

Для цитирования: Зуков Р.А., Слепов Е.В., Семёнов Э.В., Куртасова Л.М. Фенотипические особенности клеток осадка мочи больных неинвазивным раком мочевого пузыря. Сибирский онкологический журнал. 2017; 16 (3): 52–56. DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-3-52-56.

For citation: Zukov R.A., Slepov E.V., Semonov E.V., Kurtasova L.M. Phenotypic features of cells of urine sediment of patients with non-invasive bladder cancer. Siberian Journal of Oncology. 2017; 16 (3): 52–56. DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-3-52-56.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОК ОСАДКА МОЧИ БОЛЬНЫХ НЕИНВАЗИВНЫМ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Р.А. Зуков^{1,2}, Е.В. Слепов^{1,3}, Э.В. Семёнов^{1,2}, Л.М. Куртасова²

КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского», г. Красноярск¹

660133, г. Красноярск, ул. 1-ая Смоленская, 16. E-mail: zukov_rus@mail.ru¹

ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, г. Красноярск²

660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1²

ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск³

660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79³

Аннотация

В мире ежегодно диагностируется более 430 тыс. новых случаев рака мочевого пузыря (РМП), при этом у 70–80 % больных выявляется неинвазивный рак. Для повышения эффективности раннего выявления рака мочевого пузыря необходимо использовать высокочувствительные методы диагностики, в основе которых лежит выявление различных онкомаркеров. В работе описано применение метода проточной цитометрии для определения поверхностных маркеров клеточного осадка мочи. Обнаружено повышение относительного содержания в клеточном осадке клеток, экспрессирующих поверхностный антиген CD13, у пациентов с неинвазивным раком мочевого пузыря по сравнению с показателями контрольной группы. В группе больных выявлено увеличение в осадке мочи в 4,8 раза клеток, экспрессирующих поверхностный антиген CD15, и в 4,9 раза клеток, экспрессирующих антиген CD45. В большинстве случаев при раке мочевого пузыря после комбинированного лечения отмечается рецидив опухолей. В связи с этим изучение зависимости уровня экспрессии поверхностных маркеров клеток осадка мочи от развития рецидива заболевания представляется актуальным. Отсутствие различий в количестве CD15⁺-клеток в осадке мочи у пациентов с развитием рецидива можно объяснить отсутствием разницы в пролиферативной активности рецидивирующих и нерецидивирующих опухолей. Большее количество CD13⁺-клеток в группе пациентов с развитием рецидива отражает глубину поражения органа. Эти данные важны, так как при более глубокой инвазии опухоли в подслизистый слой мочевого пузыря возникает большая вероятность нерадикального выполнения трансуретральной резекции и последующего развития рецидива заболевания. Таким образом, изучение содержания CD13⁺- и CD45⁺-клеток в осадке мочи дает важную информацию не только об инвазии опухоли в подслизистый слой, но и о вероятности возникновения рецидива рака мочевого пузыря.

Ключевые слова: неинвазивный рак мочевого пузыря, рецидив, клеточный осадок мочи, поверхностные антигены.

В мире ежегодно диагностируется более 430 тыс. новых случаев рака мочевого пузыря (РМП). В структуре общей онкологической заболеваемости РМП составляет 3,1 % всех неоплазий и занимает 9-е ранговое место. Мужчины более чем в 4 раза чаще страдают данным заболеванием, 59 % случаев РМП регистрируется в экономически развитых странах [3]. В России ежегодно регистрируется более 16 тыс. новых случаев, что составляет 2,7 % всех злокачественных опухолей [1]. На момент первичного обращения у 70–80 % больных опухоль

локализована в пределах слизистого (Ta, Tis) или подслизистого слоя (стадия T₁) [4].

Неинвазивный характер исследования клеток осадка мочи, непосредственный контакт данной биологической среды с пораженным уротелием делают этот тест весьма перспективным индикатором возникновения РМП. Считается, что цитологическое исследование мочи имеет высокую чувствительность при низкодифференцированных опухолях мочевого пузыря и низкую – при высокодифференцированных. Опубликовано большое

количество обзоров по изучению диагностической значимости молекулярных маркеров мочи. Некоторые тестовые системы – UroVysion, ImmunoCyt и др. – применяются в клинической практике, однако ни одна из них не признана стандартным диагностическим методом [3]. Учитывая приведенные данные, представляет интерес исследование клеток осадка мочи, экспрессирующих различные поверхностные антигены у больных неинвазивным РМП. Полученные данные могут представлять интерес в оценке особенностей биологического течения и диагностики заболевания.

