

© С.Х.Аль-Шукри, И.А.Корнеев, М.Н.Агеев, И.А.Новикова, А.С.Аль-Шукри, 2006
УДК 616.62-006.6-036.8:611.018.13

С.Х.Аль-Шукри, И.А.Корнеев, М.Н.Агеев, И.А.Новикова, А.С.Аль-Шукри

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АРГЕНТОФИЛЬНЫХ ЯДРЫШКОВЫХ ПРОТЕИНОВ В КЛЕТКАХ ОСАДКА МОЧИ И ПРОГНОЗ У БОЛЬНЫХ ПОВЕРХНОСТНЫМ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

S.Kh. Al-Shukri, I.A. Korneev, M.N. Ageev, I.A. Novikova, A.S. Al-Shukri

THE DISTRIBUTION OF ARGENTOPHILIC NUCLEOLAR PROTEINS IN URINARY SEDIMENT AND PROGNOSIS OF PATIENTS WITH SUPERFICIAL CANCER OF THE URINARY BLADDER

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

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Изучить распределение ядрышек и аргентофильных ядрышковых организаторов в поверхностных переходноклеточных опухолях мочевого пузыря, проанализировать связь полученных показателей с рецидивированием рака и выживаемостью больных после оперативного лечения. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Ретроспективно изучены данные первичного обследования и диспансерного наблюдения 22 больных поверхностным переходноклеточным раком мочевого пузыря, которым была произведена трансуретральная резекция (ТУР) опухолей. В дополнение к стандартному обследованию осадок полученной перед ТУР мочи окрашивали 50% раствором AgNO_3 , идентифицировали и считали ядра опухолевых клеток, в ядрах определяли количество ядрышек и подсчитывали расположенные в них аргентофильные гранулы. Показатели распределения исследованных признаков сопоставляли с результатами гистологического исследования удаленной опухолевой ткани, а также с клиническими данными, полученными перед оперативным вмешательством и в ходе послеоперационного диспансерного наблюдения. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Число клеточных ядер в препарате оказалось связанным с количеством ядрышек ($p < 0,001$) и аргентофильных гранул ($p = 0,001$), число ядрышек – с количеством гранул ($p < 0,001$). Ни число ядрышек, ни количество аргентофильных гранул не было связано с глубиной инвазии и степенью дифференцировки рака ($p > 0,1$). Более высокие показатели пятилетней выживаемости отмечены у больных с меньшим числом аргентофильных гранул в ядрышках ($p = 0,007$), ядер ($p = 0,023$) и содержанием ядрышек в клеточных ядрах ($p = 0,062$). Рецидивирование рака чаще наблюдали у больных с большим числом ядер ($p = 0,057$) и ядрышек ($p = 0,081$), короткий безрецидивный промежуток соответствовал большему количеству аргентофильных гранул ($p = 0,078$) и большей насыщенности ими ядрышек ($p = 0,074$). **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Изучение клеток осадка мочи при помощи методики серебрения дает дополнительную информацию о принадлежности больных поверхностным переходноклеточным раком мочевого пузыря к группам риска рецидивирования и прогрессии.

Ключевые слова: поверхностный рак мочевого пузыря, прогноз, ядрышки, аргентофильные ядрышковые организаторы (AgNOR).

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to study the distribution of nucleoli and argentophilic nucleolar organizers in the superficial transitional cell tumors of the bladder and to analyze the correlation of the obtained indices with recurrences of cancer and survival of the patients after surgical treatment. **PATIENTS AND METHODS.** The data of primary examination and dispensary observation were retrospectively studied in 22 patients with superficial transitional cell cancer of the bladder in whom transurethral resections (TUR) of the tumors were fulfilled. In addition to standard examination the sediment of urine taken before TUR was stained with 50% solution of AgNO_3 , identified and the tumor cell nuclei were counted. The numbers of nucleoli were determined in the nuclei and the argentophilic granules in them were counted. The indices of the distribution of the signs studied were compared with the results of a histochemical investigation of the ablated tumor tissue as well as with the clinical findings obtained before operations and during the postoperative dispensary follow-up. **RESULTS.** The number of cell nuclei in the preparation proved to be associated with the number of nucleoli ($p < 0.001$), and the argentophilic granules ($p = 0.001$), the number of nucleoli - with the number of granules ($p < 0.001$). Neither the number of nucleoli, nor the argentophilic granules were associated with the depth of invasion and degree of the cancer differentiation ($p > 0.1$). Higher indices of the 5 year survival were noted in patients with less number of the argentophilic granules in the nucleoli ($p = 0.007$), nuclei ($p = 0.023$) and content of nucleoli in cell nuclei ($p = 0.062$). Recurrence of cancer was observed more often in patients with great number of nuclei ($p = 0.057$) and nucleoli ($p = 0.081$). A short period without recurrences corresponded to a great number of the argentophilic granules ($p = 0.078$) and more saturation with them in nucleoli ($p = 0.074$). **CONCLUSION.** Investigation of the urine sediment using the method of silver impregnation provides additional information of belonging of patients with superficial transitional cell cancer of the bladder to groups of risk of recurrences and progression.

