

ЗНАЧИМОСТЬ ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ОПУХОЛЕВЫХ ОЧАГОВ У БОЛЬНЫХ НЕМЫШЕЧНО-ИНВАЗИВНЫМ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

УДК 616.62.001.6-006-074

Поступила 13.03.2012 г.



Л.А. Державец, к.б.н., зав. клинико-диагностической лабораторией

Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, Минск, Республика Беларусь, 223040, Минский район, пос. Лесной-2

Цель исследования — оценка значимости лабораторных показателей для определения количества опухолевых очагов у больных немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря.

Материалы и методы. Современными лабораторными методами (иммуноферментным, иммунотурбидиметрическим, спектрофлуориметрическим, озонирования, электронной парамагнитно-резонансной спектроскопии) проведено исследование опухолевых маркеров, факторов роста, ангиогенеза, межклеточной адгезии и повреждения эндотелия, продуктов воспаления и окислительной модификации белков и липидов в биологических жидкостях (сыворотка и плазма крови, моча) у 552 больных немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря, лечившихся в 2002–2010 гг. в РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова (Республика Беларусь). Исследования выполнялись до начала специального лечения. Больные были разделены на две группы в зависимости от количества опухолевых очагов (у 266 пациентов — единичная опухоль, у 286 — множественные опухолевые очаги).

Результаты. Статистический анализ полученных результатов выявил из 27 исследованных параметров четыре показателя (Urinary Bladder Cancer — UBC, Tissue Polypeptide Antigen Specific — TPS, Intercellular Adhesion Molecule — sICAM, Transmembrane HER2-neu ресептор — p185), максимально коррелирующих с количеством опухолевых очагов и минимально — между собой, и позволил создать на их основе два регрессионных уравнения, которые дают возможность определять с чувствительностью 81–84% наличие множественных опухолевых очагов у больных немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря еще на дооперационном этапе. Это позволяет клиницистам своевременно провести дополнительное углубленное обследование пациента (фотодинамическая диагностика) с целью выявления мультифокального роста опухоли.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, опухолевые очаги, лабораторные показатели, биологические жидкости.

English

The significance of laboratory indices to determine the number of lesions in patients with non-muscle invasive urinary bladder cancer

L.A. Derzhavets, PhD, Head of Clinicodiagnostic Laboratory

Republic Scientific Practical Centre of Oncology and Medical Radiology named after N.N. Alexandrov, Lesnoy village-2, Minsky district, Minsk, Republic of Belarus, 223040

The aim of the investigation is to estimate laboratory indices to determine the number of lesions in patients with non-muscle invasive urinary bladder cancer.

Materials and methods. There were studied 552 patients with non-muscle invasive urinary bladder cancer, who had been treated in Republic Scientific Practical Centre of Oncology and Medical Radiology named after N.N. Alexandrov in 2002–2010 (Republic of Belarus). Modern laboratory techniques (immunoenzyme, immunoturbidity method, spectrofluorometry, ozonation, electron paramagnetic resonance spectrometry) were used to study tumour markers, growth factors, angiogenesis, cell-cell adhesion, endothelial damage, the products of inflammation and oxidative modifications of proteins and lipids in biological fluids (blood serum and plasma, urine). The investigation had been carried out before special treatment was started. The patients were divided into two groups depending on the number of lesions (266 patients with a single mass lesion, and 286 — with multiple mass lesions).

Results. Statistical analysis of the data obtained enabled to reveal four indices from 27 studied parameters (Urinary Bladder Cancer — UBC, Tissue Polypeptide Antigen Specific — TPS, Intercellular Adhesion Molecule — sICAM, Transmembrane HER2-neu ресептор — p185) correlating

Для контактов: Державец Лилия Александровна, тел. раб. +375(17)265-38-52, тел. моб. +375 29-629-81-83; e-mail: L-Derzhavets@mail.ru

maximally with the number of lesions and minimally — among themselves, and form two regression equations on their basis. The equations make it possible to determine the presence of multiple mass lesions in patients with non-muscle invasive urinary bladder cancer preoperatively, the sensitivity of equations being 81–84%. Thus, clinicians can carry out an additional thorough examination of a patient (photodynamic diagnosis) in due time in order to reveal multifocal tumour growth.

