

Лабораторная диагностика рака мочевого пузыря.

*Боженко В.К., Кулинич Т.М., Мельникова Н.В., Нестеров П.В. ФГУ
“РНЦРР Росмедтехнологий” г.Москва.*

Резюме

В настоящее время большое распространение получил автоматизированный метод диагностики опухолей – проточная цитометрия. Были проанализированы результаты проточной цитометрии осадка мочи 86 больных РМП (72 мужчины и 14 женщины) и 30 больных страдающих доброкачественными заболеваниями мочевого пузыря (n=116). Анализ показателей проточной цитометрии был возможен в 78 образцах мочи (90,7%) полученных от больных раком мочевого пузыря. В обеих группах больных РМП чувствительность проточной цитометрии оказалась выше чувствительности цитологического исследования 72% и 54% соответственно, для группы больных с впервые выявленным раком мочевого пузыря, и 70% и 50% соответственно, для группы мониторинга. Специфичность проточной цитометрии составила 86%, специфичность цитологического исследования - 100%.

Laboratory diagnostic in bladder cancer.

Federal State Enterprise Russian Scientific Center of Roentgenoradiology (Russian Medical Technologies Department)

Bojenko V.K, Kulinich T.M., Melnikova N.V., Nesterov P.V.

Currently, a large spread automated method for the diagnosis of tumors - flow cytometry. Results were analyzed urine flow cytometry sludge RMP 86 patients (72 males and 14 females) and 30 patients suffering from benign disease bladder (n = 116). Analysis of flow cytometry was possible in 78 urine samples (90.7%) from bladder cancer patients. In both groups of patients RMP sensitivity of flow cytometry was higher sensitivity cytological studies 72% and 54%, respectively, for the first time, the group of patients with bladder cancer identified, and 70% and 50%, respectively, for the monitoring group. Specificity flow cytometry was 86%, specificity of the cytological studies - 100%.

Оглавление:

Введение.

Материалы и методы.

Результаты.

Выводы.

Список литературы.

Введение.

Рак мочевого пузыря (РМП) является актуальной проблемой современной онкологии. В структуре онкологической заболеваемости в России частота РМП достигает ориентировочно 15,1 случаев на 100 000 человек в год у мужчин и 3,5 - у женщин. На долю РМП в структуре онкологической заболеваемости, в нашей стране, приходится 8,9% [1]. Начиная с XIX века, для диагностики РМП стали широко применять цитологическое исследование осадка мочи. Среди всех своих плюсов этому методу присущи и существенные недостатки, среди которых, прежде всего, необходимо отметить неудовлетворительные показатели чувствительности, особенно в случае поверхностных и высокодифференцированных форм РМП [2,3]. В последние годы внимание исследователей сосредоточено на поиске новых онкомаркеров РМП. В настоящее время разработаны методы ранней диагностики РМП, основанные на тумор-ассоциированных антигенах [4,5]. Кроме этого создано большое количество моноклональных антител, специфичных для переходно-клеточного РМП (M344, 19A211, T138 и др.). Большинство, разработанных в последние годы, методов лабораторной диагностики РМП обладает почти 100% чувствительностью. Однако недостатком данной группы тестов является большая частота ложноположительных результатов, что обуславливает низкую специфичность. Таким образом, надежного теста пока не существует. Многие из разработанных маркеров еще изучаются и не нашли широкого практического применения в клинической онкологии [6,7]. В настоящее время большое распространение получил автоматизированный метод диагностики опухолей – проточная цитометрия. С внедрением этого метода появилась возможность сопоставить показатели, имеющие прямое отношение к агрессивности опухолевого роста (тип плоидности опухоли и степень пролиферативных процессов) с другими клинико-морфологическими критериями прогноза и взаимно дополнить их [8]. Как только были созданы проточные системы, их сразу попытались использовать в диагностических целях. Для диагностики опухолей эти системы очень выгодны, так как за короткий промежуток времени можно проанализировать десятки тысяч клеток. Этому и были посвящены первые работы с проточными системами [9,10]. Основываясь на анализе данных зарубежной литературы [12,13] чувствительность метода проточной цитометрии осадка мочи в диагностике РМП составляет 55-83%. Столь большой разброс диагностических показателей побудил нас к проведению собственного исследования диагностической ценности метода проточной цитометрии в диагностике РМП. Следует отметить, что публикаций по данной тематике в отечественной литературе нами встречено не было.

