

Дуб А. А., Четер И. Р.

Характеристика маркеров клеточного обновления при АМАСР-позитивном фенотипе атипической мелкоацинарной пролиферации и аденокарциномах предстательной железы различной степени градации

ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, кафедра Патологической анатомии и судебной медицины, г. Челябинск

Dub A. A., Cheter I. R.

Cell renewal markers in AMACR-positive phenotype of atypical small acinar proliferation and prostate carcinoma of different grades

Резюме

Исследовано 540 трепан-биоптатов предстательной железы от 90 пациентов, в результате сформировано 6 групп: 1-я – 15 пациентов с аденокарциномой градации Grade group I; 2-я – 15 пациентов с Grade group II; 3-я – 15 мужчин с Grade group III; 4-я – 15 пациентов с Grade group IV; 5-я – 15 пациентов с аденокарциномой градации Grade group V; 6-я – 15 мужчин с атипической мелкоацинарной пролиферацией. Применялись морфологические и статистические методы. Самая высокая митотическая активность эпителиоцитов установлена при аденокарциноме Grade group V [Me = 15% (9-31)]. Самый низкий уровень митотической активности выявлен при атипической мелкоацинарной пролиферации предстательной железы [Me = 3% (1-6)] и Grade group II [Me = 3% (1-6)]. Наибольшее сходство по уровню экспрессии каспазы-3 выявлено при атипической мелкоацинарной пролиферации [Me = 9% (2-18)], аденокарциноме Grade group I [Me=11% (2-18)]. При Grade group V маркер каспазы-3 экспрессирован был ещё значительно слабее [Me = 3% (1-12)].
Ключевые слова: атипическая мелкоацинарная пролиферация предстательной железы, каспазы-3, Ki-67, аденокарцинома

Summary

We took 540 prostate biopsy samples from 90 patients and divided them into six groups: the 1st group consisted of 15 patients with prostate carcinoma of a I Grade; the 2nd group — 15 patients with prostate carcinoma of a II Grade; the 3rd group — 15 patients with carcinoma of a III Grade; 4th group — 15 patients with prostate carcinoma of a IV Grade; 5th — 15 patients with prostate carcinoma of a V Grade; 6th — 15 patients with atypical small acinar proliferation. We used morphological assay and statistical methods to provide comparative analysis of the groups. The highest mitotic activity of epithelial cells was found in patients with adenocarcinoma of a V Grade [Me = 15% (9-31)]. The lowest level of mitotic activity was identified in patients with atypical small acinar proliferation [Me = 3% (1-6)] and II Grade [Me = 3% (1-6)]. The lowest expression of caspase-3 was detected in patients with atypical small acinar proliferation [Me=9% (2-18)] and with carcinoma of a I Grade [Me=11% (2-18)]. The smallest expression of caspase-3 marker was identified in patients with adenocarcinoma of a V Grade [Me = 3% (1-12)].
Key words: atypical small acinar proliferation of prostate, caspase-3, Ki-67, adenocarcinoma

Введение

Молекулярные маркеры, характеризующие процессы пролиферации и апоптоза могут быть особенно важны для проведения дифференциальной диагностики пренеопластических заболеваний и карциномы предстательной железы [1]. В современных международных гистологических классификациях для оценки злокачественного потенциала многих опухолей разработан комплекс прогностических критериев, включающий обычно и количественные показатели клеточной пролиферации. Известно, что темпы роста карциномы определяются,

прежде всего, митотической активностью и выраженностью апоптоза опухолевых клеток, для оценки которых используют индекс пролиферации, митотический и апоптотический индексы [2]. Точное определение параметров клеточного обновления при биопсиях простаты может позволить рассчитывать не только скорость роста опухоли, но и являться одним из дифференциально-диагностических и прогностических критериев [3].

Цель исследования – оценить состояние клеточного обновления эпителиоцитов при АМАСР-позитивном фенотипе атипической мелкоацинарной пролиферации и

аденокарциномах предстательной железы различной степени градации.

