І. П. СЕМЕНІВ

І. П. Семенів, головний лікар клінічної лікарні (КЛ) «Феофанія»

О. В. Каленська, завідувач патологоанатомічним відділенням КЛ «Феофанія», кандидат медичних наук

О. Г. Курик, головний науковий співробітник наукового відділу малоінвазивної хірургії Державної наукової установи «Науково-практичний центр профілактичної та клінічної медицини» Державного управління справами; завідувач патогістологічним центром медичного центру «Універсальна клініка "Оберіг"», доктор медичних наук, доцент

Імуногістохімічна діагностика передракових захворювань і раку передміхурової залози

Вступ

Рак передміхурової залози (РПЗ) є однією із найбільш актуальних та до кінця не вивчених проблем сучасної медицини. Початок третього тисячоліття відзначився підвищенням рівня захворюваності та смертності внаслідок РПЗ. В структурі захворюваності чоловічого населення України РПЗ займає четверте місце, смертність від РПЗ займає третє місце після смертності від раку легенів та шлунка [11]. У США і країнах Західної Європи РПЗ становить третю частину всіх злоякісних новоутворень у чоловіків, а серед причин смерті від пухлин знаходиться на другому місці після раку легенів [12].

На сьогодні стандартним методом діагностики РПЗ та передракових проліферативних процесів є трепанобіопсія простати під трансректальним ультразвуковим контролем [1, 5]. Впродовж тривалого часу «золотим стандартом» вважалася біопсія за 6-точковою (секстантною) схемою, проте рядом авторів було встановлено, що при секстантному протоколі дослідження втрачається виявлення близько половини випадків раку при пальпаторно незміненій передміхуровій залозі (ПЗ) та показниках простатспецифічного антигену (prostate-specific antigen — PSA) до 4 нг/мл. На сьогодні розроблено схеми з забором від 10 до 32 шматочків залози [8]. Така схема значно підвищує вірогідність діагностики як РПЗ, так і передракових захворювань простати.

Простатична інтраепітеліальна неоплазія (ПІН), за даними різних авторів, при пункційних біопсіях, виконаних у пацієнтів з підозрою на РПЗ, діагностується у 8–50 % випадків [7]. Згідно з рекомендаціями Американської асоціації клінічних патологів ПІН поділяють на ПІН низького ступеня і ПІН високого ступеня. Різниця між ПІН високого і низького ступенів базується, перш за все, на цитологічних критеріях, а потім і на структурному рівні [10, 17].

Термін «атипова дрібноацинарна проліферація» (atypical small acinar proliferation — ASAP) було запропоновано для характеристики залоз з ознаками архітектурної та клітинної атипії, коли їх не можна віднести до реактивної атипії, атипової аденоматозної гіперплазії, ПІН або аденокарциноми простати. За даними різних авторів, частота виявлення ASAP у пункційних біопсіях у пацієнтів з підозрою на РПЗ становить від 1 до 9 % [13]. Диференційний діагноз ASAP і аденокарциноми проводиться на основі великих і малих діагностичних критеріїв. До великих критеріїв зараховують інфільтративний ріст, відсутність

© Колектив авторів, 2013

базального шару клітин й атипію ядер, що виражається збільшенням ядер і ядерець. Аденокарцинома діагностується тільки за наявністю всіх трьох критеріїв. Малі критерії однаково часто діагностують при ASAP та аденокарциномі, до них відносять мітотичні фігури, фокуси ПІН високого ступеня, ядерну гіперхромазію [15].

Обов'язковою частиною гістологічних досліджень на сьогоднішній день є імуногістохімічні методи, оскільки лише вони забезпечують специфічну візуалізацію локалізації в тканинах різних клітин, гормонів та їх рецепторів, ферментів, імуноглобулінів, компонентів клітин і навіть окремих генів.

Маркери РПЗ можна умовно поділити на дві групи:

1) маркери, що використовуються для діагностики РПЗ;

2) маркери, що визначають потенціал злоякісності РПЗ [4].

До першої групи маркерів можна віднести цитокератини, що визначаються у базальному епітелії (загальний цитокератин, СК-5/6, високомолекулярний цитокератин), і маркер p63. Останній є функціональним гомологом p53, але експресується у тканині ПЗ виключно базальним шаром епітелію. При РПЗ експресія p63 значно знижується, що виявляється при імуногістохімічному дослідженні. Цей маркер використовують для приготування так званих коктейлів з антитіл [4].

Альфа-метилацил-КоА-рацемаза (alpha-methylacyl-CoA racemase — AMACR) належить до ферментів, що каналізують перехід розгалужених жирних кислот з R- в S-стереоізомери, які підлягають дії пероксисомних оксидаз, що, в свою чергу, підсилює вільнорадикальні процеси в клітині і пошкодження ДНК. Цей маркер вважається позитивним у 80–100 % випадків малих осередків раку. Однак, рацемаза, згідно з останніми літературними даними, виявляється й у 15 % ПІН і ASAP, тому в останні роки було розроблено одночасне подвійне імуногістохімічне забарвлення з PIN-cocktail, який складається з AMACR та p63 — маркера базальних клітин, що підвищує вірогідність правильно встановленого діагнозу до 92–97 % [3].

