

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В ДИАГНОСТИКЕ, СТАДИРОВАНИИ И ПРОГНОЗЕ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ УРОТЕЛИАЛЬНОЙ КАРЦИНОМЫ

Цмокалюк Е.Н., Маслякова Г.Н.

*ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И.Разумовского Минздрава России», Саратов
Саратов, Россия (410012, г. Саратов, ул.Б.Казачья, 112) etsmokalyk@mail.ru*

Проведен анализ результатов иммуногистохимического исследования 13 моноклональных антител в биопсийном материале фрагментов ткани опухоли, полученного у пациентов, страдающих различными формами рака мочевого пузыря. Было обследовано 106 пациентов с новообразованиями мочевого пузыря, проходивших лечение в НИИ «Фундаментальной и клинической уронефрологии» Саратовского ГМУ. С помощью обзорных методов окрашивания диагноз уротелиального рака был поставлен 94 пациентам. Иммуногистохимические реакции проводили, используя стрептавидин-биотиновый метод. После обработки полученных данных все используемые антитела были разбиты на три основные группы по диагностической значимости: маркеры, информативные для ранней и дифференциальной диагностики поверхностных форм рака – маркеры Ki67, p53, p63; для определения глубины инвазии – маркеры p53, EGFR; для прогноза заболевания – маркер Ki67.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, моноклональные антитела, маркеры прогноза.

IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS IN DIAGNOSTICS, STAGE DETERMINATION AND THE FORECAST OF VARIOUS FORMS OF THE UROTHELIAL CARCINOMA

Tsmokalyuk E.N., Maslyakova G.N.

*Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky
Saratov, Russia (410012, Saratov, Bolshaya Kazachia st. 112) etsmokalyk@mail.ru*

The analysis of results of immunohistochemical studies of monoclonal antibodies in 13 biopsies fragments of tumor tissue obtained from patients suffering from various forms of bladder cancer. 106 patients with bladder tumors who were treated at the Research Institute "Fundamental and Clinical uronefrologii" Saratov State Medical University were examined. With the help of survey methods for the diagnosis of urothelial cancer dye was placed 94 patients. Immunohistochemical reactions were carried out using a streptavidin-biotin method. After processing the data used by all antibodies were divided into three major groups of diagnostic significance: markers informative for the early and differential diagnosis of superficial forms of cancer - markers Ki67, p53, p63; to determine the depth of invasion - p53, EGFR; for prognosis - marker Ki67.

Key words: bladder cancer, monoclonal antibodies, forecast markers stage.

Высокий интерес к совершенствованию ранней диагностики онкоурологических заболеваний обусловлен их широким распространением, высокой смертностью и снижением качества жизни больных, нередко сопровождающегося развитием инвалидности [4]. Рак мочевого пузыря является самым частым новообразованием мочевыводящих путей.

Ежегодно в мире раком мочевого пузыря заболевают 335,8 тыс. человек, с развитием летального исхода у 132 тыс. человек, то есть каждый третий умирает от данного заболевания. В России регистрируется ежегодно примерно 12700 новых случаев рака мочевого пузыря. Его доля в структуре онкологической заболеваемости среди мужского населения составляет 4,5 %, среди женского населения – 1,1 % [1].

В Российской Федерации выявление больных с поверхностной формой рака (I стадия) составляет всего лишь 20–30 % наблюдений, в противоположность зарубежным данным, в соответствии с которыми I стадия рака мочевого пузыря диагностируется в 80 %

случаев [2]. В нашей стране в 11,6–15,6 % наблюдений выявляется IV стадия рака мочевого пузыря.

Следует указать и тот факт, что при адекватной диагностике и своевременном лечении жизнь умерших от рака мочевого пузыря можно было бы продлить в среднем на 14 лет. Именно поэтому, своевременная диагностика опухолей мочевого пузыря остается одной из важнейших задач современной онкоморфологии.

