

Т.А. Летковская, В.А. Захарова, Е.Д. Черствый, И.Л. Масанский, Л.М. Сагальчик

Иммуногистохимическое исследование пролиферативной активности карцином простаты в материале радикальных простатэктомий

*Белорусский государственный медицинский университет,
Минский городской клинический онкологический диспансер*

В статье приведены литературные и собственные данные по пролиферативной активности карцином простаты. Установлена гетерогенность экспрессии маркера пролиферации Ki-67 при раке простаты, взаимосвязь индекса пролиферативной активности с другими параметрами, отражающими степень биологической агрессивности данной опухоли. Ключевые слова: карциномы простаты, пролиферативная активность, иммуногистохимия, Ki-67, прогноз

В Республике Беларусь новообразования простаты с 1993 года занимают 1-е место в структуре онкоурологической патологии мужчин [1]. Совершенно очевидна необходимость в дальнейшей разработке новых высокоинформативных методов ранней диагностики. Однако установление диагноза рака простаты и определение клинической стадии болезни являются важными, но не достаточными условиями для проведения адекватного лечения. В настоящее время остро ощущается потребность в прогнозировании таких важных параметров, как агрессивность естественного течения заболевания, чувствительность опухоли к эндокринной и цитостатической терапии, склонность к рецидивированию после простатэктомии или лучевого лечения [3]. Среди используемых факторов прогноза при раке предстательной железы (РПЖ) наибольшее распространение имеют уровень простат-специфического антигена (ПСА) до начала лечения и дифференцировка опухоли по шкале Глисона [4, 23]. Вместе с тем, несмотря на высокую прогностическую значимость данных показателей, у многих пациентов, относящихся к одной группе по этим признакам, течение болезни существенно различается. Поэтому изучение дополнительных биологических характеристик первичной опухоли имеет как важное теоретическое значение для понимания процессов канцерогенеза в простате, так и практическое значение для прогнозирования течения болезни и оптимизации ее лечения.

Важнейшим интегральным показателем особенностей клинического течения опухолей является скорость их роста, которая в значительной степени определяется пролиферативной активностью (ПА). ПА опухолевых клеток представляет собой «фракцию роста» новообразования, т.е. характеризует клетки, активно синтезирующие ДНК и находящиеся в разных фазах (G1-, S-, G2-или M-фазе) клеточного цикла [7].

В настоящее время не подвергается сомнению необходимость изучения ПА опухолевых клеток для определения течения и прогноза злокачественных

новообразований [6]. ПА является ведущим фактором, как в механизме злокачественной трансформации клеток, так и в биологическом поведении уже возникших опухолей [22]. Многие факторы, влияющие на течение и исход онкологических заболеваний, свое патогенетическое действие на опухоль опосредуют через изменение ПА [6]. Оценивать ПА раковых клеток необходимо не только для биологической характеристики опухолей, но и для селективного лечения и определения прогноза [5, 8].

Изучению ПА карцином простаты посвящены многочисленные исследования [9-11, 14-21, 24, 25]. Работы последних лет, в большинстве случаев направлены на изучение взаимосвязи ПА РПЖ с характером течения заболевания и способностью опухоли к рецидивированию и метастазированию. По данным некоторых исследователей [6, 15, 17], ПА РПЖ прямо коррелирует со степенью гистологической злокачественности, размерами опухоли, наличием метастазов в паховых лимфатических узлах и имеет обратные взаимоотношения с содержанием андроген-рецепторов в опухоли. Однако в ряде существующих работ не установлено корреляционной связи между ПА РПЖ и такими параметрами, как возраст пациентов, степень злокачественности, уровень дифференцировки, а также стадией заболевания и наличием / отсутствием метастазов в регионарные лимфатические узлы и отдаленных синхронных метастазов [14, 19, 25]. Возможно, расхождения во мнениях обусловлены тем, что результаты исследований не всегда сопоставимы из-за отсутствия единообразия в методологии и категоризации больных. Следовательно, прогностическая роль ПА остается неясной. Есть предположение, что ПА имеет значение при локализованном процессе. У больных с отдаленными метастазами статус ПА на выбор лечения не влияет. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования ПА карцином простаты.

Цель настоящего исследования – изучение ПА РПЖ по экспрессии антигена Ki-67 в зависимости от клинико-морфологических особенностей опухоли.

