

НАШ ОПЫТ FISH-ДИАГНОСТИКИ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

К.А. Малхасян, М.Ю. Ульянов, Э.Ф. Абдрахманов, С.В.Петров, Р.Ш. Хасанов

Российский онкологический научный центр
им. Н.Н.Блохина РАМН, г. Москва
Республиканский клинический онкологический диспансер
Министерства Здравоохранения РТ, г. Казань

Малхасян Карен Альбертович,
аспирант РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН,
115478, Россия, г. Москва, Каширское ш., 24,
тел. 8 (495) 324-11-14, +7 927 242 04 84,
e-mail: karen_mal@rambler.ru

В статье представлены первые результаты проспективного когортного исследования 50 пациентов с первичным раком мочевого пузыря, прошедших лечение в РКОД МЗ РТ в 2009 и 2010 годах, включавшего метод флюоресцентной in situ гибридизации. Результаты работы свидетельствуют о высокой точности этого метода в подтверждении диагноза рака мочевого пузыря и дают основание для более детального его изучения.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, FISH-диагностика, переходноклеточная карцинома, флюоресцентная in situ гибридизация.

OUR EXPERIENCE IN URINARY BLADDER CANCER FISH-DIAGNOSIS

K.A. Malkhasian, M.Y. Ulianin, E.F. Abdrakhmanov, S.V. Petrov, R.Sh. Khasanov

State Institution , Blokhin Oncological Scientific center of Russia,
Russian Academy of Medical Sciences, Moscow
Clinical Oncology Dispensary of the Republic of Tatarstan,
Ministry of Healthcare of the Republic of Tatarstan, Kazan

The article represents the first results of the prospective cohort trial led through the example of 50 primary urinary bladder cancer patients which were treated in the Clinical Oncology Dispensary of the Republic of Tatarstan (Ministry of Healthcare of the Republic of Tatarstan) in 2009 and 2010. The treatment included the method of the fluorescence

hybridization. The work results prove a high accuracy of this method in support of the urinary bladder cancer diagnosis and give grounds for its more detailed study.

The key words: urinary bladder cancer, FISH diagnosis, transient cell carcinoma, fluorescence hybridization.

Введение

Заболееваемость раком мочевого пузыря неуклонно растет. По последним данным, в России у мужчин в структуре заболеваемости эта нозология занимает 5 место с показателем 4,6%, у женщин – 1%. За 2007 год в России было зарегистрировано около 13 тыс. новых случаев рака мочевого пузыря [1]. В 70-75% случаев рак мочевого пузыря диагностируется на немышечно-инвазивной стадии [2,3], что служит толчком для распространения органоосохраняющих операций на мочевом пузыре. Золотым стандартом лечения поверхностного рака мочевого пузыря остается трансуретральная резекция (ТУР). Однако настоящим вызовом урологам и онкологам является вариабельность степени злокачественности и выраженная склонность заболевания к рецидивированию и прогрессированию на любой стадии. Это побудило ученых искать различные признаки опухоли, способные предсказать течение заболевания и достоверно диагностировать его рецидивы на самых ранних сроках. Одним из таких новых методов диагностики является FISH-диагностика, основанная на коммерческом наборе UroVysion® (Abbott Laboratories, США).

Материалы и методы

В проспективное когортное исследование были включены 50 пациентов с первичным раком мочевого пузыря, прошедших лечение в РКОД МЗ РТ в 2009 и 2010 годах. Всем пациентам было проведено хирургическое лечение в объеме ТУР опухоли мочевого пузыря или один из вариантов комбинированного лечения, включавшего ТУР и адъювантную внутривезикулярную химио- или иммунотерапию. Все пациенты, включенные в исследование, получили всю информацию о предстоящем исследовании и дали добровольное согласие на участие в нем. У всех пациентов непосредственно перед операцией на операционном столе был проведен забор промывных вод из мочевого пузыря стерильным физиологическим раствором в объеме 100–150 мл. Операционный материал исследовался опытным патоморфологом, заключение в каждом случае содержало информацию о характере роста опухоли, глубине прорастания и степени анаплазии опухолевых клеток согласно классификации ВОЗ 1973 года.