Материалы и методы

Был изучен материал, полученный путём тонкоигольной трепан-биопсии из 6 точек предстательной железы от 90 пациентов отделения лучевой диагностики ГБУЗ "Челябинский областной клинический центр онкологии и ядерной медицины" в возрасте 41- 86 (Me = 69) лет за 2012-2013гг. Критерии включения: диагноз аденокарциномы предстательной железы и АМАСР-позитивный фенотип АМАП. Критерии исключения: наличие вторичной злокачественной опухоли предстательной железы; химио- и/или лучевая терапия в анамнезе жизни и/или заболевания, АМАСР-негативный фенотип АМАП.

Морфологическое исследование проводилось согласно рекомендациям руководства Bostwick D. G. и соавт. (2008), классификации опухолей ВОЗ (2016) [4,5]. Морфологическая оценка степени злокачественности осуществлялась по модифицированной шкале Глисона (2014) [6]. В результате исследования сформировано 6 групп: 1-я – 90 биоптатов от 15 пациентов с аденокарциномой Grade group I; 2-я – 90 биоптатов от 15 пациентов с аденокарциномой Grade group II; 3-я – 90 биоптатов от 15 пациентов с аденокарциномой Grade group III; 4-я – 90 биоптатов от 15 пациентов с аденокарциномой Grade group IV; 5-я – 90 биоптатов от 15 пациентов с аденокарциномой Grade group V; 6-я – 90 биоптатов от 15 пациентов с АМАП. Морфологические исследования выполнялись на кафедре Патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО «ЮУГМУ» Минздрава России. Фрагменты тканей фиксировались в растворе нейтрального формалина (10%) в течение суток. Далее обезвоживали, обезжировали и заливали в парафин в гистологическом автомате по принятой методике. Окрашивали гематоксилином и эозином. При иммуногистохимическом исследовании применяли моноклональные антитела к Caspase-3 (СРР32) и Ki-67 (ООО «Биовитрум», г. Санкт-Петербург). Определяли индекс апоптоза (IАПТ) по формуле $IАПТ (\%) = N (\text{число апоптозных ядер}) / N (\text{общее число ядер}) \times 100$ [14]. Индекс Ki-67 вычисляли по количеству ядер, иммунопозитивных к белку Ki-67 на 100 учтенных опухолевых клеток при ув. 400, но так как значения индекса в промиллях получались слишком большими, его для удобства выражали в процентах [14]. При морфометрическом исследовании использовали электронный аналог окулярной стереометрической сетки Г.Г. Автандилова, содержащий 100 тест-точек. Проводили подсчет по 50 полям зрения при увеличении x400. Использовали непараметрические методы статистического исследования, так как распределение отличалось от нормального: применяли медиану и интерквартильный размах, вариационный анализ производили с помощью критерия Манна-Уитни. Просмотр и фотографирование микропрепаратов осуществляли на тринокулярном цифровом микроскопе Levenhuk D607T, 5,1 Мпикс (США). Для расчетов применяли лицензионные программы Microsoft Excel, Statistica 6,0 для операционной системы

Windows XP. Исследование проводилось при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Проект № 16-34-01349.

Результаты и обсуждение

Пролиферативную активность оценивали по экспрессии маркера Ki-67. Характерным являлось наличие метки в виде темно-коричневых гранул различного размера и плотности в ядрах клеток. Наибольшее количество митотически активных клеток с помощью этого маркера регистрировалось при аденокарциноме Grade group V (Рис. 1 - *этой и другие рисунки к статье смотри на специальной цветной вставке журнала - прим. ред.*) [Me = 15% (9-31)] и имело различия со всеми исследовательскими группами: с АМАП [Me = 3% (1-6)] ($p=0,000003$), аденокарциномой Grade group I [Me = 2% (1-9)] ($p=0,000003$), аденокарциномой Grade group II [Me = 3% (1-6)] ($p=0,000003$), аденокарциномой Grade group III [Me = 4% (1-17)] ($p=0,000004$), аденокарциномой Grade group IV [Me = 8% (3-23)] ($p=0,000003$). Самый низкий уровень митотической активности выявлен при АМАП (Рис. 2) и аденокарциноме Grade group II [Me = 3% (1-6)] в сравнение с аденокарциномой Grade group I [Me = 4% (1-9)] ($p=0,000004$), аденокарциномой Grade group III [Me = 4% (1-17)] ($p=0,000002$), аденокарциномой Grade group IV [Me = 8% (3-23)] ($p=0,000003$) и аденокарциномой Grade group V [Me = 15% (9-31)] ($p=0,000003$).