PSA кодується геном, розміщеним у довгому плечі 19-ї хромосоми, і синтезується секреторним епітелієм ПЗ за участю дигідростерону. PSA відносять до глікопротеїнів, за функцією це протеолітичний фермент, який належить до сімейства калікреїнів [16].

Після відкриття, PSA став одним з найважливіших доступних імуногістохімічних маркерів диференціювання простати. PSA локалізується в цитоплазмі непухлинних гландулярних клітин, що розташовані в усіх зонах ПЗ. Маючи високу органоспецифічність, він експресується в усіх аденокарциномах ПЗ та використовується для визначення простатичного диференціювання у випадках метастазів без первинно виявленої локалізації [4].

Для пацієнтів з аденокарциномою характерним є зниження експресії PSA після проведення гормонотерапії або променевої терапії.

Простатспецифічна кисла фосфатаза (prostate specific acid phosphatase — PSAP) є ще одним маркером, характерним для нормального залозистого і пухлинного епітелію ПЗ. Так само, як і PSA, цей маркер використовується для диференційної діагностики раку простатичного походження з пухлинами іншого генезу, а також для визначення первинної локалізації пухлини при метастазах.

В тих випадках, коли обидва вищевказані маркери негативні, використовують простатспецифічний мембранний антиген (prostate-specific membrane antigen — PSMA). Однак слід зазначити, що експресія PSA невисокої інтенсивності відзначається не лише в тканині ПЗ, але й у сечовипускальному каналі, періуретральних залозах, анальних залозах, залишках урахуса. Позитивну реакцію з PSA відзначають при хворобі Педжета статевого члена, в аденокарциномі сечового міхура, деяких нейрогенних аденомах, пухлинах слинної залози — плеоморфній аденомі, мукоепідермоїдному раку, протоковому раку, адено-кістозній карциномі. Експресія PSAP також відзначається і в інших органах, а саме, в епітелії ниркових канальців, островкових клітинах підшлункової залози, гепатоцитах, парієтальних клітинах шлунка, при деяких нейроендокринних пухлинах, при уротеліальній аденокарциномі, анальному клоакогенному раку, раку слинних залоз і зрілій тератомі [4].

Нейроендокринне диференціювання РПЗ виявляють визначенням експресії переважно хромограніна А (chromogranin A), синаптофізину (synaptophysin) і нейрон-специфічної енолази (neuron-specific enolase). При аденокарциномі простати, призначаючи лікування та визначаючи прогноз щодо захворювання, необхідно визначати вміст нейроендокринного компонента, який є нечутливим до стандартної схеми гормонотерапії [9].

Оскільки ПЗ є гормонально залежним органом, важливо визначити рівень експресії рецепторів андрогенів в пухлинних клітинах для визначення чутливості щодо гормональної терапії. Андрогени і естрогени мають здатність стимулювати проліферативні процеси в ПЗ, але діють на різні структури: андрогени — на епітелій, а естрогени — на сполучну і м'язову строму ПЗ [3].

Є дані щодо синергізму функції рецепторів андрогенів і гіперекспресії рецепторів сімейства Her-2/neu.

До другої групи імуногістохімічних маркерів відносять такі, що їх використовують для оцінки біологічної активності пухлини — Кі-67 (проліферативна активність), bcl-2 і p53 (апоптоз), Е-кадгерин та бетакатенін (міжклітинна адгезія) [16].

Маркер p53 локалізується у ядрі клітини, є супресором пухлинного росту, попереджає вступ клітини з пошкодженою ДНК в синтетичну фазу циклу і спричиняє апоптоз. Мутація гена p53 призводить до втрати контролю над проліферацією клітин, пригнічення апоптозу. Втрата його функції може бути пов'язана з високим метастатичним потенціалом пухлини і розвитком андрогеннезалежного РПЗ. Наявність мутацій в гені p53 при РПЗ є несприятливим прогностичним фактором для перебігу захворювання.

Кі-67 відноситься до регуляторних білків, його поява співпадає зі вступом клітини в мітоз, що дозволяє використовувати його в якості універсального маркера проліферації для оцінки росту злоякісних пухлин. Індекс Кі-67 є незалежним показником прогнозу рецидиву і виживання хворих на РПЗ. Існує пряма корелятивна залежність між кількістю пухлинних клітин, що експресують Кі-67, і стадією РПЗ. Білки сімейства bcl (bcl-2 і bax) відіграють важливу роль у регуляції процесів апоптозу, вони можуть затримувати апоптоз клітин, спричинений p53 та іншими стимуляторами, в тому числі цитостатичними препаратами. В тканині ПЗ в нормі експресія bcl-2 здійснюється лише клітинами базального шару епітелію. При андрогеннезалежному РПЗ відзначають підсилену експресію гена bcl-2, що є ознакою гормоностійкості та резистентності до індукторів апоптозу [4].