Материалы и методы.

Были проанализированы результаты проточной цитометрии осадка мочи 86 больных РМП (72 мужчины и 14 женщины) и 30 больных страдающих доброкачественными заболеваниями мочевого пузыря (n=116). Больные РМП были условно разделены на две группы: первую группу составили пациенты с впервые выявленным РМП (n=50), в состав второй группы вошли больные, находящиеся под наблюдением, после органосохраняющего лечения РМП (n=36). У 43 пациентов (26 в первой группе и 17 – во второй) были выявлены поверхностные опухоли мочевого пузыря, инвазивный рак был диагностирован также в 43 случаях (24 пациента в первой группе и у 19 – во второй). В 41 случае (первая группа – 22 случая и вторая группа – 19 случаев) опухоли были высокодифференцированы (G1), в 25 случаях (первая группа – 16 случаев и вторая группа – 9 случаев) - умереннодифференцированы (G2) и 20 случаях опухоли были представлены низкодифференцированным РМП (первая группа – 12 случаев и вторая группа – 8 случаев). У пациентов с доброкачественными заболеваниями мочевого пузыря список нозологий был следующим: хронический цистит – 14 случаев, лейкоплакия мочевого пузыря – 7 случаев, у одной пациентки был выявлен экстрагенитальный эндометриоз с поражением мочевого пузыря, также в состав этой группы вошли 8 здоровых добровольцев.

Всем пациентам выполнялась проточная цитометрия и трехкратное цитологическое исследование осадка мочи. Материалом для исследования в обоих случаях являлся осадок утренней порции мочи. Проточная цитометрия проводилась на аппарате ДАКО, (Дания). Выполнялась фиксация осадка мочи раствором 70% этанола, затем производилась окраска материала с помощью антител к цитокератину (моноклональные антитела к цитокератину IMMUNOTECH, Франция, № 2356). В качестве флуорохрома для метки ДНК эпителиальных клеток использовался пропидия йодид (CALBIOCHEM, № 537059). Цитологическое исследование проводилось по стандартной технологии с использованием окраски по методу Паппенгейма.

Исходя из того, что все клетки переходного эпителия мочевого пузыря, в норме (находящиеся в G0/1 фазе клеточного цикла) обладают диплоидным набором хромосом (2n), в своем исследовании мы придерживались мнения о том, что обнаружение ануэплоидных клеток в осадке мочи является абсолютным показателем наличия злокачественной опухоли мочевого пузыря [7]. Ануэплоидными считали образцы в случае наличия более одного G1 пика на ДНК-гистограмме.

Помимо пloidности эпителиальных клеток с помощью проточной цитометрии также изучалось количественное распределение клеток по фазам клеточного цикла - определение индекса пролиферации (ИП) - S-фаза+G2M. Вторым диагностическим критерием РМП по данным проточной цитометрии считали величину ИП превышающую или равную 21% [13].

Цитологическое исследование считали положительным при наличии в осадке мочи клеток принадлежащих раку. Диспластические изменения эпителия рассматривались как суспициозные и при расчетах диагностических показателей не учитывались.

Результаты проточной цитометрии во всех случаях были соотнесены с данными гистологического исследования (материал, полученный во время цистоскопии либо послеоперационный материал).

Результаты.

Необходимо отметить то, что анализ показателей проточной цитометрии был возможен в 78 образцах мочи (90,7%) полученных от больных раком мочевого пузыря.

