

Значение маркеров опухолевого роста и ангиогенеза в диагностике рака мочевого пузыря

П.В. Глыбочко, А.Н. Понукалин, Н.К. Шахпазян, Н.Б. Захарова

НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии и ЦНИЛ ГОУ ВПО Саратовский ГМУ Росздрава

THE SIGNIFICANCE OF TUMOR GROWTH MARKERS AND ANGIOGENESIS IN THE DIAGNOSIS OF URINARY BLADDER CANCER

P.V. Glybochko, A.N. Ponukalin, N.K. Shakhpazyan, N.B. Zakharova

Research Institute of Fundamental and Clinical Urology; Saratov State Medical University, Russian Agency for Health Care

Examinations were made in 121 patients, including 76 patients with urinary bladder cancer (UBC) (superficial ($T_1N_0M_0$) ($n = 16$) and invasive ($T_2N_0M_0$ and $T_3aN_0M_0$) ($n = 39$) carcinomas, carcinoma invading into and out of the bladder wall ($n = 21$), including $T_3bN_0M_0$ ($n = 14$), $T_3bN_1M_0$ ($n = 6$), and with $T_4N_1M_1$ ($n = 1$)), 10 patients with cystitis, 10 with urolithiasis, and 25 apparently healthy individuals who made up a control group. The patients with UBC were additionally divided into the following groups according to the degree of tumor cell differentiation: 27 with a low-grade tumor (G1), 24 with a moderate-grade tumor (G2), and 25 with a high-grade tumor (G3). The levels of oncomarkers (urinary bladder carcinoma antigen (UBCA), tissue polypeptide antigen (TPA), tissue-specific polypeptide antigen (TSPA), cytokines (interleukin (IL)-12, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and angiogenetic factors (vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor- α (TGF α), fibroblast growth factor (FGF), and insulin-like growth factor-I (IGF-I)) were studied by solid-phase enzyme immunoassay. It has been established that measuring the level of cytokeratin oncomarkers (UBC II, TPA, TPS) in the serum, urine, and washings can be, along with cystoscopy, used in the early diagnosis of UBC. A combination of UBC II, TPA, and TPS contents allows specification of the stage of UBC and the grade of tumor cells. The increased levels of TNF- α and IL-12 in patients with UBC confirm the development of a proinflammatory cytokine shift and activation of angiogenesis. The ratio of proangiogenic TNF- α to anti-angiogenic IL12 rises with UBC progression. This may be considered to cause increased vascular permeability and a proneness to bleedings from tumor tissues in patients with UBC. Tumor growth and UBC progression are accompanied by a pronounced increase in the serum levels of growth and angiogenetic factors (VEGF, TGF- α , b-FGF, and IGF-I) as compared to the normal values and to those seen in noncancer diseases. Angiogenetic and growth factors may be used in the early diagnostics of UBC and in the verification of the stage and malignancy of tumor growth.

Key words: bladder cancer, diagnostics, markers of tumor growth and angiogenesis

Рак мочевого пузыря (РМП) занимает 2-е место среди онкоурологических заболеваний и 3-е — по смертности от них. Заболеваемость РМП постоянно растет. За последние 10 лет прирост больных РМП в России составил 58,6% [1].

Поверхностные и мышечно-инвазивные опухоли мочевого пузыря в 90—95% случаев представлены уротелиальной карциномой, но отличаются по целому ряду молекулярно-генетических, морфологических и иммуногистохимических признаков. Доказано, что с началом инвазии опухоли в мышечный слой увеличивается частота метастазирования в регионарные лимфоузлы и отдаленные органы. Выживаемость и прогноз заболевания тесно коррелируют с распространенностью онкологического процесса [2].

В Российской Федерации в 2003 г. у 43,8% пациентов установлена T3—4 стадия РМП, в 5,3% случаев распространенность болезни вообще не выявлена. Число умерших на 100 вновь выявленных больных составляет 59% [3]. Эти цифры отражают как позднюю обращаемость пациентов и неточное определение стадии заболевания, так и неадекватность проводимого лечения [4]. Ошибки в стадировании связаны с отсутствием маркеров прогноза РМП.

