

УДК 616-006.04

ТЕХНОЛОГИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ IN SITU ГИБРИДИЗАЦИИ В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ РЕЦИДИВА РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ У ЛИЦ ПОЖИЛОГО И СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТА

Пушкин А.С., Рыжак Г.А., Парфёнов Ю.А.

*Санкт-Петербургский государственный институт психологии и социальной работы,
Санкт-Петербург, e-mail: my-internety@yandex.ru*

В статье изложены результаты опыта применения методики флуоресцентной in situ гибридизации (FISH) в ранней диагностике рецидивов поверхностного рака мочевого пузыря у 103 пациентов среднего, пожилого и старческого возраста в течение первых 24 месяцев после перенесённой трансуретральной (ТУР) резекции мочевого пузыря. Авторами получены сведения о том, что применение методики FISH актуально для ранней диагностики рецидивов рака мочевого пузыря, особенно у лиц старческого возраста. Уже на самых начальных стадиях и при высокой степени дифференцировки опухоли FISH-методика показала значительные результаты. Так, у больных на стадии pTaG1 чувствительность метода составила 85,7%, специфичность – 94,7% и точность – 88,2%. Отмечено, что для полноты оценки картины заболевания необходимо вести подсчёт не только гиперплоидии специфических для рака мочевого пузыря хромосом, но и учитывать количество делеций локуса 9p в 21 хромосоме.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, рецидив рака мочевого пузыря, флуоресцентная in situ гибридизация, трансуретральная резекция, пожилой и старческий возраст

TECHNOLOGY OF FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION IN EARLY DIAGNOSTICS OF RELAPSE OF A BLADDER CANCER AT OLD AND ELDERLY PERSONS

Pushkin A.S., Ryzhak G.A., Parfjonov J.A.

*Saint-Petersburg State Institute of Psychology and Social Work, St. Petersburg,
e-mail: my-internety@yandex.ru*

In article results of experience of application of a technique of fluorescence in situ hybridization (FISH) in early diagnostics of relapse of a superficial bladder cancer at 103 patients of middle, old and elderly persons, within the first 24 months after transferred transurethral of a resection of a bladder (TURB) are stated. Authors received data that application of a technique of FISH is actual for early diagnostics of relapse of a bladder cancer, especially at elderly persons. Already at the most initial stages and high degree of a differentiation of a tumor, the FISH technique showed considerable results, so at patients at a stage pTaG1: sensitivity of a method – 85,7%, specificity – 94,7% and accuracy – 88,2%. It is noted that for completeness of an assessment of a picture of a disease it is necessary to conduct calculation not only polysomy specific to a cancer of a bladder of chromosomes, but also to consider quantity of deletion of a locus 9p in 21 chromosomes.

Keywords: bladder cancer, relapse of a bladder cancer, fluorescence in situ hybridization, transurethral resection, old and elderly persons

В структуре онкологических заболеваний населения России рак мочевого пузыря (РМП) занимает 8-е место среди мужчин и 18-е – среди женщин. Около 80% пациентов относятся к возрастной группе 50–80 лет, а пик заболеваемости приходится на 7-е десятилетие жизни. Ежегодно в России регистрируется 11267 больных с впервые выявленным диагнозом РМП [4]. Уровень смертности от этого заболевания во многих индустриально развитых странах составляет от 3 до 8,5% [5].

Цитостопия и цитологическое исследование остаются стандартными рутинными диагностическими инструментами для обнаружения и контроля РМП.

Генетические нарушения появляются уже на начальных стадиях развития опухоли и являются основными определяющими факторами малигнизации. Флуоресцентная in situ гибридизация (FISH) является цитогенетической технологией,

которая используется для анализа хромосомных нарушений в исследуемых клетках. FISH использует флуоресцентные метки в исследовании ДНК, которые крепятся к центромерам хромосом или уникальным участкам, для обнаружения клетки с числовыми, структурными нарушениями, показательными для злокачественного развития [3]. В настоящее время становится широко популярна FISH-методика с высокой чувствительностью и специфичностью для обнаружения РМП, использующая четыре флуоресцентные метки, выявляющие цитогенетические транслокации в хромосомах 17, 3 и 7 и локус-специфический ген 9p21 – ген из семейства опухолевых супрессоров, в 9-й хромосоме [1, 2].

