

Павлова Т.В.<sup>1</sup>, Лыков Ю.А.<sup>1</sup>, Павлов И.А.<sup>2</sup>

## Новые сведения о морфогенезе рака мочевого пузыря

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

Pavlova T.V., Lykov Y.A., Pavlov I.A.

### New data on the morphogenesis of bladder cancer

#### Резюме

В статье представлены результаты изучения послеоперационных би-оптатов мочевого пузыря и эритроцитов крови у больных с опухолями мочевого пузыря с помощью растровой электронной и атомно-силовой микроскопии. Было обнаружено снижение процента микроцитов и увеличение содержания макроцитов в сравнении с контрольной группой. Также было отмечено увеличение минимальных и максимальных размеров эритроцитов и увеличение их среднего диаметра. Получены новые сведения об особенностях строения опухолевых клеток. Эти данные свидетельствуют о возможности использования сканирующей микроскопии как скринингово-го экспресс-метода для диагностики опухолевого роста при раке мочевого пузыря.

**Ключевые слова:** опухоль мочевого пузыря, эритроциты, диагностика, микроскопия, микроцитоз, макроцитоз

#### Summary

The article presents the results of the study of postoperative biopsies of the bladder and red blood cells in patients with bladder tumors using scanning electron and atomic force microscopy. We discovered a reduction in the percentage of microcytes and increase of macrocytes in comparison with the control group. Also there was an increase of minimum and maximum sizes of erythrocytes and their average diameter increase. Received new information about the structural features of tumor cells. This data indicates the possibility of the use of scanning microscopy as a screening method for the rapid diagnosis of tumor growth in bladder cancer.

**Keywords:** bladder tumor, erythrocytes, diagnostics, microscopy, micro-cytosis, macrocytosis

#### Введение

Инновационные подходы в исследовании биологических объектов во многом расширяют возможности морфологии. Современные методы забора материала с целью биопсии позволяют получить клетки любых органов и тканей. Прогресс медицинских технологий позволяет исследовать ткани, которые не столь широко использовались ранее для диагностики состояния организма с целью последующей коррекции, такие как волосы, кожа, клетки крови и лимфы. Это стало доступным после появления работ, которые показали возможность интерпретации данных, полученных от одной клетки, при трактовке целостного состояния организма, так как не существует болезней, оказывающих только локальное воздействие на организм. Среди социально важных заболеваний одной из первых мест занимает онкоурологическая патология. Следует отметить, что опухоли мочевого пузыря преимущественно носят злокачественный характер. Рак мочевого пузыря плохо диагностируется на начальных стадиях.

В структуре онкологической заболеваемости опухоли мочевого пузыря составляют от 2 до 5 % всех новообразований [1, 3, 9, 10]. Ежегодно в мире раком мочевого пузыря (РМП) заболевают 335,8 тыс. человек и 132,4 тыс. умирает, то есть каждый третий умирает от этого тяжелого заболевания. У мужчин опухоли мочевого пузыря встречаются в 3-4 раза чаще, чем у женщин [2, 3]. По данным официальной статистики Минздрава, заболеваемость раком мочевого пузыря постоянно растет, за период с 2006 по 2010 г. прирост больных раком мочевого пузыря в России составил 8,3 %, поднявшись в относительных цифрах с 8,9 до 9,7 на 100 000 населения [3]. Следует отметить, что в настоящее время только у 45 % больных РМП диагностируется на ранней стадии [9]. Поэтому своевременная диагностика опухолей и лечение больных раком мочевого пузыря остаются актуальной проблемой современной онкологии [4, 7, 12].

Новообразования мочевого пузыря в подавляющем большинстве случаев представлены переходноклеточным раком. Более 95 % опухолей мочевого пузыря имеют

эпителиальное происхождение, включая переход-ноклеточную карциному (более 90 %), плоскоклеточный рак (6-8 %), аде-нокарциному (2 %). Недифференцированный рак встречается менее чем в 1 % случаев [5, 6].