FISH-исследование: промывные воды из мочевого пузыря не позднее 1 часа с момента забора центрифугировались с последовательным отбором центрифугата и удалением надосадочной жидкости. Далее клеточный осадок экспонировался в подогретом до 37°C 0,56% водном растворе KCl в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем полученный раствор снова центрифугировался до объема

двух контейнеров по 1,5 мл с последующим поэтапным замещением надосадочной жидкости, приготовленным ex tempore консервантом (метанолуксусная кислота - 3:1), центрифугирование и смена консерванта проводилась 3 раза в каждом случае. Сразу после этого из полученного материала готовились мазки аппаратом CytoSpin (от 2 до 6 стекол для каждого случая) с подбором удовлетворительной клеточной плотности. Полученный материал (стекла и консервированные клетки) хранился при 20°C. В последующем была выполнена специальная обработка полученных мазков согласно инструкции набора UroVysion® и гибридизация с ДНК-пробой, содержащей 4 зонда, меченых флюорофорами. В состав пробы входили зонды, комплементарные центромерным участкам 3 (красный SpectrumRed), 7 (зеленый SpectrumGreen) и 17 хромосомы (синий SpectrumAqua), а также зонд к локусу 9p21 на 9 хромосоме (желтый SpectrumGold). После выдерживания стекол в гибридайзере в течение 16 часов при 37°C, отмывке и добавлении красителя DAPI выполнялась флюоресцентная микроскопия полученных мазков на микроскопе Leica DM 5000B с предустановленными светофильтрами DAPI single, Aqua single, Yellow single и Red/Green dual.

В каждом случае на мазке выбирались клетки с наиболее крупным ядром, с неровными контурами ядра и неравномерной окраской ядра DAPI. Всего в каждом препарате было подсчитано не менее 25 клеток. В случае невыполнения критериев положительного заключения проводилась оценка 100 клеток, после чего выставлялось окончательное заключение. Оценка препарата проводилась по критериям, рекомендуемым производителем. Так, положительным результатом считалось обнаружение 4 и более клеток с гиперпloidией по 2 и более центромерным меткам, или 12 и более клеток с мозаичной делецией локуса 9p21 на 9 хромосоме. При подсчете учитывались только клетки с визуальным аномальным ядром.

Статистическая обработка полученных результатов выполнялась с помощью статистического модуля программы MS Excel из пакета MS Office 2003 (Корпорация Майкрософт, США). Для оценки уровня значимости различий чувствительности применялся точный критерий Фишера. Пограничный уровень значимости был установлен при $p=0,05$.

Результаты и обсуждение

У всех пациентов была диагностирована переходноклеточная карцинома: в 27 случаях - в стадии T_a, в 12 случаях - T₁ и в 11 случаях была зафиксирована стадия T_{2a}. По степени дифференцировки в заключении патоморфолога результаты были таковы: у 20 пациентов зафиксирована опухоль G₁, у 15 па-

циентов – G2, а в 15 случаях – G3. Ни в одном случае Cis не был выявлен.

Общая чувствительность FISH-диагностики составила 88% (44/50). Нами проведено разделение всех пациентов на группы по признакам максимальной стадии (Stage) и максимального уровня анаплазии клеток урокарциномы (Grade). Результаты подсчета чувствительности для каждой группы приведены в таблице 1.

Таблица 1

Распределение чувствительности FISH-диагностики у пациентов с диагнозом рак мочевого пузыря по стадии и степени дифференцировки

Группа	Количество пациентов	Количество FISH «+» результатов	Чувствительность для группы (%)
Ta	27	22	81,5
T1	12	11	91,7
T2a	11	11	100
Ta+T1	39	33	84,6
G1	20	14	70
G2	15	15	100
G3	15	15	100

При анализе результатов FISH-диагностики различия чувствительности у пациентов с опухолями Ta, T1 и T2a при парном сравнении между собой оказались статистически незначимыми. Чувствительность в группе Ta+T1 в сравнении с группой T2a также значимо не различается.

В группе пациентов G1 чувствительность FISH-диагностики значимо отличается от чувствительности в группах G2 и G3 ($p=0,027$).

Несмотря на однозначный рост чувствительности метода с увеличением стадии заболевания эти различия оказались статистически недостоверными, что может отражать, впрочем, относительно малое число наблюдений. Зависимость чувствительности FISH-диагностики от степени дифференцировки оказалась более четкой. Относительно низкая чувствительность метода в группе G1 может свидетельствовать о низком уровне генетических аномалий клеток высокодифференцированной урокарциномы. В целом, чувствительность FISH-диагностики в нашем исследовании (88%) оказалась несколько выше, чем в литературных источниках (69-87%) [4]. Это свидетельствует о высокой точности этого метода в подтверждении диагноза и дает основание для более детального его изучения.

Список литературы

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2007 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. – 2009. - Т. 20. - №3 (Прил.1).
2. Матвеев Б.П., Кудашев Б.В., Бухаркин Б.В., Романов В.А., Рубанов Ю.В. Роль флюоресцентного контроля в повышении радикализма оперативного лечения поверхностного рака мочевого пузыря // Урология. – 2000. - № 3. – С. 22–24.
3. Lokeshwar V.B., Habuchi T., Grossman B. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus on bladder tumor markers // Urology. - 2005. – Vol. 66. - Suppl. 1. – P. 35-63.