Целью исследования явилось определение экспрессии поверхностных маркеров на клетках осадка мочи у больных неинвазивным РМП.

Материал и методы

В исследование было включено 85 пациентов с неинвазивным РМП (TaN_0M_0 , $TisN_0M_0$ или $T_1N_0M_0$), получавших лечение на базе КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского» (КККОД). Порцию мочи пациентов забирали до проведения им трансуретральной резекции (ТУР). Полученные образцы мочи центрифугировали при 2 000 об/мин в течение 20 мин для осаждения клеточных элементов. После этого супернатант сливали, к осадку добавляли 2 мл забуференного физиологического раствора (PBS), проводили ресуспендирование путем пипетирования на протяжении 1–2 мин и центрифугировали при 2 000 об/мин в течение 10 мин. Описанную процедуру отмывки клеточного осадка проводили дважды. Далее супернатант сливали, к осадку добавляли 0,5 мл PBS, проводили

ресуспендирование путем пипетирования в течение 1–2 мин. К полученной клеточной взвеси добавляли моноклональные антитела к CD13, меченные фикоэритрином (PE – максимум флуоресценции на 578 нм, производитель BD Biosciences, США) в объеме 20 мкл. Перемешивали на персональном вортексе в течение 20 сек. Добавляли моноклональные антитела к CD15, меченные аллофикоцианином (APC – максимум флуоресценции на 657,5 нм, производитель BD Biosciences, США) в объеме 20 мкл. Перемешивали на персональном вортексе в течение 20 сек. Далее добавляли моноклональные антитела к CD45, меченные флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ – максимум флуоресценции на 518 нм, производитель BD Biosciences, США) в объеме 20 мкл. Перемешивали на персональном вортексе в течение 20 сек и убирали в темное место. Инкубацию клеточной взвеси проводили при комнатной температуре на протяжении 15 мин. После инкубации проводили измерение флуоресценции на проточном цитофлуорометре BD FACS Canto II (BectonDickinson, США).

Для формирования группы контроля аналогичным способом были исследованы клетки осадка мочи группы здоровых доноров (n=47).

После проведения ТУР всем пациентам проводилась внутривульварная химиотерапия митомицином 40 мг внутривульварно, 1 раз в нед, в течение 6–8 нед. Наблюдение за пациентами после окончания комбинированного лечения осуществлялось в течение 3 лет. На основании динамического наблюдения больные РМП были разделены на 2 группы: 1-я группа – с рецидивом заболевания (n=46); 2-я группа – без рецидива (n=35).

Таблица 1

Клинико-морфологическая характеристика изучаемых групп

Показатель		1-я группа (n=46)	2-я группа (n=39)
Степень дифференцировки опухоли	G1	34,9 %	250 %
	G2	53,5 %	58,7 %
	G3	11,6 %	16,3 %
	1	61,7 %	67,5 %
Количество выявленных очагов опухоли	2	10,6 %	4,4 %
	3	4,3 %	4,4 %
	>3	23,4 %	23,7 %
	Задняя стенка	23,9 %	29,8 %
Локализация опухоли	Передняя стенка	–	1,8 %
	Боковая стенка	41,3 %	35,1 %
	Верхушка	–	0,9 %
	Шейка	4,3 %	2,6 %
	Дно	26,1 %	26,3 %
	Множественная	4,3 %	3,5 %
	<1 см	19,1 %	16,7 %
Размер опухоли	1,0–1,9 см	21,3 %	23,7 %
	2,0–2,9 см	21,3 %	31,6 %
	3,0–3,9 см	27,7 %	17,5 %
	≥4 см	10,6 %	10,5 %

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ «Statistica 7.0» (StatSoft, Inc., США). Данные представляли в виде Me (C25–C75) (где Me – медиана, C25 и C75 – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й перцентилей).

Результаты и обсуждение

Основные клинико-морфологические особенности РМП оценивались по следующим показателям: степень дифференцировки опухоли (G), количество выявленных очагов опухолевого роста, локализация новообразования в мочевом пузыре и линейный размер опухоли (табл. 1). Проведенный анализ клинических и патоморфологических характеристик уротелиальной карциномы не выявил статистически значимых различий по распределению частот между сравниваемыми группами больных РМП.

Анализ фенотипических особенностей клеток осадка мочи у пациентов с неинвазивным РМП выявил значимое повышение относительного содержания в осадке мочи клеток, экспрессирующих поверхностный антиген CD13, по сравнению с показателями контрольной группы (табл. 2). Кроме того, в группе больных с неинвазивным РМП обнаружено увеличение в осадке мочи в 4,8 раза ($p < 0,001$) клеток, экспрессирующих поверхностный антиген CD15, и в 4,9 раза ($p < 0,001$) клеток, экспрессирующих антиген CD45.

CD45 является общим лейкоцитарным антигеном. Содержание лейкоцитов в клеточном осадке мочи повышается при различных заболеваниях мочеполовой системы, в том числе и при злокачественных новообразованиях. Однако данный показатель характеризуется низкой специфичностью по отношению к заболеванию. По имеющимся данным литературы [2], CD13 экспрессируется на поверхности клеток подслизистого слоя мочевого пузыря. Кроме того, данный маркер фиксируется на поверхности клеток, развивающихся из эктодермального зародышевого листка – нервной ткани и лимфы. Превышение CD13⁺-клеток в группе пациентов с РМП по сравнению с относительно здоровыми донорами является свидетельством того, что в патологический процесс вовлечены не только клетки поверхностного эпителия. При этом на начальных этапах развития РМП в канце-

рогенез вовлекаются только поверхностные слои тканей органа. При распространении процесса на подслизистый слой часть клеток с определяемым поверхностным антигеном переносится в жидкую фазу и аккумулируется в клеточном осадке. Lewis-X-антиген, или CD15, является углеводной молекулой адгезии на поверхности активно делящихся клеток. Значительное содержание CD15⁺-клеток в осадке мочи свидетельствует о том, что патология сопровождается ростом пролиферативной активности клеток и нарушением межклеточного взаимодействия. Известно, что экспрессия генов, участвующих в синтезе данного рецептора, активизируется при РМП. Это также приводит к накоплению продукта данных генов.

Учитывая, что в большинстве случаев неинвазивного РМП отмечается рецидив опухолей после комбинированного лечения, значительный интерес представляет изучение зависимости уровня экспрессии поверхностных маркеров клеток осадка мочи от развития рецидива заболевания.

Результаты исследования установили повышение содержания в клеточном осадке мочи в 1-й группе больных РМП (с рецидивом заболевания), клеток, экспрессирующих поверхностный антиген CD13 ($p < 0,05$) и антиген CD45 ($p < 0,01$), относительно показателей, зарегистрированных во 2-й группе пациентов (без рецидива РМП). При этом количество клеток в осадке мочи, экспрессирующих поверхностный антиген CD15 в сравниваемых группах больных, не имело статистически значимых различий (табл. 3).

Отсутствие статистически значимых различий в количестве CD15⁺-клеток в осадке мочи у пациентов с развитием рецидива заболевания можно объяснить отсутствием принципиальной разницы в пролиферативной активности рецидивирующих и неретицидивирующих опухолей. Большее количество CD13⁺-клеток в группе пациентов с развитием рецидива РМП отражает глубину поражения органа. Очевидно, что при более глубокой инвазии опухоли в подслизистый слой мочевого пузыря возникает большая вероятность нерадикального выполнения ТУР и последующего рецидива.

Обращает на себя внимание интересная особенность в группе больных с рецидивом РМП: большее содержание лейкоцитов в моче относительно группы пациентов без рецидива заболе-

Таблица 2

Уровни экспрессии поверхностных антигенов на клетках осадка мочи

Показатель	Контрольная группа (n=47) Me (C25–C75)	Больные РМП (n=85) Me (C25–C75)	p
Количество CD13 ⁺ клеток	1,90 (1,10–2,80) %	3,70 (1,60–8,20) %	$p < 0,05$
Количество CD15 ⁺ клеток	1,30 (0,70–3,70) %	6,20 (2,80–14,1) %	$p < 0,001$
Количество CD45 ⁺ клеток	0,85 (0,30–4,00) %	4,20 (1,80–8,00) %	$p < 0,001$

Примечание: p – уровень статистических различий по сравнению с показателями контрольной группы.