Возникновение рака мочевого пузыря у мужчин многие связывают с застоем мочи в пузыре, особенно в пожилом возрасте [3]. Один из известных факторов риска для развития рака мочевого пузыря – курение, так как химические канцерогенные вещества усваиваются и экскретируются в мочу, где в качестве канцерогенов воздействуют на уротелий. Важным фактором риска после курения является работа на вредных производствах. Повышенный риск существует у рабочих (в том числе бывших), занятых в окраске материалов, резиновой и химической промышленности, в кожевенном и сапожном производстве, среди живописцев. Кроме того, роль в канцерогенезе мочевого пузыря могут играть гормональные факторы. Имеются отдельные данные о генетической предрасположенности данного заболевания. Имеются работы, что рак мочевого пузыря, являясь агрессивным заболеванием, склонен к метастазированию уже на ранних стадиях. Частота метастазирования при поверхностном РМП достигает 5 %, при *carcinoma in situ* – 20 %, у 50 % пациентов с инвазивной опухолью метастатическое поражение обнаруживается при первичном обращении [3, 11].

#### *Цель работы*

В связи с этим, целью нашего исследования является определение роли сканирующей (атомно-силовой и электронной) микроскопии для выявления их роли как дополнительных методов в изучении морфогенеза рака мочевого пузыря.

#### **Материалы и методы**

Нами исследовано 20 мужчин, сформовавшие 2 группы по 10 чело-век. 1-я группа включала в себя практически здоровых пациентов, не имеющих тяжелой соматической патологии с благоприятным прогнозом, 2-ю группу составили пациенты с диагностированным раком мочевого пузыря. Для световой микроскопии образцы (10 случаев), полученные после операции, заливали в парафиновые блоки. Срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, просматривали и фотографировали в световом микроскопе TOPIC-T («СЕТИ 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». Полученные размеры эритроцитов были распределены на 3 группы: микроциты (до 6,4µм), нормоциты (6,5-8,9µм), макроциты (9,0-10,9µм), мегало-

циты (более 10,9 µм). При описании морфологических характеристик, эритроцитарная популяция была распределена на основные группы: 1) дискоциты; 2) переходные формы (способные к обратной трансформации): эллипсы, дискоциты с гребнем, плоские диски, дискоциты с выростом, дискоциты с множественными выростами, эритроциты в виде «стуговой ягоды»; 3) предгемолитические формы (с изменениями, носящими необратимый характер): куполообразные, сферические, в виде «спущенного мяча»; 4) дегенеративные формы.

Согласно целям и задачам исследования результаты группировались для сопоставления различных качественных показателей. Для визуализации исходных данных и результатов их анализа использовали модуль построения диаграмм системы Microsoft Office. Характер распределения данных нормальный. 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 расхождений между средними выборочных совокупностей, была оценена однородность исследуемых совокупностей на основе коэффициента вариации.

#### **Результаты и обсуждение**

При морфологическом исследовании относительно сохраненных участков мочевого пузыря при раке этого органа мы обнаружили ряд морфологических изменений, которые можно охарактеризовать как паранеопластические процессы. Чаще всего обнаруживались очаги плоскоклеточной и железистой метастазии. Еще одним вариантом паранеопластических процессов являлись небольшие по размерам очаги, в которых отмечалась активная пролиферация эпителия, а также незначительные по площади участки атрофии.

Исследование с помощью сканирующей микроскопии позволило охарактеризовать ткань мочевого пузыря непосредственно после операции (Рис.1 А) на незначительном, доступном в световой микроскоп увеличении до 500 раз на участках площади, приходящийся на 2-3 среза. Данный метод также позволяет на боковом срезе просмотреть глубину расположения опухоли, которая была различна в представленных случаях. С помощью линейки, демонстрирующей увеличение, мы определяли, что они представляли собой участки от 0,01 мм до 0,1 мм в диаметре овальной формы, которые тонкой капсулой, практически не просматриваемой в световой микроскоп, отграничены от окружающей ткани. Но уже на увеличении 2000 раз (Рис.1 Б) и более в этих участках видны отдельные опухолевые клетки, различных размеров (от 12,5±2,16 µм до 23,7±3,25 µм) и формы (червеобразные, в виде колбасок, неправильного овала) или группы из нескольких клеток. Примечательно, что вокруг них расположено множество эритроцитов, соединенных с ними цитоплазматическими мостиками или активно проникающими в клетки. Связи между клетками не прочные, что хорошо видно как при помощи растровой электронной, так и атомно-силовой микроскопии.



