

УДК 611.611:616.61-006

**ПЕРИТУМОРОЗНАЯ ЗОНА РАКА ПОЧКИ:
ВСЕ ЛИ ПРОБЛЕМЫ РЕШЕНЫ?**

**¹Черданцева Т.М., ^{1,2}Бобров И.П., ¹Климачев В.В., ¹Брюханов В.М., ²Лазарев А.Ф.,
²Авдалян А.М., ¹Таранина Т.С., ¹Гервальд В.Я.**

¹ГОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет»;

²Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Барнаул, e-mail: drakon@agmu.ru

В работе исследуется проблема ренальной интра tubулярной неоплазии (РИН) при раке почки. Материалом для исследования послужил операционный материал 42 больных раком почки. Средний возраст пациентов составил $57,4 \pm 1,4$ года. Мужчин было 25 (59,5%), женщин – 17. С помощью гистологического, микроспектрофотометрического и иммуногистохимического методов была исследована морфо-функциональная характеристика эпителия канальцев в перитуморозной зоне (ПЗ) рака почки. Показано, что в ПЗ опухолей высокой степени злокачественности проявление РИН встречалось чаще, чем при опухолях низких степеней анаплазии. В опухолях высокой степени анаплазии в эпителии канальцев ПЗ отмечали увеличение ядер, плоидности, активности AgNOR и более высокую иммуногистохимическую экспрессию маркеров Ki-67, bcl-2 и p53. Данные изменения канальцевого эпителия ПЗ при раке почки следует учитывать при органосохраняющих операциях.

Ключевые слова: рак почки, перитуморозная зона, ренальная интра tubулярная неоплазия

**THE PERITUMOROUS ZONE OF A RENAL CARCINOMA:
WHETHER ALL PROBLEMS ARE SOLVED?**

**¹Cherdantseva T.M., ^{1,2}Bobrov I.P., ¹Klimachev V.V., ¹Brjuhanov V.M.,
²Lazarev A.F., ²Avdaljan A.M., ¹Taranina T.S., ¹Gervald V.J.**

¹The Altay state of medical university;

²The Altay branch GU «The Russian oncological centre of N.N. Blohina of the Russian Academy of Medical Science, Barnaul, e-mail: drakon@agmu.ru

The problem of renal intraepithelium neoplasia at (RIN) a renal carcinoma was investigated in this work. The object of our work, are the peritumorous zone (PZ) the operative materials of 42 patients with a renal carcinoma. Middle age of patients has made $57,4 \pm 1,4$ years. Men was 25 (59,5%), women – 17 (40,5%). Has been investigated morpho-functional characteristic of epithelium tubular in the peritumorous zone (PZ) of a renal carcinoma by of the histologic, microspectrophotometrical and immunohistochemical methods. Manifestation of RIN in PZ a high-grade tumor met more often, than in low-grade tumor have been shown in research. The increase of nucleuses, ploidy, number AgNORs, expression Ki-67, bcl-2 p53 in epithelium of tubule PZ have been register in group of a high-grade tumor. It's changes in epithelium of PZ should be considered at surgery operations of a renal carcinoma at keep organ.

Keywords: renal carcinoma, peritumorous zone, renal intratubular neoplasia

При исследовании перитуморозной зоны (ПЗ) почечно-клеточного рака (ПКР) перед морфологом встает ряд нерешенных проблем и прежде всего – это проблема ренальной интра tubулярной неоплазии (РИН).