Экспрессия маркера каспазы-3 (СРР32) определялась по наличию метки в ядрах эпителиоцитов в виде различного размера и плотности темно-коричневых гранул, которые располагались, как правило, хаотично. Экспрессия СРР32 в эпителиоцитах обнаруживалась при АМАП (Рис. 3) [Me = 9% (2-18)], аденокарциноме Grade group I (Рис.4) [Me=11% (2-18)], аденокарциноме Grade group II [Me=14% (4-28)] и Grade group III [6% (1-28)] в виде слабого либо умеренного по интенсивности напыления светло-коричневого цвета. Установлен наибольший уровень экспрессии СРР32 при аденокарциноме Grade group II, в сравнение с аденокарциномами других Grade group ($p=0,000007$, $p=0,000003$, $p=0,000003$, $p=0,000003$, соответственно градации). Экспонирование метки маркера СРР32 было представлено в единичных клетках, либо отсутствовало совсем при аденокарциномах Grade group IV [Me = 5% (1-7)] и Grade group V [Me = 3% (1-12)], между ними также выявлены различия и наиболее слабой экспрессии маркера регистрировалась при Grade group V ($p=0,002$).

Согласно литературным данным, индексы пролиферативной активности и активности апоптоза являются важным показателем, характеризующим биологическую природу опухоли [7]. Экспрессию ядерного белка Ki-67, являющегося маркером пролиферативной активности клеток, многие исследователи считают прогностическим фактором для большинства опухолей, включая и карциному предстательной железы [8]. Индекс Ki-67 представляет собой независимый показатель прогноза рецидива и выживаемости у пациентов с карциномой предстательной железы [9]. В исследовании А. А. Костина и соавт.


(2005) отмечено выраженное увеличение пролиферативной активности атипических клеток в высокоинвазивных аденокарциномах Grade group IV и V, что обнаружено и в нашем исследовании. Проллиферативную активность атипических клеток аденокарциномы различных градаций по шкале Глисона, можно считать чувствительным методом для использования в дифференциальной диагностике новообразований простаты [10]. V. Ananthanarayanan et al. в своём исследовании обнаружили снижение уровня СРР32 в очагах простатической интраэпителиальной неоплазии высокой степени. Нормальные железы, по их данным, имели значительно более низкие показатели пролиферации и более высокую экспрессию СРР32 по сравнению с тоже нормальными, но располагающимися вблизи фокусов желез с признаками атипии [1].

Вероятно, большое значение в изменении параметров клеточного обновления имеет и органоспецифичность, и степень дифференцировки, стадия опухолевой прогрессии. Так, в отдельных научных работах, посвящённых изучению процессов обновления в аденокарциномах молочной железы, говорится об одновременном содружественном увеличении экспрессии СРР32 и Ki-67 [12]. В то же время, в своём исследовании В. А. Туманский и соавт. описали слабый уровень экспрессии каспазы-3 опухолевыми клетками и преимущественно умеренный уровень их пролиферации примерно у 47,16% больных гепатоцеллюлярной карциномой [13].

Alaa A. Q. et al., напротив, обнаружили высокую экспрессию каспазы-3 при доброкачественной эпителиальной гиперплазии и в высокодифференцированных карциномах и потерю экспрессии этого маркера в умеренно- и низкодифференцированных карциномах. Также этими авторами определена связь между экспрессией

каспазы-3 и степенью дифференцировки опухоли [11]. Подобные результаты получены и в нашем исследовании в виде параметров апоптоза, превышающих темпы пролиферации при АМАП и карциномах Grade group I и II и прогрессивного снижения индекса апоптоза наряду с увеличением темпов пролиферации при снижении дифференцировки карциномы Grade group IV и особенно Grade group V.