В современной литературе имеется большой объем опубликованных работ по применению диагностических иммуногистохимических маркеров при раке мочевого пузыря [3,5,6]. Однако, в клинических рекомендациях, выпущенных по инициативе Российского общества онкоурологов с разрешения Европейской ассоциации по урологии, в 2009 году сведения по применению конкретных иммуногистохимических маркеров для диагностики рака мочевого пузыря отсутствуют. Нет их и в стандартах диагностики и лечения рака мочевого пузыря, как в России, так и в Европе. Все вышесказанное позволило нам сформулировать цель нашего исследования.

Разработать панель иммуногистохимических маркеров ранней диагностики, стадирования и прогноза рака мочевого пузыря.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужили операционный и биопсийный материал 106 пациентов с новообразованиями мочевого пузыря, проходивших лечение в НИИ «Фундаментальной и клинической уронефрологии» ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И.Разумовского Минздравсоцразвития России. С помощью обзорных методов окрашивания диагноз уротелиального рака был поставлен 94 пациентам. Остальные 12 пациентов составили группу сравнения. Операционный и биопсийный материалы были зафиксированы в 10 %-м растворе нейтрального формалина и залиты в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм, окрашенные гематоксилин-эозином, были подвергнуты обзорному морфологическому анализу, при котором стадию рака определяли в соответствии с классификацией TNM, а степень дифференцировки опухолевых клеток оценивали в соответствии с рекомендациями ВОЗ, 2004. Микроскопическое изучение препаратов было проведено с применением бинокулярного микроскопа «Micros MC100» при 400-кратном увеличении.

Иммуногистохимические реакции проводили на серийных парафиновых срезах (5мкм), используя стрептавидин-биотиновый метод. В качестве детекционной системы применяли систему LSAB2 System, HRP (K0675), Dako, в качестве хромогена – диаминобензидин (Dako).

Иммуногистохимическое исследование 13 маркеров было проведено на биопсийном и операционном материале 66 пациентов. Все используемые моноклональные антитела были разделены на группы по функциональной значимости:

- маркеры пролиферативной активности – Ki67, PCNA, p63;
- супрессор опухолевого роста – p53;
- маркер апоптоза – Bcl2;
- рецептор эпидермального фактора роста – EGFR;
- цитокератиновый профиль – CK7, CK8, CK10/13, CK17, CK18, CK19.

Интенсивность реакций с антигенами, локализованными в цитоплазме (цитокератины 7,8,13,17,18,19) и на мембранах клеток (EGFR), оценивали полуколичественным способом по балльной шкале от 0 до 3, учитывая выраженность реакции и ее локализацию: 0 – отсутствие реакции, 1 – слабая реакция, 2 – умеренная реакция, 3 – сильная реакция.

Результаты реакций с антигенами, имеющими ядерную локализацию (PCNA, Ki67, p53, p63, bcl-2), оценивали по системе подсчета histochemical score. Система подсчета включает в себя интенсивность иммуногистохимической окраски по 3-балльной шкале и долю (%) окрашенных клеток и представляет собой сумму произведений процентов,

отражающих долю клеток с различной интенсивностью окраски на балл, соответствующий интенсивности реакции. Интенсивность окраски 0 – нет окрашивания, 1 – слабое окрашивание, 2 – умеренное окрашивание, 3 – сильное окрашивание.

Формула подсчета следующая: $\text{histochemical score} = \sum P(i) \times I$,
где i – интенсивность окрашивания, выраженная в баллах от 0 до 3.

$P(i)$ – процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью. Максимальное значение гистосчета должно соответствовать 300.

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ статистической обработки результатов SSPS 13.0 for Windows.

Результаты исследования

При анализе показателей экспрессии иммуногистохимических маркеров, имеющих ядерное окрашивание, необходимо выделить маркер пролиферации Ki67, который четко показал отрицательную экспрессию в группе сравнения и имел корреляционную зависимость высокой степени значимости между стадией рака мочевого пузыря, процентом экспрессирующих клеток и интенсивностью иммуногистохимической реакции. То есть, с увеличением глубины инвазии опухоли возрастал процент экспрессирующих клеток и степень их экспрессии. Учитывая это, мы считаем, что данный маркер может использоваться в качестве критерия на ранних этапах диагностики рака мочевого пузыря.