Key words: superficial transitional cell cancer of the bladder, prognosis, nucleoli, argentophilic nucleolar organizers (AgNOR).

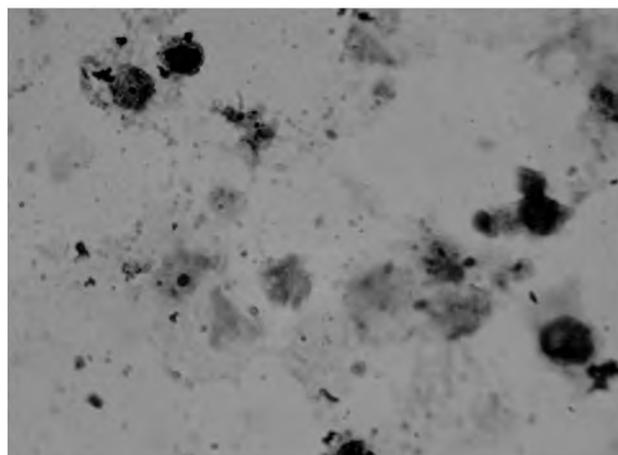
ВВЕДЕНИЕ

Поверхностные формы переходноклеточного рака мочевого пузыря встречаются часто и составляют около 4% всех онкологических заболеваний, при этом ежегодно отмечается рост числа впервые диагностированных больных [1]. Биологическое поведение принадлежащих к одним и тем же классификационным категориям карцином мочевого пузыря существенно различается. Многие исследователи ведут поиск дополнительных признаков, указывающих на риск прогрессирования и рецидивирования рака и позволяющих выбрать адекватный потенциалности агрессивности рака метод лечения. Одним из направлений поиска стало изучение пролиферативной активности опухолевых клеток путем анализа распределения аргентофильных ядрышковых протеинов (AgNOR) – признаков, свидетельствующих об активности транскрипции рибосомальной РНК [2]. Получены данные о прогностической ценности этих показателей в опухолевой ткани у больных поверхностным и местно-распространенным раком мочевого пузыря [3,4]. Недостатками этой методики являются необходимость проведения инвазивного оперативного вмешательства для получения раковых клеток и получение представления об агрессивности карциномы после оперативного лечения. В связи с этим представляет интерес применение метода серебрения при изучении клеток рака мочевого пузыря в осадке дневной порции мочи.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В основу работы положено проспективное изучение материалов клинического обследования 22 больных раком мочевого пузыря (Ta-T1, N0, M0). Соотношение мужчин и женщин составило 6:1, возраст варьировал от 43 до 81 года и в среднем ($\bar{X} \pm SD$) составил $64,5 \pm 11,2$ года. Размер опухоли колебался от 0,4 до 3,5 см и в среднем был равен $2,6 \pm 1,4$ см. У 4 (18%) пациентов поражение стенок мочевого пузыря было множественным.

В осадке мочи, окрашенном 50% раствором $AgNO_3$, идентифицировали и считали ядра опухолевых клеток, в ядрах определяли количество ядрышек и подсчитывали расположенные в них аргентофильные гранулы (см. микрофото). Исследование аргентофильных ядрышковых протеинов в уротелиальных клетках производили по методике W.M. Howell and D.A. Black (1980) [5] в модификации, в соответствии с которой после центрифугирования самопроизвольно выпущенной мочи при 1000 об. в течение 4 мин. и фиксации препаратов на предметных стеклах в 2% растворе муравьиной кислоты на стекло наносили



Микрофото, увеличение $\times 2000$. Клетки осадка мочи у больного переходноклеточным раком мочевого пузыря, окраска нитратом серебра. Определяются импрегнированное серебром ядро и ядрышки, содержащие аргентофильные гранулы.