Как известно, оценить биологическую агрессивность первичной опухоли можно, исследуя показатели

ее пролиферативной активности, активность апоптоза, факторы ангиогенеза, состояние ряда регуляторных рецепторов и систем. Для этого проводится исследование целого ряда белков — регуляторов клеточного цикла, генов-супрессоров опухолей и их продуктов, белков, регулирующих запрограммированную клеточную гибель, многочисленные факторы роста и их рецепторы, многие другие регуляторные системы клетки.

Цель исследования — определение значения маркеров опухолевого роста и ангиогенеза в диагностике РМП.

Материалы и методы

В ходе представленной работы обследован 121 человек, 96 больных из этого числа находились на лечении в НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии ГОУ ВПО Саратовский ГМУ Росздрава. 25 человек составили группу контроля. Возраст пациентов колебался от 44 до 79 лет (средний возраст — 63 года). В числе обследованных пациентов — 27 женщин и 69 мужчин.

Группу сравнения составили 10 больных циститом и 10 — мочекаменной болезнью. При проведении клинико-инструментального обследования у 16 пациентов установлен поверхностный РМП ($Ta-T1N0M0$), у 39 — инвазивный РМП в пределах органа ($T2aN0M0-T3aN0M0$), а у 21 — прорастающий паравезикальную

клетчатку и окружающие органы (T3bN0M0 — 14; T3bN1M0 — 2; T4N1M0 — 4; T4N1M1 — 1).

При гистологическом исследовании у всех 76 больных диагностирован переходно-клеточный рак. Опухоли имели следующие градации: G₁ — 27; G₂ — 24; G₃ — 25.

Исследование содержания онкомаркеров, цитокинов, факторов ангиогенеза проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием анализатора Stat Fax 2100. При определении онкомаркеров UBC (антиген РМП), ТРА (тканевый полипептидный антиген), TPS (тканевый специфический полипептидный антиген) применяли наборы фирмы «IDL Biotech AB» (Швеция). Результаты выражали соответственно в мкг/л, нг/л и ЕД/л.

UBC определялся в моче и смыве 0,9% раствором NaCl со стенки мочевого пузыря, полученном во время проведения диагностической цистоскопии, ТРА и TPS исследовались в сыворотке крови. Факторы роста эндотелия сосудов (ФРЭС), трансформирующий (ТРФ-α), фактор роста фибробластов (ФРФ) и инсулиноподобный (ИФР-1) определяли в сыворотке крови с применением наборов реактивов фирм «Biosource, Europe S.A.» (ФРЭС, ФРФ, ИФР-1),

«R&D Systems» (ТРФ-α). Результаты выражали в пг/мл. Содержание цитокинов интерлейкина-12 (ИЛ-12), фактора некроза опухоли-α (ФНО-α) определяли с помощью наборов реактивов фирм «Biosource, Europe S.A.» во взвеси мононуклеаров в плазме крови, полученной с использованием пробирок Vacutainer с фиколом. Результаты выражали в фг/1000 клеток.

Статистическую обработку результатов проводили с применением набора программ StatSoft Statistica v6.0. Результаты представлены в виде медианы с интерквартильным размахом (25—75-й процентиль), для определения достоверности различия результатов исследования между группами использовали критерий Крускала — Уоллиса.

Результаты исследования

Анализ полученных результатов показал, что у всех больных РМП имеют место значимые изменения исследуемых показателей. Непараметрический критерий Крускала — Уоллиса при сопоставлении контрольной группы и групп сравнения с группами больных РМП не превышал 0,05.

На рис. 1—4 представлены изменения содержания в моче, смывных водах, полученных при цистоскопии мочевого пузыря, и в сыворотке крови онкомарке-