Key words: urinary bladder cancer, tumour foci, laboratory indices, biological fluids.

Среди опухолей мочеполовой системы большую часть составляет немышечно-инвазивный рак мочевого пузыря (РМП). Результаты его лечения напрямую зависят от ранней диагностики. Ведущую роль в диагностике опухолей мочевого пузыря на сегодняшний день занимает цистоскопия с биопсией (предпочтительнее в сочетании с трансуретральной резекцией), позволяющая оценить количество, локализацию, размеры, характер роста новообразования. Цистоскопия также обязательно используется в послеоперационном наблюдении за больными [1]. Однако этот метод наряду с преимуществами имеет и ряд недостатков, среди которых на первом месте стоят неудобство для больного, вероятность осложнений, в первую очередь инфекции. Кроме того, при немышечно-инвазивном РМП (T_a , T_1 , T_{is}) одну из наиболее серьезных проблем представляет невозможность визуализировать все имеющиеся опухолевые очаги при цистоскопии. По данным литературы, такие диагностические ошибки могут достигать 30–40% [2]. Решение этой проблемы возможно при внедрении в клиническую практику метода фотодинамической диагностики РМП [3]. Однако такое исследование довольно дорогостоящее, трудоемкое, требует специального оборудования, поэтому его проведение каждому пациенту с подозрением на рак мочевого пузыря нецелесообразно [4]. В последние годы активно ведется поиск различных клинико-биохимических, молекулярно-биологических маркеров, позволяющих прогнозировать наличие или отсутствие множественных опухолевых очагов, а также дающих возможность отказаться от цистоскопии в послеоперационном периоде в пользу менее инвазивных лабораторных исследований крови и мочи. В течение последних 10 лет в отечественной и зарубежной литературе появляются работы по изучению информативности некоторых биохимических показателей, опухолевых маркеров, цитокинов для диагностики и мониторинга РМП [5–9].

Цель исследования — оценка значимости лабораторных показателей для определения количества опухолевых очагов у больных немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря.

Материалы и методы. Исследовали сыворотку, плазму крови и мочу 552 больных (497 мужчин и 55 женщин) с диагнозом немышечно-инвазивного РМП, получавших лечение в отделении онкоурологической патологии Республиканского НПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова (Республика Беларусь) в 2002–2010 гг. Возраст больных варьировал от 30 до 85 лет, большинство относилось к возрастной категории старше 60 лет. Диагноз РМП установлен на основании рентгенологических, эндоскопических, клинических методов исследования с обязательной морфологической верификацией. Больные

были разделены на две группы в зависимости от количества опухолевых очагов: 1-я группа ($n=266$) — обнаружена единичная опухоль, 2-я группа ($n=286$) — выявлены множественные опухолевые очаги.

У всех обследованных больных до начала специализированного лечения проводилось определение в биологических жидкостях концентрации опухолевых маркеров: Nuclear Matrix Protein 22 (NMP-22), Bladder Tumor Antigen (BTA), Tissue Polypeptide Antigen (TPA), Tissue Polypeptide Antigen Specific (TPS), Cytokeratin Fragment 19 (Cyfra 21-1), Urinary Bladder Cancer (UBC), раково-эмбрионального антигена (РЭА), тимидинкиназы (ТК); факторов роста, ангиогенеза, межклеточной адгезии и растворимых форм их рецепторов: Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Epidermal Growth Factor (EGF), Intercellular Adhesion Molecule (sICAM), Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (sPECAM), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Tumor Necrosis Factor Receptor (p55), Transmembrane HER2-neu receptor (p185); факторов повреждения эндотелия: эндостатин, фактор Виллебранда, гомоцистеин; продуктов воспаления: С-реактивный белок (СРБ), анти-трипсин, интерлейкин-8 (ИЛ-8); продуктов окислительной модификации белков и липидов: двойные связи липидной фракции крови (ДС), малоновый диальдегид (МДА), нитрозодиметиламины, ЭПР-параметр α .

