

Клиническое применение FISH-метода в ранней диагностике поверхностного рака мочевого пузыря

А.В. Севаньяев, Е.Ф. Лушников, О.Б. Карякин, Г.Ф. Михайлова,
Н.А. Горбань, С.В. Башкатов, Е.В. Голуб, Т.Г. Шкаврова, В.В. Цепенко

Отделение лучевого и хирургического лечения урологических заболеваний,
клинико-морфологический отдел, лаборатория молекулярной цитогенетики ГУ МРНЦ РАМН

CLINICAL APPLICATION OF FISH METHOD IN THE EARLY DIAGNOSTICS OF SUPERFICIAL BLADDER CANCER

A.V. Sevankaev, E.F. Lushnikov, O.B. Karyakin, G.F. Mikhailova,
N.A. Gorban, S.V. Bashkatov, E.V. Goloub, T.G. Shkavrova, V.V. Tsepenko

Department of radiotherapy and surgery of urologic disorders, clinical morphologic department,
laboratory of molecular cytogenetics, Medical Radiological Research Centre of Russian Academy of Medical Sciences

Patients with primary diagnosis of bladder cancer (42 persons) were studied. FISH analysis performed in all patients showed the following results: 39 (93%) patients were FISH positive and 3 (7%) were FISH negative. The molecular cytogenetic criterion for determining the grade of differentiation of Ta and T1 tumors — chromosomal hyperploidy in morphologically abnormal cells, was suggested. All patients demonstrating increased amount (more than 26%) of abnormal cell with hyperploidy of chromosomes 3, 7 and 17 were found to have high grade malignancies.

В структуре онкологической заболеваемости России значительную долю занимает рак мочевого пузыря (РМП). По данным на 1998 г. [1], он занимал 8-е место среди мужчин и 18-е — среди женщин, составляя среди всех онкологических больных соответственно 4,3 и 1%. В связи с этим проблема ранней диагностики этого тяжелейшего заболевания представляется чрезвычайно актуальной задачей. В настоящее время значительно расширились возможности диагностирования РМП на раннем этапе его развития благодаря интенсивному внедрению в клиническую практику последних достижений в области молекулярной биологии, в частности развития методов молекулярно-генетических исследований.

В канцерогенезе РМП, как и многих других злокачественных опухолей, важнейшую роль играют количественные и структурные аномалии хромосом генома опухолевых клеток, которые могут быть использованы в качестве диагностических и прогностических критериев развития заболевания. Предпринятые в последнее десятилетие целенаправленные цитогенетические исследования позволили определить, какие из хромосом генома клеток претерпевают изменения при РМП. По разным наблюдениям, таковыми чаще оказывались хромосомы 1, 3, 7, 8, 9, 11, 17, 18, 20 и др. [2—4]. Но наиболее часто при РМП встречаются количественные изменения (анеуплоидии) хромосом 3, 7, 17 и генетические нарушения в локусе 9p21 [2, 4, 5]. Учет этих генетических нарушений

стал возможен благодаря разработке молекулярно-генетического метода анализа хромосомных нарушений с использованием флуоресцентной *in situ* гибридизации (fluorescent *in situ* hybridization — FISH) клеток. В настоящее время разработан и широко используется в клинической практике за рубежом при диагностике РМП коммерческий набор молекулярно-генетических зондов UroVysion (Vysis, США) для центромер хромосом 3, 7, 17 и генного локуса 9p21. Как показывает клинический опыт применения FISH-метода, он значительно повышает эффективность ранней диагностики РМП. Оказалось, что данный метод позволяет выявлять опухолевые клетки еще до того, как наличие опухоли возможно будет определить с помощью традиционно используемых в клинике методов диагностики — цитоскопии и цитологии [5]. К настоящему времени появилось достаточно много работ, в которых был проведен сравнительный анализ чувствительности цитологии и FISH-метода [6—13]. В данных работах показано, что чувствительность цитологии не превышает 50%, в то время как чувствительность FISH-метода составляет в среднем 85%. Появляются первые сообщения об использовании FISH-метода при диагностике РМП и в отечественных клиниках [14].