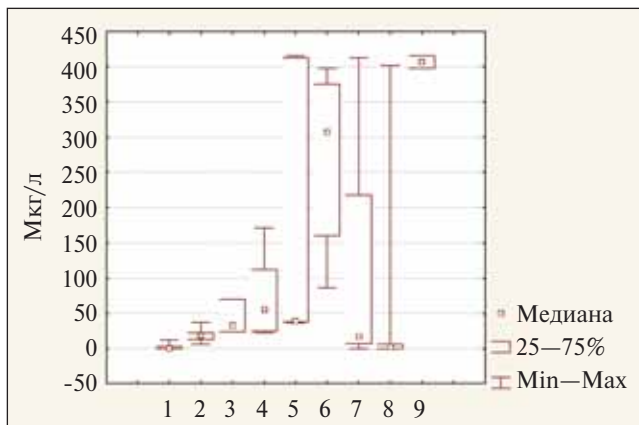


Рис. 1. Уровень UBC мочи у больных контрольной группы

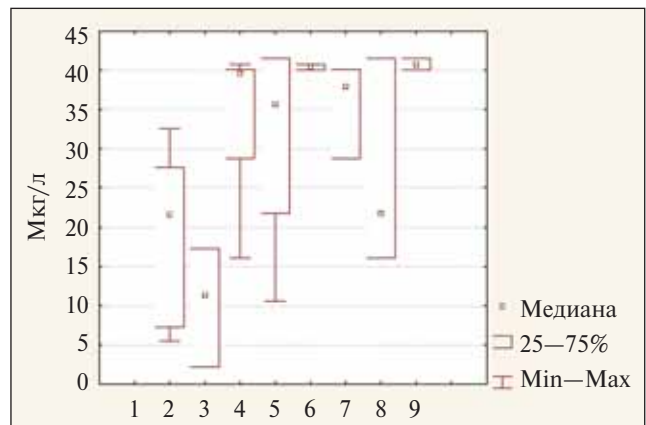


Рис. 2. Уровень UBC смывных вод у пациентов с циститом

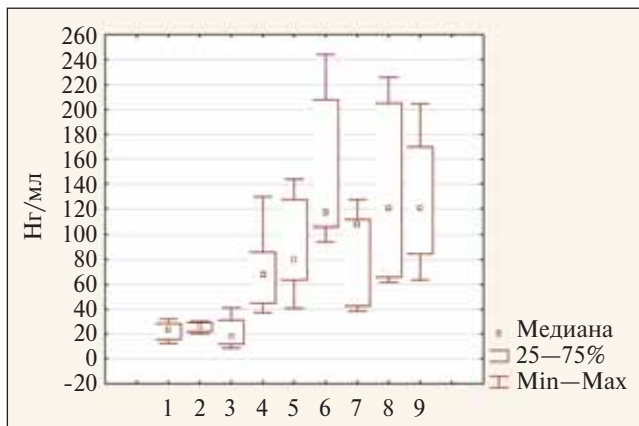


Рис. 3. Уровень TPS сыворотки крови у больных мочекаменной болезнью

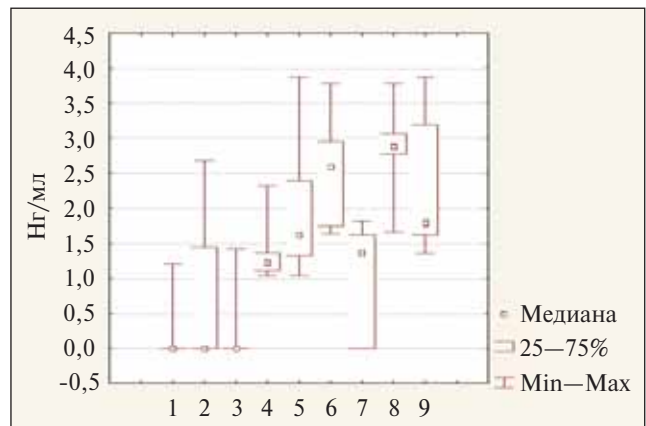


Рис. 4. Уровень ТРА сыворотки крови у больных неинвазивным РМП

ров UBC, ТРА и TPS. Показано, что увеличение содержания данных маркеров опухолевого роста зависит как от стадии и распространенности опухолевого роста, так и от степени дифференцировки ткани опухоли.

Существенное повышение диагностических качеств такого маркера, как UBC II, удалось получить при исследовании его содержания в смывных водах, полученных при цистоскопии. Также значимое увеличение уровня UBC отмечено у больных поверхностным раком. Разница уровней UBC у больных с разной степенью дифференцировки опухоли связана с высокой пролиферативной активностью низкодифференцированных опухолей.

Нарастание содержания TPS в сыворотке крови пациентов групп сравнения значительно меньше, чем у пациентов с РМП. Повышение содержания TPS зависит от стадии онкологического процесса и, в меньшей степени, от степени дифференцировки опухоли. Уровень ТРА возрастает по сравнению с группой контроля как при РМП, так и при циститах. При циститах экспрессия ТРА сравнима с высокодифференцированным РМП. По мере прорастания опухолью стенки мочевого пузыря уровень ТРА увеличивается.