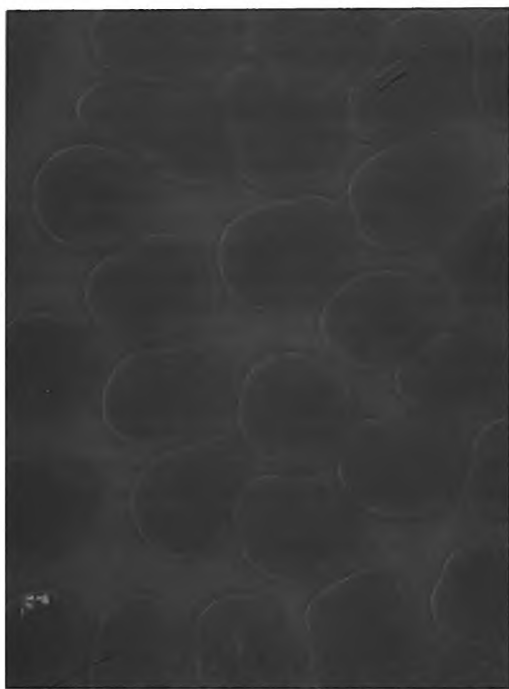
а)



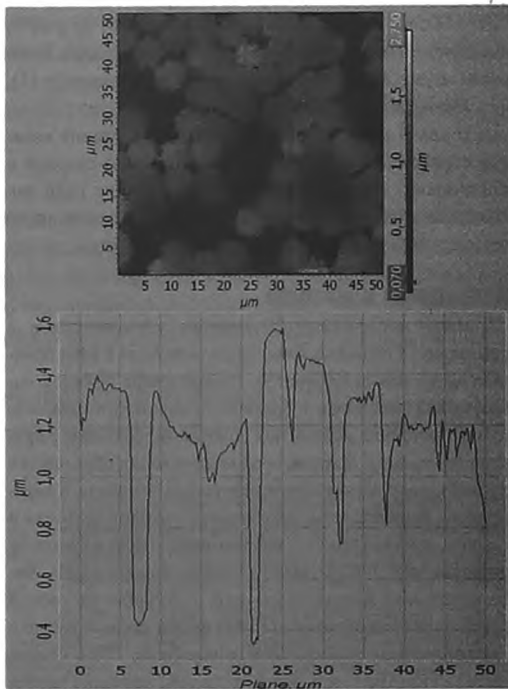
б)

**Рис. 1 Аденокарцинома мочевого пузыря.**

**Рисунок** Опухолевые клетки расположены группами и окружены эритроцитами.  
*А (500). Растровая электронная микроскопия. Б (x2000) фрагмент*



**Рис. 2 Эритроциты крови у пациентов при раке мочевого пузыря. Наблюдается изменение формы и размеров эритроцитов. Растровая электронная микроскопия (x5000)**



**Рис. 3 Эритроциты в группе пациентов с диагнозом рак мочевого пузыря. Нарушение рельефа поверхности эритроцитов. Двухмерная гистограмма и графическое изображение. Гистограмма и графическое изображение.**

Проведенный анализ данных сканирующей электронной микроскопии эритроцитов показал, что в группе пациентов с раком мочевого пузыря и в контрольной группе большая часть эритроцитарной популяции имеет диа-

метр от 6,5µм до 8,9µм (нормоциты) (Рис. 2). Так, средний размер эритроцитов в группе пациентов с раком мочевого пузыря составил -  $7,2 \pm 0,07 \mu\text{m}$ , в контрольной группе данный показатель был равен  $7,00 \pm 0,05 \mu\text{m}$  (Таблица 1).

Таблица 1. Процентное соотношение размеров эритроцитов у больных с раком мочевого пузыря

Критерий	Контрольная группа	Группа больных раком мочевого пузыря
Микроциты (%)	23,3±3,28	17,2±1,31
Нормоциты (%)	75,6±3,14	80,6±0,68
Макроциты (%)	1,1±0,28	2,2±0,66

Таблица 2. Средние размеры эритроцитов при раке мочевого пузыря

Критерий	Контрольная группа	Группа больных раком мочевого пузыря
Средний диаметр эритроцитов (μм)	7,00±0,05	7,2±0,07
Диапазон размеров эритроцитов (μм)	5,60±0,28-8,60±0,22	5,8±0,27-9,0±0,42