Проблема предраковых изменений относительно ПКР остается малоизученной [2, 9]. Одним из первых сообщений о наличии морфологических изменений в tubулярном эпителии в виде гиперплазии извитых канальцев и их отношение к ПКР принадлежит Prinke A. (1936). Данные изменения автор рассматривал как компенсаторные по периферии рубца. Использование термина «дисплазия эпителия канальцев» принадлежит Warter R. (1983). В 1994 г. Mourad W. и соавт. впервые описали зоны интра tubулярной эпителиальной дисплазии при в ПЗ при ПКР, преимущественно в корковом слое, которые выявлялись более чем в 25 % случаев. В последующей работе данные авторы выявили такие зоны уже в 54 % случа-

ев. Yoryucoglu K. и соавт. (1999) описали подобные изменения у 14 из 62 больных ПКР (23%), причем в трех случаях – в виде карциномы in situ (5%). Зоны пролиферации и дисплазии эпителия сосочковых протоков, связанные с развитием рака собирательных протоков, впервые были описали Fleming S. и Lewi H. (1986), а также Kennedy S. [7].

В 2000 г. группой европейских патологов для обозначения указанных изменений был предложен термин – RIN-ренальная интра tubулярная неоплазия. Последняя представлена в виде зон обычно расположенных недалеко от опухолевого узла и нередко в ассоциации с явлениями нефросклероза. Эпителиальные клетки в таких зонах варьируются в размере, и их ядра увеличены [3].

В литературе имеется небольшое количество работ, посвященных иммуногистохимическому исследованию РИН. Так, показано, что позитивная корреляцион-

ная связь между показателями экспрессии PCNA, K-ras и c-erb-B-2 в опухолевой ткани и очагах РИН является веским аргументом в пользу предракового характера РИН [4, 8].

Целью исследования стало иммуногистохимическое выявление уровня экспрессии маркеров Ki-67, Vcl-2 и p53 в эпителии канальцев ПЗ рака почки.

Материал и методы исследования

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; 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, TлюбаяN2M1, TлюбаяNлюбаяM1) – 11 (26,2%). Степень злокачественности клеток опухоли оценивали по Fuhrman S.A. и соавт. (1982) [6]. 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.

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, низкими значениями AgNORs (≤ 5 AgNOs) 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, высокими значениями AgNORs (> 5 AgNORs) и наличием метастазов.

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 Гизон и на эластические волокна резорцин-фуксином по Вейгерту.

Активность аргирофильных белков, ассоциированных с областью ядрышкового организатора (AgNOR), выявляли с помощью реакции по Daskal Y. et al [5], в нашей модификации [1].

Морфометрические и микроспектрофотометрические 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 (2с) и использовали в качестве стандарта. Для получения стандарта в каждом срезе оценивали 25–30 лимфоцитов. Затем в исследуемых эпителиальных клетках

высчитывали содержание генетического материала в единицах пloidности (с).

Уровень экспрессии молекулярно-биологических маркеров p53 (клон DO-7, «ДАКО»), Vcl-2 (клон 124, «ДАКО») и Ki-67 (клон MIB-1, «ДАКО») определяли при помощи иммуногистохимического метода по рекомендованным производителем протоколам.

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.

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 варьировалась, например от + (1 балл) до ++ (2 балла), получали среднее – 1,5 балла. Когда выявляли равномерное окрашивание цитоплазмы всех клеток, тогда цифра, характеризующая интенсивность окрашивания, была круглой: + (1), ++ (2), +++ (3) или ++++ (4 балла).

Интенсивность ИГХ – окрашивания p53 оценивалась как негативная (нет окрашивания), слабо позитивная ($< 5\%$ окрашенных клеток), умеренно позитивная ($> 5\%$ средней интенсивности окраски) и сильно позитивная ($> 5\%$ высокой интенсивности окраски).

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 $W = 0,89$, $p < 0,01$), то применяли тест Колмогорова – Смирнова или U-тест Манна – Уитни. Данные считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

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

В ПЗ I группы больных элементы канальцевого эпителия встречались в небольшом количестве. Они мало отличались от канальцев неизменного эпителия почки. Площадь ядра клеток в среднем составила $37,9 \pm 2,0$ мкм². Число AgNORs составило $2,25 \pm 0,22$ на 1 ядро. При микроспектрофотометрическом исследовании в клетках эпителия канальцев содержание ДНК составило $3,9 \pm 0,2$, что может говорить о ги-

перпластических и пролиферативных процессах, происходящих в эпителии.