При сравнении изменения уровней ФНО- α и ИЛ-12 во взвеси мононуклеаров у больных РМП и контрольной группы (рис. 5, 6) установлено, что по мере нарастания глубины инвазии и снижения степени дифференцировки ткани опухоли происходит достоверное увеличение их содержания в крови.

На рис. 7—10 представлены изменения содержания факторов роста у больных РМП.

Одновременно с изменением содержания вышеперечисленных цитокинов у больных РМП происходит возрастание уровней в сыворотке крови таких факторов ангиогенеза, как ФРЭС, ТФР- α , ТФР, и понижение ИФР-1. По мере нарастания глубины инвазии и снижения степени дифференцировки ткани опухоли в сыворотке крови повышалось количество ФРЭС, ТФР- α , ТФР и уменьшилось содержание ИФР-1.

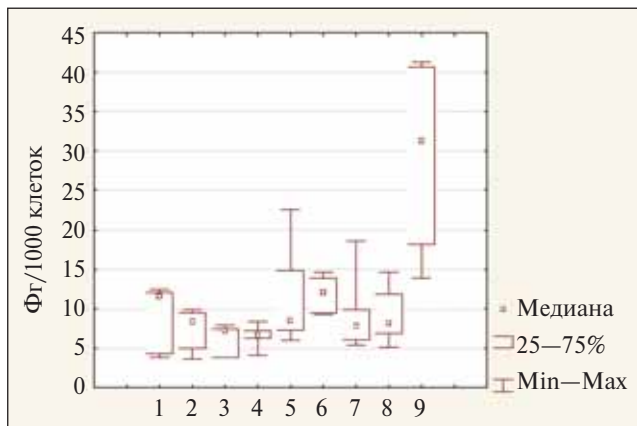


Рис. 5. Уровень ФНО- α мононуклеаров у больных инвазивным РМП в пределах органа

Наиболее высокие значения ФРЭС отмечаются у больных экстраорганным и низкодифференцированным РМП.

Самые высокие значения ФРФ зафиксированы на стадии инвазивного РМП.

Обсуждение результатов

В последнее десятилетие диагностика РМП и онкологических заболеваний в целом выходит на новый этап благодаря широкому внедрению в клиническую практику молекулярных маркеров опухолевого роста.

Исследования экономической эффективности диагностики и лечения РМП показали, что опухолевые маркеры могут значительно снизить стоимость мониторинга РМП, изменив режим наблюдения, а именно — удлинив интервалы между цистоскопиями [5].

Такие наиболее широко используемые онкомаркеры, как UBC (цитокератины 8 и 18, определяемые в моче), ТРА и TPS (фрагменты цитокератинов, определяемые в сыворотке крови), можно рекомендовать к применению для диагностики рецидивов и оценки эффективности методов лечения [6].

В моче обследованных больных РМП обнаруживается высокое содержание онкомаркера UBC, колеблющееся от 22 до 416 мкг/л, при максимальном уровне в контрольной группе 16 мкг/л. Уровень UBC несколько выше, чем в группе контроля, в группах сравнения (цистит, мочекаменная болезнь), зависит также от стадии роста опухоли. Можно считать, что UBC как онкомаркер имеет диагностическое значение на ранних этапах выявления РМП и может подтвердить переход РМП в стадию T2. Стадия T2 РМП характеризуется увеличением содержания UBC в моче >170 мкг/л.

Также высокие значения уровня UBC отмечаются у больных РМП с высоким риском инвазивного роста и плохим прогнозом — низкодифференцированный РМП. Таким образом, измерение уровня UBC может помочь в выделении группы больных с высоким риском инвазии и неблагоприятным прогнозом. По данным литературы [7], определение данного онкомаркера

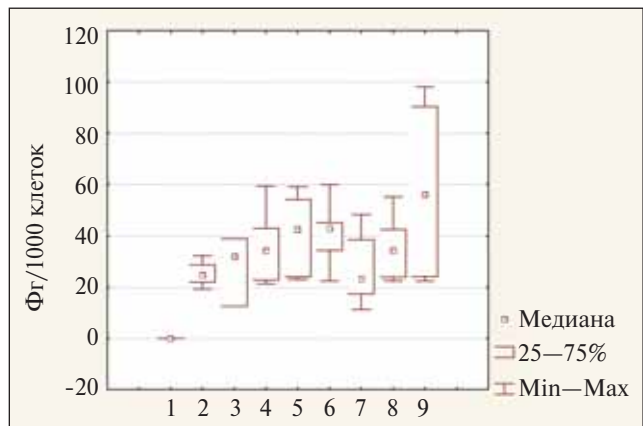


Рис. 6. Уровень ИЛ-12 мононуклеаров у больных инвазивным РМП с экстраорганным ростом

в моче считается одним из лучших методов неинвазивной диагностики РМП в дополнение к цистоскопии.