Целью настоящей работы было проведение сравнительного анализа молекулярно-цитогенетического и гистологического методов исследования при диагностике поверхностного РМП, степе-

ни дифференцирования опухоли и ее злокачественности.

Материалы и методы

Обследована группа из 42 первичных больных (40 мужчин и 2 женщины) с диагнозом карциномы мочевого пузыря. Возраст обследованных варьировал от 36 до 74 лет. Стадию заболевания, размер и число опухолей устанавливали при ультразвуковом исследовании и цистоскопии (см. таблицу). Гистологические срезы опухолевой ткани толщиной 3—4 мкм были окрашены гематоксилином и эозином. На светооптическом уровне оценивали степень дифференцировки опухоли и стадию опухолевого процесса в соответствии с требованиями ВОЗ (2004) [15]. Патологоанатомическая стадия заболевания устанавливалась согласно Международной TNM-классификации злокачественных опухолей (5-я редакция). Категория T и степень дифференцировки опухоли окончательно выставлялись на основании заключений двух независимых морфологов.

Параллельно у этих же пациентов проводился молекулярно-цитогенетический анализ с помощью FISH-метода в интерфазных клетках слущенного эпителия мочевого пузыря. Образцы мочи (по 33 мл) забирали в пробирки, содержащие 17 мл консерванта (2% полиэтиленгликоль в 50% этаноле) и центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об/мин с последующей обработкой осадка раствором 1-кратного фосфатно-солевого буфера (1 × PBS). После повторного центрифугирования клеточный осадок заливали фиксатором (метанол: уксусная кислота в соотношении 3:1) и помещали на 30 мин в морозильную камеру (–20°C). Смену фиксатора с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин проводили дважды. На предметное стекло наносили от 30 до 120 мкл клеточной суспензии, в зависимости от ее плотности. Препараты высушивали в термостате (37°C) в течение ночи. Затем на

препарат наносили по 200 мкл раствора рибонуклеазы — РНКазы (100 мкг/мл в 2 × SSC) и инкубировали во влажной камере при 37°C в течение 1 ч. Далее проводили серию отмывок препаратов: 1 × PBS (5 мин), раствор 10% пепсина (5 мин при 37°C), 1 × PBS (5 мин), раствор MgCl₂ (10 мин), 1 × PBS (5 мин). После отмывки препараты дегидратировали в 70, 85 и 100% этаноле по 3 мин в каждом, после чего высушивали.

Молекулярные зонды наносили на препарат в соответствии с протоколом фирмы изготовителя (Vysis, США). Анализ препаратов проводили на флюоресцентном микроскопе Axioplan (Zeiss, Германия). Для визуализации сигналов использовали соответствующие фильтры DAPI, Spectrum Red/Green, Spectrum Aqua, Spectrum Gold.

Согласно протоколу фирмы Vysis, анализировали только морфологически аномальные клетки (с подозрением на злокачественность), для отбора которых использовали следующие критерии: большой размер ядра; неправильная форма ядра; «пятнистость» DAPI-окраски; клеточные кластеры (клетки в кластере, наложенные друг на друга, не учитываются при подсчете).

Микроскопический анализ прекращали при обнаружении четырех морфологически аномальных клеток с увеличенным числом копий двух или трех промеченных хромосом 3, 7, 17 или двенадцати клеток с гомозиготной потерей локуса 9p21. При выполнении этих критериев данный образец считался FISH-положительным, т.е. изменения в клетках расценивались как злокачественные [4].

Результаты и обсуждение

У всех 42 пациентов морфологически был верифицирован папиллярный уротелиальный РМП. В 14 случаях имел место неинвазивный папиллярный уротелиальный рак низкой степени злокачественности (Ta, low grade). У 10 больных папиллярной уротелиальной карциномой низкой степени злокачественности выявлены фокусы инвазии в подслизистый слой или основу сосочков (T1, low grade). В 3 случаях диагностирован неинвазивный папиллярный рак высокой степени злокачественности (Ta, high grade), в 15 — папиллярный рак высокой степени злокачественности с фокусами инвазии в подслизистый слой (T1, high grade).

