

© А.С.Аль-Шукри, Д.И.Данильченко, 2009
УДК 616.62-006.6-07-036.8:577.112

А.С. Аль-Шукри¹, Д.И. Данильченко¹

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАТРИКС-МЕТАЛЛОПРОТЕАЗ В МОЧЕ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

A.S. Al-Shukri, D.I. Danilchenko

THE DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC VALUE OF THE DETERMINATION OF MATRIX-METALLOPROTEAS IN THE URINE OF PATIENTS WITH URINARY BLADDER CANCER

¹Кафедра урологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ РАБОТЫ – изучить влияние глубины инвазии и степень дифференцировки опухолевого процесса на уровень матрикс-металлопротеаз 2 и 9 в моче у больных раком мочевого пузыря. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Обследовали 71 больного раком мочевого пузыря. Группу сравнения составили 14 больных хроническим циститом, а контрольную группу – 45 больных, не имеющих болезней мочевого пузыря, обструкции и инфекции мочевыводящих путей. Уровень металлопротеаз определяли методом цимографии. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Доказано, что ферменты протеолиза мочи ММП-2 и ММП-9 являются высокочувствительными показателями наличия рака мочевого пузыря, а их концентрация зависит от глубины инвазии и степени дифференцировки опухоли и указывает на прогноз течения болезни. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Для диагностики и неинвазивного определения глубины инвазии и степени дифференцировки рака мочевого пузыря целесообразно методом цимографии определять ММП-2 и ММП-9 в моче.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, прогноз заболевания, матрикс-металлопротеазы.

ABSTRACT

THE AIM. To study the influence of the depth of the invasion and degree of the differentiation of the tumor processes on the level of matrix-metalloproteas 2 and 9 in the urine of the patients with urinary bladder cancer. **PATIENTS AND METHODS.** 71 patients with urinary bladder cancer were evaluated. The comparison group consisted of 14 patients with chronic cystitis, and the control group consisted of 45 patients, without any urinary bladder problems, obstruction and infection of urinary tract. The level of metalloproteas was determined with the cymography method. **RESULTS.** Was proven that the proteolysis ferments of urine MMP-2 and MMP-9 are high sensitive characteristics of the presence of urinary bladder cancer, and their concentration depends on the depth of the invasion and differentiation stage of the tumor and shows it's prognosis on the diseases flow. **CONCLUSION.** For the diagnostics and noninvasive determination of the depth of the invasion and the stage of the differentiation of the urinary bladder cancer it is reasonable to determine the levels of MMP-2 and MMP-9 in the urine by cymography method.

Key words: urinary bladder cancer, prognosis, matrix-metalloproteas.

ВВЕДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря (РМП) является одним из наиболее часто встречающихся новообразований и по данным Всемирной Организации Здравоохранения составляет 70% от всех опухолей мочевой системы [1]. В России в 1995 – 2005 гг. заболеваемость РМП увеличилась на 58,6% – с 5,76 до 9,14 на 100 000 населения [2]. Это заболевание наносит обществу значительный социально-экономический ущерб [3], поэтому своевременное распознавание и правильно выбранное лечение РМП с учетом определения прогноза заболевания явля-

ются актуальной проблемой современной медицины.

Для разработки новых высокоэффективных методов определения прогноза РМП необходимо более детальное и глубокое изучение биологических особенностей этого вида опухоли. Одним из новых методов оценки агрессивности опухолей в настоящее время является определение эндогенных ферментов протеолиза. В последние годы доказано, что в процессе инвазии злокачественных новообразований происходит протеолитическое разрушение базальной мембраны слизистой оболочки мочевого пузыря опухолевыми клетками [4]. К эндогенным ферментам, участвующим в этом процессе, относят матрикс-металлопротеазы

Данильченко Д.И. 197022, С.-Петербург, ул. Л.Толстого, 17. Кафедра урологии СПб ГМУ им. акад. И.П.Павлова. Тел.: (812) – 234-66-57; E-mail: ad330@mail.ru

