрессии Ki-67 в среднем составил $30,71 \pm 5,11\%$ и зависел от дифференцировки опухоли. Так, все случаи рака с пролиферативной активностью 3+ были среди НУРМП ВСЗ, а низкая пролиферативная активность (1+) была характерна для НУРМП НСЗ ($\chi^2=15,9$; $p < 0,0001$). Различия между НУРМП НСЗ и НУРМП ВСЗ по уровню экспрессии Ki-67 достоверны ($\chi^2=17,36$; $p < 0,0001$). Полученные результаты согласуются с данными научной литературы [7] и являются закономерными, поскольку дифференцировка НУРМП определяется уровнем митотической активности, а следовательно, зависит и от процента клеток, экспрессирующих Ki-67. По данным некоторых авторов, маркер пролиферативной активности Ki-67 является критерием прогноза прогрессии заболевания и выживаемости пациентов [8], однако сведения противоречивы [9].

Выявлена слабая зависимость между уровнем экспрессии Ki-67 и принадлежности опухоли к группам исследования ($\chi^2=10,31$; $p < 0,03$). Экспрессия Ki-67 1+ была характерна для НУРМП I группы ($\chi^2=8,3$; $p < 0,005$), не характерна для III группы ($\chi^2=5,9$; $p < 0,03$), выраженная экспрессия (3+) была присуща III группе ($\chi^2=5,8$; $p < 0,03$). Однако зависимость между изученным маркером и принадлежностью опухоли к группам исследования была слабой ($p=0,03$) за счет достоверно значимого различия между I и III группами ($\chi^2=9,9$; $p=0,007$), в то время как достоверно значимого различия между I и II группами не наблюдалось ($\chi^2=4$; $p=0,13$). Полученные данные в целом указывают на ограниченное значение этого маркера для прогноза рецидивирования и прогрессии.

Прослежена обратная корреляционная связь между уровнем экспрессии Ki-67 и коллагена IV ($r=-0,755$; $p < 0,01$). Так, в НУРМП со слабой экспрессией Ki-67 экспрессия коллагена IV типа была хорошо выражена, а по мере возрастания экспрессии Ki-67 в опухолях, демонстрирующих возрастание инвазивных свойств и снижение дифференцировки, экспрессия коллагена IV типа снижалась.

Средняя экспрессия ММР-9 составила $2,04 \pm 0,26$. Опухолевые клетки, которые более интенсивно окрашивались маркером, отличались более выраженной клеточной атипией. Прослежена зависимость уровня экспрессии ММР-9 и дифференцировки НУРМП ($\chi^2=11,86$; $p=0,002$). Выраженный уровень экспрессии был характерен для НУРМП ВСЗ ($\chi^2=4,0$; $p < 0,05$) и отмечался в 55,6% (10/18) случаев этой дифференцировки. Образцы нерезидивирующего НУРМП (I группы) характеризовались наиболее слабой реакцией на ММР-9 при сравнении с опухолями, давшими рецидивы с прогрессией (III группой), различия достоверны ($\chi^2=7,2$; $p < 0,03$). Слабый уровень экспрессии ММР-9 (1+) был характерен для I группы ($\chi^2=5,3$; $p < 0,03$). В целом полученные результаты согласуются с данными других авторов. Высокая экспрессия ММР-9 является критерием прогноза рецидивирования, низкой общей выживаемости пациентов и выживаемости, связанной с прогрессией рака [10, 11].

Прослежена прямая корреляционная связь между уровнем экспрессии ММР-9 и Ki-67 ($r=0,783$; $p < 0,01$). Таким образом, обнаружена прямая зависимость между возрастанием способности раковых клеток к продуцированию металлопротеиназ, разрушающих компоненты экстрацеллюлярного матрикса, и повышением пролиферативной активности опухоли, что обуславливает активный рост и распространение рака. Выявлена также обратная корреляционная зависимость между ММР-9 и коллагеном IV типа ($r=-0,863$; $p < 0,01$), что согласуется со способностью ММР-9 разрушать коллаген IV типа и в целом указывает на взаимосвязь исследованных нами трех маркеров в процессах опухолевой прогрессии.