Определение VEGF, FGF, sICAM, sPECAM, эндостатина, гомоцистеина, TPA, TPS, ТК в сыворотке крови, UBC, NMP-22, BTA в моче осуществляли методом иммуноферментного анализа на автоматических анализаторах Alisei (Seac, Италия) и Elecsys 2010 (Roche, Швейцария) с использованием наборов реагентов производства фирм BioSource (Бельгия), R&D Systems (США), BenderMedSystems (Австрия), DRG (США), Roche (Швейцария). Иммунотурбидиметрическим методом исследовали уровень фактора Виллебранда в плазме крови на анализаторе гемостаза STA Compact (Diagnostica Stago, Франция), определяли концентрацию в сыворотке крови СРБ и анти-трипсина на автоматическом анализаторе Hitachi-912 Roche (Швейцария). Спектрофлуориметрическим методом с использованием флуоресцентного спектрофотометра Hitachi-MPF-4 Roche (Швейцария) исследовано содержание МДА в крови; определение ДС осуществляли методом озонирования с помощью анализатора «АММО» (Россия), ЭПР-параметра α — методом спиновой ЭПР-спектрометрии на анализаторе EPRA-9300 (ф. «АДАНИ», Беларусь).

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 StatSoft и включала проверку нормальности распределения количественных показателей в выборке с использованием критерия Шапиро–Уилка. Количес-

венные значения показателей, не подчинявшихся нормальному закону распределения, описывались в виде медианно-квартильных характеристик: медианы, 25-го и 75-го процентилей (Me [25; 75]), минимального и максимального значений (min-max). При изучении статистических различий исследуемых показателей использовали критерий Манна-Уитни, для анализа взаимосвязи между исследуемыми показателями — непараметрический корреляционный анализ Спирмена. В качестве критерия статистической значимости

принимали $p < 0,05$. С целью оценки значимости лабораторных показателей для определения количества опухолевых очагов использовали логистическую регрессию и ROC-анализ.

Результаты и обсуждение. Статистическая обработка полученных результатов исследования выявила в группах больных с единичными и множественными опухолевыми очагами статистически значимые различия 17 из 27 изученных лабораторных параметров (табл. 1).

Таблица 1

Содержание исследуемых лабораторных показателей в биологических жидкостях больных немышечно-инвазивным РМП

