

Заключение

Тактика активного динамического наблюдения за опухолями почки, накапливающими рентгеноконтрастное вещество, позволила нам лучше понять биологическое поведение ПКР. Хотя большинство опухолей демонстрирует медленный темп роста, некоторые из них прогрессируют. В настоящее время не выявлено реальных факторов прогноза опухолевого роста и возможной прогрессии ПКР. Хирургическое удаление новообразований, находившихся под наблюдением в течение определенного периода времени, с последующим гистологическим исследо-

ванием операционного материала доказывает, что большинство опухолей является злокачественными. Дальнейшие исследования кинетики опухолевого роста и молекулярных маркеров позволят выделить более точные факторы прогноза гистологического строения новообразований почечной паренхимы и избежать ненужного хирургического вмешательства у отобранных больных. В связи с тем что подобные прогностические признаки пока не выявлены, всем пациентам, являющимся подходящими кандидатами для хирургического вмешательства, показано оперативное лечение.

Литература

1. Chow W.H., Devesa S.S., Warren J.L., Fraumeni J.F. Jr. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. JAMA 1999;281(17):1628—31.
2. Hollingsworth J.M., Miller D.C., Daignault S., Hollenbeck B.K. Rising incidence of small renal masses: a need to reassess treatment effect. J Natl Cancer Inst 2006;98(18):1331—4.
3. Clark J.I., Atkins M.B., Urba W.J. et al. Adjuvant high-dose bolus interleukin-2 for patients with high-risk renal cell carcinoma: a cytokine working group randomized trial. J Clin Oncol 2003;21(16):3133—40.
4. Negrier S., Escudier B., Lasset C. et al. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. Groupe Francais d'Immunotherapie. N Engl J Med 1998;338(18):1272—8.
5. Chawla S.N., Crispen P.L., Hanlon A.L. et al. The natural history of observed enhancing renal masses: meta-analysis and review of the world literature. J Urol 2006;175(2):425—31.
6. Wehle M.J., Thiel D.D., Petrou S.P. et al. Conservative management of incidental contrast-enhancing renal masses as safe alternative to invasive therapy. Urology 2004;64(1):49—52.
7. Sowery R.D., Siemens D.R. Growth characteristics of renal cortical tumors in patients managed by watchful waiting. Can J Urol 2004;11(5):2407—10.
8. Lamb G.W., Bromwich E.J., Vasey P., Aitchison M. Management of renal masses in patients medically unsuitable for nephrectomy — natural history, complications, and outcome. Urology 2004;64(5):909—13.
9. Kassouf W., Aprikian A.G., Laplante M., Tanguay S. Natural history of renal masses followed expectantly. J Urol 2004;171(1):111—3; discussion 3.
10. Kunkle D.A., Crispen P.L., Chen D.Y. et al. Enhancing renal masses with zero net growth during active surveillance. J Urol 2007;177(3):849—54.
11. Kouba E., Smith A., McRackan D. et al. Watchful waiting for solid renal masses: insight into the natural history and results of delayed intervention. J Urol 2007;177(2):466—70; discussion 70.
12. Bosniak M.A. Observation of small incidentally detected renal masses. Semin Urol Oncol 1995;13(4):267—72.
13. Bosniak M.A., Birnbaum B.A., Krinsky G.A., Waisman J. Small renal parenchymal neoplasms: further observations on growth. Radiology 1995;197(3):589—97.

Прогностическое значение экспрессии тимидинфосфорилазы, Bcl-2 и Ki-67 при раке почки T1—2N0M0

С.Л. Гуторов, Е.В. Степанова, Я.В. Вишневская,
Е.В. Черноглазова, И.Н. Соколова, В.Б. Матвеев

Отделение химиотерапии и комбинированных методов лечения злокачественных опухолей
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

PROGNOSTIC VALUE OF EXPRESSION OF THYMIDINE PHOSPHORYLASE, Bcl-2, AND Ki-67 IN RENAL CANCER (T1—2N0M0)

S.L. Gutorov, Ye.V. Stepanova, Ya.V. Vishnevskaya, Ye.V. Chernoglazova, I.N. Sokolova, V.B. Matveev
Department of Chemotherapy and Combined Treatments for Malignancies,
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The incidence of the relapse following radical nephrectomy for renal cancer is as high as 20—30%. The traditional predictors (including the histological type of a tumor) are insufficient to predict the likelihood of the relapse. The authors studied the expression of a number of molecular markers including thymidine phosphorylase (TP), Bcl-2, and Ki-67 and their prognostic value in patients with renal cancer (T1—2N0M0). The risk of progression significantly increased in higher grade of the tumor and in cases of TP hyperexpression. The favorable prognostic factors may include the absence of PT expression on the tumor cells.