(ММП), повышение концентрации которых связано с инвазией и метастазированием опухоли [5,6,7]. Однако опубликованные данные о прогностическом значении ММП у больных РМП являются противоречивыми.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния активности опухолевого процесса (глубины инвазии и степени дифференцировки опухоли) на уровень матрикс-металлопротеаз 2 и 9 в моче у больных раком мочевого пузыря.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Настоящая работа основана на обследовании 71 больного раком мочевого пузыря, среди которых было 36 женщин и 35 мужчин в возрасте от 38 до 83 лет. Средний возраст пациентов составил $63,2 \pm 5,5$ лет. Больные предъявляли жалобы на учащенное (68 чел.) и болезненное (61 чел.) мочеиспускание и тупые боли над лобком (40 чел.) У 28 (39,4%) пациентов был диагностирован рак мочевого пузыря в стадии T_a (папиллярная неинвазивная карцинома), у 15 (21,1%) – в стадии T_1 (опухоль распространялась на субэпителиальную соединительную ткань), у 18 (25,3%) – в стадии T_2 (опухоль распространялась на мышцы) и у 10 (14,1%) – в стадиях T_3 и T_4 (опухоль распространялась на околопузырные ткани и органы).

По степени гистопатологической градации, т.е. дифференцировки опухоли, у 11 (15,5%) больных была установлена высокая степень дифференцировки (G-1), у 27 (38,0%) – умеренная степень дифференцировки (G-2), а у 33 (46,5%) – низкая степень дифференцировки (G-3). У всех больных патоморфологический диагноз был определен или после трансуретральной резекции опухоли мочевого пузыря с выполнением биопсии или после цистэктомии.

В группу сравнения были включены 14 больных (6 женщин и 8 мужчин) с другим заболеванием мочевого пузыря – хроническим циститом в стадии обострения. Контрольную группу из 45 человек (4 женщины и 41 мужчина) составили пациенты, у которых не были диагностированы болезни мочевого пузыря, а они лечились в клинике урологии по поводу варикоцеле, водянки оболочек яичка, фимоза, мочекаменной болезни, но без наличия обструкции или инфекции мочевыводящих путей.

У всех пациентов в моче определяли концентрацию ММП-2 и ММП-9 по стандартной методике, описанной в работах S.Zucker и соавт. [8]. Для этого утреннюю порцию мочи центрифугировали в течение 10 мин. при температуре $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ со скоростью 3000 об./мин. Надосадочную жидкость за-

мораживали при температуре -80°C до момента исследования. Концентрацию ММП-2 и ММП-9 в моче определяли при помощи цимографии, применяя при этом электрофорез в геле в течение 3 часов с 10% раствором Sodium-Dodecylsulfat-Poliacrylamid (SDP). Электрофорезом разделяли белки в зависимости от их молекулярного веса. Гель освобождали от SDP, отмывая его в течение 2 часов в буфере, а затем окрашивали его 0,2% раствором Coomassie-blau и сканировали на аппарате Scanmaker-4 (США). По оптической плотности геля судили о концентрации матрикс-металлопротеаз. В каждом образце геля для сравнения создавали калибровочную кривую со стандартным набором ММП-2 и ММП-9 с учетом их молекулярного веса (для ММП-2 – 72 кДа, для ММП-9 – 92 кДа).

Полученные относительные показания ММП сопоставляли с концентрацией креатинина в моче для устранения разницы диуреза пациентов [8]. В результате были получены абсолютные значения ММП-2 и ММП-9 мочи, необходимые для дальнейшего сравнения по группам.

Статистический анализ проводили с помощью программы Statistika-6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оказалось, что у больных раком мочевого пузыря концентрация ММП-2 и ММП-9 в моче была значительно выше, чем у больных, страдающих хроническим циститом и у лиц контрольной группы. Так, у больных раком мочевого пузыря концентрация ММП-2 в моче составила $278,7 \pm 29,6$ мкг/г креатинина, тогда как у пациентов, страдающих хроническим циститом в стадии обострения – $101,5 \pm 18,8$ мкг/г креатинина ($p < 0,01$), а у лиц контрольной группы – $83,5 \pm 5,6$ мкг/г креатинина ($p < 0,001$). Содержание ММП-9 в моче у больных раком мочевого пузыря составило $405,4 \pm 32,7$ мкг/г креатинина, тогда как у пациентов с хроническим циститом – $130,0 \pm 50,7$ мкг/г креатинина ($p < 0,01$), а у лиц контрольной группы – $92,1 \pm 7,7$ мкг/г креатинина ($p < 0,001$).