Материал и методы

Исследование проведено на материале радикальных простатэктомий 31 пациента, прооперированного по поводу РПЖ в онкоурологическом отделении Минского городского клинического онкологического диспансера в период 2004 – 2005 гг. Возраст пациентов на момент операции колебался от 50 до 75 лет и составил в среднем $66,7 \pm 6,2$ года. Распространенность опухолевого процесса оценивали в соответствии с 4-ым изданием Атласа TNM [2]. Степень дифференцировки РПЖ оценивали по системе Глисона [12, 13]. Для приготовления гистологических препаратов ткань ПЖ фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине и заключали в парафин. Толщина гистологических срезов составила 4 мкм. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином. С целью определения ПА РПЖ во всех случаях применялось иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание срезов опухоли толщиной 4 мкм. В качестве отмывочного использовался буфер 0,05 мол/л Tris/HCl, 0,15 мол/л NaCl, 0,05% Tween 20 (pH 7,6) (Dako Cytomation). Срезы депарафинизировались в ксилоле и затем

регидратировались в батарее спиртов нисходящей концентрации, после чего промывались в дистиллированной воде. Демаскировка антигенов проводилась в СВЧ-печи в буфере pH 9,9 (Dako Cytomation). Эндogenous пероксидаза блокировалась 3% H₂O₂ в течение 30 мин. С целью блокирования неспецифического связывания антител на срезы на 30 мин наносился 1% раствор бычьего сывороточного альбумина. Инкубация с первичными антителами производилась в течение 30 мин при комнатной температуре. В связи с тем, что часто возникают трудности при различении раковых, нормальных, а также гиперпластических желез, окрашивание препаратов, вошедших в исследование, производилось «коктейлем» из антител Ki-67 и анти-цитокератин 34bE12 в разведении 1:200 для дифференциальной маркировки непосредственно в препарате опухолевых и неопухолевых эпителиальных структур и отдельного подсчета их ПА. В качестве системы визуализации использовался набор LSAB2 (Dako Cytomation) в соответствии с рекомендациями производителя. Негативный контроль ставился путем исключения первичных антител. Определение индекса ПА производилось в 4-9 случайных полях зрения (окуляр x10, объектив x40), где подсчитывалось общее число опухолевых клеток (не менее 1000) и количество иммунопозитивных клеток к Ki-67, с последующим вычисления их процентного соотношения: индекс ПА = число иммунопозитивных клеток / общее число опухолевых клеток x100

Результаты и обсуждение

Результат ИГХ выявления антигена Ki-67 был представлен в виде очень четко окрашенных в коричневый цвет ядер (nuclear pattern) с более интенсивным окрашиванием ядрышек, а также отчетливого окрашивания митотических фигур. Окрашивание ядер было сплошным либо гранулярным. Иммунопозитивная реакция с антителами к Ki-67 наблюдалась во всех исследованных случаях РПЖ, однако имели место значительные различия по степени ее выраженности и распространенности (рисунки 1 и 2).

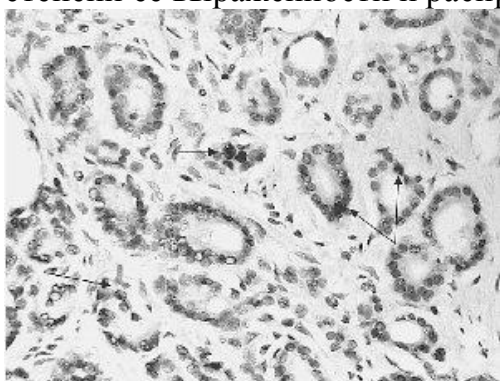


Рис. 1. Низкая пролиферативная активность рака простаты (образец по Глиссону 2). Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Ki-67, хромоген диаминобензидин, контрокрашивание гематоксилином Майера (объектив x40, окуляр x10).