Материалы и методы исследования

Проведено обследование 103 человек, проходящих диспансерное наблюдение по поводу поверхностного рака мочевого пузыря, после ТУР. Обследуемые лица по результатам наблюдения в течение

24 месяцев после ТУР мочевого пузыря были разделены на 3 группы: 1 – пациенты в возрасте от 35 до 59 лет (средний возраст), 31 человек; 2 – 60–74 года (пожилой возраст), 37 человек; 3 – 75–86 лет (старческий возраст), 35 человек. Всем пациентам в течение 24 месяцев после ТУР мочевого пузыря каждые 3 месяца было проведено однотипное обследование, включающее цистоскопию с последующей гистологией и FISH-методикой.

Методика FISH осуществлялась на реагентах компании АВБОТТ (США). Набор UroVysion™ Multi-color FISH Probe Mixture включал флуоресцентные ДНК-зонды для определения анеуплоидии хромосом 3, 7 и 17 и утраты локуса 9p21 в образцах мочи больных раком мочевого пузыря (CEP 3 SpectrumRed™, CEP 7 SpectrumGreen, CEP 17 SpectrumAqua, LSI 9p21 (p16) SpectrumGold™). Образцы мочи подготавливались к исследованию согласно протоколу методики. Результат считался FISH-положительным, если в 4 из 25 аномальных клеток обнаруживалось увеличение количества сигналов по 2-м и более хромосомам (3, 7 или 17) в одной и той же клетке, или если более чем в 12 из 25 аномальных клетках отсутствует сигнал 9p21. Если это условие не соблюдалось, то препарат анализировали до тех пор, пока не было обнаружены: 4-клетки с увеличенным количеством сигналов по 3, 7 и 17 хромосомам или 12 клеток с отсутствием сигнала 9p21.

Результаты исследования и их обсуждение

Учитывая тот факт, что клинико-морфологические факторы не позволяют полно-

ценно прогнозировать развитие рецидива рака мочевого пузыря, а количество поздних выявлений остается высоким, в том числе у лиц пожилого и старческого возраста, мы провели анализ молекулярно-цитогенетических маркеров данной опухоли с использованием флуоресцентной in situ гибридизации (FISH) параллельно с цистоскопией и гистологическим исследованием.

Из 103 пациентов в течение 24 месяцев по данным гистологического исследования у 49 (47,6%) человек развился рецидив заболевания. Из 103 пациентов в течение 24 месяцев, по данным FISH-методики у 51 (49,5%) человека развился рецидив заболевания, однако в четырех случаях FISH-методика дала неверные ответы: 3 ложноположительных и 1 ложноотрицательный результаты, тем самым показав чувствительность методики – 94,2%, специфичность – 98,2% и точность – 96,3%. В таблице приведены условные обозначения параметров расчета сравнительных характеристик ($p < 0,05$).

В результате сравнения уровня чувствительности, специфичности и точности методики в зависимости от стадии и дифференцировки опухоли выявлены значимые различия, результаты которых представлены в табл. 1 ($p = 0,03$).

Таблица 1

Зависимость чувствительности, специфичности и точности FISH-методики от стадии заболевания и степени дифференцировки опухоли

Стадия заболевания и степень дифференцировки опухоли	Сравнительные характеристики		
	чувствительность, %	специфичность, %	точность, %
pTaG1	85,7	94,7	88,2
pTaG2	88,6	95,8	92,1
pTaG3	90,7	96,2	93,8
pTis G1	93,8	98,3	96,5
pTis G2	94,3	98,7	98,7
pTis G3	96,5	100	98,4
pT1G1	98,4	100	99,2
pT1G2	99,4	100	99,5
pT1G3	100	100	100

Необходимо отметить, что уже на самых начальных стадиях и при самой высокой степени дифференцировки опухоли FISH-методика показала не менее положительные результаты, так у больных на стадии pTaG1: чувствительность метода составила 85,7%, специфичность – 94,7% и точность – 88,2%.

Полисомию пар 3, 7 и 17 хромосом определяли у всех из 51 больного, у которых FISH-методика дала положительный результат на рецидив рака мочевого пузыря, включенных в исследование, делецию локуса 9p21 – у 37(72,5%) пациентов.

В зависимости от частоты встречаемости аномальных клеток мы выделили 4 группы:

- 1) 1–4% клеток;
- 2) 5–30%;
- 3) 31–60%;
- 4) 61–100%.

Частота выявленных нами хромосомных аномалий представлена в табл. 2.

У большей части пациентов аномалии по 3, 7, 17 и 9 хромосомам встречались более чем в 60% клеток. Так, 61–100% клеток с гиперплоидией по 3 хромосоме выявлены у 22 (47,8%) человек, по 7 хро-

мосоме у 17 (43,6%) и по 17 хромосоме – у 19 (45,2%) человек, а с делецией локуса 9p21 – у 15 (40,5%).