Процент нормоцитов при раке мочевого пузыря был выше, чем в контрольной группе и составил 80,6±0,68%, тогда как в контрольной группе количество нормоцитов составило 75,6±3,14%. Содержание микроцитов в группе пациентов с диагностированным раком мочевого пузыря было равно - 17,2±1,31%. В группе практически здоровых людей данный показатель был выше и составил 23,3±3,28% от общего числа сканированных клеток. На долю макроцитов в контрольной группе приходилось 1,1±0,28%. При раке мочевого пузыря содержание макроцитов было выше и составило 2,2±0,66%. Наличие мегацитоза в изучаемых образцах не наблюдалось. Диапазон размеров эритроцитов в контрольной группе находился в пределах 5,60±0,28μм-8,60±0,22μм, в группе пациентов с раком мочевого пузыря 5,8±0,27μм-9,0±0,42μм (Таблица 2). При изучении эритроцитов с помощью атомно-силовой микроскопии выявлено нарушение рельефа поверхности эритроцитов (Рис. 3).

## Заключение

Таким образом, у пациентов с раком мочевого пузыря наблюдалось снижение процента микроцитов от общего числа сканированных клеток и увеличение содержания

макроцитов в сравнении с контрольной группой. Кроме того, в основной группе было отмечено увеличение минимальных и максимальных размеров эритроцитов, а также увеличение среднего диаметра. Сканирующая микроскопия крови может быть использована как скрининговый экспресс-метод для диагностики опухолевого роста, так и для изучения морфогенеза различных форм рака, в том числе, мочевого пузыря. ■

*Павлова Татьяна Васильевна – д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологич. ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ», г. Белгород, Лыков Юрий Александрович – студент Медицинского института ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ», г. Белгород, Павлов И.А. – к.м.н., врач онкоуролог, ОГБУЗ "Белгородский областной онкологический диспансер", г. Белгород, Автор, ответственный за переписку: Павлова Татьяна Васильевна – 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85. E-mail: pavlova@bsu.edu.ru*

## Литература:

1. Глыбочко П.В., Зуев В.В., Попков В.М. и др. Возможности лучевых методов исследования в диагностике рака мочевого пузыря. Саратовский научно-медицинский журнал. 2011; 7 (1): 148-151.
2. Коробкин А.С., Терновой С.К., Пушкарь Д.Ю. Камплексная диагностика рака мочевого пузыря. REJR. 2012; 2 (1): 74-78.
3. Григорьев Е.Г., Фролова И.Г., Усынин Е.А. и др. Рак мочевого пузыря: возможности лучевых методов диагностики (обзор литературы). Сибирский онкологический журнал. 2013; 3 (57): 75-81.
4. Аполихин О.И., Сивков А.В., Бешлиев Д.А. Анализ уронефрологической заболеваемости в РФ по данным официальной статистики. Экспериментальная и клиническая урология. 2010; 1: 4-11.
5. Аль-Шукри С.К., Ткачук В.Н. Опухоли мочеполовых органов: руководство для врачей. СПб.: Питер. 2000. 320 с.
6. Воробьев А.В. Классификация и диагностика рака мочевого пузыря, вопросы дифференциальной диагностики. Практическая онкология. 2003; 4 (4): 196-203.
7. Павлова Т.В., Куликовский В.Ф., Павлова Л.А. Клиническая и экспериментальная морфология. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2016. 256 с.
8. Державец Л.А. Лабораторные показатели и выживаемость пациентов, страдающих раком мочевого

- пузыря. *Сибирский онкологический жур-нал*. 2013; 4: 12-6.
9. Рязанцев В.Е. Использование цитокератинов ТРА и TPS в ранней диагностике и стадировании рака мочевого пузыря. *Актуальные проблемы управления здоровьем населения: сб. науч. тр. посвящ. 80-летию кафедры Нижегородской ГМА. - Вып. IV. Под ред. И. А. Камаева. Н.Новгород. 2011; 245-248.*
10. Худяшев С.А., Каприн А.Д. *Возможности применения методов лучевой диагностики в стадировании и определении тактики лечения рака мочевого пузыря. Онкоурология. 2010; 1: 14-18.*
11. Мартов А.Г., Ергаков Д.В., Андронов А.С. и др. Рецидивирование мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря: возможные эндоскопические пути решения проблемы. *Онкоурология. 2010; 1: 4-11.*
12. Pavlova T. *Scanning microscopy and diagnostic test of cancer of organs of urinary system. Virchows Archiv. 2015; Vol. 467. № 1: P. 233*