Выполненный FISH-анализ у этих же 42 пациентов показал, что у 39 из них результаты оказались положительными и у 3 человек — отрицательными. Таким образом, у 93% обследованных с помощью FISH-метода пациентов изменения в уротелиальных клетках расценивались как злокачественные. Полученный результат достаточно

Параметры опухоли

Показатель	Число больных
Стадия заболевания	
Ta	17
T1	25
Число опухолей	
1	26
2—7	15
> 8	1
Размер опухоли, см	
< 1	2
1—3	29
> 3	11

хорошо согласуется с данными литературы. У большинства авторов общая чувствительность FISH-метода, т.е. без учета стадии заболевания и степени дифференцировки опухоли, колеблется в пределах 60—100% [4—10, 12]. Однако анализ данных литературы показал, что для стадий Ta и T1 в некоторых исследованиях отмечена также высокая чувствительность FISH-метода (78—93%) [4, 7, 9, 12], а по сведениям других авторов чувствительность FISH-метода оказалась сравнительно низкой для стадии Ta (26—45%) и несколько выше для T1 (45—65%) [6, 8, 10].

Одной из задач данного исследования являлось установление молекулярно-цитогенетических критериев степени дифференцировки опухоли при Ta и T1 стадиях заболевания в морфологически аномальных клетках слущенного эпителия мочевого пузыря. В качестве такого критерия было выбрано наличие гиперпloidии хромосом в морфологически аномальной клетке (с подозрением на злокачественность), т.е. присутствие в интерфазном ядре более двух копий какой-либо из промеченных хромосом — 3, 7, 17. В соответствии с этим критерием для каждого из 42 обследованных пациентов был определен процент морфологически аномальных клеток с гиперпloidией по каждой из промеченных хромосом.

Анализ полученных данных позволил разделить пациентов на 2 подгруппы. В 1-й подгруппе число морфологически аномальных клеток с гиперпloidией промеченных хромосом не превышало 25% (рис. 1), во 2-й подгруппе оно варьировало в пределах 26—100% (рис. 2). В 1-ю подгруппу вошли 29 пациентов с FISH-положительным и 3 пациента с FISH-отрицательным результатами. Согласно проведенному гистологическому исследованию данная группа включала в себя 12 больных с неинвазивным папиллярным раком Ta стадии (11 с низкой степенью злокачественности и 1 — с высокой) и 17 пациентов T1 стадии (10 — с низкой степенью злокачественности и 7 — с высокой). У 3 больных с FISH-отрицательным результатом по данным гистологического исследования была определена неинвазивная папиллярная уротелиальная карцинома низкой степени злокачественности (Ta, low grade). Во 2-ю подгруппу вошли 10 пациентов с FISH-положительным результатом, у которых по результатам гистологического исследования были установлены опухоли высокой степени злокачественности, из них 2 больных с Ta стадией и 8 — с T1 стадией.

Сравнительный анализ результатов молекулярно-цитогенетического и гистологического