Введение

На ранних стадиях рака почки, несмотря на выполнение радикальной нефрэктомии, частота рецидива болезни достигает 20—30%. Так, при T1 5-летняя выживаемость достигает 76%, а при T2 — 67% [1]. Вторым после стадии T независимым фактором прогноза является степень анаплазии опухолевых клеток (G). 5-летняя общая выживаемость при G₁ составляет 76%, G₂ — 72%, G₃ — 51%, G₄ — 35% [2, 3].

Тем не менее для предсказания вероятности рецидива часто недостаточно определения традиционных факторов прогноза, включая гистологический тип опухоли. Исследования последнего времени выявили ряд маркеров, которые могут иметь прогностическое значение. Среди них, учитывая биологию рака почки, ключевыми могут оказаться факторы неоплазии и апоптоза.

Важным регулятором ангиогенеза является тимидинфосфорилаза (ТФ). Известно, что повышенная экспрессия ТФ связана с увеличением количества сосудов в опухоли [4]. В отличие от других стимуляторов ангиогенеза — VEGF и bFGF, ТФ не является прямым митогеном эндотелиальных клеток. Это один из ферментов, участвующих в метаболизме пиримидинов, который катализирует обратное фосфорилирование тимидина в тимин и 2-дезоксирибозо-1-фосфат. Последний покидает клетку и стимулирует миграцию клеток эндотелия [5]. Кроме того, ТФ в моделях *in vitro* и *in vivo* предотвращает вступление эндотелиальных клеток в апоптоз [6].

Частота экспрессии ТФ в ткани рака почки достигает 80% [7]. Установлено, что уровень ТФ в опухолевой ткани значительно (в 3,5—10 раз) выше, чем в неизмененной ткани почки [7—9]. Выявлена сильная прямая корреляция между экспрессией ТФ и размером опухоли T. Показано, что у больных с высоким уровнем экспрессии ТФ медиана безрецидивной и общей выживаемости после нефрэктомии была достоверно ниже в сравнении с ТФ-отрицательными случаями. По предварительным данным, были обнаружены значимые корреляции между экспрессией ТФ и количеством микрососудов в опухоли, морфологической структурой, наличием и риском развития метастазов, опухолевым тромбозом [7, 9—11]. Гиперэкспрессия ТФ в прилежащей к опухоли ткани коррелировала со степенью анаплазии G опухоли ($p < 0,01$) и неблагоприятным прогнозом ($p < 0,001$) болезни [11].

Таким образом, получены предварительные данные, позволяющие рассматривать наличие высокой экспрессии ТФ как фактор неблагоприятного прогноза [4, 9, 11].

Ключевыми элементами регуляции процесса апоптоза являются белки семейства Bcl-2 и супрес-

сор опухолевого роста p53. Было показано, что Bcl-2 является протоонкогеном, ингибирующим апоптоз; экспрессия Bcl-2 ассоциируется с низкоагрессивным фенотипом опухоли [12].

Частота выявления экспрессии Bcl-2 в ткани рака почки варьирует от 20 до 94%. Столь большой разброс может быть объяснен разными морфологическими характеристиками изучаемых случаев.

При раке почки взаимосвязь экспрессии Bcl-2, клинико-морфологических характеристик, прогноза болезни неоднозначна. В серии исследований было показано, что положительные значения Bcl-2 не влияли на прогноз [13, 14]. В другой работе при анализе 101 случая была продемонстрирована значимая корреляция экспрессии Bcl-2 с хорошим прогнозом болезни. Частота экспрессии Bcl-2 была обратно пропорциональна индексу пролиферации и индексу апоптоза. Положительные значения Bcl-2 значимо коррелировали с лучшей выживаемостью, более низкой стадией T и низкой степенью анаплазии G. По мнению авторов, экспрессия Bcl-2 может служить фактором благоприятного прогноза при раке почки [12].