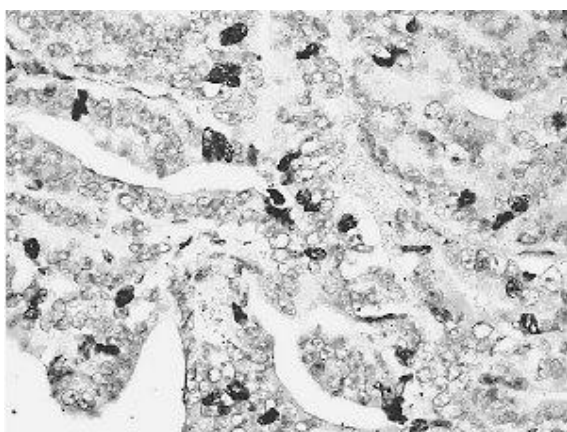


Рис. 2. Высокая пролиферативная активность папиллярного рака простаты (образец по Глисону 4). Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Ki-67, хромоген диа-минобензидин, контрокрашивание гематоксилином Майера (объектив x40, окуляр x10).

Индекс ПА (ИПА) клеток РПЖ значительно варьировал – от низких значений, равных 1,46%, до 16,44% клеточной популяции. Такие колебания ИПА опухолевых клеток подчеркивают резко выраженную гетерогенность РПЖ, которую следует учитывать при определении прогноза клинического течения опухоли и выработке тактики лечения.

В таблице 1 приведены значения ИПА в зависимости от степени дифференцировки (G) РПЖ, а в таблице 2 – в зависимости от суммы Глисона. Таблица 1

Взаимосвязь степени дифференцировки (G) РПЖ и ИПА опухолевых клеток

G	MEAN, %	SD	MIN, %	MAX, %	VALID_N
G 1	4,08	1,86	1,46	6,87	8
G 2	6,66	3,49	3,32	14,96	11
G 3	6,91	1,59	5,78	8,03	2
G 4	8,78 p = 0,036	5,55	3,24	16,6	10

Таблица 2

Взаимосвязь суммы Глисона РПЖ и ИПА опухолевых клеток

Сумма Глисона	MEAN, %	SD	MIN, %	MAX, %	VALID_N
3	3,33				1
4	4,18	1,98	1,46	6,87	7
5	5,8	2,13	3,85	10,12	7
6	8,16	5,19	3,32	14,96	4
7	6,91	1,59	5,78	8,03	2
8	8,78	5,55	3,24	16,6	10

Как видно из таблиц 1 и 2, ПА клеток РПЖ тесно связана со степенью гистологической злокачественности новообразования. В исследованной группе наблюдается повышение ИПА при снижении степени дифференцировки РПЖ, однако различие индекса ПА случаев РПЖ достоверно лишь по степени дифференцировки (G) в группах G1 и G4 ($p = 0,036$), а по сумме Глисона в группах с суммой Глисона = 4 и 7 ($p = 0,049$).

Корреляционный анализ показал наличие корреляционной связи ИПА с рядом клинико-морфологических характеристик РПЖ (таблица 3).

Таблица 3

Взаимосвязь гистологических характеристик РПЖ с ИПА

	ИПА	pT	Степень дифференцировки (G)	Сумма Глисона	Первый компонент суммы Глисона
Первый компонент суммы Глисона	r = 0,41 p = 0,02	r = 0,54 p < 0,002	r = 0,81 p < 0,001	r = 0,88 p < 0,001	-
Сумма Глисона	r = 0,41 p = 0,02	r = 0,62 p < 0,001	r = 0,98 p < 0,001	-	r = 0,88 p < 0,001
pT	r = 0,32 p = 0,09	-	r = 0,67 p < 0,001	r = 0,62 p < 0,001	r = 0,54 p = 0,002
Степень дифференцировки (G)	r = 0,39 p = 0,03	r = 0,67 p < 0,001	-	r = 0,98 p < 0,001	r = 0,81 p < 0,001

Как видно из таблицы 3, имеется прямая умеренная корреляционная связь между ИПА опухолевых клеток РПЖ и первым компонентом ($r=0,41$, $p=0,02$), суммой Глисона ($r=0,41$, $p=0,02$) и грейдом ($r=0,39$, $p=0,03$). То есть, ПА РПЖ увеличивается при возрастании первого компонента, суммы Глисона и степени дифференцировки (грейда G) опухоли. Таким образом, по мере нарастания дедифференцировки раковых клеток (при увеличении G и суммы Глисона), происходит усиление процессов клеточной пролиферации. Также, с увеличением размера первичной опухоли отмечается достоверное увеличение первого компонента ($r=0,54$, $p<0,002$) и суммы Глисона ($r=0,62$, $p<0,001$), происходит снижение степени дифференцировки опухоли ($r=0,67$, $p<0,001$).