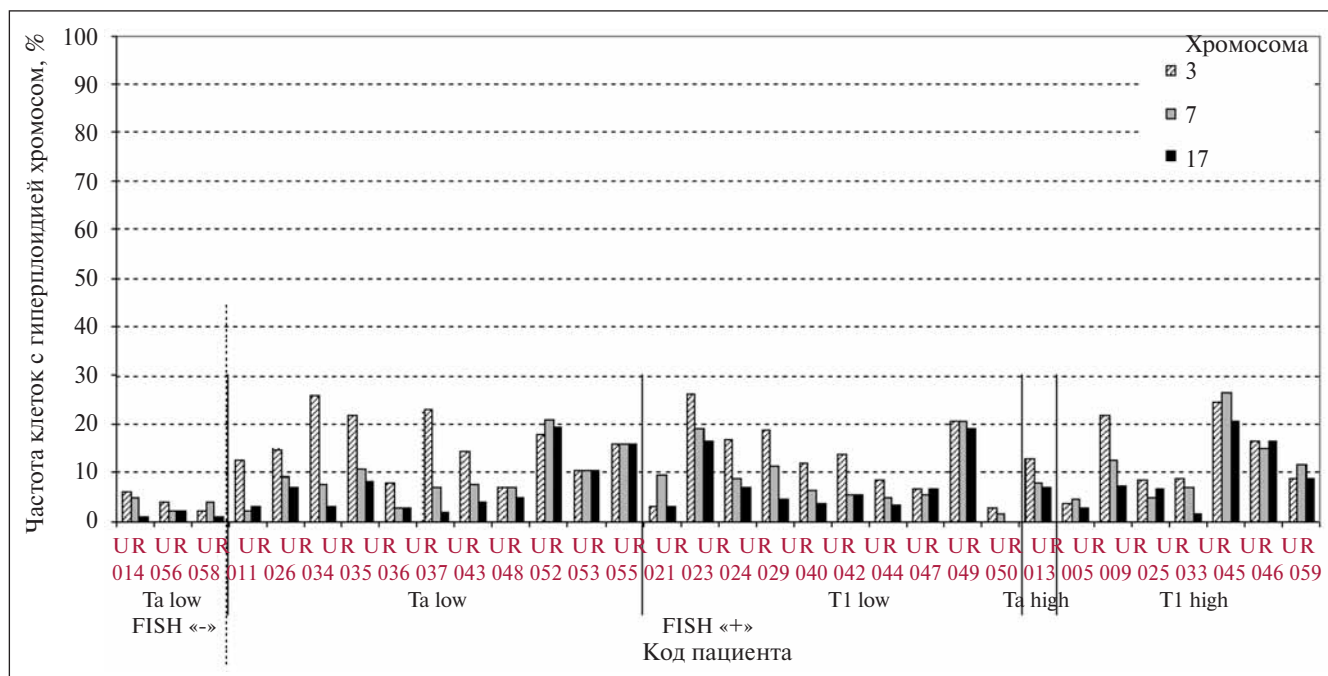


Рис. 1. Частота клеток с гиперпloidией хромосом 3, 7, 17, не превышающая 25%, у пациентов с папиллярным уротелиальным РМП. Ta low — пациенты с Ta стадией заболевания и низкой степенью злокачественности опухоли. Ta high — больные с Ta стадией заболевания и высокой степенью злокачественности опухоли. T1 low — пациенты с T1 стадией заболевания и низкой степенью злокачественности опухоли. T1 high — больные с T1 стадией заболевания и высокой степенью злокачественности опухоли. FISH «-» — группа пациентов с отрицательным FISH-анализом, FISH «+» — больные с положительным FISH-анализом

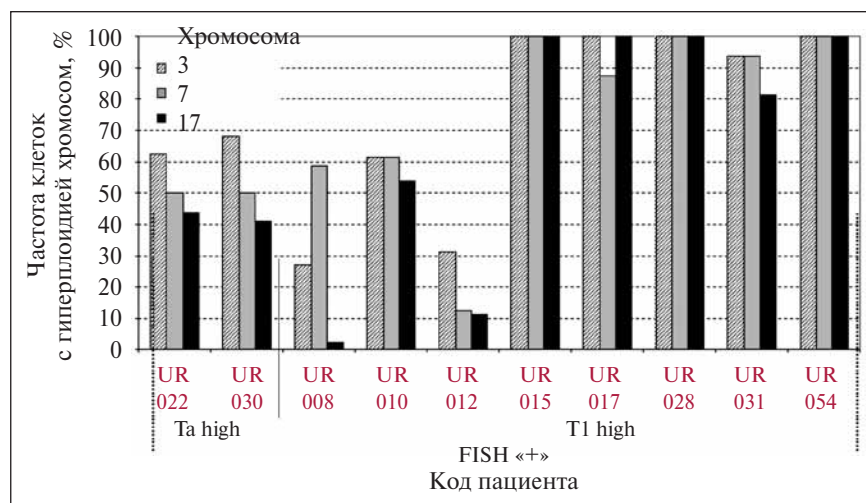


Рис. 2. Частота клеток с гиперплоидией хромосом 3, 7, 17, превышающая 25%, у пациентов с папиллярным уротелиальным РМП