Выводы

1. Для НУРМП ВСЗ характерна экспрессия Ki-67 более 20% опухолевых клеток ($p < 0,0001$), выраженная экспрессия ММР-9 ($p < 0,05$) и отсутствие реакции на коллаген IV типа

($p < 0,01$), що определяє ці маркери як критерії злоякісності НУРМП.

2. В образцах рецидивующего НУРМП экспрессия Ki-67 и MMP-9 ниже, чем в опухолях рецидивующего с прогрессирующей НУРМП ($p < 0,01$ и $p < 0,03$ соответственно). Слабая экспрессия MMP-9 и Ki-67 (до 20% опухолевых клеток) характерна для рецидивующего НУРМП ($p < 0,03$ и $p < 0,005$ соответственно), выраженная экспрессия Ki-67 (более 50% опухолевых клеток) — для рецидивующего с прогрессирующей НУРМП ($p < 0,03$).

3. Прослежена прямая корреляционная зависимость между экспрессией Ki-67 и MMP-9 ($p < 0,01$) и обратная зависимость между экспрессией Ki-67 и коллагена IV типа ($p < 0,01$), MMP-9 и коллагена IV типа, что характеризует взаимосвязь процессов повышения пролиферативной активности раковых клеток с возрастанием их способности к продуцированию металлопротеиназ и разрушению экстрацеллюлярного матрикса, и коллагена IV типа в частности. Эти изменения приводят к более агрессивному биологическому поведению опухоли и могут служить критериями прогноза заболевания.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nagata M., Muto S., Horie S. (2016) Molecular biomarkers in bladder cancer: novel potential indicators of prognosis and treatment outcomes. *Dis. Markers*, 2016: 8205836. doi: 10.1155/2016/8205836
2. Gschwend J.E., Dahm P., Fair W.R. (2002) Disease specific survival as end-point of outcome for bladder cancer patients following radical cystectomy. *Eur. Urol.*, 41: 440–448. doi: 10.1016/S0302-2838(02)00060-X
3. Ogata D.C., Marcondes C.A., Tuon F.F. et al. (2012) Superficial papillary urothelial neoplasms of the bladder (PTA E P 1): Correlation of expression of P53, Ki-67 and CK 20 with histologic grade, recurrence and tumor progression. *Rev. Col. Bras. Cir.*, 39: 394–400. doi: 10.1590/S0100-69912012000500010
4. Enache M., Simionescu C., Lascu L.C. (2012) Ki67 and Bcl-2 immunoeexpression in primitive urothelial bladder carcinoma. *Rom. J. Morphol. Embryol.*, 53(3): 521–525. PMID: 22990542
5. Mannello F., Tonti G., Papa S. (2005) Matrix metalloproteinase inhibitors as targets of anticancer therapeutics. *Curr. Cancer Drug Targets*, 5: 285–298. DOI: 10.2174/1568009054064615
6. Brunner A., Tzankov A. (2007) The role of structural extracellular matrix proteins in urothelial bladder cancer (review). *Biomarker Insights*, 2: 418. PMID: 19662222, PMID: PMC2717820
7. Ahn C., Jeong C.W., Kwak C. et al. (2018) Ki-67 as a prognostic marker in upper urinary tract urothelial carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Genitourin. Cancer*, 16(4): 1–9. doi: 10.1016/j.clgc.2018.02.010
8. Wu P., Liu S., Zhang W. et al. (2015) Low-level Ki-67 expression as an independent predictor of bladder tumour recurrence in patients with primary upper tract urothelial carcinoma after radical nephroureterectomy. *Jpn J. Clin. Oncol.*, 45(12): 1175–1181. doi: 10.1093/jco/hyv139
9. Yalçın Ö., Sağlıcan Y., Özdemir S. et al. (2015) The relationship of p16, Ki-67, Bcl-2, P53 and CK20 immune expressions with recurrence in superficial bladder tumors. *World J. Pathol.*, 8: 44–51. http://www.nprpub.com/wjpp/content/4/8
10. Wu G.J., Bao J.S., Zeng F.C. et al. (2018) Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 is associated with bladder cancer pathogenesis. *J. Cancer Res. Ther.*, 14(Suppl.): S54–S59. doi: 10.4103/0973-1482.163761
11. Chenkui M., Chao L., Jundong Z. et al. (2017) Prognostic role of matrix metalloproteinases in bladder carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 8(19): 32309–32321. doi: 10.18632/oncotarget.15907

