

Павлова Т.В.¹, Чаплыгина М.А.¹, Павлов И.А.², Нестеров А.В.¹

Инновационные аспекты в изучении рака почки

1 – ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ», Г. Белгород; 2 – ОГБУЗ "Белгородский областной онкологический диспансер" г. Белгород

Pavlova T.V., Chaplygina M.A., Pavlov I.A., Nesterov A.V.

Innovative aspects in study of cancer cancer

Резюме

С целью изучения отдельных звеньев патогенеза рака почки с применением инновационных морфофункциональных методов исследования, провели обследование 84 пациентов. Сформированные группы различались по возрасту и характеру распространённости опухолевого процесса. Результаты комплексного подхода исследования показали, что при раке почки в периферической крови отмечается изменение соотношения морфологических форм эритроцитов. Было определено, что уровень содержания некоторых биомаркеров при раке почки выше при более выраженном метастатическом поражении, а концентрации различна при сравнении возрастных групп. Кроме того, в работе представлена гистологическая картина рака почки, полученная методом атомно-силовой и растровой микроскопии.

Ключевые слова: рак почки, растровая микроскопия, атомно-силовая микроскопия, серологические биомаркеры

Summary

In order to study the individual links of the pathogenesis of kidney cancer using innovative morphofunctional methods of investigation, 84 patients were examined. The groups formed differed in age and in the nature of the prevalence of the tumor process. The results of the complex approach of the study showed that in renal carcinoma in peripheral blood a change in the ratio of the morphological forms of erythrocytes is noted. It was determined that the level of some biomarkers in a kidney cancer is higher with a more pronounced metastatic lesion, and the concentration is different when comparing age groups. In addition, the work presents a histological picture of kidney cancer, obtained by atomic-force and raster microscopy.

Key words: kidney cancer, raster microscopy, atomic force microscopy, serological biomarkers

Введение

На сегодняшний день отмечается увеличение продолжительности жизни населения, а вместе с этим и повышается вероятность развития злокачественных новообразований и смертности от них. Одним из решений данного вопроса является возможность ранней диагностики по средствам скрининга, а также детальное изучение состояния органов и систем при опухолевом процессе [1-3]. Наиболее показательной тестируемой системой состояния здоровья человека является кровь. Изменение состояния организма находит отражение в отклонениях гематологических показателей, и наоборот. Для злокачественных новообразований, в частности рака почки, наиболее актуально комплексное исследование крови с определением биологических маркеров [5]. Ресурсы в изучении опухолевого процесса претерпели изменения в связи с внедрением современных методов исследования [6], что дает возможность детального изучения вопросов канцерогенеза.

Целью явилось применение современных методов микроскопии и комплексного подхода в клинко-морфологическом исследовании аспектов рака почки.

Материалы и методы

Было исследовано 84 пациента среднего возраста ($n=40$, средний возраст $44,3\pm 0,45$) и пожилого ($n=44$, средний возраст $68,0\pm 0,78$). Подгруппы включали в себя пациентов с раком почки без метастазов, с метастазами в региональных лимфатических узлах и с отдаленными метастазами.

В образцах сыворотки крови изучали уровень концентрации серологических биомаркеров: фактор некроза опухолей альфа (TNF- α), интерлейкин 12 (IL-12), фибробластический фактор роста (FGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), инсулиноподобный фактор роста (соматомедин) (IGF-1), опухолевая пируваткиназа типа M2 (TuM2Pk), простатспецифический антиген (PSA общий). Определение концентрации проводили методом иммуноферментного анализа с применением диагностических наборов фирмы Fujirebio Diagnostics (Швеция). Иммуноферментный анализ осуществляли с применением оборудования (ридер, вошер) фирмы Stat Fax (США). Полученные данные обрабатывались на персональном компьютере с последующим анализом результатов в программе «Microsoft Excel».