методов исследования показал, что в группе пациентов, у которых доля морфологически аномальных клеток с гиперплоидией промеченных хромосом 3, 7, 17 не превышала 25%, гистологически преобладала низкая степень злокачественности опухоли — 75% больных. В остальных 25% случаях гистологически определялся папиллярный уротелиальный рак высокой степени злокачественности. Во 2-й группе больных, в которой число морфологически аномальных клеток с гиперплоидией промеченных хромосом 3, 7, 17 варьировало от 26 до 100%, у всех (100%) пациентов гистологически определялись опухоли высокой степени злокачественности. В основу классификации ВОЗ (2004) положены генетические изменения в клетках опухоли. Большинство неинвазивных уротелиальных опухолей высокой степени злокачественности и инвазивные карциномы являются генетически нестабильными новообразованиями. Результаты нашего исследования подтверждают это. Наблюдаемый во 2-й обследованной группе больных высокий уровень генетических изменений (гиперплоидия промеченных хромосом 3, 7, 17 от 26 до 100%) в морфологически аномальных клетках соответствует, согласно гистологическому исследованию, высокой степени злокачественности уротелиальной опухоли и наличию ее инвазии.

Подгруппа пациентов с низким уровнем генетических изменений (до 25% опухолевых клеток с гиперплоидией хромосом 3, 7 и 17) оказалась разнородной. По данным гистологического исследования, в этой подгруппе преобладали больные с опухолями низкой степени злокаче-

венности, которые, по классификации ВОЗ (2004), соответствуют генетически стабильным новообразованиям. Однако почти половина из них (10 из 22) имели микрофокусы инвазии в подслизистый слой или основу сосочков. Кроме того, в этой группе в 5 случаях опухоли морфологически верифицировались как папиллярный рак высокой степени злокачественности. Возможно, это связано с неоднородностью категории папиллярных уротелиальных раков высокой степени злокачественности, часть из которых демонстрирует преимущественно морфологическую картину

карциномы низкой степени злокачественности, однако с наличием участков с признаками высокой степени злокачественности. В такой ситуации при гистологическом исследовании, по рекомендациям ВОЗ, устанавливается карцинома высокой степени злокачественности.

Таким образом, при использовании предложенного нами критерия молекулярно-цитогенетических нарушений — гиперплоидии промеченных хромосом 3, 7 и 17 в морфологически аномальных клетках слущенного эпителия мочевого пузыря — представляется возможным достаточно точно определять генетически нестабильные уротелиальные опухоли высокой степени злокачественности на стадиях заболевания Ta и T1, которые характеризуются более агрессивным развитием. При уровне гиперплоидии промеченных хромосом меньше 25% определить степень злокачественности и стадию процесса молекулярно-цитогенетическим методом пока не представляется возможным. Выявленная при гистологическом исследовании разнородность этой группы предполагает поиск новых молекулярно-цитогенетических критериев для дифференциации опухолей с разной степенью злокачественности и стадии развития.

В настоящее время нами продолжается постклиническое наблюдение за данными больными. Каждые 3 мес проводится цитоскопическое обследование этих пациентов и осуществляется забор образцов мочи на FISH-анализ. Полученные результаты позволяют оценить возможности FISH-метода в раннем выявлении рецидивирования опухоли.