При сравнении возрастных групп определяется большее количество пациентов с числом аномальных клеток 61–100% в тре-

тней группе – (75–86 лет, $n = 35$) более чем в 45% случаев, в то время как в первой (35–59 лет, $n = 31$) и во второй (60–74 лет, $n = 37$) группах – до 35%. Распределение пациентов с числом аномальных клеток 61–100% по возрастным группам представлены в табл. 3.

Таблица 2

Частота встречаемости хромосомных aberrаций по группам

Вид хромосомной aberrации	Количество клеток в препарате с хромосомными aberrациями					Всего	
	1–4 %	5–30 %	31–60 %	61–100 %	абс.	%	
Гиперплоидия 3 хромосомы	5/10,9	12/26,1	7/15,2	22/47,8	46	90,2	
Гиперплоидия 7 хромосомы	4/10,2	9/23,1	9/23,1	17/43,6	39	76,5	
Гиперплоидия 17 хромосомы	4/9,6	13/30,9	6/14,3	19/45,2	42	82,4	
Делеция локуса 9p21	6/16,2	6/16,2	10/27,3	15/40,5	37	72,5	

Таблица 3

Распределение пациентов с числом аномальных клеток 61–100% по возрастным группам

Стадия	Группа 1. 35–59 лет, $n = 31$	Группа 2. 60–74 лет, $n = 37$	Группа 3. 75–86 лет, $n = 35$	Всего
Гиперплоидия 3 хромосомы	5 (22,7%)	7 (31,8%)	10 (45,5%)	22
Гиперплоидия 7 хромосомы	4 (23,5%)	5 (29,4%)	8 (47,1)	17
Гиперплоидия 17 хромосомы	5 (26,3%)	5 (26,3%)	9 (47,4%)	19

С учетом делеции 9p21 частота FISH-положительных результатов оказалась достоверно ($p = 0,04$) выше по сравнению FISH-положительными результатами только по гиперплоидии 3, 7 и 17 хромосом

– 51 и 46 случаев соответственно, что составило разницу почти в 10%. Количество FISH-положительных результатов с учетом делеции 9p21 и без нее представлено на рис. 1.

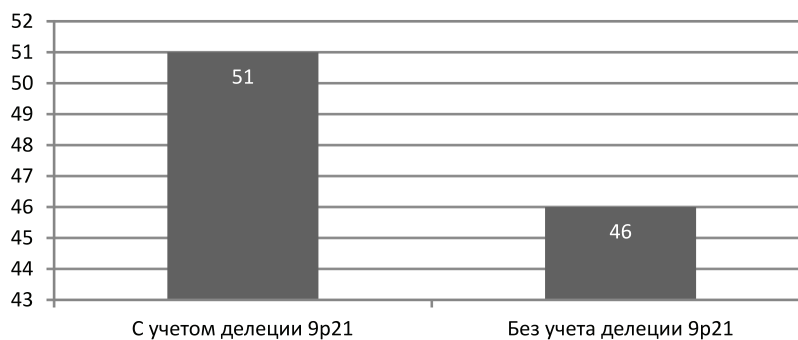


Рис. 1. Количество FISH-положительных результатов с учетом делеции 9p21 и без нее

При анализе дополнительных параметров FISH-диагностики в настоящей работе выявлен рост частоты (среднего числа клеток с хромосомными аномалиями) и глубины (среднего числа копий хромосом 3, 7 и 17 и локуса 9p21) генетических аномалий с увеличением стадии и степени дифференцировки опухоли. Обращает на себя внимание ступенчатое увеличение частоты аномалий при переходе от степени дифференцировки опухоли G1, G2 к степени G3. Результаты этих наблюдений представлены на рис. 2.

Необходимо обратить внимание на то, что наличие ложноположительных резуль-

татов при использовании метода флуоресцентной *in situ* гибридизации не всегда является таковым. Неоднократно было замечено в ходе исследования, что у пациентов, у которых на ранних сроках после трансуретральной резекции мочевого пузыря методика FISH давала положительный результат наряду с отрицательными данными цистоскопии и гистологического исследования, спустя месяц или два выявлялся рецидив заболевания, подтвержденный морфологическими исследованиями.