Биологические и клиничко-анатомические параметры опухолей в группах исследования ($M \pm m$)

Параметры опухолей	Группы пациентов	
	I группа	II группа
Плоидность ядра (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)	$7 \leq$	> 7
Степень анаплазии по Фурману (G)	I, II	III, IV
Наличие метастазов	N-	N+

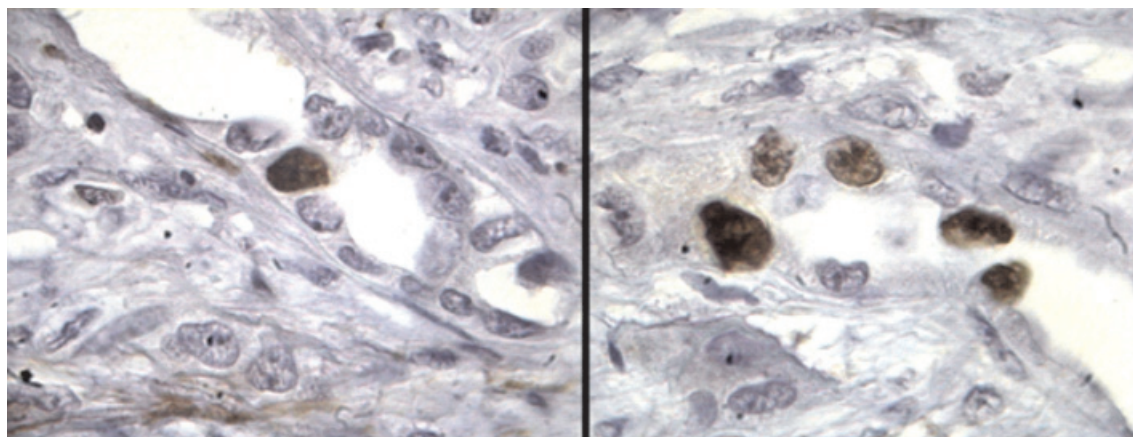
Примечание: * – $P < 0,05$.

В ПЗ II группы больных, в большем количестве отмечались элементы канальцевого аппарата почки. Канальцы были замурованы в плотной склерозированной и гиалинизированной соединительной ткани с выраженным эластозом и содержали

небольшое число клеточных элементов. Клетки нефротелия имели признаки атипизма: полиморфизм, гиперхромия ядра и увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения. Средняя площадь ядра составила $54,2 \pm 5,3$ мкм². Число AgNORs в ядрах клеток достигало $5,15 \pm 0,35$ на 1 ядро. Во второй группе пациентов было обнаружено увеличение среднего содержания ДНК до $5,5 \pm 0,2$, что свидетельствует о тяжелой дисплазии.

Нами было проведено сравнение степени экспрессии Ki-67; p53; bcl-2 в обеих группах.

В неизменной 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 неизменном эпителии I группы больных ИМ Ki-67 составил $1,0 \pm 0,4\%$, а во II группе возрастал до $2,9 \pm 1,1\%$. ИМ Ki-67 в эпителии канальцев в ПЗ I группы варьировался в пределах от 0 до 3% и в среднем составил $1,8 \pm 0,5$, а во II группе возрастал до $3,5 \pm 0,9$, пределы колебаний составили от 0 до 8% (рис. 1. а, б).



а

б

Рис. 1. ИМ Ki-67 в эпителии канальцев ПЗ в группах исследования: а – низкий ИМ Ki-67 в эпителии канальцев ПЗ в I группе исследования; б – высокий ИМ Ki-67 в эпителии канальцев ПЗ во II группе исследования. ИГХ окрашивание. Увеличение $\times 1000$

При исследовании экспрессии белка-супрессора апоптоза bcl-2 в неизменной ткани почки иммуноокрашивание маркера обнаруживали во всех случаях, ее интенсивность в среднем составила $1,8 \pm 0,1$ баллов. Результаты иммуноокрашивания bcl-2 в цитоплазме клеток эпителия канальцев ПЗ в I группе больных были отрицательными (0 баллов) или интенсивность окраски была слабой (1 балл), а в ПЗ II группы экспрессия маркера в эпителии во всех

случаях была интенсивной (3 и 4 балла) (рис. 2. а, б).