Таблица 1. Содержание основных опухоль-ассоциированных маркеров в плазме крови при раке почки у людей среднего возраста (44,30±0,80)

Серологические онкомаркеры	Группа больных без метастазов	Группа больных с метастазами в региональных лимфоузлах	Группа больных с отдаленными метастазами
TNF-α (пг/мл)	135,39±2,73 xx, xxx, y, yy, yyy	167,67±3,03 x, xxx, yy, yyy	195,32±2,30 x, xx, y, yyy
IL-12 (пг/мл)	72,80±1,43 xx, xxx, y, yyy	93,39±2,07 x, xxx, y, yy	117,31±2,43 x, xx, y, yy, yyy
FGF (пг/мл)	126,41±1,87 xx, xxx, y, yy, yyy	140,89±1,35 x, xxx, y, yy, yyy	161,55±1,79 x, xx, y, yy, yyy
VEGF (пг/мл)	343,97±10,15 xx, xxx, y, yyy	529,49±17,71 x, xxx, y, yy	718,15±15,56 x, xx, y, yy, yyy
IGF-1 (пг/мл)	154,09±2,92 xx, xxx, y, yyy	183,95±2,18 x, xxx, y, yy	227,00±3,70 x, xx, y, yy, yyy
TuM2Pк (Ед/мл)	34,04±1,62 xx, xxx, yy, yyy	41,12±0,80 x, xxx, yy, yyy	55,26±1,25 x, xx, y, yy, yyy
PSA общий (нг/мл)	9,48±1,46 xx, yy, yyy	15,28±1,15 x, yy, yyy	13,65±0,74 yy, yyy

x p < 0,01 в сравнении с группой больных раком почки без метастазов среднего возраста; x x p < 0,01 в сравнении с группой больных раком почки с метастазами в региональных лимфатических узлах среднего возраста; x x x p < 0,01 в сравнении с группой больных раком почки с отдаленными метастазами среднего возраста; y p < 0,01 в сравнении с группой больных раком почки без метастазов пожилого возраста; y y p < 0,01 в сравнении с группой больных раком почки с метастазами в региональных лимфатических узлах пожилого возраста; y y y p < 0,01 в сравнении с группой больных раком почки с отдаленными метастазами пожилого возраста

Для световой микроскопии образцы, полученные после операции, заливали в парафиновые блоки. Срезы просматривали и фотографировали в световом микроскопе TOPIC-T («CETI Medline Scientific Ltd», Великобритания). Для изучения проб с помощью растровой электронной микроскопии (РЭМ) пробы просматривали в сканирующем электронном микроскопе "FEI Quanta 200 3D". Помимо этого, было проведено изучение тканей с применением атомно-силового микроскопа «Ntegra-Aura». Обработку и построение АСМ-изображений проводили при помощи программного обеспечения «NOVA» (НТ-МДТ, Россия) и «Image Analysis» (НТ-МДТ, Россия).

Дополнительно материалом для изучения служили эритроциты венозной крови. Описание морфометрии и фотографирования клеток выполнялось в растровом микроскопе «FEI Quanta 200 3D» и атомно-силовом микроскопе «Ntegra-Aura».

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью Microsoft Excel и Statistica 6.0. В целях определения репрезентативности исследования высчитывался коэффициент вариации ($V < 33\%$), далее применялся t-критерий Стьюдента для оценки значимости расхождения между средними выборочных совокупностей, была оценена однородность исследуемых совокупностей на основе коэффициента вариации.

Результаты и обсуждение

Исследование крови у пациентов среднего возраста с раком почки без метастазов показало варьирование концентрации в плазме крови основных опухоль-ассоциированных маркеров (табл.1). Так, уровень содержания фактора некроза опухолей альфа TNF-α составил 135,39±2,73 пг/мл, IL-12 - 72,80±1,43 пг/мл. Концентрация FGF была

равна 126,41±1,87 пг/мл, VEGF - 343,97±10,15 пг/мл, IGF-1 - 154,09±2,92 пг/мл. Содержание TuM2Pк составляло 34,04±1,62 Ед/мл, а общего PSA - 9,48±1,46 нг/мл.