Показатель	Группы сравнения	Статистические параметры			
		n	Me (25%; 75%)	min-max	p
UBC, мкг/мл	1-я	266	18,5 [15,3; 23,5]	4,4–190,9	<0,0001
	2-я	286	23,7 [18,8; 27,9]	3,7–196,8	
TPS, МЕ/мл	1-я	264	97,45 [89,5; 101,4]	64,0–126,0	<0,0001
	2-я	286	101,0 [95,5; 105,0]	11,8–130,0	
TPA, МЕ/мл	1-я	264	131,0 [127,0; 140,0]	93,0–162,0	<0,0001
	2-я	286	134,0 [129,4; 142,0]	99,0–162,0	
Cyfra 21-1, нг/мл	1-я	266	2,10 [1,68; 2,40]	0,42–4,90	<0,0001
	2-я	285	2,30 [1,90; 2,70]	0,52–8,20	
BTA, ЕД/мл	1-я	266	13,7 [8,70; 19,60]	2,4–500,0	<0,0001
	2-я	286	16,4 [10,60; 28,00]	0,5–500,0	
NMP-22, ЕД/мл	1-я	262	22,25 [16,7; 33,4]	9,1–112,0	<0,0006
	2-я	283	29,40 [19,00; 36,60]	9,2–112,0	
VEGF, пг/мл	1-я	265	258,30 [214,00; 315,80]	54,2–975,1	<0,0001
	2-я	285	296,50 [235,80; 376,80]	34,8–1265,6	
sICAM, нг/мл	1-я	264	122,80 [116,00; 138,00]	76,8–456,0	<0,0001
	2-я	282	131,35 [120,00; 146,00]	15,0–410,0	
sPECAM, нг/мл	1-я	264	102,80 [95,45; 113,85]	65,0–220,0	0,0006
	2-я	282	109,00 [98,50; 116,80]	47,3–210,0	
TNF- α , пг/мл	1-я	263	9,78 [5,92; 13,93]	1,41–64,80	<0,0001
	2-я	281	12,40 [8,64; 24,54]	1,02–45,32	
p55, нг/мл	1-я	261	3,30 [2,40; 4,70]	1,0–18,0	<0,0001
	2-я	272	4,15 [2,80; 5,40]	1,5–11,8	
EGF, нг/мл	1-я	257	21,60 [18,60; 27,40]	5,5–200,5	0,0005
	2-я	270	24,70 [19,50; 31,70]	9,8–152,8	
p185, нг/мл	1-я	255	4,43 [3,70; 5,90]	2,8–12,5	<0,0001
	2-я	263	5,70 [4,30; 7,00]	0,5–11,6	
FGF, пг/мл	1-я	262	132,00 [112,40; 155,60]	19,10–348,14	<0,0001
	2-я	277	143,60 [122,70; 198,00]	16,68–423,5	
ИЛ-8, пг/мл	1-я	165	23,90 [18,40; 33,90]	11,2–112,3	0,0076
	2-я	176	29,40 [920,10; 45; 65]	11,7–98,4	
Антитрипсин, г/л	1-я	258	1,20 [1,00; 1,40]	0,8–2,4	<0,0001
	2-я	281	1,30 [1,10; 1,50]	0,7–2,8	
СРБ, мг/дл	1-я	263	0,55 [0,45; 0,70]	0,1–7,0	<0,0001
	2-я	285	0,65 [0,52; 0,80]	0,1–4,2	

Непараметрический корреляционный анализ Спирмена показал, что с количеством опухолевых очагов умеренно коррелируют ($R=0,35-0,55$; $p<0,05$) следующие показатели: UBC, TPS, p185, TPA, sICAM, CPB, p55, FGF, TNF- α . Анализ чувствительности и специфичности вышеперечисленных показателей проводили с учетом построения характеристических ROC-кривых и определения площади под кривой AUC (Area Under Curve). По полученным данным (табл. 2) установили, что ни один из исследованных показателей не обладает достаточной чувствительностью и специфичностью для определения количества опухолевых очагов у больных немышечно-инвазивным РМП (чувствительность $<75\%$, специфичность $<65\%$).

Для повышения эффективности прогнозирования наличия или отсутствия множественных опухолевых очагов разработана статистическая модель в виде регрессионных уравнений. Для построения ее исследовали корреляционные связи между анализируемыми показателями по Спирмену. При значении коэффициента корреляции $R>0,5$ связь считали сильной, что требовало исключения из анализа одного показателя из пары. Обнаружена сильная корреляционная связь в парах: UBC–CPB; UBC–FGF; p185–p55; TPS–TPA; sICAM–TNF- α . Из анализа исключены TPA, CPB, p55, FGF, TNF- α . В регрессионные уравнения включены показатели, минимально коррелирующие между собой: UBC–p185 ($R=0,25$; $p=0,028$); TPS–sICAM ($R=0,25$; $p=0,026$) — и на их основе построены два регрессион-

ных уравнения, по которым осуществляли прогнозирование наличия множественных опухолевых очагов у больных немышечно-инвазивным РМП (табл. 3).

При использовании регрессионного уравнения Z_1 следует определить концентрацию опухолевого маркера UBC в моче и p185 — в сыворотке крови больных РМП и ввести их значения в уравнение Z_1 . При использовании регрессионного уравнения Z_2 следует определить концентрацию TPS и sICAM в сыворотке крови больных РМП и решить уравнение Z_2 .