одну каплю 2% раствора желатина и 2 капли 50% раствора азотнокислого серебра. После минутной экспозиции стекло помещали в чашку Петри на водяную баню и оставляли в термостате при температуре $37^\circ C$ в течение 25 минут. Затем стекло промывали водой и окрашивали раствором Гимзы. После просушивания при температуре $20-23^\circ C$ в препаратах подсчитывали при увеличении $420\times$ количество клеточных ядер, а при увеличении $2000\times$ – число ядрышек в ядрах и аргентофильных гранул в ядрышках уротелиальных клеток. Кроме того, в каждом препарате рассчитывали среднее число ядрышек, приходящееся на одно ядро, и среднее количество аргентофильных гранул, приходящееся на каждое ядрышко.

Всем пациентам была произведена трансуретральная резекция новообразований в пределах здоровых тканей стенки мочевого пузыря. При морфологическом исследовании удаленной опухоли у всех больных был выявлен переходноклеточный рак с глубиной инвазии pTa и pT1 в 8 (36%) и 14 (64%) случаях и степенью дифференцировки G1, G2, G3 – в 13 (59%), 5 (23%) и 4 (18%) случаях соответственно.

После операции пациенты регулярно проходили контрольные обследования в течение пяти и более лет после оперативного лечения. За время наблюдения рак мочевого пузыря рецидивировал у 10 (46%) пациентов. Срок первого рецидива колебался от 7 до 38 мес. и в среднем составил $22,3 \pm 15,9$ мес. Средняя продолжительность жизни после операции больных раком мочевого пузыря стадии pTa и pT1 составила $75,2 \pm 12,3$ и $67,2 \pm 9,4$ мес. соответственно. Результаты анализа показателей распределения аргентофильных ядрышковых протеинов и ядрышек были сопоставлены с клас-

Показатели распределения (среднее значение (\bar{X}), стандартное отклонение (SD), минимальное (Min) и максимальное (Max) значения аргентофильных гранул, ядер и ядрышек в клетках осадка мочи у больных раком мочевого пузыря

Исследуемый признак в препарате	Показатели распределения			
	M	SD	Min	Max
Число ядер	6,5	1,7	2	8
Число ядрышек в ядрах	17,5	6,7	4	26
Число аргентофильных гранул в ядрышках	21,4	10,1	3	39
Насыщенность ядер ядрышками	2,7	0,7	0,9	4,3
Насыщенность ядрышек гранулами	1,2	0,4	0,6	2,1

сификационными категориями pT и G, а также с показателями выживаемости больных без прогрессирования болезни, рецидивированием рака и продолжительностью безрецидивного периода.

Статистическая обработка. Для каждого препарата рассчитывали минимальное (Min), максимальное (Max), среднее количество (\bar{X}) и стандартное отклонение (SD) распределения ядрышек, аргентофильных гранул и коэффициентов насыщенности ядер ядрышками и ядрышек гранулами путем определения отношения количества ядрышек к числу ядер и числа гранул к количеству ядрышек соответственно. Достоверность связей между этими показателями и клиническими признаками заболевания анализировали при помощи t-теста Стьюдента, коэффициента ранговой корреляции Спирмена и лог-рэнк-анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты подсчета и расчета соотношений аргентофильных гранул, ядрышек и ядер опухолевых клеток в осадке мочи больных раком мочевого пузыря представлены в таблице. Несмотря на индивидуальные различия показателей, они оказались тесно связанными между собой: число ядер в препарате – с количеством ядрышек и аргентофильных гранул ($r=0,72$, $p<0,001$ и $r=0,64$; $p=0,001$), а число ядрышек – с количеством гранул ($r=0,76$, $p<0,001$). Достоверность связей между числом ядер, ядрышек и аргентофильных гранул в клетках осадка мочи и характеристиками рака мочевого пузыря – глубиной инвазии и степенью дифференцировки оказались ниже порогового значения ($p>0,1$). При этом были выявлены зависимости между средними значениями исследуемых признаков и показателями, характеризующими клиническое течение заболевания – рецидивированием рака, продолжительностью безрецидивного периода и выживаемостью без признаков прогрессирования.

