



УДК 616.34:616.22

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ *INSITU* ГИБРИДИЗАЦИЯ В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ РЕЦИДИВА РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ В ПЕРВЫЕ 12 МЕСЯЦЕВ ПОСЛЕ ТРАНСУРЕТРАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ У ЛИЦ СТАРЧЕСКОГО И ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА

**Г.А. РЫЖАК
А.С. ПУШКИН**

*Санкт-Петербургский институт
биорегуляции и геронтологии
СЗО РАМН*

e-mail: pushkindoc@mail.ru

В статье изложены результаты опыта применения методики флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) в ранней диагностике рецидивов поверхностного рака мочевого пузыря у 103 пациентов среднего, пожилого и старческого возраста, перенёсших трансуретральную резекцию мочевого пузыря.

Ключевые слова: гериатрия, рак мочевого пузыря, флуоресцентная *in situ* гибридизация, трансуретральная резекция, пожилой и старческий возраст.

Во многих развитых странах за последнее время значительно возросла численность пожилого населения. В результате сокращения рождаемости и увеличения продолжительности жизни население все большего числа стран будет стремительно стареть. В период с 2005 по 2050 годы половина прироста численности населения в мире будет являться результатом роста численности населения в возрасте старше 60 лет. Таким образом, население в возрасте старше 60 лет увеличится практически в два раза (с 245 миллионов человек в 2005 году до 406 миллионов в 2050 году). Например, в Российской Федерации в 2000 г. в возрасте старше 65 лет было около 18 миллионов человек, а в 2020 г., по прогнозам, их будет уже 21 миллион человек [1]. В Германии на 82 миллиона населения приходится 17% людей в возрасте старше 60 лет, а к 2020 г. их численность повысится до 22% от ожидаемой общей численности населения. В США к 2020 г. ожидается увеличение численности людей старших возрастных групп на 5 миллионов человек [2].

В структуре онкологических заболеваний населения России рак мочевого пузыря (РМП) занимает 8-е место среди мужчин и 18-е место среди женщин. Ежегодно в России регистрируется 11267 больных с впервые выявленным диагнозом РМП [3]. РМП занимает седьмое место в мире среди общего количества онкологических заболеваний [4] и четвертое среди общего количества злокачественных новообразований, диагностируемых у мужчин в Соединённых Штатах и европейских странах [5]. Опухоли мочевого пузыря преобладают среди новообразований мочевого тракта и составляют 70% от их числа. Около 80% пациентов относятся к возрастной группе 50-80 лет, а пик заболеваемости приходится на 7-е десятилетие жизни. Уровень смертности от этого заболевания во многих индустриально развитых странах составляет от 3% до 8,5% [6].

Лечение поверхностного РМП начинают с трансуретральной резекции (ТУР) мочевого пузыря (за исключением больных с тотальным поражением мочевого пузыря, им показана цистэктомия). В 40-80% случаев после ТУР в течение 6-12 месяцев развивается рецидив, а у 10-25% больных инвазивный рак. После ТУР мочевого пузыря пациентам рекомендуется проходить динамическое наблюдение, включающее ряд регулярных диагностических исследований, в том числе: цистоскопическое исследование с цитологическим анализом мочи, ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза в первые 2 года 1 раз в 3 месяца [7].

Генетические нарушения появляются уже на начальных стадиях развития опухоли и являются основными определяющими факторами малигнизации. Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) является цитогенетической технологией, которая используется для анализа хромосомных нарушений в исследуемых клетках. FISH использует флуоресцентные метки в исследовании ДНК, которые крепятся к центромерам хромосом или уникальным участкам для обнаружения клетки с числовыми, структурными нарушениями, показательными для злокачественного развития [8]. В настоящее время становится широко популярна FISH-методика с высокой чувствительностью и специфичностью для обнаружения РМП, использующая четыре флуоресцентные метки, выявляющие цитогенетические транслокации в хромосомах 17, 3 и 7 и локус-специфический ген 9p21 – ген из семейства опухолевых супрессоров, в 9-й хромосоме [9, 10, 11].

В приказе Минздравсоцразвития РФ от 07.12.2004 г. № 303 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным злокачественным новообразованием мочевого пузыря» не упоминается о цитогенетическом исследовании клеток эпителия мочевого пузыря. Ввиду роста популярности данной методики как в Российской Федерации, так и в мировой практике возникает вопрос о целе-



сообразности включения её в стандарт диагностики РМП, в частности для лиц пожилого и старческого возраста.

Цель данного исследования заключалась в определении целесообразности включения методики флуоресцентной *in situ* гибридизации в стандартный алгоритм диагностики рецидива рака мочевого пузыря после ТУР мочевого пузыря применительно к лицам пожилого и старческого возраста.