Заключение

Подводя итоги, можно отметить, что индекс пролиферативной и активности и активности апоптоза при АМАСР-положительном фенотипе АМАП имеет определённое сходство с таким пренеопластическим заболеванием, как простатическая интраэпителиальная неоплазия. Но ещё большее сходство по параметрам клеточного обновления проявляется у АМАСР-позитивной АМАП с Grade group I-II. Использование маркеров Ki-67 и каспазы-3 может способствовать установлению определённого диагноза в более ранние сроки, особенно в условиях ограничения биопсийных образцов. Кроме того, параметры клеточного обновления должны обязательно учитываться в качестве потенциального прогностического фактора при пренеопластических процессах и карциномах предстательной железы. 

Дуб А. А., д-р мед. наук, доцент, Четер И. Р., ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, кафедра Патологической анатомии и судебной медицины, г. Челябинск; Автор, ответственный за переписку: Дуб Анжела Алексеевна, 454092, Челябинск, ул. Воровского, 64. e-mail: drow_2390@mail.ru, тел. 8(351)232-01-45, моб. +7-912-4789794.

Литература:

1. Ananthanarayanan V, Deaton R. J., Yang X. J., Pins M. R., Gann P. H. Alteration of proliferation and apoptotic markers in normal and premalignant tissue associated with prostate cancer. *BMC Cancer*. 2006;6:73.
2. Лулиников Е. Ф., Абросимов А. Ю. Гибель клетки (апоптоз). М.: Медицина; 2001. 192 с.
3. Singh S. S., Mehedint D. C., Ford O. H. et al. Comparison of ACINUS, caspase-3, and TUNEL as apoptotic markers in determination of tumor growth rates of clinically localized prostate cancer using image analysis. *Prostate*. 2009;69(15):1603-1610.
7. Летковская Т. А. Иммуногистохимическое исследование пролиферативной активности карцином простаты в материале радикальных простатэктомий. *Медицинский журнал*. 2007;4:75-77.
8. Murphy G. P., Busch C., Abrahamsson P. A. et al. Histopathology of localized prostate cancer. Consensus Conference on Diagnosis and Prognostic Parameters in Localized Prostate Cancer. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl*. 1993;162:7-42.
9. Mitselou A., Ioachim E., Kitsou E. et al. Immunohistochemical study of apoptosis — related bcl-2 protein and its correlation with proliferation indices (Ki-67, PCNA), tumor suppression genes (p53, pRb), the oncogene c-erb-B2, sex steroid hormone receptors and other clinicopathological features, in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *In vivo*. 2003;17:469-78.
10. Костин А. А., Андрюхин М. И., Бабиченко И. И., Пульбере С. А., Мотин П. И., Тальберез П. И. Продукция факторов роста при доброкачественных и злокачественных болезнях предстательной железы. *Вестник РУДН, серия Медицина*. 2015;3:75-83.
11. Alaa A. Q., Nabeel W. R. Procaspase-3 Status in Benign Prostatic Hyperplasia and Carcinoma (A Correlative Retrospective Study). *J Fac Med Baghdad*. 2009;51(3):316-319.
12. Filinte D., Kaymakci D., Mollamemisoglu H., Ugurlu M. U., Kaya H. Ki-67 and caspase expression in breast carcinoma: does variance in locational sampling exist? *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11305-11313.
13. Туманский В. А., Зубко М. Д. Гепатоцеллюлярный рак: иммуногистохимическая характеристика апоптоза и пролиферативной активности клеток. *Morphologia*. 2014;8(3):57-60.

Характеристика маркеров клеточного обновления при АМАСР-позитивном фенотипе атипичной мелкоацинарной пролиферации и аденокарциномах предстательной железы различной степени градации

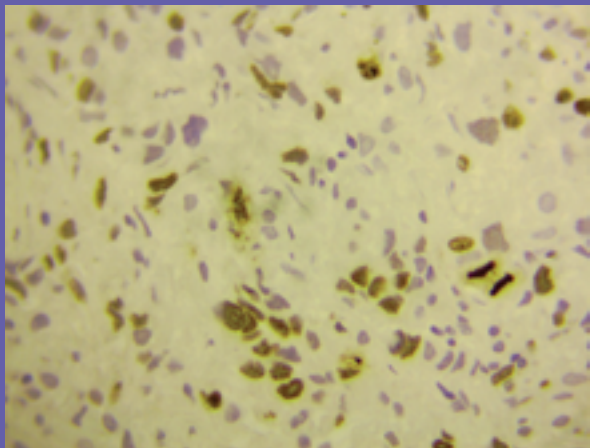


Рис. 1. Экспрессия маркера пролиферации (Ki-67) при аденокарциноме предстательной железы Grade group V. Окраска ядер атипичного железистого эпителия варьирует от светло- до темно-коричневого цвета. Окраска: иммуногистохимический метод – моноклональные антитела к Ki-67 $\times 200$