До настоящего времени при раке почки нет однозначных данных о прогностическом значении одного из маркеров пролиферативной активности опухоли — индекса пролиферации (Ki-67). Считается, что антиген Ki-67 экспрессируется практически во всех фазах митотического цикла, отражая степень пролиферации. Выявление его высокого уровня, по данным отдельных исследований, связано со снижением выживаемости больных и прямо коррелирует со степенью ядерной градации по Фурману, стадией опухоли и риском метастазирования [15, 16].

Имеются сообщения, что частота встречаемости случаев положительного окрашивания ядер клеток Ki-67 значимо выше при G₃, чем при G₁₋₂, и при T3—4, чем при T1—2. Выявлены положительная связь между индексом апоптоза и Ki-67 и их обратная корреляция с экспрессией Bcl-2 [12]. Описана прямая связь между частотой выявления экспрессии Ki-67 и наличием зон некроза в опухолевом узле почки. Выраженность зон некроза, в свою очередь, прямо коррелировала с размером опухоли T, наличием метастазов, высокой степенью анаплазии, плохим соматическим статусом и, в целом, с уменьшением медианы выживаемости [17, 18].

Тем не менее опубликованные данные не позволяли однозначно судить о наличии связей того или иного маркера с вероятностью рецидива болезни. Это послужило основанием для проведения иммуноморфологического исследования влияния экспрессии ТФ, Bcl-2 и Ki-67 на безрецидивную выжи-

ваемость больных на ранних стадиях рака почки. Оценена их роль как фактора прогноза рецидива болезни.

Материалы и методы

В ретроспективный анализ были включены 38 больных раком почки (18 женщин и 20 мужчин). Всем в период с 1985 по 1995 г. была выполнена радикальная нефрэктомия. У 19 больных была установлена стадия pT1N0M0 и у 19 — pT2N0M0. В послеоперационном периоде дополнительного лечения не проводилось. При последующем наблюдении у 14 (36,8%) больных в различные сроки были выявлены рецидив болезни или отдаленные метастазы. В 24 (63,2%) случаях болезнь не прогрессировала при длительности наблюдения более пяти лет.

Материалом исследования служили стандартные парафиновые блоки опухолевой ткани.

Методом световой микроскопии изучали гистологический вариант опухоли, степень ее анаплазии, наличие и выраженность некроза опухолевой ткани. К светлоклеточному раку относили случаи, когда опухоль полностью (100%) состояла только из светлых клеток.

Степень анаплазии опухоли определяли по наименее дифференцированному клеточному компоненту. Оценку проводили по классификации ВОЗ (2002) 2. Различали первую степень (G_1), когда клетки имели мелкое гиперхромное ядро с невидимой нуклеолой и мелкодисперсным хроматином. При степени G_2 клетки имели полиморфные ядра, в некоторых из них нуклеола была невидима, в некоторых увеличенная нуклеола определялась при ув. 10, также фиксировались мелкие свободно лежащие гранулы хроматина. Степень G_3 характеризовалась наличием в клетках резко полиморфных гиперхромных ядер с одной или несколькими макронуклеолами, грубодисперсным хроматином.

Степень анаплазии для хромофобного (гранулярно-клеточного, зернистоклеточного) и папиллярного рака почки определяли так же, как и для светлоклеточного варианта 2, 3. Во всех отобранных случаях встречались морфологические варианты с преобладанием светлых клеток. Однако в ряде опухолей встречались и светлоклеточные, и гранулярно-клеточные, и папиллярные структуры. Такие опухоли были отнесены к одному из вышеперечисленных вариантов с учетом преобладающего структурного и клеточного компонента.

Иммуногистохимическое исследование было проведено на срезах с парафиновых блоков опухолей, предназначенных для световой микроскопии. Срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. Для «демаскировки» антигенов проводили прогревание срезов на водяной бане в течение 30 мин в предварительно нагретом

до 95—99°C цитратном буфере. Инкубацию с первичными антителами проводили при 4°C в течение 16 ч. Затем стекла промывали 2 раза по 5 мин в фосфатном буфере. В качестве вторичных антител использовали тест-систему LSAB+kit (DAKO). Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали систему DAB+(DAKO). Срезы докрашивали гематоксилином Майера и заключали в канадский бальзам.