Измерение уровня UBC в смывных водах, полученных при цистоскопии, позволяет значительно повысить чувствительность данного онкомаркера. По сравнению с определением UBC в моче данный вид биоматериала позволяет лучше дифференцировать РМП от неонкологических заболеваний, затрагивающих уретелий.

На более поздних стадиях уровень онкомаркера UBC не позволяет отличить инвазивный рак в пределах органа от рака с экстраорганный локализацией. Возможно, это связано с тем, что в мочу попадают цитокератины с поверхности слизистой оболочки.

Помимо UBC, более точно верифицировать стадию заболевания позволяют маркеры ТРА и TPS, особенно на этапах инвазивного РМП в пределах органа и инвазивного экстраорганный РМП.

TPS как наиболее чувствительный серологический маркер можно рекомендовать для мониторинга рецидивов РМП.

Выступающие в качестве иммунорегуляторных и ангиогенных факторов цитокины также рассмат-

риваются и как показатели диагностики и прогноза РМП. ИЛ-12 и ФНО- α относятся к провоспалительным цитокинам с разнонаправленным влиянием на ангиогенез. ФНО- α обладает проангиогенным, а ИЛ-12 — антиангиогенным действием.

ИЛ-12 ингибирует ангиогенез. Антиангиогенное действие ИЛ-12 реализуется на уровне рецепторов протеинкиназ, адгезивных молекул, интегринов и других поверхностных структур.

У всех больных РМП в ответ на инвазию раковых клеток в стенку мочевого пузыря происходит повышение экспрессии ряда провоспалительных цитокинов основными иммунокомпетентными клетками крови. Усиление образования ФНО- α и ИЛ-12, по-видимому, связано с активацией так называемых вторичных каскадов иммунной реакции, или клеточного звена иммунного ответа.

Подъем уровней ФНО- α и ИЛ-12 у больных РМП можно рассматривать как следствие активации явлений апоптоза и ангиогенеза, сопровождающихся процессами перестройки структурно-функциональных свойств эндотелия сосудов. Очевидно, в процессе опухолевого роста одновременно с усилением выброса