Так, у больных, впоследствии проживших в течение пяти и более лет после первичного опера-

тивного лечения в осадке мочи было выявлено меньшее число аргентофильных гранул в ядрышках ($r=0,71$; $p=0,007$), меньшее количество ядер ($r=0,62$, $p=0,023$) и меньшее содержание ядрышек в клеточных ядрах ($r=0,53$, $p=0,062$). Рецидивы также чаще наблюдали у больных, имеющих в осадке мочи перед первичным оперативным вмешательством большее число ядер и ядрышек ($r=0,56$, $p=0,057$ и $r=0,52$, $p=0,081$), а более короткий «светлый» безрецидивный

промежуток соответствовал большему количеству аргентофильных гранул ($r=0,58$, $p=0,078$) и большей насыщенности ими ядрышек ($r=0,59$, $p=0,074$).

ОБСУЖДЕНИЕ

«Золотым стандартом» анализа клеток осадка мочи при раке мочевого пузыря является цитологическое исследование. Во многих случаях оно позволяет определить дифференцировку уротелиальных новообразований и, следовательно, принадлежность больных к группам риска рецидивирования и прогрессирования рака. К преимуществам этого исследования относят возможность получения прогностически ценной информации на этапе клинического обследования, что дает возможность планировать соответствующий потенциальной агрессивности рака режим лечебных мероприятий. Недостатками являются низкая чувствительность при раке степени G1-2 и субъективизм причисления опухоли к соответствующей классификационной категории [1, 2].

В соответствии с современными представлениями, показатели аргентофильности ядрышкообразующих районов хромосом в опухолевой ткани позволяют уточнить глубину инвазии, степень дифференцировки, а также риск агрессивного течения рака мочевого пузыря [2,6]. Возможность использования окрашенных нитратом серебра клеток осадка мочи для прогнозирования клинического течения карцином уротелия в настоящее время изучена недостаточно полно. В нашей работе мы наблюдали тесную связь между аргентофильными ядрышковыми организаторами, рецидивирующим характером течения заболевания, сроком развития рецидива и прогрессированием рака. Установлено, что достоверность связей показателей распределения аргентофильных гранул и ядрышек и традиционных прогностических критериев – глубины инвазии и степени дифференцировки рака – оказалась ниже порогового значения. Это позволяет рассматривать полученные данные как самостоятельные, не зависящие от степени местного

распространения и светооптических характеристик опухоли прогностические факторы. Кроме того, возможность выполнения количественного анализа этих показателей позволяет рассчитывать на меньший субъективизм и хорошую воспроизводимость оценки препаратов.

В настоящее время проблема прогнозирования при поверхностном раке мочевого пузыря является одной из наиболее актуальных в современной урологии. В стремлении выбрать необходимый и достаточный объем лечебных мероприятий, многие исследовательские группы ведут поиск дополнительных факторов. Среди них признаки, характеризующие пролиферативную активность опухолей, являются наиболее многообещающими [7]. Наша работа подтверждает это представление, очевидно, что для получения диагностических алгоритмов требуется продолжение исследований в данном направлении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, подсчет числа ядрышек и содержащихся в них аргентофильных гранул в клетках осадка мочи у больных с поверхностными формами рака мочевого пузыря в нашей работе по-

зволил получить дополнительную прогностически ценную информацию о принадлежности пациентов к группам риска рецидивирования и прогрессирования заболевания.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Аль-Шукри СХ, Ткачук ВН. *Опухоли мочеполовых органов*. Питер, СПб.; 2000
2. Матвеев БП, ред. *Клиническая онкоурология*. Вердана, М.; 2003
2. Корнеев ИА. Аргентофильные ядрышковые организаторы и прогноз у больных поверхностным и местно-распространенным переходно-клеточным раком мочевого пузыря. *Урология* 2005; (1): 5-9
4. Bozlu M, Orhan D, Baltaci S et al. The prognostic value of proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and nucleolar organizer region in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int Urol Nephrol* 2002; 33(1): 59-66
5. Howell WM, Black DA. Controlled silver staining of nucleolus organiser regions with a protective colloidal developer: a one step method. *Experientia* 1980; 36: 1014-1015
6. Мационис АЭ, Коган МИ, Матвеевко АА и др. Новые реальности цитологической диагностики рака мочевого пузыря. В: *Актуальные вопросы лечения онкоурологических заболеваний: Материалы 4-й Всероссийской научной конференции с участием стран СНГ*. Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН, Медицинский радиологический научный центр РАМН, М., 2001; 28 – 30
7. Wolf H. Prognostic factors in bladder carcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 1991; 138: 153-160

Поступила в редакцию 17.04.2006 г.