Опухоль считали положительной по ТФ, если более 20% клеток были окрашены антителами со средней или сильной интенсивностью. Опухоль оценивали как ТФ₁₊, если окрашивалось 20—70% опухолевых клеток, и как ТФ₂₊ — если количество окрашенных клеток превышало 70%.

Опухоль считали положительной по Bcl-2, если было окрашено более 25% клеток и отрицательной — если в ткани опухоли отсутствовала реакция цитоплазмы с антителами или количество окрашенных клеток было менее 25%.

Пролиферативную активность опухоли оценивали как процент Ki-67 положительных клеток от общего количества клеток. Высокая пролиферативная активность соответствовала индексу Ki-67 $\geq 5\%$.

Статистический анализ проводили при помощи программы Statistica v.6 с использованием критерия χ^2 , критерия Фишера, коэффициента Стьюдента. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$. Расчет кривой выживаемости проведен методом Каплана — Майера.

Результаты и обсуждение

При гистологическом исследовании в 18 (47,4%) случаях был установлен светлоклеточный рак, в 18 (47,4%) сочетались зернистоклеточные и светлоклеточные структуры с преобладанием последних (в 80% и более). Зернистоклеточный и папиллярный варианты были в одном наблюдении. В одном случае выявлены все 3 компонента с преобладанием светлоклеточных структур (см. таблицу).

Степень анаплазии G_2 была установлена в 19 (50%) случаях, G_3 — в 14 (37%) и G_1 — в 5 (13%) случаях. Зернистоклеточные структуры преобладали в низкодифференцированных опухолях: 17 случаев при G_2+G_3 против одного случая при G_1 . При светлоклеточном раке это соотношение составляло 14:4.

Очаги некроза были выявлены в 17 (45%) из 38 случаев; в 14 из них они занимали менее 50% площади опухолевой ткани, а в 3 — 50% и более. Зависимость их наличия от варианта опухоли и степени анаплазии G представлена в таблице.

При светлоклеточном раке не выявлено некрозов ткани опухоли в 10 (56%) из 18 случаев; в 6 (33%) площадь некроза занимала менее 50%, а в 2 (11%) — 50% и более. Некроз ткани при G_1 выяв-

Соотношение наличия и выраженности зон некроза, гистологического варианта и степени анаплазии рака почки

Вариант	Число образцов	Без некроза	Некроз	
			<50%	≥50%
Светлоклеточный				
G ₁	4 (10)	3	1	—
G ₂	9 (24)	6	3	—
G ₃	5 (13)	1	2	2
Смешанный (светло- и зернистоклеточный)				
G ₁	1 (3)	1	—	—
G ₂	9 (24)	6	3	—
G ₃	8 (21)	2	5	1
Другие				
G ₂	1 (2)	1	—	—
G ₃	1 (3)	1	—	—
Всего	38 (100)	21	14	3

Примечание. Данные представлены как число случаев (в скобках — процент).

лен в 1 случае из 4, при G₂ — в 3 из 9, а при G₃ — в 4 из 5, т.е. было отмечено увеличение выраженности зон некроза параллельно увеличению степени анаплазии ткани опухоли. Подобная тенденция прослеживалась и для смешанной формы при G₃. Нами не установлена связь между наличием зон некроза, степенью его выраженности и вероятностью рецидива болезни. При наличии очагов некроза опухолевой ткани прогрессирование наблюдалось у 5 из 17 больных, а при его отсутствии — у 9 из 21.

При степени анаплазии G₁ прогрессирования болезни не было и у 4 из 5 больных была стадия T1. Из них у четырех был светлоклеточный рак, у одного при стадии T2 выявлен зернистоклеточный компонент (3%). Некроз опухоли менее 50% был выявлен в одном случае при T1.

При G₂ прогрессирование было установлено у 7 (37%) из 19 больных, при этом T2-стадия была в че-

тырех случаях. Светлоклеточный рак был установлен у 3 больных, смешанная форма — у 4, доля зернистоклеточного компонента составляла от 5 до 20% ткани (в среднем 14%). случаев выявления некроза опухоли не было. Медиана времени до прогрессирования составила 44 мес.