В группе того же возраста с метастазами в региональные лимфатические узлы содержание TNF-α было выше - 167,67±3,03 пг/мл, а IL-12 - 93,39±2,07 пг/мл. Увеличение концентрации FGF было до 140,89±1,35 пг/мл, VEGF до 529,49±17,71 пг/мл, а IGF-1 до 183,95±2,18 пг/мл. Уровень содержания TuM2Pк был повышен до 41,12±0,80 Ед/мл, а общего PSA до 15,28±1,15 нг/мл.

Для группы пациентов с отдаленными метастазами, страдавших раком почки среднего возраста, было характерно достоверное ($p < 0,01$) повышение содержания всех изучаемых биомаркеров в отношении групп пациентов с отсутствием метастазов, и с метастазами в региональных лимфоузлах, за исключением общего PSA. При этом, содержание TNF-α составило 195,32±2,30 пг/мл, IL-12 - 117,31±2,43 пг/мл, TuM2Pк - 55,26±1,25 Ед/мл, а PSA общего - 13,65±0,74 нг/мл. Уровень концентрации FGF достигал 161,55±1,79 пг/мл, VEGF - 718,15±15,56 пг/мл, а IGF-1 - 227,00±3,70 пг/мл. Степень достоверности ($p < 0,01$) изменения концентрации серологических биомаркеров, в сравнении с другими исследуемыми группами, также представлена в таблице 1.

Результаты исследования основных серологических биомаркеров в группе пациентов пожилого возраста больных раком почки с различной степенью метастатического поражения отражены в таблице 2.

Для пациентов в пожилом возрасте, имевших рак почки без метастазов, был отмечен следующий уровень концентрации серологических опухоль-ассоциированных маркеров: TNF-α - 160,12±2,13 пг/мл, IL-12 - 60,29±0,78 пг/мл, FGF - 102,93±1,78 пг/мл, VEGF - 230,67±10,58 пг/мл.

Таблица 2. Содержание основных опухоль-ассоциированных маркеров в плазме крови при раке почки у людей пожилого возраста (69,79±0,88)

Серологические онкомаркеры	Группа больных без метастазов	Группа больных с метастазами в региональных лимфоузлах	Группа больных с отдаленными метастазами
TNF-α (пг/мл)	160,12±2,13 x, xxx, y, yyy	187,02±2,39 x, xx, y, yyy	220,29±2,27 x, xx, xxx, y, yy
IL-12 (пг/мл)	60,29±0,78 x, xx, xxx, yy, yyy	72,20±1,75 xx, xxx, y, yyy	94,54±1,82 x, xxx, y, yy
FGF (пг/мл)	102,93±1,78 ^{***,****} x, y, yyy, xxx, yy, yyy	119,32±1,24 ^{****} x, y, yyy, xxx, yy, yyy	134,10±1,56 x, xx, xxx, y, yy
VEGF (пг/мл)	230,67±10,58 x, xx, xxx, yy, yyy	341,25±10,14 xx, xxx, y, yyy	537,30±16,41 x, xxx, y, yy
IGF-1 (пг/мл)	134,14±1,33 x, xx, xxx, yy, yyy	158,61±2,08 xx, xxx, y, yyy	187,33±2,10 x, xxx, y, yy
TuM2Pк (Ед/мл)	38,79±0,92 xxx, yy, yyy	45,43±0,75 x, xx, xxx, y, yyy	64,30±1,50 x, xx, xxx, y, yy
PSA общий (нг/мл)	12,87±1,25 yy, yyy	21,77±1,42 x, xx, xxx, y	22,01±1,23 x, xx, xxx, y

x p < 0,01 в сравнении с группой больных раком почки без метастазов среднего возраста;

xx p < 0,01 в сравнении с группой больных раком почки с метастазами в региональных лимфатических узлах среднего возраста;

xxx p < 0,01 в сравнении с группой больных раком почки с отдаленными метастазами среднего возраста;

y p < 0,01 в сравнении с группой больных раком почки без метастазов пожилого возраста;

yy p < 0,01 в сравнении с группой больных раком почки с метастазами в региональных лимфатических узлах пожилого возраста;

yyy p < 0,01 в сравнении с группой больных раком почки с отдаленными метастазами пожилого возраста