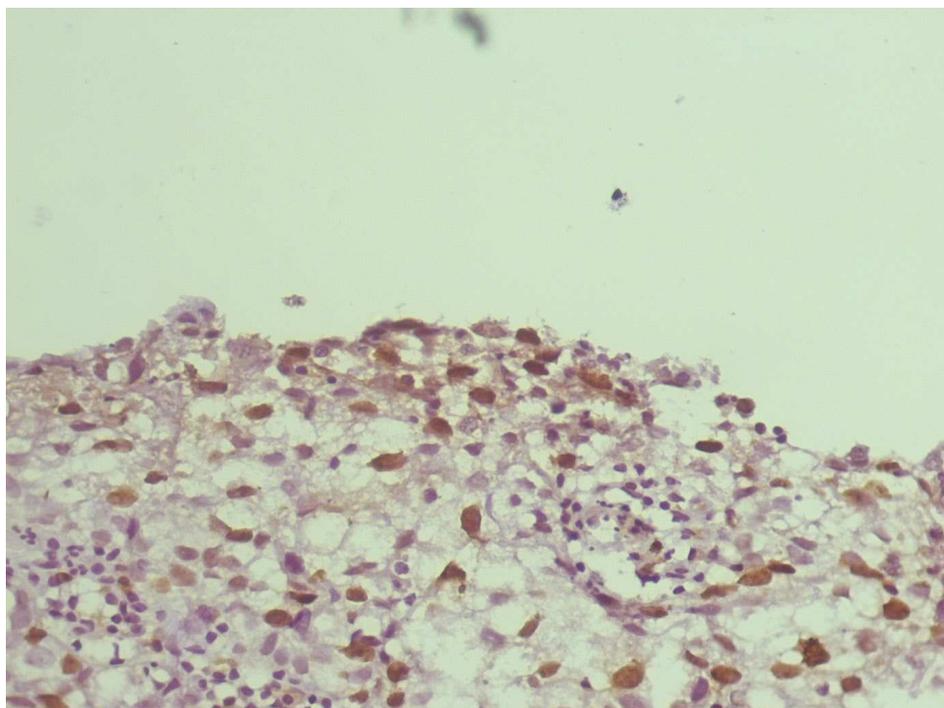


Рис. 1. Инвазивный уротелиальный рак. Умеренная и высокая экспрессия Ki-67 в ядрах уротелия

Равнозначные показатели получили при анализе экспрессии моноклонального антитела p53, являющегося белком-регулятором клеточного цикла и апоптоза. Отмечалось отсутствие окрашивания препаратов в группе сравнения, а интенсивность экспрессии и процент клеток с выраженной окраской имели четкую тенденцию к увеличению с возрастанием глубины инвазии опухоли. Раковые клетки с интенсивной иммуногистохимической реакцией маркера p53 появляются только в тех случаях, когда уротелиальная карцинома начинает прорастать в мышечный слой. Данные показатели позволяют использовать p53 как критерий прогноза заболевания, так и для определения глубины инвазии.