В таблице 4 приведены значения ИПА для локализованного РПЖ (без инвазии капсулы) и местно распространенного (при инвазии капсулы и за ее пределы).

Таблица 4

Значения ИПА в зависимости от наличия либо отсутствия инвазии капсулы ПЖ

Инвазия капсулы	MEAN, %	SD	MIN, %	MAX, %	VALID_N
Отсутствует	3,38	1,58	1,46	5,01	6
Распространение в капсулу	6,39 P = 0,026	2,84	3,32	14,96	14
Распространение за пределы капсулы	8,87 P = 0,029	5,36	3,24	16,6	11

Как видно из таблицы 4, ПА растет при переходе из стадии локализованного РПЖ в стадию местно распространенного: имеется достоверное различие ИПА группы случаев РПЖ с отсутствием инвазии капсулы ПЖ с группой минимальной инвазии в капсулу ($p = 0,026$) и распространением за пределы капсулы ПЖ ($p = 0,029$). Разница ИПА в группах РПЖ с распространением в капсулу и за пределы капсулы не достоверна ($p = 0,15$).

Нами проведено сравнение значений ИПА у пациентов без метастазов в регионарные лимфоузлы и при их наличии (табл. 5).

Таблица 5

Значения ИПА в зависимости от поражения регионарных лимфоузлов

	MEAN, % p = 0,45	SD	MIN, %	MAX, %	VALID_N
Регионарные метастазы					
отсутствуют	6,6	4,05	1,46	16,44	25
имеются	7,08	5,08	3,24	16,6	6

Как видно из таблицы 5, ИПА в группе РПЖ с наличием регионарных метастазов несколько выше, чем в группе с отсутствием поражения регионарных лимфоузлов. Однако различие индекса ПА данных групп не достоверно (p = 0,45).

Выводы

1. Проведенное исследование ПА с использованием маркера пролиферации Ki-67, показало гетерогенность экспрессии этого антигена при РПЖ, его взаимосвязь с другими клинико-морфологическими параметрами.
2. Повышение ПА опухолевых клеток при РПЖ коррелирует с гистологическими признаками и со степенью злокачественности, определяющими агрессивность опухоли и может рассматриваться как признак более неблагоприятного течения заболевания.
3. ПА РПЖ является важным показателем, характеризующим биологическую природу опухоли.

Литература

1. Актуальные вопросы диагностики и лечения рака предстательной железы: материалы междунар. науч.-практ. конф. – Минск: ГУ РНМБ, 2006. – 132 с.: ил.
2. Атлас TNM: Иллюстрированное руководство по TNM/pTNM-классификации злокачественных опухолей / Пер. с англ. 4-го издания / Под ред. В.К. Кратенко, Е.А. Короткевича. – Минск: Белорусский центр научн. мед. информации, 1998. – 381 с., ил.
3. Воробьев, А.В. Скрининг мужского населения, стандартное обследование пациентов, классификация РПЖ. // Практич. онкология. – 2001. – №2. – С. 8-16.
4. Лоран, О.Б., Пушкарь, Д.Ю., Франк, Г.А. Простат-специфический антиген и морфологическая характеристика РПЖ: Руководство для врачей. – М.: «МЕДпресс», 1999. – 144 С.
5. Лукашино, М.И., Глухова, Е.И., Жукова, Л.Г. и др. Экспрессия HER-2/NEU, Ki-67 и плоидность при раке молочной ПЖ // Архив патологии. – 2003. – № 5. – С. 25-29.
6. Пожарисский, К.М., Леенман, Е.Е. Прогностическое и предсказательное значение иммуногистохимических маркеров при онкологических заболеваниях. – Материалы III съезда онкологов и радиологов СНГ: Минск, 25-28 мая, 2004 г. В 2 ч. Ч. 1. – Мн.: ОДО «Тонпик», 2004. – С. 113-116.
7. Шацева, Т.А., Мухина, М.С. Антиген Ki-67 в оценке опухолевой пролиферации. Его структура и функции. // Вопросы онкологии. – 2004, № 2. – С. 157-163.
8. Юрин, А.Г., Ковальский, Г.Б. Исследование пролиферативной активности по экспрессии антигена Ki-67 в одиночных и множественных синхронных

эпителиальных опухолях толстой кишки. // *Арх. патол.* – 2005. – № 5. – С. 38-41.