мл, IGF-1 - 134,14±1,33 пг/мл, TuM2Pк - 38,79±0,92 Ед/мл, PSA общий - 12,87±1,25 нг/мл. При этом, уровень концентрации TNF-α был достоверно (p<0,01) выше, в сравнении с группой среднего возраста больных раком почки без метастазов и достоверно (p<0,01) ниже в сравнении с группой пациентов среднего возраста больных раком почки с отдаленными метастазами. Концентрация IL-12, FGF, VEGF и IGF-1 была достоверно (p<0,01) ниже по сравнению с группами среднего возраста больных раком почки без метастазов и разной степени распространенности метастазов. Уровень содержания TuM2Pк был достоверно (p<0,01) ниже по отношению к группе пациентов среднего возраста больных раком почки с отдаленными метастазами. Изменение уровня общего PSA носило статистически не значимый характер.

В группе пациентов пожилого возраста, страдавших раком почки, с наличием метастазов в региональных лимфатических узлах, было определено следующее значение маркеров: TNF-α - 187,02±2,39 пг/мл, IL-12 - 72,20±1,75 пг/мл, FGF - 119,32±1,24 пг/мл, VEGF - 341,25±10,14 пг/мл, IGF-1 - 158,61±2,08 пг/мл, TuM2Pк - 45,43±0,75 Ед/мл, PSA общий - 21,77±1,42 нг/мл. В сравнении с пациентами больными раком почки без метастазов той же возрастной группы наблюдалось достоверное (p<0,01) увеличение всех изучаемых показателей иммуногистохимического статуса. При сопоставлении полученных результатов с таковыми у лиц среднего возраста были отмечены достоверные (p<0,01) изменения. Так, содержание TNF-α было достоверно (p<0,01) выше в сравнении с группами

среднего возраста без метастазов и метастазами в региональных лимфатических узлах. Содержание IL-12, VEGF и IGF-1 было достоверно (p<0,01) ниже в сравнении с группами пациентов среднего возраста с метастазами в региональных лимфатических узлах и отдаленными метастазами. Концентрация FGF была достоверно (p<0,01) ниже относительно групп среднего возраста с разной степенью метастазирования. Уровень содержания TuM2Pк был достоверно (p<0,01) выше по сравнению с группами среднего возраста без метастазов и метастазами в региональных лимфоузлах, и ниже (p<0,01) в сравнении с группой пациентов среднего возраста и отдаленными метастазами. Содержание общего PSA было достоверно (p<0,01) выше по отношению к группам среднего возраста больных раком почки без метастазов и разной степени метастазирования.

При исследовании плазмы крови у пациентов пожилого возраста с диагностированным раком почки и отдаленными метастазами, было характерно следующее значение биомаркеров: TNF-α - 220,29±2,27 пг/мл, IL-12 - 94,54±1,82 пг/мл, FGF - 134,10±1,56 пг/мл, VEGF - 537,30±16,41 пг/мл, IGF-1 - 187,33±2,10 пг/мл, TuM2Pк - 64,30±1,50 Ед/мл, PSA общий - 22,01±1,23 нг/мл. В сравнении с группами пациентов больными раком почки без метастазов того же возраста, было отмечено достоверное (p<0,01) повышение всех изучаемых показателей иммуногистохимического статуса, а в сравнении с группами пациентов больными раком почки с метастазами в региональных лимфатических узлах той же возрастной

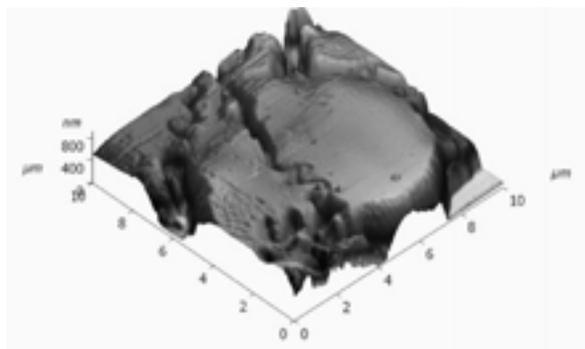


Рис.1. Эритроциты в группе пациентов с раком почки.