Сопоставление результатов, полученных с использованием разработанных регрессионных уравнений, с данными гистологических исследований и клиники проводилось при переклассификации обучающей выборки (552 больных раком мочевого пузыря). Для полученных значений Z_1 и Z_2 был проведен ROC-анализ.

При использовании регрессионного уравнения Z_1 240 больных из 286 (84%) были правильно отнесены к группе с множественными опухолевыми очагами, 165 больных из 266 (62%) были правильно отнесены к группе с единичным опухолевым очагом. Таким образом, чувствительность метода составила 84%, специфичность — 62%. AUC для Z_1 составила $0,72\pm 0,02$, $p<0,0001$; точка отсечения — 0,42.

При использовании регрессионного уравнения Z_2 232 больных из 286 (81%) были правильно отнесены к группе с множественными опухолевыми очагами, 146 больных из 266 (55%) были правильно отнесены к группе с единичным опухолевым очагом. Таким об-

Таблица 2
Характеристики ROC-кривых исследуемых показателей

Показатель	Чувствительность, %	Специфичность, %	Точка отсечения в единицах измерения	AUC	p
UBC, мкг/мл	73,8	59,0	19,3	$0,68\pm 0,02$	$<0,0001$
TPS, МЕ/мл	71,0	49,6	97,1	$0,64\pm 0,02$	$<0,0001$
p185, нг/мл	68,8	52,9	4,6	$0,64\pm 0,02$	$<0,0001$
TPA, МЕ/мл	68,2	49,6	130,9	$0,62\pm 0,02$	$<0,0001$
sICAM, нг/мл	68,1	51,9	123,9	$0,61\pm 0,02$	$<0,0001$
CPB, мг/дл	65,3	53,2	0,6	$0,61\pm 0,02$	$<0,0001$
p55, нг/мл	64,0	54,4	3,4	$0,62\pm 0,02$	$<0,0001$
FGF, пг/мл	63,9	51,5	132,0	$0,60\pm 0,02$	$<0,0001$
TNF- α , пг/мл	62,3	60,8	10,7	$0,62\pm 0,02$	$<0,0001$

Таблица 3
Прогнозирование наличия множественных опухолевых очагов у больных РМП с помощью логистических регрессионных уравнений

Показатель	Регрессионное уравнение	Статистическая значимость модели p
UBC, мкг/л, p185, нг/мл	$Z_1 = \exp [-2,1779+(0,215678)\times p185+(0,046401)\times UBC] / (1+\exp [-2,1779+(0,215678)\times p185+(0,046401)\times UBC])$	$<0,00001$
sICAM, нг/мл, TPS, МЕ/мл	$Z_2 = \exp [-4,3158+(0,004084)\times sICAM+(0,039214)\times TPS] / (1+\exp [-4,3158+(0,004084)\times sICAM+(0,039214)\times TPS])$	$<0,00001$

Примечания: Z — вероятность определения множественных опухолевых очагов (выражается в значащих цифрах от 0 до 1); exp — постоянная величина, равная 2,71.

разом, чувствительность метода составила 81%, специфичность — 55%. Для Z_2 AUC составила $0,69 \pm 0,02$, $p < 0,0001$; точка отсечения — 0,47.

Таким образом, при значении $Z_1 > 0,42$ или $Z_2 > 0,47$ можно говорить о наличии у больных РМП множественных опухолевых очагов. При значении $Z_1 < 0,42$ или $Z_2 < 0,47$ можно говорить о наличии у больного РМП единичного опухолевого очага.

Заключение. Статистический анализ результатов проведенного современными методами исследования широкого спектра лабораторных показателей в биологических жидкостях больных немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря с целью оценки их значимости для определения количества опухолевых очагов выявил четыре показателя, максимально коррелирующих с количеством опухолевых очагов и минимально — между собой, и позволил создать на их основе два регрессионных уравнения, которые дают возможность прогнозировать с чувствительностью 81–84% наличие множественных опухолевых очагов у больных немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря еще на дооперационном этапе. Это позволяет клиницистам своевременно провести дополнительное углубленное обследование пациента (фотодинамическая диагностика) с целью выявления мультифокального роста опухоли, что в конечном итоге дает возможность повысить эффективность трансуретральной резекции немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря, избежать повторных операций, уменьшить длительность пребывания больных в стационаре.