В настоящем исследовании распределение ДНК в клетках осадка мочи было диплоидным в 37 случаях (46,15%) (16 - в первой группе, 21 - во второй и 29 - в третьей), анеуплоидные линии клеток были получены в 42 случаях (53,85%) (29 - в первой группе, 12 - во второй группе и 1 случай в третьей). При этом в 9 случаях (21,43%) ИДНК был менее 1, в 31 случае (73,81%) – более 1,1 и менее 2,0, и в 1 случае (2,38%) была получена гипертетраплоидия – ИДНК составил 2,3. Среднее значение ИДНК для анеуплоидной линии клеток составило $1,26 \pm 0,36$.

Была проанализирована взаимосвязь содержания ДНК в клетках осадка мочи с морфологическими характеристиками опухолевого процесса – уровень инвазии опухоли (Т) и степень клеточной анаплазии опухоли (G) в группах больных РМП. Было выявлено преобладание анеуплоидных клеточных линий в опухолях высокой степени злокачественности: при инвазивной форме рака и III степени опухолевой анаплазии (G3) анеуплоидия была получена в 70% наблюдений; диплоидные опухоли при этом составили 30% случаев. И наоборот поверхностные (Ta-T1) и высокодифференцированные (G1) опухоли чаще других были диплоидные – 65,79% и 66,67% соответственно (см. таб. 1 и 2).

При анализе показателей чувствительности метода проточной цитометрии, основываясь на приведенных выше диагностических критериях, были получены следующие результаты. В обеих группах больных РМП чувствительность проточной цитометрии оказалась выше чувствительности цитологического исследования 72% и 54% соответственно, для группы больных с впервые выявленным раком мочевого пузыря, и 70% и 50% соответственно, для группы мониторинга. В обеих группах различия были статистически значимы $p < 0,05$. Зависимость чувствительности от уровня инвазии опухоли и степени клеточной анаплазии приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1.

Чувствительность методов прочной цитометрии и цитологического исследования в зависимости от степени опухолевой инвазии (Т) и клеточной анаплазии (G) (n=50).

Степень Т и G	Кол-во больных	Чувствительность (%)		P
		ПЦ	ЦИ	
Ta-T1	26	61,54	46,15	$p < 0,05$
T2	12	75,00	50,00	$p > 0,05$
T3-T4	12	81,81	75,00	$p > 0,05$

G1	22	63,64	36,36	$p>0,05$
G2	16	68,75	56,25	$p>0,05$
G3	12	91,67	83,33	$p>0,05$
Всего	50	72,00	54,00	$p<0,05$

Примечание: ПЦ - проточная цитометрия

ЦИ - цитологическое исследование

Таблица 2.

Чувствительность методов прочной цитометрии и цитологического исследования в зависимости от степени опухолевой инвазии (Т) и клеточной анаплазии (G) (n=36).

Степень Т и G	Кол-во больных	Чувствительность (%)		P
		ПЦ	ЦИ	
Ta-T1	17	61,54	38,46	$p<0,05$
T2	19	76,47	58,82	$p>0,05$
G1	19	60,00	40,00	$p<0,05$
G2	9	77,78	55,56	$p<0,05$
G3	8	83,33	66,67	$p>0,05$
Всего	36	70,00	50,00	$p<0,05$

Примечание: ПЦ - проточная цитометрия

ЦИ - цитологическое исследование

Таким образом, чувствительность проточной цитометрии оказалась выше чувствительности цитологического исследования для всех значений Т и G. При этом, важным является то, что статистически значимые различия ($p<0,05$) в первой группе были получены в случае поверхностных опухолей (Ta-T1), а во второй – в случае поверхностных (Ta-T1) и высокодифференцированных (G1) опухолей.

При анализе результатов проточной цитометрии в группе больных доброкачественными заболеваниями мочевого пузыря в одном случае, у пациентки, страдающей экстрагенитальным эндометриозом с поражением мочевого пузыря, была получена анеуплоидная линия клеток. При этом отсутствие РМП было достоверно доказано при выполнении мультифокальной биопсии мочевого пузыря и при дальнейшем наблюдении за пациенткой. Еще в шести случаях величина ИП превышала 21%-й уровень. В этих случаях также не было подтверждено наличие РМП. Указанные случаи были расценены как ложноположительные.

Необходимо отметить то, что по результатам цитологического исследования ложноположительных результатов выявлено не было.