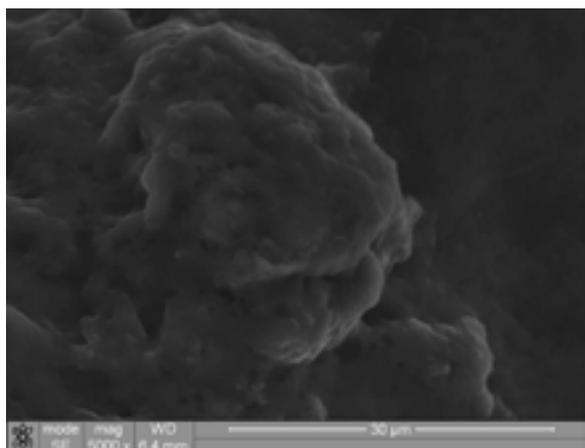


Рис. 2. Светлоклеточный рак почки. Представлен узлом с полиморфными опухолевыми клетками, рыхло, при помощи отростков, соединенный с окружающей тканью. Растровая электронная микроскопия (x 5000).

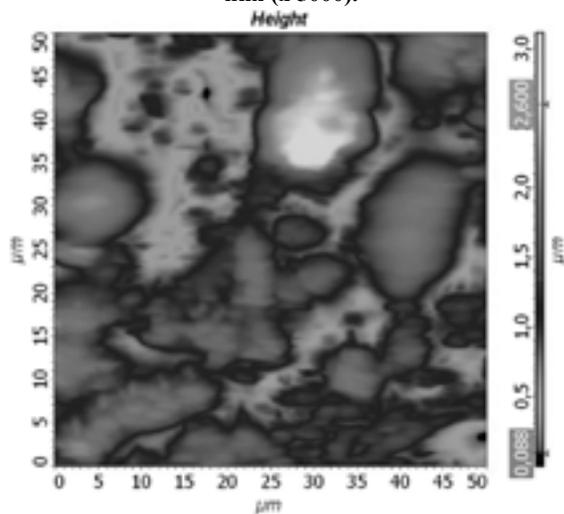


Рис. 3. Светлоклеточный рак почки. Представлен узлом с полиморфными опухолевыми клетками. Хорошо видны округлые, неправильной формы, удлиненные, веретенообразные, звездчатые, округлые мелкие недифференцированные клетки эмбрионального характера различных размеров, рыхло соединенные между собой. Атомно-силовая микроскопия, двухмерная гистограмма.

группы, было отмечено достоверное ($p < 0,01$) повышение всех изучаемых показателей иммуногистохимического статуса, за исключением общего PSA. При сопоставлении полученных результатов с таковыми у лиц среднего возраста так же наблюдалось достоверное ($p < 0,01$) изменение уровней концентрации. Так, содержание TNF- α , TuM2Pк и общего PSA было достоверно ($p < 0,01$) выше в сравнении с группами среднего возраста без метастазов и разной степенью метастазирования. Концентрация IL-12, VEGF и FGF была достоверно ($p < 0,01$) выше в отношении группы среднего возраста без метастазов и ниже в сравнении с группой среднего возраста с отдаленными метастазами. Степень достоверности ($p < 0,01$) изменения концентрации опухоль-ассоциированных маркеров, в сравнении с другими исследуемыми группами, также представлена в таблице 2.