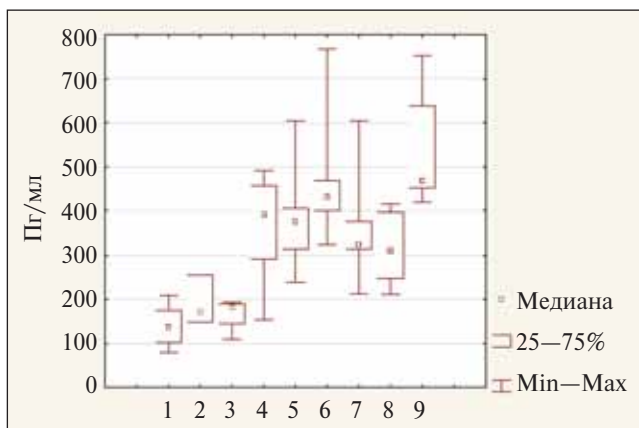


Рис. 7. Уровень ФРЭС сыворотки крови у пациентов с высокодифференцированным РМП

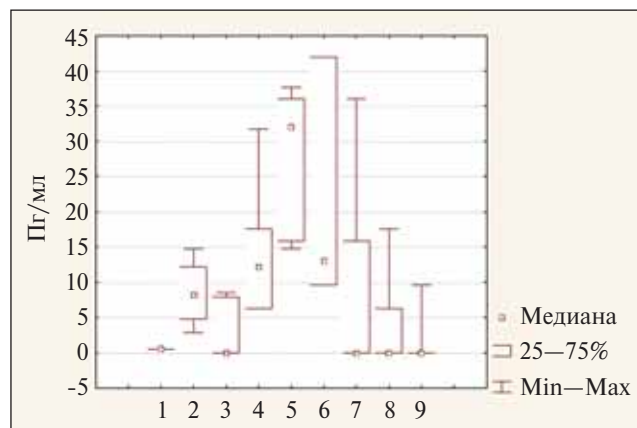


Рис. 8. Уровень ФРФ сыворотки крови у больных умеренно дифференцированным РМП

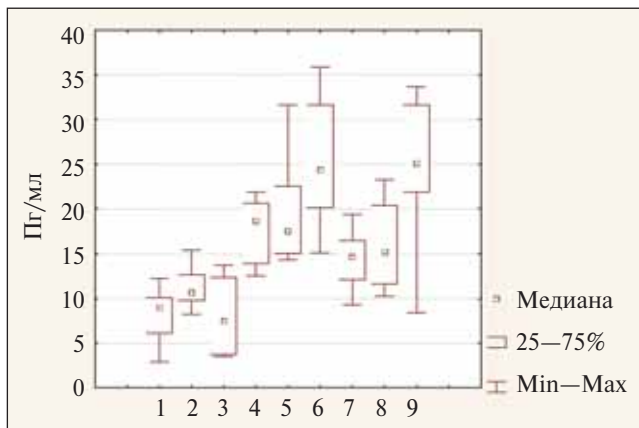


Рис. 9. Уровень ТФР- α сыворотки крови у больных низкодифференцированным РМП

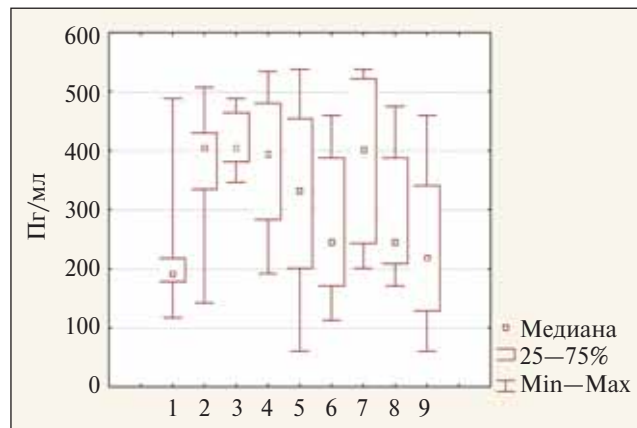


Рис. 10. Уровень ИФР-1 сыворотки крови

провоспалительных цитокинов развивается активация ангиогенеза. Образование новых сосудов происходит на фоне изменения соотношения между содержанием ангиогенных и антиангиогенных цитокинов. Отношение проангиогенного ФНО- α к антиангиогенному ИЛ-12 возрастает по мере прогрессирования РМП. У больных с неинвазивным РМП соотношение ФНО- α /ИЛ-12 в среднем составляет 0,19. По мере прорастания опухоли соотношение увеличивается от 0,2 до 0,28 на стадиях Т3b и Т4. Степень дифференцировки опухоли также влияет на увеличение соотношения ФНО- α /ИЛ-12 (от 0,33 при высокодифференцированном до 0,56 — при низкодифференцированном РМП). Вероятно, выброс проангиогенных факторов приводит к переходу эндотелиальных клеток из дремлющего состояния в активное и характеризуется как момент «включения» ангиогенеза. Данные процессы становятся причиной аномального формирования слоя эндотелиальных клеток сосудистого русла РМП. Это можно считать причиной возникновения повышенной проницаемости сосудов и склонности к кровотечениям из опухолевой ткани у больных РМП.

В качестве перспективных маркеров прогноза и диагностики РМП могут быть предложены целый ряд факторов ангиогенеза [8]. Ключевой фактор ангиогенеза — ФРЭС [5, 6] секретируется опухолевыми и окружающими опухоль клетками. Он способствует образованию новых кровеносных сосудов и повышению проницаемости сосудистой стенки. ФРЭС участвует в регуляции пролиферации эндотелиоцитов, хемотаксиса и дифференцировки предшественников эндотелиоцитов, играет важную роль в реорганизации структуры внеклеточного матрикса [9—11].

Другими известными факторами ангиогенеза являются ФРФ, ИФР-1, ТФР- α [12, 13].