Значення експресії колагену IV типу, Ki-67 і MMP-9 у м'язово-неінвазивному уротеліальному раку сечового міхура для прогнозу перебігу захворювання

I.I. Yakovtsova, E.V. Titov, I.V. Ivakhno, O.V. Dolgaya, S.V. Daniluk
Харківська медична академія післядипломної освіти

Резюме. Рак сечового міхура (PCM) в 70–80% випадків діагностують на м'язово-неінвазивній стадії, при цьому рецидиви виникають у майже 70% пацієнтів. У рутинній діагностиці неінвазивного уротеліального раку сечового міхура (НУРМП) (стадії T1) імуногістохімічне дослідження може дати об'єктивну оцінку біологічної поведінки пухлини, а також служити критеріями прогнозу перебігу захворювання. **Мета** дослідження — вивчення експресії маркерів Ki-67, матриксної металопротеїнази-9 (matrix metalloproteinase-9 — MMP-9) і колагену IV типу в НУРМП для виявлення критеріїв прогнозу рецидивування і прогресії захворювання. **Об'єкт і методи дослідження.** Сформовані дві групи дослідження: НУРМП без рецидивування — I група (14 випадків), первинні НУРМП з рецидивуванням без прогресії — II група (14 випадків) та первинні НУРМП з рецидивуванням і прогресією у вторинні пухлини у вигляді інвазії в м'язовий шар стінки — III група (14 випадків). Імуногістохімічне дослідження проводилося з використанням первинних моно-

клональних антитіл фірми DAKO до колагену IV типу, MMP-9 і Ki-67. Показники експресії маркерів, пов'язаних з імунною відповіддю, вивчали в трьох полях зору мікроскопа на гістологічних зрізах із найбільш вираженою експресією при збільшенні $\times 400$. Підрахунок кількості експресуючих маркерів клітин проводився на мікроскопі Primo Star з фотокамерою при збільшенні об'єктива 400 за допомогою програми Adobe Photoshop CS6. Площа тестування становила 0,057 мм² (57 000 мкм²). Для оцінки імуногістохімічної реакції використовували напівкількісну шкалу від 0 до 3 з урахуванням відсотка експресуючих маркерів клітин в полі зору. Реакція на Ki-67: 1 бал — до 20% пухлинних клітин у полі зору, 2 бали — 20–50% пухлинних клітин, 3 бали — більше 50% пухлинних клітин. Реакція на колаген IV типу: 0 — відсутність реакції або експресія в менше ніж 5% площі пухлини, 1 бал — слабка, переривчаста експресія маркера, 2 бали — безперервне чітке фарбування базальних мембран. Реакція на MMP-9: 1 бал — до 50% пухлинних клітин, 2 бали — більше 50% пухлинних клітин різного ступеня інтенсивності, 3 бали — інтенсивна експресія 100% пухлинних клітин. **Результати та їх обговорення.** Для НУРМП високого ступеня злоякісності характерна експресія Ki-67 більше 20% пухлинних клітин ($p < 0,0001$), виражена експресія MMP-9 ($p < 0,05$) і відсутність реакції на колаген IV типу ($p < 0,01$), що визначає ці маркери як критерії злоякісності НУРМП. У I групі НУРМП експресія Ki-67 і MMP-9 нижче, ніж в III ($p < 0,01$ і $p < 0,03$ відповідно). Слабка експресія MMP-9 і Ki-67 (до 20% пухлинних клітин) характерна для I групи ($p < 0,03$ і $p < 0,005$ відповідно), виражена експресія Ki-67 (більше 50% пухлинних клітин) — для III групи ($p < 0,03$). Простежена пряма кореляційна залежність між експресією Ki-67 і MMP-9 ($p < 0,01$) і зворотною залежністю між експресією Ki-67 і колагену IV типу ($p < 0,01$), MMP-9 і колагену IV типу, що характеризує взаємозв'язок процесів підвищення проліферативної активності ракових клітин зі зростанням їхньої здатності до продукування металопротеїназ і руйнування екстрацелюлярного матриксу, та колагену IV типу зокрема. Ці зміни призводять до більш агресивної біологічної поведінки пухлини і можуть служити критеріями прогнозу захворювання.