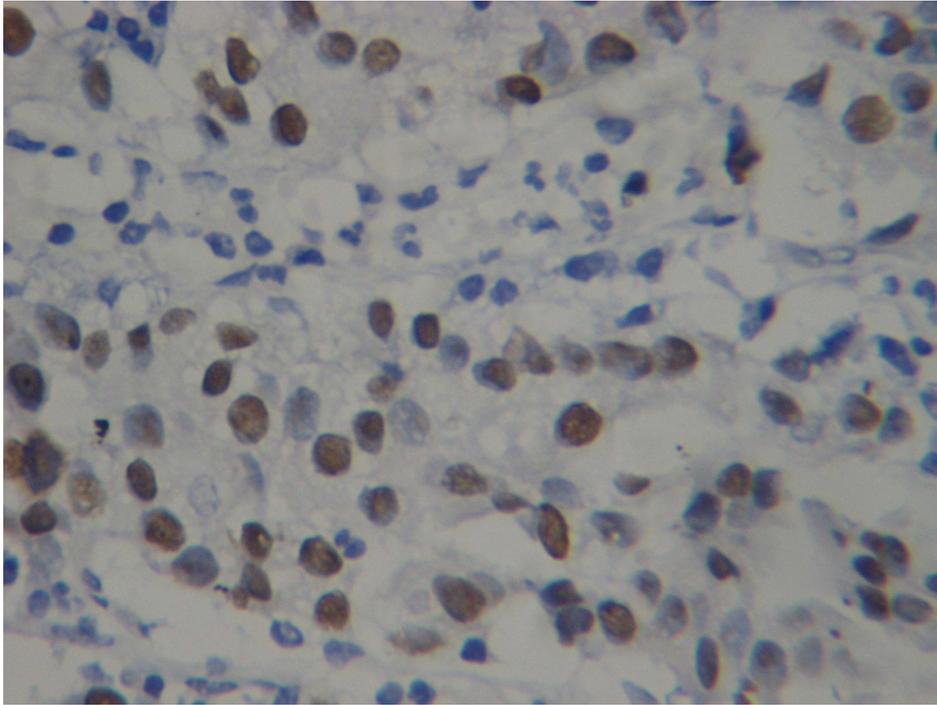


Рис. 2. Умеренная и выраженная экспрессия маркера Р53 в клетках инвазивной уротелиальной карциномы

Белок р63 также не дает экспрессии в группе сравнения. Однако достоверных различий частоты и интенсивности иммуногистохимической реакции в группах больных с различной стадией заболевания не выявлено.

При иммуногистохимической реакции на антигены, локализованные в цитоплазме, было установлено, что их экспрессия во всех исследованных группах больных является положительной. Достоверно значимых различий между группами больных по показателям иммуногистохимических реакций с цитокератинами (СК7, СК8, СК10/13, СК17, СК18, СК19) не установлено.

При исследовании полученных результатов иммуногистохимической реакции рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) установлено, что его экспрессия отсутствует в группе сравнения и в группе больных с неинвазивными раками мочевого пузыря и нарастает с увеличением глубины инвазии. Таким образом, данное антитело не дает возможности на ранних этапах развития дифференцировать между собой доброкачественные процессы и злокачественные опухоли, поэтому данный маркер целесообразно использовать только для определения глубины инвазии опухоли.

Маркеры PCNA, Bcl2 не показали достоверной разницы в экспрессии ни в одной из изучаемых групп.

Выводы

Таким образом, проведенные исследования 13 моноклональных иммуногистохимических антител позволили разработать три основных направления в использовании данных маркеров:

1. Для ранней и дифференциальной диагностики – определение маркеров Ki-67, p53, p63.
2. Для глубины инвазии (стадирующая) – определение онкомаркера p53, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR).
3. Для прогноза заболевания – определение маркера пролиферативной активности Ki67.

Список литературы

1. Давыдов М.И. Злокачественные образования в России и странах СНГ в 2001 г. / М.И. Давыдов, Е.М. Аксель. – М., 2003.
2. Лопаткин Н.А. Руководство по урологии. – М.: Медицина, 1998. – Т.3. – 670 с.
3. Магер О.В., Казанцева Н.В. Прогностическое значение биологических маркеров у больных поверхностным и инвазивным раком мочевого пузыря // Онкоурология. – 2006. – №4. – С. 30-34.
4. Матвеев Б.П. Клиническая онкоурология.– Москва, 2003. – С.195-244.
5. Петров, С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / С.В. Петров, Н.Т. Райхлин. – Казань, 2004. – 456 с.
6. Франк Г.А., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю. Иммуногистохимическая характеристика и степень дифференцировки рака мочевого пузыря // Архив патологии. – 2002. – Т.64, № 6. – С.16-18.

Рецензенты:

Федорина Т.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей и клинической патологии: патологической анатомии, патологической физиологии ГБОУ ВПО «СамГМУ» Минздравсоцразвития РФ. г. Самара.

Бугоркова С.А., д.м.н., зав. лабораторией патоморфологии, ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов.