

Гистоспектрофотометрическое и иммуногистохимическое исследование ренальной интратубулярной неоплазии в перитуморозной зоне рака почки

Т.М. Черданцева, И.П. Бобров, В.В. Климачев, В.М. Брюханов,
А.Ф. Лазарев, А.М. Авдальян, В.Я. Гервальд, Е.И. Сеченев
Алтайский ГМУ, Алтайский филиал ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Барнаул

Контакты: Татьяна Михайловна Черданцева drakon@agtu.ru

В работе изучены проявления ренальной интратубулярной неоплазии (РИН) в перитуморозной зоне (ПЗ) рака почки. Материалом для исследования послужил операционный материал от 42 больных. Средний возраст пациентов составил $57,4 \pm 1,4$ года. Мужчин было 25, женщин — 17. С помощью гистологического, гистоспектрофотометрического и иммуногистохимического методов была исследована морфо-функциональная характеристика эпителия канальцев в ПЗ рака почки. Показано, что в ПЗ опухолей высокой степени злокачественности проявления РИН встречались значительно чаще, чем при опухолях низких степеней анаплазии. В опухолях высокой степени анаплазии в эпителии канальцев ПЗ отмечали увеличение ядер, плоидности и экспрессии AgNORs, Ki-67, p53 и bcl-2. Наличие проявлений РИН в канальцевом эпителии ПЗ при раке почки следует учитывать при органосохраняющих операциях.

Ключевые слова: рак почки, перитуморозная зона, ренальная интратубулярная неоплазия

Histospectrophotometrical and immunohistochemical research of renal intratubular neoplasia in peritumorous zone of a renal carcinoma

T.M. Cherdantseva, I.P. Bobrov, V.V. Klimachev, V.M. Brjuchanov, A.F. Lazarev, A.M. Avdalyan, V.Ya. Gervald, E.I. Sechenov
The Altay state of medical university;

The Altay branch GU «The Russian oncological centre of N.N. Blohina» of the Russian Academy of Medical Science, Barnaul

In this work displays renal intratubular neoplasia (RIN) in peritumorous zone of a renal carcinoma have been studied. The object of our work, are the operative materials of 42 patients. Middle age of patients has made $57,4 \pm 1,4$ year. Men was 25, women — 17. Characteristic of tubular epithelium in PZ a renal carcinoma have been studied morphofunctional by means of histological, histospectrophotometrical and immunohistochemical methods. It is shown, that in PZ tumors of a high degree displays, of RIN much more often, than in tumors of low degree anaplasia. In tumors of a high degree anaplasia in tubular epithelium PZ registered increasing of nucleus, ploidy and expression of AgNORs, Ki-67, p53 and bcl-2. The presence of displays RIN in tubular epithelium PZ at a renal carcinoma should be considered at surgery operations.

Key words: renal carcinoma, peritumorous zone, renal intratubular neoplasia

Введение

Проблема предраковых изменений относительно почечно-клеточного рака (ПКР) остается малоизученной [1]. Одним из первых сообщений о наличии морфологических изменений в тубулярном эпителии в виде гиперплазии извитых канальцев и их отношение к ПКР принадлежит А. Prinke (1936). Данные изменения автор рассматривал как компенсаторные по периферии рубца. Использование термина «дисплазия эпителия канальцев» принадлежит R. Warter (1983). В 1994 г. W. Mourad и соавт. [2] впервые описали зоны интратубулярной эпителиальной дисплазии в перитуморозной зоне (ПЗ) при ПКР, преимущественно в корковом слое, которые выявлялись более чем в 25 % случаев. В последующей работе они выявили такие зоны уже в 54 % случаев. К. Yorcoglu и соавт. [3] описали подобные изменения у 14 (23 %) из 62 больных ПКР, причем в 3 (5 %) случаях в виде карциномы *in situ*. Зоны пролиферации и дисплазии эпителия сосочковых

протоков, связанные с развитием рака собирательных протоков, впервые были описали S. Fleming и H. Lewi (1986), а также S. Kinnedy и соавт. [4].

В 2000 г. группой европейских патологов для обозначения указанных изменений был предложен термин «ренальная интратубулярная неоплазия» (РИН). Последняя обычно представлена в виде зон, расположенных недалеко от опухолевого узла и нередко ассоциирующихся с явлениями нефросклероза. Эпителиальные клетки в таких зонах варьируют в размере, и их ядра увеличены [5].

В литературе имеется небольшое количество работ, посвященных гистоспектрофотометрическому и иммуногистохимическому (ИГХ) исследованию РИН. Так, было показано, что положительная корреляционная связь между показателями экспрессии PCNA, K-ras и c-erb-B-2 в опухолевой ткани и очагах РИН служит веским аргументом в пользу предракового характера РИН [6].

Цель исследования — гистоспектрофотометрическое и ИГХ-исследование эпителия канальцев в ПЗ рака почки.

Материалы и методы

Изучен операционный материал 42 больных ПКР. Средний возраст пациентов составил $57,4 \pm 1,4$ года. Мужчин было 25 (59,5%), женщин — 17 (40,5%). По гистологическому строению опухоли были представлены следующим образом: светлоклеточный рак — 28 случаев; зернистоклеточный рак — 8; папиллярный рак — 5 и саркоматоидный рак — 1.

При группировке опухолей по клиническим стадиям (I–IV) было выделено: I стадии (T1N0M0) соответствовали 22 (52,4%) наблюдения; II стадии (T2N0M0) — 1 (2,4%) наблюдение; III стадии (T1N1M0, T2N1M0, T3N0M0, T3N1M0) — 8 (19%) и IV стадии (T4N0M0, T4N1M0, T_(любая)N2M1, T_(любая)N_(любая)M1) — 11 (26,2%) наблюдений. Степень злокачественности оценивали по классификации S.A. Fuhrman и соавт. (1982) [7]. В изученном материале было 2 (4,8%) опухоли степени анаплазии G₁; 11 (26,2%) опухолей степени анаплазии G₂; 22 (52,4%) — степени анаплазии G₃ и 7 (16,7%) — степени G₄.

Материал забирали из центра опухоли, ПЗ (за ПЗ принимали непосредственно прилежащую в псевдокапсуле опухолевую ткань, псевдокапсулу и ткань, расположенную за псевдокапсулой до неизменной ткани почки) и неизменной ткани почки, из максимально отдаленных от опухоли участков. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином, на коллаген по ван Гизону и на эластические волокна резорцин-фуксином по Вейгерту.

В процессе исследования больные были разделены на 2 группы. В 1-ю группу вошли пациенты с диплоидными, триплоидными (в среднем 3,4 с) опухолями небольшого размера (≤ 7 см), степени злокачественности G_{1–2}, с низкими значениями AgNORs (≤ 5 AgNORs) и отсутствием метастазов. Во 2-ю группу были включены больные с полиплоидными и анеуплоидными (в среднем 5,6 с) опухолями большого размера (> 7 см), степенями злокачественности G_{3–4}, с высокими значениями AgNORs (> 5 AgNORs) и наличием метастазов.

Активность аргирофильных белков, ассоциированных с областью ядрышкового организатора (AgNOR) выявляли с помощью 2-ступенчатого метода по Y. Daskal и соавт. [8] в нашей модификации [9].

Морфометрическое и гистоспектрофотометрическое исследования проводили с использованием системы компьютерного анализа изображений, состоящей из микроскопа Leica DME, цифровой камеры Leica EC3 (Leica Microsystems AG, Германия), персонального компьютера и программного обеспечения ВидеоТест — Морфология 5.2. Пloidометрию ДНК

проводили на гистологических срезах, окрашенных по Фельгену. Среднее содержание ДНК в ядрах малых лимфоцитов принимали за диплоидное (2 с) и использовали в качестве стандарта. Для получения стандарта в каждом срезе оценивали 25–30 лимфоцитов. Затем в исследуемых клетках высчитывали индекс накопления ДНК (ИН ДНК) в единицах плоидности (с).

Уровень экспрессии молекулярно-биологических маркеров p53 (клон DO-7, DAKO), Bcl-2 (клон 124, DAKO), CD31 (клон JC70A, DAKO) и Ki-67 (клон MIB-1, DAKO) определяли при помощи ИГХ-метода по рекомендованным производителями протоколам.

Интенсивность ИГХ-окрашивания p53 оценивали как негативную (нет окрашивания), слабopоложительную ($< 5\%$ окрашенных клеток), умеренно положительную ($> 5\%$ средней интенсивности окраски) и сильноположительную ($> 5\%$ высокой интенсивности окраски).

При оценке ИГХ-окрашивания bcl-2 использовали полуколичественный метод: 0 баллов — отсутствие окрашивания; + (1 балл) — более 20% клеток со слабой интенсивностью окрашивания цитоплазмы; ++ (2 балла) — умеренное окрашивание цитоплазмы; +++ (3 балла) — интенсивное окрашивание цитоплазмы; ++++ (4 балла) — интенсивное окрашивание цитоплазмы более чем 80% клеток. В тех случаях, когда интенсивность окрашивания варьировала, например от + (1 балл) до ++ (2 балла), получали среднее — 1,5 балла. Когда выявляли равномерное окрашивание цитоплазмы всех клеток, цифра, характеризующая интенсивность окрашивания, была круглой: + (1), ++ (2), +++ (3) или ++++ (4 балла).

Пролиферативную активность (ПА) эпителия определяли путем выявления в ядрах клеток антигена Ki-67. Подсчет проводили на 1000 клеток на цифровых микрофотографиях с помощью морфометрической программы Image Tool 3.0, с последующим выражением результата в процентах. Индекс мечения (ИМ) маркера менее 5,0% считали проявлением низкой, а 5,0% и более — высокой ПА.

Подсчет микрососудов проводили, оценивая положительно окрашенный эндотелий к CD31. Плотность микроциркуляторного русла (ПМЦР) высчитывали при увеличении $\times 400$ в 6 полях зрения (что составляло в абсолютных размерах площади 0,73 мм²).

Статистическую обработку материала проводили при помощи статистического пакета Statistica 6.0. При нормальном распределении данных при проверке статистических гипотез применяли методы параметрической статистики (t-test Стьюдента), а если полученные данные не соответствовали критериям нормального распределения (критерий Шапиро–Уилка $W = 0,89$, $p < 0,01$), применяли тест Колмогорова–Смирнова или U-тест Манна–Уитни. Данные считали достоверными при $p < 0,05$.

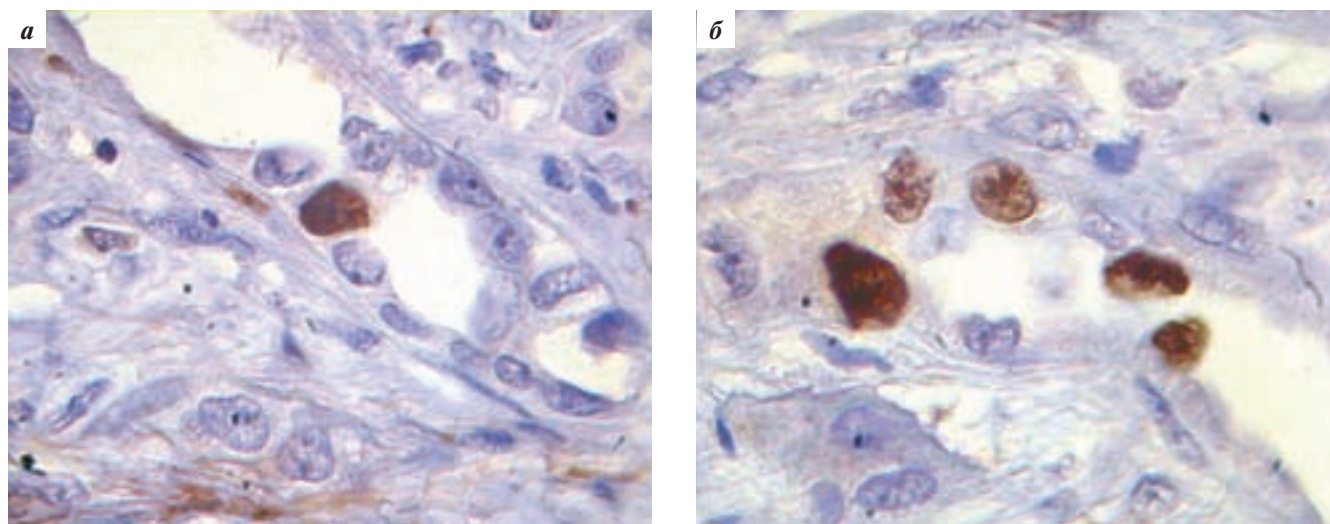


Рис. 1. ИМ Ki-67 в эпителии канальцев в ПЗ в группах исследования: а — низкий ИМ Ki-67 в эпителии канальцев в ПЗ в 1-й группе исследования; б — высокий ИМ Ki-67 эпителиа канальцев в ПЗ во 2-й группе исследования. ИГХ-окрашивание; $\times 1000$

Результаты

Результаты проведенного исследования показали, что гистологическое строение, ПМЦР, активность пролиферативных процессов и апоптоза в ПЗ в группах исследования зависели прежде всего от молекулярно-биологических и анатомических особенностей опухолей (табл. 1).

В ПЗ 1-й группы больных элементы канальцевого эпителия встречались в небольшом количестве. Они мало отличались от канальцев неизмененного эпителия почки. Число AgNORs составило $2,25 \pm 0,2$ на 1 ядро эпителия канальцев (табл. 2). Площадь ядра клеток в среднем составила $37,9 \pm 2,0$ мкм². ИН ДНК составил $3,9 \pm 0,2$ с.

В ПЗ 2-й группы больных элементы канальцевого аппарата почки отмечали в большем количестве. Канальцы выглядели замурованными в плотной склерозированной и гиалинизированной соединительной ткани, с выраженным эластозом и содержали неболь-

шое число клеточных элементов. Клетки нефротелиа имели признаки атипизма: полиморфизм, гиперхромия ядра и увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения. Число AgNORs в клетках нефротелиа достигало $5,15 \pm 0,35$ на 1 ядро (см. табл. 2). Средняя площадь ядра составила $54,2 \pm 5,3$ мкм². ИН ДНК был равен $5,5 \pm 0,2$ с.

При ИГХ-исследовании в неизмененной ткани почки, взятой из максимально удаленных от опухоли участков, в канальцевом эпителии ИМ маркера пролиферации Ki-67 колебался от 0 до 8 % (в среднем $1,6 \pm 0,6$ %). При этом в неизмененном эпителии почки больных 1-й группы ИМ Ki-67 составил $1,0 \pm 0,4$ %, а во 2-й группе возрастал до $2,9 \pm 1,1$ %. ИМ Ki-67 в эпителии канальцев в ПЗ 1-й группы варьировал в пределах от 0 до 3 % и в среднем составил $1,8 \pm 0,5$ %, а во 2-й группе возрастал до $3,5 \pm 0,9$ %, пределы колебаний составили от 0 до 8 % (рис. 1а, б).

Таблица 1. Биологические и клинко-анатомические параметры опухолей в группах исследования ($M \pm t$)

Параметр опухолей	Значение параметра	
	1-я группа	2-я группа
ИН ДНК, с	$3,4 \pm 0,1^*$	$5,6 \pm 0,2^*$
Количество AgNORs на 1 ядро	$5,3 \pm 0,2^*$	$14,4 \pm 0,5^*$
Размер опухолевого узла, см	≤ 7	> 7
Степень анаплазии по Fuhrman (G)	I, II	III, IV
Наличие метастазов	N–	N+

* $p < 0,05$.

Таблица 2. Гистоспектрофотометрические параметры элементов ПЗ в группах исследования ($M \pm t$)

Параметр эпителия канальцев	Значение параметра	
	1-я группа	2-я группа
Площадь ядра эпителия канальцев, мкм ²	$37,9 \pm 2,0^*$	$54,2 \pm 5,3^*$
Количество AgNORs в эпителии канальцев	$2,25 \pm 0,2^*$	$5,15 \pm 0,35^*$
ИН ДНК, с	$3,9 \pm 0,2^*$	$5,5 \pm 0,2^*$
ПМЦР	$23,4 \pm 1,7^*$	$43,5 \pm 2,4^*$

* $p < 0,05$.

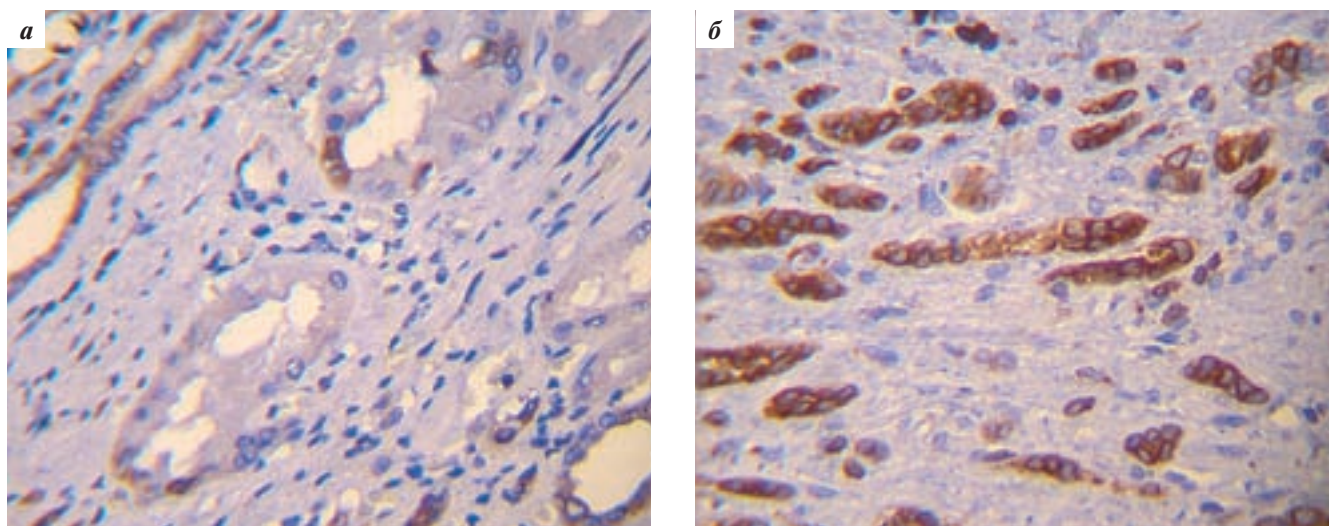


Рис. 2. Иммуноокрашивание *bcl-2* в эпителии канальцев в ПЗ в группах исследования: а — отрицательное и слабое иммуноокрашивание на *bcl-2* эпителиа канальцев в ПЗ в 1-й группе исследования; б — умеренное и интенсивное иммуноокрашивание на *bcl-2* эпителиа канальцев в ПЗ во 2-й группе исследования. ИГХ-окрашивание; $\times 400$

При исследовании экспрессии белка-супрессора апоптоза *bcl-2* в неизменной ткани почки иммуноокрашивание маркера обнаруживали во всех случаях и ее интенсивность в среднем составила $1,8 \pm 0,1$ балла. Результаты иммуноокрашивания *bcl-2* в цитоплазме клеток эпителиа канальцев в ПЗ в 1-й группе больных либо отрицательные (0 баллов), либо имеют слабую окраску (1 балл). В ПЗ 2-й группы экспрессия маркера в эпителии во всех случаях была интенсивной (3 и 4 балла) (табл. 3, рис. 2а, б).

При исследовании экспрессии гена-активатора апоптоза *p53* в неизменной ткани почки иммуноокрашивание маркера обнаруживали *p53* во всех случаях, слабopоложительное окрашивание отмечали в 86,9 %

случаев, умеренно положительное в 13,1 % случаев. Иммуноокрашивание ядер клеток эпителиа канальцев в ПЗ на *p53* в 1-й группе пациентов в 9,1 % случаев было отрицательным, в 72,7 % слабopоложительным, в 9,1 % — умеренно положительным и в 9,1 % — сильноположительным. Во 2-й группе исследования отрицательной реакции не отмечено, слабopоложительное окрашивание отмечали в 27,2 % случаев, умеренно положительное — в 36,4 % и сильноположительное — в 36,4 % (рис. 3а, б).

По данным ИГХ-анализа по выявлению маркера CD31 в неизменной ткани почки, взятой из максимально удаленных от опухоли участков, число микрососудов колебалась от 12 до 104 (в среднем $47,8 \pm 1,3$).

Таблица 3. ИГХ-параметры пролиферации и апоптоза эпителиа канальцев ПЗ в группах исследования

Интенсивность экспрессии маркера	Группы пациентов	
	1-я	2-я
BCL-2, баллы	0,6	3,8
<i>p53</i> , %:		
негативное окрашивание	9,1	0
слабopоложительное окрашивание	72,7	27,2
умеренно положительное окрашивание	9,1	36,4
сильноположительное окрашивание	9,1	36,4
ИМ Ki-67	$1,8 \pm 0,5^*$	$3,5 \pm 0,9^*$

* $p < 0,05$.

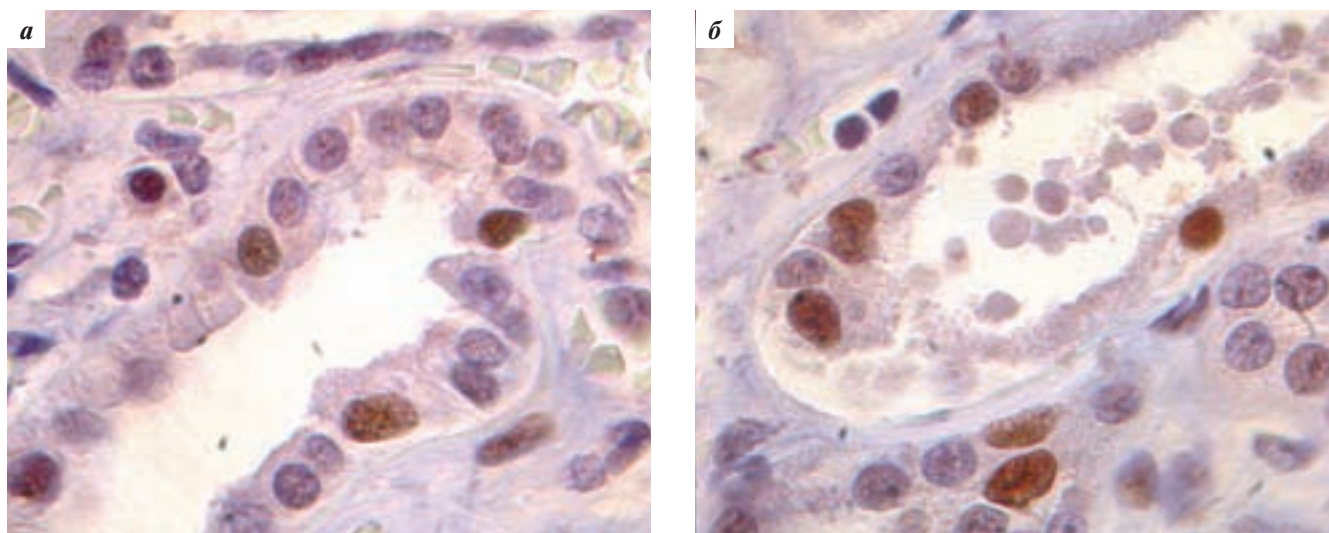


Рис. 3. Иммуноокрашивание на p53 в эпителии канальцев в ПЗ в группах исследования: а — слабая интенсивность иммуноокрашивания p53 эпителия канальцев в ПЗ в 1-й группе исследования; б — сильная интенсивность иммуноокрашивания p53 эпителия канальцев в ПЗ во 2-й группе исследования. ИГХ-окрашивание; $\times 1000$

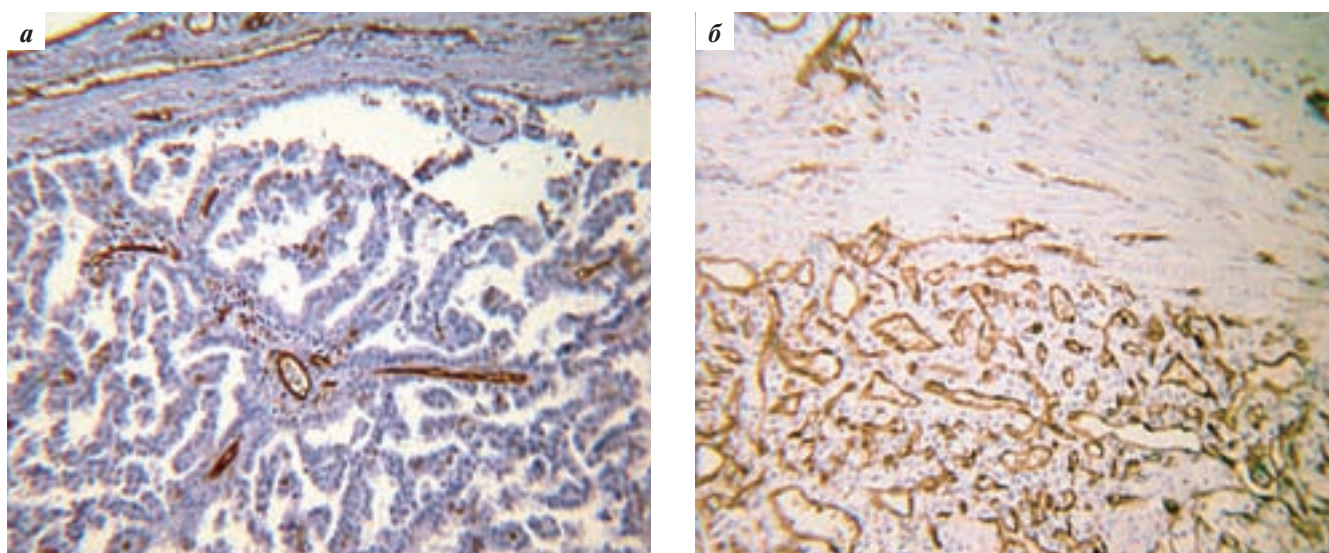


Рис. 4. Иммуноокрашивание на CD31 в эндотелии сосудов в ПЗ в группах исследования: а — небольшое количество сосудов в ПЗ в 1-й группе исследования; б — большое количество сосудов в ПЗ во 2-й группе исследования. ИГХ-окрашивание; $\times 200$

При этом в неизмененных почках 1-й группы больных ПМЦР составила $61,9 \pm 1,8\%$, а во 2-й группе уменьшалась до $39,9 \pm 1,2$. ПМЦР в ПЗ в 1-й группе пациентов составила $23,4 \pm 1,7$, а во 2-й группе достоверно увеличивалось до $43,5 \pm 2,4$ (рис. 4а, б).

Заключение

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что в ПЗ рака почки возникают явления РИН, которые проявляются дисбалансом процессов пролиферации и апоптоза. Степень тяжести РИН зависит прежде всего от биологических и клинко-анатомических особенностей опухоли. Так, в ПЗ опухолей

высокой степени злокачественности по сравнению с опухолями низкой степени злокачественности в эпителии канальцев отмечали более высокие значения плоидности и площади ядра, экспрессии AgNORs, Ki-67, p53, bcl-2 и активности ангиогенеза. Как известно, почка является «тихим» органом в отношении пролиферации и поэтому было интересно отметить, что в неизмененной ткани почки отмечались аналогичные с ПЗ тенденции: чем выше была злокачественность и размер опухоли, тем более возрастала в эпителии канальцев почки экспрессия маркеров пролиферации и апоптоза, а активность ангиогенеза снижалась. Из этого может следовать, что почка реагирует на рост злокачественной

опухоли не только перитуморозной зоной, но и как орган в целом. По-видимому, динамику параметров изученных маркеров в ПЗ можно трактовать следующим образом: увеличение ИН ДНК может говорить о нарастающей нестабильности генетического материала в ядрах клеток; увеличение ИМ p53 может свидетельствовать о мутации данного гена; возрастание ИМ Ki-67 говорит об увеличении пролиферативных процессов в эпителии; увеличение экспрессии AgNORs указывает на повышение скорости пролиферации и возрастание экспрессии bcl-2 указывает на блокаду апоптоза. Осо-

бенно следует отметить возрастание экспрессии ингибитора апоптоза bcl-2, активность которого может способствовать выживанию патологических пулов клеток, образующих РИН.

Таким образом, на фоне склеротических процессов в условиях гипоксии в прилежащих к опухоли областях формируются очаги РИН, тяжесть которой непосредственно зависит от биологических и клинко-анатомических особенностей опухоли, что следует учитывать при органосберегающих операциях при раке почки.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Непомнящий В.М., Романенко А.М., Данилец Р.О. Ренальная интратубулярная неоплазия — предрак? Материалы I конгресса Российского общества онкоурологов. Москва, 4–5 октября, 2006. С. 156–157.
2. Mourad W.A., Nestok B.R., Saleg G.Y. et al. Dysplastic tubular epithelium in «normal» kidney associated with renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1994;18:1117–24.
3. Kennedy S., Merino M., Lineham W. et al. Collecting duct carcinoma of the kidney. *Hum Pathol* 1990;21:449–53.
4. Романенко А.М. Иммуногистохимическая диагностика опухолей почек. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Под ред. С.В. Петрова и Н.Т. Райхлина. 2004.
5. Романенко А.М., Возианов А.М., Непомнящий В.М. и др. Реальная интратубулярная неоплазия как предрак почки. *Урология* 2003;(4):4–9.
6. Fuhrman S.A., Lasky L.C., Limas C. Prognostic significance of morfologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982;6:655–63.
7. Daskal Y., Smetana K., Buch H. Evedence from studies on segregated that nucleolar silver proteins C23 and B23 are in fibrillar components. *Exp Cell Res* 1980;127:285–91.
8. Бобров И.П., Авдалян А.М., Климачев В.В. и др. Модификация гистохимического метода выявления ядрышковых организаторов на гистологических срезах. *Арх патол* 2010; (3):35–7.