Результаты гемосканирования показали, что у пациентов с диагностированным раком почки в периферической крови основная часть эритроцитов представлена нормоцитами $93,3 \pm 0,47\%$. Содержание микроцитов было равно - $5,2 \pm 0,34\%$, макроцитов - $1,5 \pm 0,27\%$. На долю дискоцитов приходилось $77,00 \pm 0,68\%$, переходные формы эритроцитов составили $18,83 \pm 1,08\%$, предгемолитические формы - $3,17 \pm 0,48\%$, а дегенеративные формы - $1,00 \pm 0,26\%$. При раке почки наблюдалось большое количество дискоцитов с множественными выростами и эллипсов (рис. 1). Встречались единичные куполообразные эритроциты и эритроциты в виде «спущенного мяча».

Гистологическая картина опухолевых тканей почки была представлена преимущественно светлоклеточным раком с характерной для него картиной. На электронограммах было видно, что это был чаще узел, состоящий из полигональных и полиморфных клеток, а также из отдельных клеток (рис. 2). В отдельных участках в них были выявлены некрозы, кровоизлияния, кальцификаты. Организующиеся «опухолевые тромбы» были представлены как опухолевыми клетками различной формы и размеров, так и эритроцитами. Они располагались как на эндотелии сосудов, преимущественно в участках нарушения его складчатости и некротизированной поверхности. В отдельных участках тромботические массы были соединены с ним непрочной с помощью отростков клеток, а в других - обтурировали весь сосуд при этом они либо плотно соединяясь с окружающими тканями, иногда прорастая их, или контактировали с ними лишь в отдельных участках.

Полиморфизм клеток особенно хорошо виден при помощи атомносиловой микроскопии и носит характер как размера, так и формы (рис. 3). Строение значительно варьирует в разных опухолях и разных участках одного опухолевого узла. Хорошо видны округлые, неправильной формы, удлиненные, веретенообразные, звездчатые, округлые мелкие недифференцированные клетки эмбрионального характера.

Заключение

Таким образом, при раке почки в периферической крови наблюдалось увеличение уровня содержания онкомаркеров в группах с более распространенным опухолевым процессом. Так, концентрация TuM2Pк, IL-12, FGF, VEGF,

IGF-1, TNF- α выше в обеих возрастных группах при увеличении степени распространённости метастазов. Концентрация IL-12, FGF, VEGF, IGF-1 также выше при распространенной форме рака почки в независимости от возраста, но уровень их содержания в пожилом возрасте ниже. Также в крови при раке почки наблюдается большое количество дискоцитов с множественными выростами и эллипсов. Определяются куполообразные эритроциты и эритроциты в виде «спущенного мяча». При изучении материала методом атомно-силовой микроскопии светлоклеточный рак почки представлен узлом с полиморфными опухолевыми клетками (округлые, неправильной формы, удлинённые, веретенообразные, звездчатые, округлые мелкие недифференцированные клетки эмбрионального характера различных размеров) рыхло соединённые между собой. ■ 

Павлова Татьяна Васильевна – д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологии ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ», Г. Белгород; **Чаплыгина Марина Александровна** – старший преподаватель кафедры патологии ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ», Г. Белгород; **Павлов Иван Арнольдович** – к.м.н., врач онкоуролог, ОГБУЗ "Белгородский областной онкологический диспансер", г. Белгород. **Нестеров Аркадий Витальевич** - к.м.н., доцент кафедры патологии ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ», Г. Белгород; Автор, ответственный за переписку - **Чаплыгина Марина Александровна** – старший преподаватель кафедры патологии ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ». 308015, г.Белгород, ул. Победы, 85, ФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет, e-mail: marina.chaplygina.88@mail.ru, тел. +7 920 201 38 42.

Литература:

1. ВОЗ. Официальный ежегодный отчет. Женева; 2015.
2. ВОЗ. Рак. Информационный бюллетень №297; 2015.
3. ВОЗ. Всемирный доклад о раковых заболеваниях; 2014.
4. Сергеева Н. С., Мариутина Н. В. Общие представления о серологических биомаркерах и их месте в онкологии. Практич. онкол. 2011;12(4):147-154.
5. Павлова Т.В., Куликовский В.Ф., Павлова Л.А. Клиническая и экспериментальная морфология. М: ООО «Медицинское информационное агентство»; 2016.