Диагностические показатели проточной цитометрии и цитологического исследования осадка мочи приведены в таблице 3.

Таблица 3.

Диагностические показатели проточной цитометрии и цитологического исследования осадка мочи в диагностике РМП (n=116).

Метод	Чувствительность*	Специфичность	Диагностическая эффективность
Проточная цитометрия	71,25%	86%	74,14%
Цитологическое исследование	52,5%	100%	67,24%

Примечание: *- $p < 0,05$.

Выводы.

Таким образом, по результатам настоящего исследования выявлено преобладание анеуплоидных вариантов РМП, которые составляют 53,85% случаев, в отличие от диплоидных 46,15% случаев. Среди анеуплоидных опухолей преобладают гипердиплоидные - 78,05% случаев. Диагностическая чувствительность метода проточной цитофлуориметрии в диагностике РМП составляет 71,25%, что достоверно ($p < 0,05$) превышает аналогичный показатель для цитологического исследования, составляющего 52,5% случаев. Противоположная тенденция характерна для диагностической специфичности метода – 86%, против 100% для цитологического исследования. Диагностическая чувствительность метода проточной цитофлуориметрии при мониторинге за больными РМП после проведенного органосохраняющего лечения составляет 70%, что также достоверно ($p < 0,05$) превышает аналогичный показатель для цитологического исследования, составляющий 50%.

Список литературы.

1. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2005г. Под редакцией академика РАН и РАМН М.И.Давыдова и доктора биологических наук Е.М.Аксель// Вестник Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина.- 2007.-т.18.-прилож.1.-с.58-59.
2. Матвеев А.А. Цитодиагностические критерии прогрессии рака мочевого пузыря// Материалы V Всероссийского съезда онкологов.-Казань.-2000.-С.340-342.
3. Planz B., Jochims E., Deix T., Caspers H.P., Jakse G., Boecking A. The role of urinary cytology for detection of bladder cancer.// Eur. J. Surg. Oncol.

- 2005.- V.31.-P.304-308.

4. Lorenzo Gomes M.F. The role of tumor markers in urologic consultation for screening, diagnosis and follow-up of bladder cancer// Actas.Urol.Esp.-2003.-V.27.- P.110-116.
5. Rodriguez Alonso A., Pita Fernandez S., Gonzalez-Carrero J., Nogueira March J.L. Multivariate analysis of recurrence and progression in stage T1 transitional-cell carcinoma of the bladder. Prognostic value of p53 and Ki-67 // Actas.Urol.Esp.-2003.-V.27.- P.132-141.
6. Лоран О.Б., Пушкарь Д.Ю., Раснер П.И. Лечение поверхностного рака мочевого пузыря // V Российская онкологическая конференция.- Москва.- 2001.- С.16-17.
7. Glas A.S., Roos D., Deutekom M. et al. Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review// J. Urol. – 2003.-V.169.-P.1975-1982.
8. Tribukait B.Flow cytometry in assessing the clinical aggressiveness of genito-urinary neoplasms // World. J.Urol. - 1987. V.5.- P.100-122.
9. Pulse Cytophotometry. Second International symposium.- /Ed.: Goehde W., Schuman J., Buchner T.H./- Belgium: European Press Ghent 1976;
- 10.Pulse Cytometry III.-/ Ed.: Lutz D./- Belgium: European Press Medicon, Ghent, 1978.
11. Giella J.G., Ring K., Olsson C.A. et al. The predictive value of flow cytometry and urinary cytology in followup of patients with transitional cell carcinoma of the bladder//J. Urol.-1992.- Aug;148(2 Pt 1):293-6.
12. Kumar N.U., Dey P., Mondal A.K. et al. DNA flow cytometry and bladder irrigation cytology in detection of bladder carcinoma.// Diagn Cytopathol,- 2001.-24(3).-P:153-6.
13. Slaton J.W., Dinney C.P.N., Veltri R.W. et al. Deoxyribonucleic acid ploidy enhances the cytological prediction of recurrent transitional cell carcinoma of the bladder// J. Urol. -1997.- 158: 806–11