ФРЭС при участии ТФР- α , ФРФ, проангиогенных цитокинов инициирует пролиферацию и миграцию эндотелиоцитов, образование новых кровеносных

сосудов, в конечном счете способствуя метастазированию. Нарастание уровней ФРЭС и ТФР- α в сыворотке крови свидетельствует о формировании новой сети капилляров, усиленном росте и метастазировании РМП.

ФРФ необходим для образования сосудистой стенки новообразованных сосудов и ремоделирования экстрацеллюлярного соединительнотканного матрикса. Самые высокие значения ФРФ отмечены на стадии инвазивного РМП, когда образуются крупные сосуды в самой опухоли, играющие роль магистральных для сети питающих опухоль капилляров.

Поскольку способность к инвазии опухоли в мышечный слой является решающим критерием выбора метода хирургического лечения больных РМП, в качестве кандидатов среди лабораторных показателей инвазивности РМП могут быть рассмотрены такие факторы роста, как ФРЭС и ФРФ.

Выводы

1. Уровень онкомаркеров класса цитокератинов UBC, TPA, TPS повышается при РМП. Данные онкомаркеры могут быть использованы в ранней диагностике РМП совместно с цистоскопией. В комплексе UBC, TPA, TPS позволяют уточнить стадию РМП и степень дифференцировки клеток.

2. Уровни ФНО- α и ИЛ-12 при РМП возрастают. Повышение содержания данных цитокинов свидетельствует об активации провоспалительного сдвига иммунной системы. При прогрессировании РМП происходит сдвиг отношения ФНО- α /ИЛ-12 в пользу проангиогенного ФНО- α .

3. Рост и прогрессирование РМП сопровождаются выраженным увеличением содержания в сыворотке крови факторов роста и ангиогенеза ФРЭС, ТФР- α , ФРФ, ИФР-1 по сравнению с нормой и неонкологическими заболеваниями. Факторы ангиогенеза и роста могут быть использованы для ранней диагностики РМП и верификации стадии и злокачественности опухолевого роста.

Литература

1. Аполихин О.И., Какорина Е.П., Сивков А.В. и др. Состояние урологической заболеваемости в Российской Федерации по данным официальной статистики. Урология 2008;(3):3—9.
2. Матвеев Б.П. Клиническая онкоурология. М., 2003.
3. Аксель Е.М. Заболеваемость злокачественными новообразованиями мочевых и мужских половых органов в России. Онкоурология 2005;(1):3—9.
4. Карякин О.Б., Попов А.М. Неoadъювантная химиотерапия рака мочевого пузыря: за и против. Онкоурология 2006;(2):31—4.
5. Аль-Шукри С.Х., Корнеев И.А. Общие принципы лечения больных раком мочевого пузыря. Значение клинических, гистологических и биологических факторов прогноза для выбора метода лечения. Практ онкол 2003;4(4):204—13.
6. Кадагидзе З.Г., Шелепова В.М. Опухолевые маркеры в современной клинической практике. Вест Моск онкол общ 2007;(1):56—9.
7. Quentin T., Schlott T., Korabiowska M. et al. Alteration of the vascular endothelial growth factor and angiopoietins-1 and -2 pathways in transitional cell carcinomas of the urinary bladder associated with tumor progression. Anticancer Res 2004;24(5A):2745—56.
8. Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M., Dvorak A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am J Pathol 1995;146:1029—39.
9. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. Am J Physiol Cell Physiol 2001;280:1358—66.
10. Behzadian M.A., Windsor L.J., Ghaly N. et al. VEGF-induced paracellular permeability in cultured endothelial cells involves urokinase and its receptor. FASEB J 2003;17:752—4.
11. Infanger M., Kossmehl P., Shakibaei M. et al. Vascular endothelial growth factor inhibits programmed cell death of endothelial cells induced by clinorotation. J Gravit Physiol 2004;11:199—200.
12. Conklin B.S., Zhong D.S., Zhao W. et al. Shear stress regulates occludin and VEGF expression in porcine arterial endothelial cells. J Surg Res 2002;102(1):13—21.
13. Kocak H., Oner-Iyidogan Y., Kocak T., Oner P. Determination of diagnostic and prognostic values of urinary interleukin-8, tumor necrosis factor-alpha, and leukocyte arylsulfatase-A activity in patients with bladder cancer. Clin Biochem 2004;37(8):673—8.