При исследовании экспрессии гена-активатора апоптоза p53 в неизменной ткани почки иммуноокрашивание маркера обнаруживали p53 во всех случаях, слабо позитивное окрашивание отмечали в 86,96% случаев и умеренно позитивное в 13,04% случаев. Иммуноокрашивание ядер клеток эпителия канальцев ПЗ на p53 в I группе пациентов в 9,1% случаев было

негативным, в 72,7% слабо позитивным, в 9,1% умеренно позитивным и в 9,1% сильно позитивным. Во II группе исследования негативной реакции отмечено не

было, слабо позитивное окрашивание отмечалось в 27,2% случаев, умеренно позитивное в 36,4% и сильно позитивное в 36,4% (рис. 3. а, б).

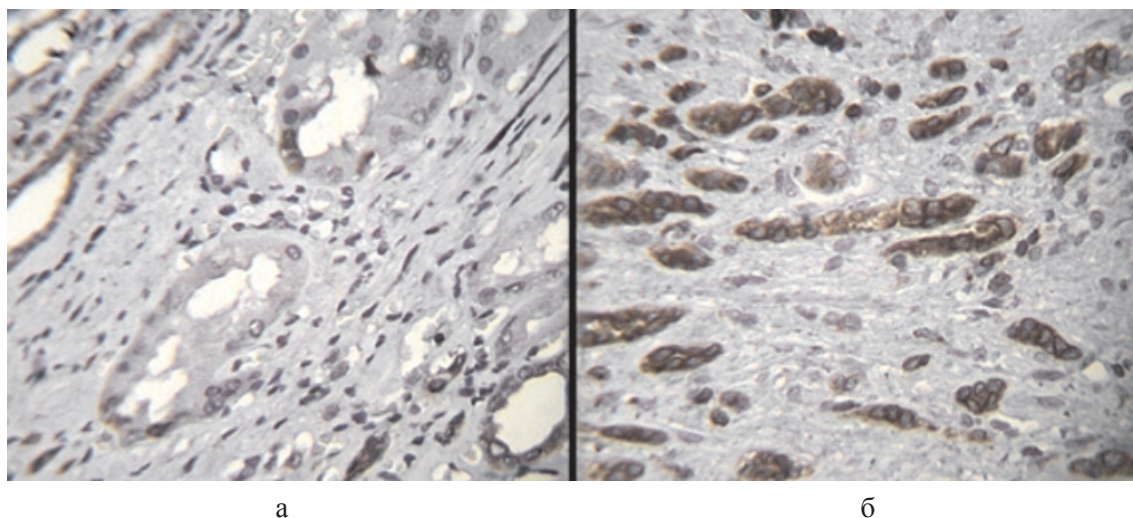


Рис. 2. Иммуноокрашивание *bcl-2* в эпителии канальцев ПЗ в группах исследования: а – отрицательное и слабое иммуноокрашивание на *bcl-2* эпителиа канальцев ПЗ в I группе исследования; б – умеренное и интенсивное иммуноокрашивание на *bcl-2* эпителиа канальцев ПЗ во II группе исследования. ИГХ окрашивание.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