Литература

1. Ролевич А.И., Суконко О.Г., Красный С.А. и др. Роль выполнения повторной трансуретральной резекции в лечении больных раком мочевого пузыря без мышечной инвазии. *Онкоурология* 2010; 1: 59–64.
2. Hall M.C., Chang S.S., Dalbagni G. et al. Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages T_a, T₁ and T_{is}): 2007 update. *J Urol* 2007; 178: 2314–2330.
3. Ягудаев Д.М., Булгакова Н.Н., Сорокатый А.Е. и др. Флюоресцентное детектирование фотосенсибилизатора Ф в опухолях мочевого пузыря. *Урология* 2007; 2: 53–58.
4. Dindyal S., Nitkunan T., Bunce C. The economic benefit of photodynamic diagnosis in non-muscle invasive bladder cancer. *Photodiagnosis Photodin Ther* 2008; 5(2): 153–158.

5. Прохорова В.И., Державец Л.А., Лаппо С.В. и др. Эндогенные факторы риска рака мочевого пузыря. В кн.: *Материалы II конгресса Российского общества онкоурологов*. 4–5 октября 2007. М; 2007.

6. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Любимова Н.В. Биологические маркеры опухолей: методические аспекты и клиническое применение. *Вестник Московского онкологического общества* 2007; 1: 5–7.

7. Глыбочко П.В., Шахпазян Н.К., Понукалин А.Н. и др. Молекулярные маркеры в диагностике мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря. *Клиническая лабораторная диагностика* 2011; 5: 16–20.

8. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Усынин Е.А. и др. Регуляция ангиогенеза при злокачественных новообразованиях почки и мочевого пузыря. *Сибирский онкологический журнал* 2008; 4(28): 65–70.

9. Szarvas T., Jäger T., Droste F. et al. Serum levels of angiogenic factors and their prognostic relevance in bladder cancer. *Pathol Oncol Res* 2008; 9: 228–232.

References

1. Rolevich A.I., Sukonko O.G., Krasnyy S.A. et al. *Onkourologiya — Oncourology* 2010; 1: 59–64.
2. Hall M.C., Chang S.S., Dalbagni G. et al. Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages T_a, T₁ and T_{is}): 2007 update. *J Urol* 2007; 178: 2314–2330.
3. Yagudaev D.M., Bulgakova N.N., Sorokatyy A.E. et al. *Urologiya — Urology* 2007; 2: 53–58.
4. Dindyal S., Nitkunan T., Bunce C. The economic benefit of photodynamic diagnosis in non-muscle invasive bladder cancer. *Photodiagnosis Photodin Ther* 2008; 5(2): 153–158.
5. Prokhorova V.I., Derzhavets L.A., Lappo S.V. et al. Endogenous factors of risk of urinary bladder cancer. In: *The reports of the II Congress of Russian Oncourologists Society*. October, 4-5, 2007]. Moscow; 2007.
6. Kushlinskiy N.E., Gershteyn E.S., Lyubimova N.V. *Vestnik Moskovskogo onkologicheskogo obshchestva — Herald of Moscow oncological society* 2007; 1: 5–7.
7. Glybochko P.V., Shakhpazyan N.K., Ponukalin A.N. et al. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika — Clinical Laboratory Diagnostics* 2011; 5: 16–20.
8. Spirina L.V., Kondakova I.V., Usynin E.A. et al. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal — Siberian Journal of Oncology* 2008; 4(28): 65–70.
9. Szarvas T., Jeger T., Droste F. et al. Serum levels of angiogenic factors and their prognostic relevance in bladder cancer. *Pathol Oncol Res* 2008; 9: 228–232.