Литература

1. Матвеев Б.П., Фигурин К.М., Карякин О.Б. Рак мочевого пузыря. М.: Вердана; 2001.
2. Ishiwata S., Takahashi S., Homma Y. et al. Noninvasive detection and prediction of bladder cancer by fluorescence *in situ* hybridization analysis of exfoliated urothelial cells in voided urine. *Urology* 2001;57(4):811–5.
3. Knowles M.A. Molecular pathology of solid tumours: translating research into clinical practice. Introduction and overview. *J Clin Pathol Mol Pathol* 2001;54:215–21.
4. Sokolova I.A., Halling K.C., Jenkins R.B. et al. The development of a multitarget, multicolor fluorescence *in situ* hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Molec Diag* 2000;2(3):116–23.
5. Halling K.C. Vysis UroVysion for the detection of urothelial carcinoma. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3(4):507–19.
6. Junker K., Fritsch T., Hartmann A. et al. Multicolor fluorescence *in situ* hybridization (M-FISH) on cells from urine for the detection of bladder cancer. *Cytogenet Genome Res* 2006;114(3–4):279–83.
7. Kang J.U., Koo S.H., Jeong T.E. et al. Multitarget fluorescence *in situ* hybridization and melanoma antigen genes analysis in primary bladder carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;164(1):32–8.
8. Marin-Aguilera M., Mengual L., Ribal M. et al. Utility of fluorescence *in situ* hybridization as a non-invasive technique in the diagnosis of upper urinary tract urothelial carcinoma. *Eur Urol* 2007;51:409–15.
9. Mian C., Lodde M., Comploj E. et al. Liquid-based cytology as a tool for the performance of uCyt+ and Urovysion Multicolour-FISH in the detection of urothelial carcinoma. *Cytopathology* 2003;14(6):338–42.
10. Moonen P.M., Merkh G.F., Peelen P. et al. UroVysion compared with cytology and quantitative cytology in the surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2007;51:1275–80.
11. Sarosdy M.F., Kahn P.R., Ziffer M.D. et al. Use of a multi target fluorescence *in situ* hybridization assay to diagnose bladder cancer in patients with hematuria. *Urology* 2006;176(1):44–7.
12. Scacel M., Fahmy M., Brainard J. et al. Multitarget fluorescence *in situ* hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology. *Urology* 2003;169(6):2101–5.
13. Veeramachaneni R., Nordberg M.L., Shi R. et al. Evaluation of fluorescence *in situ* hybridization as an ancillary tool to urine cytology in diagnosing urothelial carcinoma. *Diagn Cytopathol* 2003;28(6):301–7.
14. Строганова А.М., Хачатурян А.В. Возможности применения флюоресцентной *in situ* гибридизации в диагностике рака мочевого пузыря. *Арх патол* 2006;(5):43–6.
15. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Eds. J.N. Eble, G. Sauter, J.I. Epstein, I.A. Sesterhenn. Lyon: IARC Press; 2004.

Значение и объем тазовой лимфаденэктомии в лечении больных раком мочевого пузыря

С.Б. Петров¹, В.Д. Король¹, С.А. Рева¹, М.В. Кириченко²

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова; ²НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург

IMPORTANCE AND EXTENT OF LYMPH NODE DISSECTION IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH BLADDER CANCER

S.B. Petrov¹, V.D. Korol¹, S.A. Reva¹, M.V. Kirichenko²

¹S.M. Kirov Military Medical Academy, ²Prof. N.N. Petrov Research Institute of Oncology, St. Petersburg

Purpose: The benefit of pelvic lymph node dissection in patients with bladder cancer remains controversial. We have compared these methods of dissection in regard to the following parameters: number of extracted lymph nodes, frequency and location of identifiable metastases, complications rate, and time before development of relapses. Also we have estimated influence of clinical and intra-operative regional changes on a choice of a extent of lymph node dissection.

Materials and methods: Analysis included data on 59 patients who underwent radical cystectomy for bladder cancer between 2002 and 2008. Extended lymph node dissection was carried out in 18 patients (30,5%), and limited lymph node dissection — in 41 (69,5%) patients.

Results: The average quantity of removed lymph nodes was 11,2 in cases of limited and 20,8 — in cases of extended lymph node dissection. Consequently, the number of revealed metastases has increased from 21,9 to 33,3%. Complex estimation of preoperative and intraoperative data has demonstrated the greatest efficiency in diagnostics of changes in lymph nodes. Among perioperative complications only frequency of lymphorrhea has appeared to be higher in patients after extended lymph node dissection. Disease-free survival rate was 9,8 months (9,4 in cases of limited and 10,1 — in cases of extended dissection).

Conclusions: Extended pelvic lymph node dissection should be recommended as a component of radical cystectomy with diagnostic and, probably, with the therapeutic purpose, especially in patients with suspicion for lymph nodes involvement arisen pre- and/or intra-operatively. Both clinical examination and intra-operative and qualitative pathomorphologic evaluation of regional lymph nodes are very important for full value staging of bladder cancer.