Ключові слова: неінвазивний уротеліальний рак сечового міхура; імуногістохімія; Ki-67; MMP-9; колаген IV типу; рецидив; прогресія.

The significance of collagen IV type, Ki-67 and MMP-9 expression in non-invasive urothelial cancer of bladder for prediction of the disease

I.I. Yakovtsova, E.V. Titov, I.V. Ivakhno, O.V. Dolgaya, S.V. Daniluk
Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education

Summary. Bladder cancer (BC) in 70–80% of cases are diagnosed as non-muscle-invasive (stage T1), the overall rate of recurrence for non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) is approximately 70%. Immunohistochemistry represents an important objective complementary tool for the routine diagnosis of NMIBC and for the identification of the tumor biological behavior and also serve as criteria for predicting recurrence and progression of the disease. **The aim** of present study is to investigate the expression of Ki-67, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and collagen IV type in NMIBC for identification of the criteria for recurrence and progression of the disease. **Materials and methods.** Three groups of research were formed: NMIBC without recurrence — group I (14 cases), the primary NMIBC with recurrence without progression — group II (14 cases) and the primary NMIBC with recurrence and progression in secondary tumors in the form of invasion in muscle layer — group III (14 cases). An immunohistochemical study was carried out using primary monoclonal antibodies of DAKO to type IV collagen, MMP-9 and Ki-67. The expression indicators of markers associated with the immune response were studied in three fields of view of the microscope of histological sections with the most pronounced expression at magnification $\times 400$. Counting the number of cells expressing markers was carried out on a Primo Star microscope with a camera with an increase in $\times 400$ lens using Adobe Photoshop CS6. The area of testing was 0.057 mm² (57,000 μm^2). Reaction to Ki-67: 1 point —

up to 20% of tumor cells in sight, 2 points — 20–50% of tumor cells, 3 points — more than 50% of tumor cells. Reaction to type IV collagen: 0 — no reaction or expression in less than 5% of the tumor area, 1 point — weak, intermittent expression of the marker, 2 points — continuous clear staining of the basement membranes. Reaction to MMP-9: 1 point — up to 50% of tumor cells, 2 points — more than 50% of tumor cells of varying degrees of intensity, 3 points — intense expression of 100% of tumor cells. **Results and discussion.** A high grade of malignancy is characterized by expression of Ki-67 over 20% of tumor cells ($p < 0.0001$), pronounced expression of MMP-9 ($p < 0.05$) and lack of response to type IV collagen ($p < 0.01$), which defines these markers as criteria for the malignancy of NMIBC. In group I expression of Ki-67 and MMP-9 is lower than in group III ($p < 0.01$ and $p < 0.03$, respectively). Weak expression of MMP-9 and Ki-67 (up to 20% of tumor cells) are characteristics of cancers of group I ($p < 0.03$ and $p < 0.005$, respectively), Ki-67 expression over 50% of tumor cells associated with group III ($p < 0.03$). A direct correlation between the expression of Ki-67 and MMP-9 ($p < 0.01$) and the inverse relationship between Ki-67 and type

IV collagen ($p < 0.01$), MMP-9 and type IV collagen are traced, which characterizes the relationship processes of increasing the proliferative activity of cancer cells with an increase in their ability to produce metalloproteinases and destroy the extracellular matrix, and type IV collagen in particular. These changes lead to a more aggressive biological behavior of the tumor and can serve as criteria for the prognosis of the disease.

Key words: non-invasive urothelial cancer of the bladder; immunohistochemistry; collagen IV type; Ki-67; MMP-9; recurrence; progression.

Адрес:

Титов Евгений Вячеславович

61000, Харьков, ул. Амосова, 58

Харьковская медицинская академия последипломного образования

E-mail: titovevgeniy@ukr.net

Correspondence:

Titov Evgeniy

58 Amosova str., Kharkiv 61000

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education

E-mail: titovevgeniy@ukr.net