Материалы и методы. Проведено обследование 103 человек, проходящих диспансерное наблюдение по поводу поверхностного рака мочевого пузыря после ТУР. Обследуемые лица по результатам наблюдения в течение 12 месяцев после ТУР мочевого пузыря были разделены на 3 группы: 1 группа – пациенты в возрасте от 35 до 59 лет (средний возраст), 31 человек; 2 группа – 60-74 года (пожилой возраст), 37 человек; 3 группа – 75-86 лет (старческий возраст), 35 человек. Всем пациентам в течение 12 месяцев после ТУР мочевого пузыря каждые 3 месяца было проведено однотипное обследование, включающее цистоскопию с последующей гистологией и FISH-методикой.

Методика FISH осуществлялась на реагентах компании АВБОТТ (США). Набор UroVysion™ Multi-color FISH Probe Mixture включал флуоресцентные ДНК-зонды для определения анеуплоидии хромосом 3, 7 и 17 и утраты локуса 9p21 в образцах мочи больных раком мочевого пузыря (СЕР 3 SpectrumRed™, СЕР 7 SpectrumGreen, СЕР 17 SpectrumAqua, LSI 9p21 (p16) SpectrumGold™). Производился забор утренней мочи (первая, около 7 ч. 30 мин.) в стеклянную емкость (объем 50 мл). После сбора 33 мл мочи добавляли в пробирку, содержащую 17 мл CarboWax, и перемешивали, переворачивая пробирку. Хранились образцы при t 40С, пока продолжался процесс подготовки. Далее из полученной смеси выделяли клеточную суспензию путем центрифугирования при 1000 об./мин. (600 g) согласно протоколу. Для приготовления препаратов использовали стекла с 3 лунками, количество клеточной суспензии от 10-30 мкл в зависимости от осадка, хранение препаратов -200С; предварительная обработка препаратов – согласно лабораторному протоколу для прямомеченных зондов; денатурация и гибридизация – прибор «Thermobrite» (Abbott Molecular, США); постгибридизационная обработка – по протоколу. Анализ готовых препаратов производился на микроскопе ZEISS AXIO Imager.M2, Германия, с использованием световых фильтров компании АВБОТТ Vysis®, США: SpectrumRed, SpectrumGreen, SpectrumAqua, SpectrumGold. Препараты анализировались сканирующим методом. Критерии отбора морфологически аномальных (предположительно злокачественных) клеток: большой размер ядра; неправильная форма ядра; «пятнистость» DAPI окраски. Клеточные кластеры: клетки в кластере при наложении клеток друг на друга не учитывались. Результат считался FISH-положительным, если в 4 из 25 аномальных клеток обнаруживалось увеличение количества сигналов по 2 и более хромосомам (3, 7 или 17) в одной и той же клетке, или более чем в 12 из 25 аномальных клетках отсутствует сигнал 9p21. Если это условие не соблюдалось, то препарат анализировали до тех пор, пока не было обнаружено 4 клетки с увеличенным количеством сигналов по 3,7 и 17 хромосомам или 12 клеток с отсутствием сигнала 9p21.

Результаты. Согласно гистологическому исследованию из общей группы (103 человека) выявлен рецидив заболевания у 17 пациентов, однако результаты методики FISH оказались выше, согласно её результатам рецидив возможен у 34 человек. Общее количество рецидивов во всей выборке (103 человека) на срок 12 месяцев после ТУР мочевого пузыря соответствует данным отечественной и зарубежной литературы. При ретроспективном анализе через 12 месяцев после начала исследования выявлено 15 пациентов, у которых диагноз рецидива рака мочевого пузыря подтверждён гистологически и методикой FISH, при этом средний срок обнаруженного рецидива составил 9,6 месяцев при проведении гистологического исследования и 8,5 при проведении FISH-диагностики. Таким образом, FISH-диагностика позволила обнаружить рецидив РМП на 1 месяц раньше ($p < 0,05$).

Данные исследования, проведенного в трех группах, представлены в таблице. В первой группе FISH-диагностика позволила обнаружить рецидив в среднем через 8,6 месяца, в то время как при проведении стандартного гистологического метода исследования этот временной период составил 9,6 мес. Во второй группе были определены следующие сроки возникновения рецидива: 7,9 и 9,4 мес. при проведении FISH-диагностики и стандартного гистологического исследования, соответственно. В третьей группе рецидив был обнаружен через 8,5 мес. (данные FISH-диагностики) и 9,6 мес. (результаты гистологического исследования).

В первой группе (пациенты среднего возраста) выявлено наименьшее количество пациентов с рецидивами.

Во второй группе (пожилой возраст) максимальная разница в сроках обнаружения рецидива при проведении данных методик составила 1,45 месяца ($p < 0,05$). Проведение FISH-диагностики рецидива РМП было наиболее оправдано именно у лиц пожилого возраста.



Поскольку высокий риск возникновения рецидива РМП сохраняется на протяжении второго года, мы сочли целесообразным продолжать данное исследование, о результатах которого мы доложим позже.