9. Bettencourt, M.C., Bauer, J.J., Sesterhenn, I.A. et al. Ki67 expression is a prognostic marker of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. // *J. Urol.* – 1996. – Vol. 156. – P. 1064.

10. Bubendorf, L., Sauter, G., Moch, H. et al. Ki67 labelling index: an independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy. // *J. Pathol.* – 1996. – Vol. 178. – P. 437.

11. Debes, J.D., Sebo, T.J., Heemers, H.V. et al. p300 modulates nuclear morphology in prostate cancer. // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 708-712.

12. Gleason, D.F. Classification of prostatic carcinomas // *Cancer Chemother. Rep.* – 1966. – Vol. 50. – P. 125-128.

13. Gleason, D.F., Mellinger, G.T. and the Veterans Administration Cooperative Urological Research Group. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging // *J.Urol.* – 1974. – Vol. 111. – P. 58-64.

14. Gyftopoulos, K., Perimenis, P., Ravazoula, P., Barbaliias, G.A. Cyclin E and Ki67 (MIB1) as markers of proliferative activity in human prostate cancers: an immunohistochemical study // *Urologic Oncology.* – 2001, № 6. – P. 249-253.

15. Keshgegian, A.A., Cnaan, A. Proliferation Markers in breast Carcinoma // *Am. J. Clin. Pathol.* – 1995. – Vol. 104, – № 1. – P. 42-49.

16. Keshgegian, A.A., Johnston, E., Cnaan, A. Bcl-2 Oncoprotein Positivity and High MIB-1 (Ki-67) Proliferative Rate Are Independent Predictive Markers for Recurrence in Prostate Carcinoma // *Am. J. Clin. Pathol.* – 1998. – Vol. 110. – P. 443-449.

17. Kishi, H., Igawa, M., Kikuno, N. et al. Expression of the survivin gene in prostate cancer: correlation with clinicopathological characteristics, proliferative activity and apoptosis // *J. Urol.* – 2004. – Vol. 171. – P. 1855-1860.

18. Li, R., Wheeler, T., Dai, H., Frolov, A. et al. High level of androgen receptor is associated with aggressive clinicopathologic features and decreased biochemical recurrence-free survival in prostate: cancer patients treated with radical prostatectomy. // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2004. – Vol. 28. – P. 928-934.

19. Ojea Calvo, A., Mosteiro Cervino, M.J., Dominguez Freire, F. et al. Prognostic factors of prostate cancer: usefulness of Ki-67 expression in preoperative biopsies // *Arch. Esp. Urol.* – 2004. Vol. 57. – P. 805-816.

20. Scalzo, D.A., Kallakury, B.V.S. et.al. Cell Proliferation Rate by MIB-1 Immunohistochemistry Predicts Postradiation Recurrence in Prostatic Adenocarcinomas // *Am. J. Clin. Pathol.* – 1998. – Vol. 109, – № 2. – P. 163-168.

21. Shah, R.B., Mehra, R., Chinnaiyan, A.M. et al. Androgen-independent prostate cancer is a heterogeneous group of diseases: lessons from a rapid autopsy program. // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64 – P. 9209-9216.

22. Shimizu, T., Usuda, N., Yamanda, T. et.al. Proliferative Activity of Human Thyroid Tumors Evaluated by Proliferating Cell Nuclear Antigen // *Cancer.* – 1993. – Vol. 71 – № 9. – P. 2807-2812.

23. Stamey, T.A., McNeal, J.E., Yemoto, C.M. et al. Biological determinants of cancer progression in men with prostate cancer // J.A.M.A. – 1999. – Vol. 281, №15. – P. 1395 – 1400.
24. Stattin, P., Damber, J.E., Karlberg, L., Bergh, A. Cell proliferation assessed by Ki67 immunoreactivity on formalin fixed tissues is a predictive factor for survival in prostate cancer // J. Urol. – 1997. – Vol. 157. – P. 219-222.
25. Taftachi, R., Ayhan, A., Ekici, S. et al. Proliferating-cell nuclear antigen (PCNA) as an independent prognostic marker in patients after prostatectomy: a comparison of PCNA and Ki-67 // BJU Int. – 2005. – Vol. 95. – P. 650-654.