Концентрация ММП-2 и ММП-9 в моче в подгруппе больных с инвазивным раком мочевого пузыря (T_2) была выше ($887,4 \pm 41,4$ мкг/г креатинина и $1050,8 \pm 34,8$ мкг/г креатинина соответственно), чем у пациентов с поверхностным раком мочевого пузыря (T_a и T_1), у которых она составила $153,2 \pm 32,1$ мкг/г креатинина и $229,8 \pm 24,5$ мкг/г креатинина ($p < 0,001$).

При анализе уровня ММП-2 и ММП-9 в моче у больных РМП в зависимости от степени дифференцировки опухолевых клеток оказалось, что с

повышением степени злокачественности опухолевого процесса возрастает уровень исследуемых протеаз. При G-1 концентрация ММП-2 в моче составила $112,4 \pm 8,8$ мкг/г креатинина, при G-2 – $198,6 \pm 12,0$ мкг/г креатинина ($p < 0,05$), а при G-3 – $493,1 \pm 18,4$ мкг/г креатинина ($p < 0,001$). Концентрация ММП-9 у больных РМП с дифференцировкой клеток G-1 составила $232,8 \pm 12,8$ мкг/г креатинина, при G-2 $272,7 \pm 31,3$ мкг/г креатинина ($p < 0,05$), а при G-3 $554,3 \pm 28,6$ мкг/г креатинина ($p < 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления РМП и определения прогноза заболевания оценка пролиферативной активности опухоли путем определения уровня матрикс-металлопротеаз в моче является простым и перспективным методом исследования. Этот метод позволяет урологу заподозрить или исключить РМП уже на этапе предварительного амбулаторного обследования.

Преимущество определения концентрации ММП-2 и ММП-9 в моче методом цимографии по сравнению со стандартной цистоскопией и биопсией стенок мочевого пузыря состоит в том, что это исследование является абсолютно неинвазивным, но достаточно информативным не только для диагностики рака мочевого пузыря, но и для определения глубины прорастания опухоли и дифференцировки клеток опухоли. Повышение концентрации ММП-2 и ММП-9 в моче выше 500 мкг/г креатинина является сигналом о наличии у больного инвазивной стадии (T_2 и более) рака мочевого пузыря с низкой степенью дифференцировки (G-3) опухоли.

Это исследование позволяет врачу правильно планировать объем дальнейшего обследования больного, выбрать метод его лечения и более точно прогнозировать течение заболевания. Кроме того, это исследование позволяет своевременно диагностировать рецидив опухоли мочевого пузыря после проведенного лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ферменты протеолиза ММП-2 и ММП-9 мочи являются эффективными высокочувствительными показателями наличия рака мочевого пузыря, их концентрация зависит от глубины инвазии и степени дифференцировки опухоли и указывает на прогноз течения болезни.

Для диагностики и неинвазивного определения глубины инвазии и степени дифференцировки рака мочевого пузыря целесообразно методом цимографии определять концентрацию ММП-2 и ММП-9 в моче, что позволит неинвазивным способом определить стадию рака и проводить контроль после проведенного лечения за возможным рецидивированием опухоли.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Давыдов МИ, Аксель ЕМ. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2004 году. *Вестн РОНЦ им Блохина РАМН* 2006; 17(3): 52-89
2. Аполихин ОИ, Какорина ЕП, Сивков АВ и др. Состояние урологической заболеваемости в Российской Федерации по данным официальной статистики. *Урология* 2003; 3: 3-9
3. Лопаткин НА, Даренков СП, Чернышов ИВ и др. Диагностика и лечение рака мочевого пузыря. *Урология* 2004; 1: 12-17
4. Stetler – Stevenson WG, Hewitt R, Corcoran M. Matrix metalloproteinases and tumor invasion: from correlation and causality to the clinic. *Semin Cancer Biol* 1996; 7: 1147-154
5. Kanayama H, Yokota K, Kurokawa Y. Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer. *Cancer* 1998; 82: 1359-1366
6. Forsyth PA, Wong H, Laing TD et al. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 are involved in different aspects of the pathophysiology of different aspects of malignant gliomas. *Brit J Cancer* 1999; 79: 1828-1835
7. Sier CF, Casetta G, Verheijen JH et al. Enhanced urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) are associated with early-stage bladder carcinoma: a comparison with clinically used tumor markers. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2333-2340
8. Zucker S, Lysik R, Zarrabi H et al. Plasma assay of gelatinase B: tissue inhibitor of metalloproteinase complexes in cancer. *Cancer* 1995; 76: 700-708

Поступила в редакцию 21.10.2008 г.

Принята в печать 10.02.2009 г.