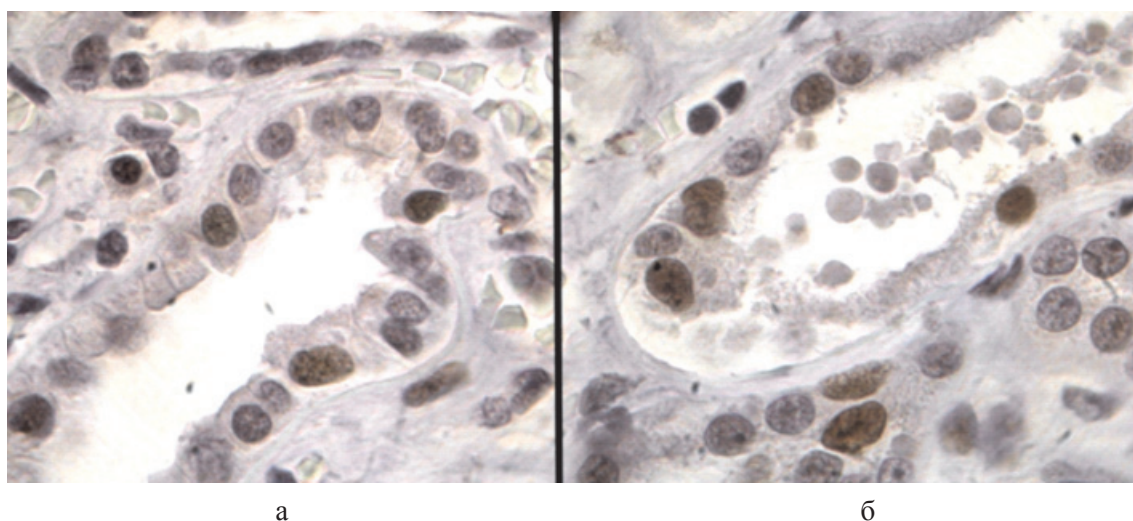


Рис. 3. Иммуноокрашивание на *p53* в эпителии канальцев ПЗ в группах исследования: а – слабая интенсивность иммуноокрашивания *p53* эпителиа канальцев ПЗ в I группе исследования; б – сильная интенсивность иммуноокрашивания *p53* эпителиа канальцев ПЗ во II группе исследования. ИГХ окрашивание. Увеличение $\times 1000$

Заключение

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что процессы пролиферации и апоптоза в ПЗ рака почки зависят, прежде всего, от биологических и клинико-анатомических особенностей опухоли. В ПЗ зонах опухолей высокой степени злокачественности, по сравнению с опухолями низкой степени злокачественности, в эпителии канальцев отмечались возрастание процессов пролиферации (по данным выяв-

ления антигена Ki-67). Также в эпителии канальцев ПЗ таких опухолей было обнаружено увеличение числа AgNORs, что говорит о возрастании скорости пролиферации. В ПЗ опухолей высокой степени злокачественности в эпителии канальцев в большей мере отмечали экспрессию активатора апоптоза *p53*, что, скорее всего, говорит о мутации гена *p53* и его активации в условиях гипоксии на фоне склеротических процессов, происходящих в ПЗ. Исследование белка супрессора-

апоптоза bcl-2 в ПЗ опухолей высоких степеней анаплазии показало высокую степень его экспрессии. Данный факт может свидетельствовать о блокаде апоптоза в патологически измененных клетках, что способствует их выживанию и размножению. Таким образом, найденные изменения, происходящие в эпителии канальцев ПЗ рака почки, можно отнести к проявлениям ренальной интратубулярной неоплазии, степень которой зависит от особенностей неоплазии.