Таблица

Результаты обследования пациентов, перенесших трансуретральную резекцию мочевого пузыря

Метод исследования	Сроки после ТУР мочевого пузыря, мес.				Всего	Средний срок возникновения рецидива, мес.
	3	6	9	12		
Группа 1. 35-59 лет, n=31						
FISH (+)	1	2	2	3	8	8,6±0,5
FISH (-)					23	
Гистологическое исследование (+)	0	1	2	2	5	9,6±0,75
Гистологическое исследование (-)	0	0	0	0	26	
Группа 2. 60-74 лет, n=37						
FISH (+)	2	4	5	3	14	7,9±1
FISH (-)					23	
Гистологическое исследование (+)	0	2	3	3	8	9,4±1
Гистологическое исследование (-)					29	
Группа 3. 75-86 лет, n=35						
FISH (+)	1	2	5	4	12	8,5±1,5
FISH (-)					23	
Гистологическое исследование (+)	0	1	1	2	4	9,6±0,5
Гистологическое исследование (-)					31	

Примечание: FISH (+) – количество пациентов, у которых по результатам FISH методики выявлен положительный результат; FISH (-) - количество пациентов, у которых по результатам FISH методики выявлен отрицательный результат; гистологическое исследование (+) – количество пациентов, у которых по результатам гистологического исследования выявлен рецидив рака мочевого пузыря; гистологическое исследование (-) – количество пациентов, у которых по результатам гистологического исследования не выявлен рецидив рака мочевого пузыря.

Заключение. Внедрение молекулярно-цитогенетических методов в урологическую практику будет способствовать ранней диагностике рака мочевого пузыря, окажет существенную помощь при мониторинге заболевания, значительно повысит эффективность выявления рецидивов РМП, особенно у лиц пожилого возраста. Использование молекулярно-цитогенетических маркеров позволяет расширить общепринятую систему клинико-морфологических маркеров прогноза течения поверхностного рака мочевого пузыря.

Литература

1. World population prospects. The 2000 revision. – New York : United Nations, Department of Economic and Social Affairs, 2001. – 13 p.
2. Millions walk as WHO launches a global movement for active ageing World Health Organization. – Geneva : World Health Organization, Office of Press and Public Relations, 1999. – 3 p.
3. Чиссов, В.И. Злокачественные новообразования в России в 2006 году (заболеваемость и смертность) / В.И. Чиссов, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – М. : МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий, 2008. – 248 с.



4. In World Health Organization Classification of Tumors, Volume 7 (Third Edition) IARC Press / J.N. Eble, G. Sauter, J.I. Epstein, I.A. Sesterhenn // Pathology and genetics of tumors of the urinary system and male genital organs. – 2004. – P. 90-157.
5. IARC Cancer Base no. 5. IARC Press / J. Ferlay, F. Bray, P. Pisani, D.M. Parkin. – GLOBOCAN, 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 2.0.
6. Чиссов, В.И. Злокачественные новообразования в России: статистика, научные достижения, проблемы / В.И. Чиссов, Б.Н. Ковалев и др. // Казан. мед. журн. – 2000. – Т. 81, №4. – С. 241-248.
7. Чиссов, В.И. Клинические рекомендации. Онкология. 2-е издание / В.И. Чиссов, С.Л. Дарьялова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 925 с.
8. Julia, A. Cushman-Vokoun (2011) Molecular Diagnostics of Soft Tissue Tumors / A. Julia, Bridge and M. Allison // Archives of Pathology & Laboratory Medicine. – 2011. – May. – Vol. 135, № 5. – P. 588-601.
9. Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer / M.F. Sarosdy, P. Schellhammer, G. Bokinsky, P. Kahn, R. Chao, L. Yore, J. Zadra, D. Burzon, G. Osher, J.A. Bridge, S. Anderson, S.L. Johansson, M. Lieber, M. Soloway, K. Flom // J. Urol. – 2002. – V. 168, № 5. – P. 1950-1954.
10. Halling, K.C. Bladder cancer detection using FISH (UroVysion assay) / K.C. Halling, B.R. Kipp // Adv. Anat. Pathol. – 2008. – Sep. – Vol. 15(5). – P. 279-286.
11. Quantitative fluorescence in situ hybridization and its ability to predict bladder cancer recurrence and progression to muscle-invasive bladder cancer / B.R. Kipp, M. Tanasescu, T.A. Else, S.C. Bryant, R.J. Karnes, T.J. Sebo, K.C. Halling // J. Mol. Diagn. – 2009. – Mar. – Vol. 11(2). – P. 148-154.

FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION IN EARLY DIAGNOSTICS OF RELAPSE OF A BLADDER CANCER IN THE FIRST 12 MONTHS AFTER A TRANSURETHRAL RESECTION OF A BLADDER AT OLD AND ELDERLY PEOPLE

**G. A. RYZHAK
A.S. PUSHKIN**

*St. Petersburg institute
of bioregulation and gerontology
of northwest branch of the Russian
academy of medical sciences*

e-mail: pushkindoc@mail.ru

The article presents the results of application experience of a fluorescent technique in situ hybridization (FISH) in early diagnostics of relapses of a superficial bladder cancer at 103 middle, old and elderly people who have transurethral resection of the bladder (TURB).

Key words: a bladder cancer, fluorescence in situ hybridization, transurethral resection of the bladder, old and elderly people