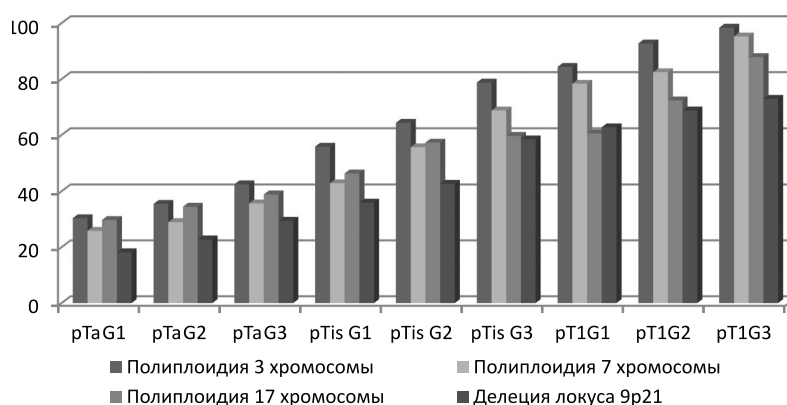


Рис. 2. Распределение частоты (среднего числа клеток с хромосомными аномалиями) и глубины (среднего числа копий хромосом 3, 7 и 17 и локуса 9p21) генетических аномалий с увеличением стадии и степени дифференцировки опухоли, %

Заключение

Внедрение молекулярно-цитогенетических методов в урологическую практику будет способствовать ранней диагностике рака мочевого пузыря, окажет существенную помощь при мониторинге заболевания, значительно повысит эффективность выявления рецидивов РМП, особенно у лиц пожилого возраста. Использование молекулярно-цитогенетических маркеров позволяет расширить общепринятую систему клинко-морфологических маркеров прогноза течения поверхностного рака мочевого пузыря.

Список литературы

1. Ебле Й.Н. Классификация опухолей Всемирной организации здравоохранения / Й.Н. Ебле, Г. Саутер, Й.И. Епстеин, И.А. Сестерхенн // Патологическая анатомия и генетика опухолей мочевыделительной системы и мужских половых органов. – 2004. – № 7. – С. 90–157.
2. Кипп Б.Р. Количественная оценка флуоресцентной ин situ гибридизации в диагностике рецидивов рака мочевого пузыря и его прогрессии в мышечноинвазивную стадию / Б.Р. Кипп, М. Танасеску Т.А. Елсе и др. // Мол. диагн. – 2009. – № 11(2). – С. 148–154.
3. Халлинг, К.Ц. Диагностика рака мочевого пузыря методом ФИШ (Уро Визион методика) / К.Ц. Халлинг, Б.Р. Кипп // Адв. Анат. Патол. – 2008. – № 15(5). – С. 279–286.
4. Чиссов В.И. Злокачественные новообразования в России в 2006 году (заболеваемость и смертность) / В.И. Чиссов, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – М.: ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий», 2008. – 248 с.
5. Чиссов В.И. Злокачественные новообразования в России: статистика, научные достижения,

проблемы / В.И. Чиссов, В.В. Старинский, Б.Н. Ковалев и др. // Казан. мед. журн. – 2004. – Т. 81, №4. – С. 241–248.

References

1. Eble J.N., Sauter G., Epstein J.I., 2004, «Classification of tumors of World Health Organization», Патологическая анатомия и генетика опухолей мочевыделительной системы и мужских половых органов, no. 7, pp. 90–157.
2. Kipp B.R., Tanasescu M., Else, T.A., et al., 2009, «Quantitative assessment fluorescent in situ hybridization in diagnostics of recurrence of a cancer of a bladder and its progression in a muscle-invasive stage», *J. Mol. Diagn.*, no. 11(2), pp. 148–154.
3. Halling K.C., Kipp B.R., 2008, «Diagnostics of a cancer of a bladder by a FISH method (Uro Vision technique)», *Adv. Anat. Pathol.*, no. 15(5), pp. 279–286.
4. Chissov V.I., 2008, «Malignant neoplasms in Russia in 2006 (a case rate and a mortality)», *FGU «MNI OI im. P.A. Gercena Rosmedtehnologij»*, p. 248.
5. Chissov V.I., Starinskij V.V., Kovalev B.N., 2004, «Oncology in Russia: statistics, scientific achievements, problems», *Kazan. med. zhurn.* no. 4(81), pp. 241–248.

Рецензенты:

Кветной И.М., д.м.н., профессор, заведующий отделом клеточной биологии и патологии Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии, г. Санкт-Петербург;

Арутюнян А.В., д.б.н., профессор, заведующий лабораторией биохимии Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии, г. Санкт-Петербург.

Работа поступила в редакцию 16.10.2012.