Таблица 3

Уровни экспрессии поверхностных антигенов на клетках осадка мочи у больных неинвазивным раком мочевого пузыря

Показатель	1-й группа (n=46) Me (C25-C75)	2-й группа (n=39) Me (C25-C75)	p
Количество CD13 ⁺ клеток	4,10 (3,00–8,10) %	2,60 (1,70–4,30) %	p<0,05
Количество CD15 ⁺ клеток	5,40 (4,10–12,30) %	5,95 (2,40–13,30) %	p>0,05
Количество CD45 ⁺ клеток	6,10 (4,00–7,90) %	2,70 (1,90–6,00) %	p<0,01

Примечание: p – уровень статистических различий по сравнению с показателями контрольной группы.

вания. Можно предположить, что особенностью рецидивирующих опухолей является способность их ухода из-под иммунологического надзора.

Заключение

Отсутствие значимых различий клинико-морфологических параметров в группах пациентов с различным течением неинвазивного рака мочевого пузыря свидетельствует о том, что развитие рецидива заболевания опосредуется индивидуальными биологическими особенностями уротелиальной карциномы. Выявленные различия демонстрируют особенности развития уротелиальной карциномы на ранних этапах канцерогенеза. Повышение содержания CD13⁺-клеток в осадке мочи может отражать воздействие растущего злокачественного новообразования на ткани подслизистого слоя органа. Увеличение поверхностных молекул адгезии и косвенное подтверждение наличия интенсивных процессов, ассоциированных с клеточным делением за счет увеличения относи-

тельного содержания CD15⁺-клеток в осадке мочи, свидетельствует о злокачественном потенциале обнаруженных изменений. Данное наблюдение подтверждает и выявленное увеличение в клеточном осадке мочи доли клеток иммунной системы, экспрессирующих CD45.

Полученные данные позволяют предположить, что уже на начальных этапах развития уротелиальной карциномы изучение экспрессии поверхностных антигенов в клеточном осадке мочи может помочь в оценке степени опухолевой инвазии в стенку мочевого пузыря. Кроме того, анализ содержания CD13⁺- и CD45⁺-клеток в осадке мочи предоставляет важную информацию не только об инвазии опухоли в подслизистый слой, но и о вероятности возникновения ее рецидива. Это позволит оптимизировать тактику ведения больных неинвазивным РМП при динамическом наблюдении после хирургического или комбинированного лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России (заболеваемость и смертность). М. 2017; 250.
2. Alvin Y.L., Ricardo Z.N.V., Laura S.P. Bladder expression of CD cell surface antigens and cell-type-specific transcriptomes. *Cell Tissue Res.* 2012; 348 (3): 589–600. doi: 10.1007/s00441-012-1383-y.
3. Babjuk M., Oosterlinck W., Sylvester R., Kaasinen E., Böhle A., Palou-Redorta J., Rouprêt M.; *European Association of Urology*

(EAU). EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol.* 2011 Jun; 59 (6): 997–1008. doi: 10.1016/j.eururo.2011.03.017.

4. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [Internet]. 2014; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.

Поступила 15.03.17

Принята в печать 15.05.17

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Зуков Руслан Александрович, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой онкологии и лучевой терапии с курсом ПО, Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск, Россия). E-mail: zukov_rus@mail.ru. SPIN-код: 3632-8415.

Слепов Евгений Владимирович, кандидат биологических наук, заведующий отделением прогностических и молекулярных методов, Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского (г. Красноярск, Россия). E-mail: slepov99@mail.ru. SPIN-код 2097-0304.

Семёнов Эдуард Васильевич, аспирант кафедры онкологии и лучевой терапии с курсом ПО, Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск, Россия). E-mail: Semenov_KrasGMU@mail.ru. SPIN-код: 5021-3613.

Куртасова Людмила Михайловна, доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии, Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск, Россия). E-mail: sibmed_obozrenie@yandex.ru. SPIN-код: 3240-0401.