При G₃ прогрессирование болезни было у 7 (50%) из 14 больных. При этом стадия T2 была у 5 больных, смешанный вариант опухоли установлен у 5 больных, доля зернистоклеточного компонента варьировала от 10 до 45% (в среднем 21%). В одном случае 55% ткани были представлены папиллярным раком. В двух случаях некроза опухоли не было,

в остальных пяти его зоны занимали от 30 до 50% опухолевой ткани. Медиана времени до прогрессирования составила 15 мес — достоверно меньше, чем при G₂ ($p<0,05$).

Выявлена прямая корреляция между степенью анаплазии и размером опухоли: при G₃ больший размер опухоли (T2 против T1) встречался существенно чаще (в 71%) по сравнению с G₂ и G₁ (42 и 20% соответственно; $p<0,05$).

Таким образом, при светлоклеточном варианте рака вероятность рецидива была ниже; риск прогрессирования болезни возрастал пропорционально увеличению степени анаплазии опухолевой ткани и, в меньшей степени, размеру опухоли T.

При иммуногистохимическом исследовании экспрессия ТФ на опухолевых клетках была выявлена в 30 (78,9%) случаях. При этом в равном соотношении наблюдалось как слабое (ТФ₁₊), так и среднее (ТФ₂₊) окрашивание клеток.



Рис. 1. Цитоплазматическая экспрессия Bcl-2 в клетках рака почки, × 20. Цитоплазматическое и мембранное окрашивание всех опухолевых клеток Bcl-2, реакция 2+

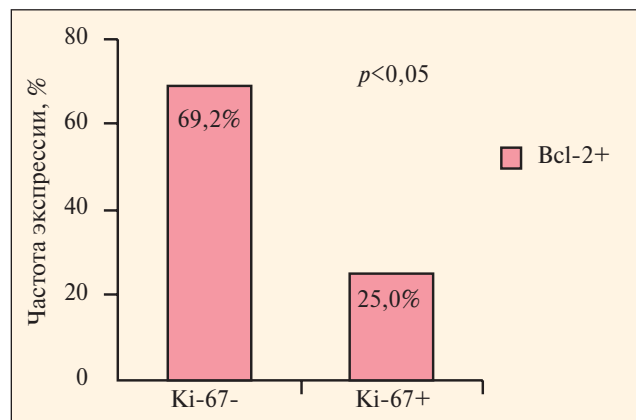


Рис. 2. Связь экспрессии Bcl-2 с пролиферативной активностью опухоли (Ki-67)

Во всех 14 случаях прогрессирования болезни была установлена экспрессия ТФ₁₊ или ТФ₂₊. Медиана времени до прогрессирования составила 23 мес. При отсутствии экспрессии (ТФ₀) болезнь не рецидивировала; разница статистически значима ($p < 0,05$). Таким образом, в случае выявления экспрессии ТФ вероятность прогрессирования болезни в течение двух лет после операции составила 50%.

В нашем исследовании не было установлено связи между размером первичной опухоли Т и наличием экспрессии ТФ: при Т1N0M0 и Т2N0M0 частота встречаемости отрицательных и положительных случаев была одинаковой (50%).

Экспрессия Bcl-2 была выявлена на 21 (55,3%) образце ткани рака почки и чаще встречалась при G₂ (в 14 случаях; 66,7%), чем при G₁ (3; 14,3%) и G₃ (4; 19%). Характер окрашивания клеток опухоли представлен на рис. 1.

При отсутствии экспрессии Bcl-2 отмечалась тенденция к возрастанию степени анаплазии опухоли. Так, из 17 отрицательных случаев G₁ была установлена в 2 (11,7%), G₂ — в 5 (29,4%) и G₃ в 10 (58,8%).

Прогрессирование болезни зарегистрировано в 6 (28,6%) из 21 случая при экспрессии Bcl-2, при отсутствии таковой — в 8 (47%) из 17. Медиана времени до прогрессирования в восьми Bcl-2 отрицательных случаях составила 17 мес, в шести положительных случаях — 23 мес (различия статистически недостоверны).

Не установлено связи между экспрессией Bcl-2 и размером опухоли. Как при Т1, так и при Т2 одинаково часто встречались как отрицательные, так и положительные значения маркера.