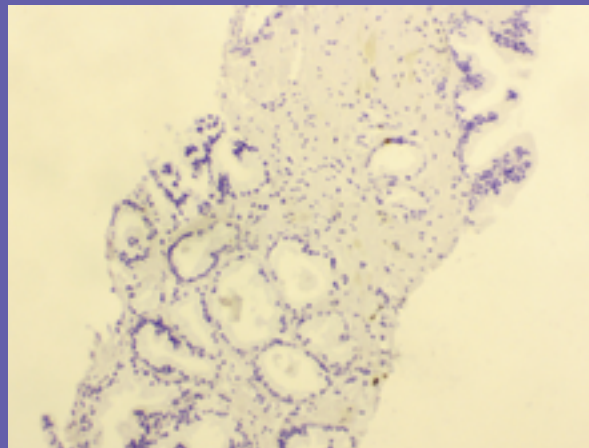


Рис. 2. Экспрессия маркера пролиферации (Ki-67) при АМАП. Представлены единичные окрашенные ядра темно-коричневого цвета в атипичном железистом эпителии. Окраска: иммуногистохимический метод – моноклональные антитела к Ki-67 $\times 200$

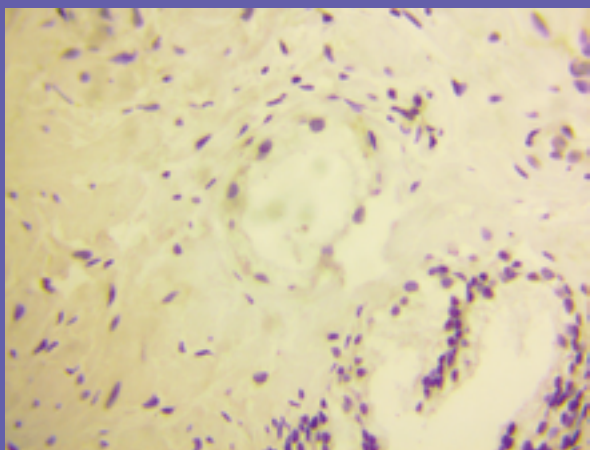


Рис. 3. Экспрессия маркера апоптоза каспазы-3 (СРР32) при АМАП Слабая экспрессия маркера в ядрах атипичного эпителия. Окраска: иммуногистохимический метод – моноклональные антитела к каспазе-3. $\times 400$

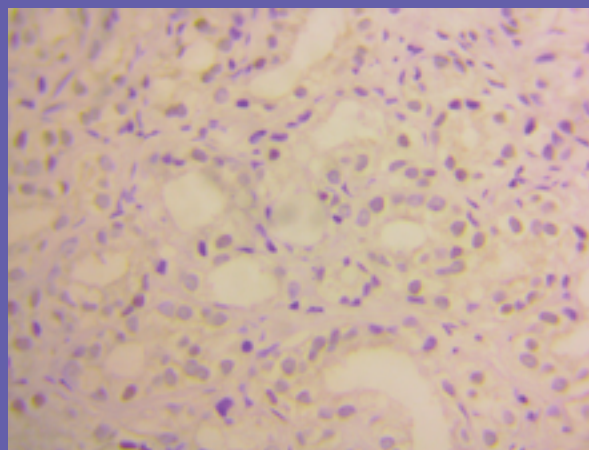


Рис. 4. Экспрессия маркера апоптоза каспазы-3 (СРР32) при аденокарциноме предстательной железы Grade group I Слабая экспрессия маркера атипичными эпителиоцитами Окраска: иммуногистохимический метод – моноклональные антитела к каспазе-3. $\times 400$