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о котором необходимо сообщить

PHENOTYPIC FEATURES OF CELLS IN URINARY SEDIMENT OF PATIENTS WITH NON-INVASIVE BLADDER CANCER

R.A. Zukov^{1,2}, E.V. Slepov^{1,3}, E.V. Semonov^{1,2}, L.M. Kurtasova²

Krasnoyarsk Regional Clinical Oncology Center named after A.I. Kryzhanovsky, Krasnoyarsk, Russia¹
16, 1-st Smolenskaya str., 660133-Krasnoyarsk, Russia¹

E-mail: zukov_rus@mail.ru¹

Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia²
1, Partizana Zheleznyak str., 660022-Krasnoyarsk, Russia²

Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia³
79, Svobodny Avenue, 660041-Krasnoyarsk, Russia³

Abstract

More than 430,000 new cases of bladder cancer are diagnosed every year in the world, and approximately 70–80 % of patients present with non-invasive disease. To improve the effectiveness of early detection of bladder cancer, high sensitivity diagnostic tools should be used. In our study we used flow cytometry to determine surface markers in urinary sediment cells of patients with bladder cancer. The analysis of the phenotypic features of urinary sediment cells showed an increase in the relative content of CD13⁺ cells in patients with non-invasive bladder cancer in comparison with the control group. In addition, there was a 4.8-fold increase in cells expressing CD15 surface antigen ($p < 0.001$) and 4.9-fold increase in cells expressing CD45 surface antigen ($p < 0.001$). Considering the fact, that most patients with bladder cancer develop recurrence after treatment, we studied the relationship between the expression level of surface markers of urinary sediment cells and the development of disease recurrence. The absence of differences in the level of CD15⁺ cells in urinary sediment of patients with recurrent bladder cancer can be explained by the absence of differences in proliferative activity of recurrent and non-recurrent tumors. The higher level of CD13⁺ cells in patients with recurrent bladder cancer indicates greater depth of tumor invasion. It is obvious that the deeper the tumor invasion into the submucosal layer of the bladder, the greater the likelihood of non-radical transurethral resection and the development of disease recurrence. Thus, the analysis of the level of CD13⁺ and CD45⁺ cells in the urinary sediment can provide information on tumor invasion into the bladder submucosal layer and the risk of bladder cancer recurrence.

Key words: non-invasive bladder cancer, recurrence, urinary sediment, surface antigens.

REFERENCES

1. Kaprin A.D., Starinski V.V., Petrova G.V. Malignant neoplasms in Russia (incidence and mortality). M.: FGBU «MNIIOI im. P.A. Gercena» Ministry of Health of the Russian Federation. 2017; 250. [in Russian]
2. Alvin Y.L., Ricardo Z.N.V., Laura S.P. Bladder expression of CD cell surface antigens and cell-type-specific transcriptomes. *Cell Tissue Res.* 2012; 348(3): 589–600.
3. Babjuk M., Oosterlinck W., Sylvester R., Kaasinen E., Böhle A., Palou-Redorta J., Rouprêt M.; *European Association of Urology*

(EAU). EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol.* 2011 Jun; 59(6): 997–1008. doi: 10.1016/j.eururo.2011.03.017.

4. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [Internet]. 2014; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.

Received 15.03.17
Accepted 15.05.17

ABOUT THE AUTHORS

Zukov Ruslan A., MD, PhD, DSc, Head of the Department of Oncology and Radiation Therapy, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky (Krasnoyarsk, Russia). E-mail: zukov.ra@krasgmu.ru. SPIN-code: 3632-8415.

Slepov Evgeny V., PhD, Head of the Department of Molecular and Prognostic methods, Krasnoyarsk Regional Clinical Oncology Center named after A.I. Kryzhanovsky (Krasnoyarsk, Russia). E-mail: Slepov99@mail.ru. SPIN-code: 2097-0304.

Semonov Eduard V., MD, Physician, Oncologist, Krasnoyarsk Regional Clinical Oncology Center named after A.I. Kryzhanovsky (Krasnoyarsk, Russia). E-mail: Semonov_KrasGMU@mail.ru. SPIN-code: 5021-3613.

Kurtasova Ludmila M., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Clinical Immunology, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky (Krasnoyarsk, Russia). E-mail: sibmed_obozrenie@yandex.ru. SPIN-code: 3240-0401.

Authors declare lack of the possible conflicts of interests