Список литературы

1. Модификация гистохимического метода выявления ядерных организаторов на гистологических срезах / И.П. Бобров, А.М. Авдальян, В.В. Климачев и др. // Архив патологии. – 2010. – Т. 72, №3. – С. 35–37.
2. Непомнящий В.М. Ренальная интратубулярная неоплазия – предрак? / В.М. Непомнящий, А.М. Романенко, Р.О. Данилец // Материалы 1 конгресса Российского общества онкоурологов. (Москва 4–5 октября, 2006). – М., 2006. – С. 156–157.
3. Романенко А.М. Иммуногистохимическая диагностика опухолей почек // Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / под. ред. С.В. Петрова и Н.Т. Райхлина. – Титул, 2004. – С. 93–97.
4. Романенко А.М. Реальная интратубулярная неоплазия как предрак почки / А.М. Романенко, А.М. Возианов, В.М. Непомнящий и др. // Урология. – 2003. – №4. – С. 4–9.
5. Daskal Y. Evidence from studies on segregated that nucleolar silver proteins C23 and B23 are in fibrillar components / Y. Daskal, K. Smetana, H. Buch // Exp. Cell. Res. – 1980. – Vol. 127. – P. 285–291.
6. Fuhrman S.A. Prognostic significance of morfologic parameters in renal cell carcinoma / S.A. Fuhrma, Lasky., L.C. Limas // Am. J. Surg. Pathol. – 1982. – Vol.6. – P. 655–663.
7. Kennedy S. Collecting duct carcinoma of the kidney / S. Kennedy, M. Merino, W. Lineham // Hum. Pathol. – 1990. – Vol. 21. – P. 449–453.
8. Mourad W.A. Dysplastic tubular epithelium in «normal» kidney associated with renal cell carcinoma / W.A. Mourad, B.R. Nestok, G.Y. Saleg // American Jornal Surgical Pathology. – 1994. – Vol.18. – P. 1117–1124.
9. Yorukoglu O.K. Tubular dysplasia and carcinoma in situ: precursor of renal cell carcinoma / O.K. Yorukoglu, S. Aktas, S.U. Mungan // Urol. – 1999. – Vol.53. – P. 684–689.

References

1. Bobrov I.P., A.M. Avdaljan A.M., Klimachev V.V. *Zhurnal Arhiv patologii* – Magazine pathology archive, 2010, Vol. 72, no. 3, pp. 35–37.
2. Nepomnjawij V.M., Romanenko A.M., Danilec R.O. *Materialy 1 kongressa Rossijskogo obwestva onkourologov*. [Materials of 1 congress of the Russian society oncurology]. Moscow, 2006, pp. 156–157.
3. Romanenko A.M. *Immunogistohimicheskaja diagnostika opuholej pochek. (Rukovodstvo po immunogistohimicheskaj diagnostike opuholej cheloveka. Pod. Red. S.V. Petrova i N.T. Rajhlina)*. [Manual immunohistochemical diagnosis of human tumors]. Titul, 2004, pp. 93–97.
4. Romanenko A.M., Vozianov A.M., Nepomnjawij V.M. i dr. *Urologija*, Urology, 2003, no. 4, pp. 4–9.
5. Daskal Y. Evidence from studies on segregated that nucleolar silver proteins C23 and B23 are in fibrillar components / Y. Daskal, K. Smetana, H. Buch // Exp. Cell. Res. 1980. Vol. 127. pp. 285–291.
6. Fuhrman S.A. Prognostic significance of morfologic parameters in renal cell carcinoma/ S.A. Fuhrma, Lasky., L.C. Limas // Am. J. Surg. Pathol. 1982. Vol.6. pp. 655–663.
7. Kennedy S. Collecting duct carcinoma of the kidney / S. Kennedy, M. Merino, W. Lineham // Hum. Pathol. 1990. Vol. 21. pp. 449–453.
8. Mourad W.A. Dysplastic tubular epithelium in «normal» kidney associated with renal cell carcinoma / W.A. Mourad, B.R. Nestok, G.Y. Saleg // American Jornal Surgical Pathology. 1994. Vol. 18. pp. 1117–1124.
9. Yorukoglu O.K. Tubular dysplasia and carcinoma in situ: precursor of renal cell carcinoma / O.K. Yorukoglu, S. Aktas, S.U. Mungan // Urol. 1999. Vol. 53. pp. 684–689.

Рецензенты:

Калачев Г.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой анатомии, физиологии и валеологии ГОУ ВПО «Алтайская государственная педагогическая академия», г. Барнаул.

Высоцкий Ю.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой нормальной анатомии человека ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» г. Барнаул.

Работа поступила в редакцию 06.02.2012.