Высокая пролиферативная активность опухоли была выявлена в 12 (31,6%) случаях, при этом индекс пролиферации Ki-67 варьировал от 6 до 37%. Прогрессирование болезни было в 5 (41,6%) из 12 случаев высокого индекса пролиферации и в 9 (34,6%) из 26 при его отрицательных значениях.

Установлена обратная зависимость между пролиферативной активностью и экспрессией Bcl-2: низкий индекс Ki-67 встречался достоверно чаще в Bcl-2-положительных случаях (69,2 против 25%; $p < 0,05$; рис. 2).

Связи между уровнем экспрессии Ki-67 и размером опухоли Т, степенью клеточной анаплазии не установлено.

Заключение

Риск прогрессирования рака почки достоверно возрастал пропорционально увеличению степени анаплазии опухолевой ткани и при выявлении гиперэкспрессии ТФ. Сочетание этих признаков можно рассматривать как значимый фактор неблагоприятного течения болезни даже на ранних стадиях рака почки. К фактору благоприятного прогноза можно отнести отсутствие экспрессии ТФ на клетках опухоли. Показано, что при светлоклеточном варианте вероятность рецидива болезни ниже, чем при других формах.

Литература

1. Godley P.A. Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2001;13:199—203.
2. Eble J.N., Sauter G., Epstein J.I., Sesterhenn I.A. Tumours of the urinary system and male genital organs. WHO Classification of tumours. 2002. p. 24—7.
3. Fuhrman S.A., Lasky L.C., Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982;6(7):655—63.
4. Imazano Y., Takebayashi Y., Nishiyama K. et al. Correlation between thymidine phosphorylase expression and prognosis in human renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1997;15:2570—8.
5. Ishitsuka H., Miwa M., Ishikawa T. et al. Capecitabine: an orally available fluoropyrimidine with tumor selectivity. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1995;36:2426.
6. Moghaddam A., Choudhuri R., Bicknell R. Tumour Angiogenesis. Oxford University Press; 1997. p. 287.
7. Suzuki K., Morita T., Hashimoto S. et al. Thymidine phosphorylase /platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) associated with prognosis in renal cell carcinoma. *Urol Res* 2001;29:7—12.
8. Mizutani Y., Wada H., Yoshida O. et al. The significance of thymidine phosphorylase /platelet-derived endothelial cell growth factor activity in renal cell carcinoma. *Cancer* 2003;98(4):730—6.
9. Morita T., Matsuzaki A., Tokue A. Quantitative analysis of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in renal cell carcinoma. *Oncology* 2003;65(2):125—31.
10. Hirano Y., Takayama T., Kageyama S. et al. Thymidine phosphorylase activity in renal cell carcinoma: relationship between histological parameters and chemosensitivity to fluorouracil-related drugs. *Urol Res* 2002;30(2):112—5.
11. Wada S., Yoshimura R., Naganuma T. et al. Thymidine phosphorylase levels as a prognostic factor in renal cell carcinoma. *BJU Int* 2003;91:105—8.
12. Itoi T., Yamana K., Bilim V. et al. Impact of frequent Bcl-2 expression on better prognosis in renal cell carcinoma patients. *Br J Cancer* 2004;90:200—5.
13. Vasavada S.P., Novick A.C., Williams B.R. P53, bcl-2, and Bax expression in renal cell carcinoma. *Urology* 1998;51:1057—61.
14. Uchida T., Gao J.P., Wang G. et al. Clinical significance of p53, mdm2, and bcl-2 proteins in renal cell carcinoma. *Urology* 2002;59:615—20.
15. Rioux-Leclercq N., Turlin B., Bansard J. et al. Value of immunohistochemical Ki-67 and p53 determinations as predictive factors of outcome in renal cell carcinoma. *Urology* 2000;55(4):501—5.
16. Papadopoulos I., Weichert-Jacobsen K., Wacker H.H., Sprenger E. Correlation between DNA ploidy, proliferation marker Ki-67 and early tumor progression in renal cell carcinoma. A prospective study. *Eur Urol* 1997;31(1):49—53.
17. Lam J.S., Shvarts O., Said J.W. et al. Clinicopathologic and molecular correlations of necrosis in the primary tumor of patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 2005;103(12):2517—25.
18. Bui M.H., Visapaa H., Seligson D. et al. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and Ki-67 as predictors of survival for renal clear cell carcinoma. *J Urol* 2004;171(6):2461—6.