Фактори росту являють собою пептиди-мітогени, які при проникненні в ядро клітини мають здатність стимулювати або пригнічувати поділ і диференціювання клітин. Фактори росту виробляються в усіх органах і тканинах неспеціалізованими клітинами строми та епітеліальної вистілки.

Рецептор епідермального фактора росту (epidermal growth factor receptor — EGFR) — трансмембранний глікопротеїн з тирозинкіназною активністю. EGFR експресується на поверхні як нормальних, так і трансформованих епітеліальних клітин і бере участь в регуляції клітинного росту і диференціюванні. Експресія EGFR при РПЗ може досягати 40 % [4].

Одним з основних факторів росту в ПЗ, що відповідають за фазу синтезу ДНК, є інсуліноподібний фактор росту (insulin-like growth factor — IGF). IGF здатний підсилювати локальну дію андрогенів. Виявлена достовірна позитивна кореляція між ступенем злоякісності пухлини (сумою балів за Глісоном) і експресією IGF при РПЗ [14].

Фактор росту ендотелію судин (vascular endothelial growth factor — VEGF) — поліфункціональний цитокін, що спричиняє проліферацію і міграцію ендотеліальних клітин, зокрема й при РПЗ. Він активує урокіназу і колагеназу, які спричиняють лізис ендотеліального матриксу, що підвищує здатність ендотеліальних клітин до міграції, а пухлинних клітин до інвазії та метастазування.

Інтерлейкін-8 (ІЛ-8) є фактором росту з паракринним та аутокринним механізмом дії. Синтез ІЛ-8 здійснюється нейроендокринними клітинами ПЗ. ІЛ-8 і його рецептор CXCR1 при аденоматозній гіперплазії простати, ПІН і андрогензалежному РПЗ не експресуються. Експресію рецепторів до ІЛ-8 CXCR2 відзначають при андрогеннезалежному РПЗ, що вказує на роль місцевих тканинних факторів росту в процесах проліферації клітин при РПЗ.

Є випадки застосування імуногістохімічних досліджень в експрес-біопсії, а саме, інтраопераційна імуноморфологічна оцінка хірургічних країв резекції при радикальній простатектомії з приводу РПЗ. Автори стверджують, що імунофенотипові ознаки малігнізації з'являються значно раніше, ніж загальноприйняті гістологічні ознаки, що можна використати для достовірнішого виявлення пухлинного росту в хірургічних краях резекції і прогнозування рецидиву [6].

Матеріали та методи

За 2011–2012 рр. на базі клінічної лікарні «Феофанія» та Державної наукової установи «Науково-практичний центр профілактичної та клінічної медицини» Державного управління справами виконано 352 трансректальні мультифокальні біопсії простати (від 6 до 12 стовпчиків тканини).

Стовпчики тканини простати фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну. Матеріал проводили у гістопроцесорі карусельного типу STP-120. Для заливки парафінових блоків використовували станцію EC-350, для різки парафінових блоків — ротаційний мікротом серії HM-340E. Препарати зафарбовували гематоксилін-еозином. Використовували мікроскоп Axioskop 40 з фотокамерою AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss).

Для імуногістохімічного дослідження використовували маркери P504S / AMACR (Clone 13H4), p63 Ab-1 (Clone 4A4) і Ki-67 (Clone). Експресію імуногістохімічних маркерів оцінювали за напівкількісною методикою — відсутня, слабка, помірна, інтенсивна.

Результати досліджень та їх обговорення

Згідно з результатами патогістологічних заключень у 228 (64,8 %) з 352 пацієнтів встановлено діагноз доброякісної гіперплазії ПЗ, у 74 (21 %) діагностовано аденокарциному (індекс Глісона від 5 до 9) [2], у 31 (8,8 %) виявлено передпухлинні захворювання ПЗ — 18 випадків ПІН (14 — низького і 4 — високого ступеня) та 13 ASAP, у 19 (5,4 %) пацієнтів встановлено наявність аденокарциноми та ПІН.

Морфологічним субстратом ПІН є наявність у протоках і ацинусах ПЗ клітинних проліфератів, формування яких супроводжується клітинною атипією. При ПІН низького ступеня відзначають проліферацію секреторних клітин, ядра яких містять маленькі ядерця, що не завжди добре візуалізуються, шар базальних клітин завжди збережений, ураження всередині залози завжди вогнищеве (рис. 1). ПІН високого ступеня характеризується більш однорідними морфологічними змінами — залози і протоки вистелені клітинами з вираженим клітинним і тканинним поліморфізмом, багато клітин містять добре помітні ядерця і глибчастий розподіл хроматину, ядра розміщені центрально (рис. 2). При ПІН низького ступеня базальний шар інтактний, а при ПІН високого ступеня кількість базальних клітин може бути збільшена.

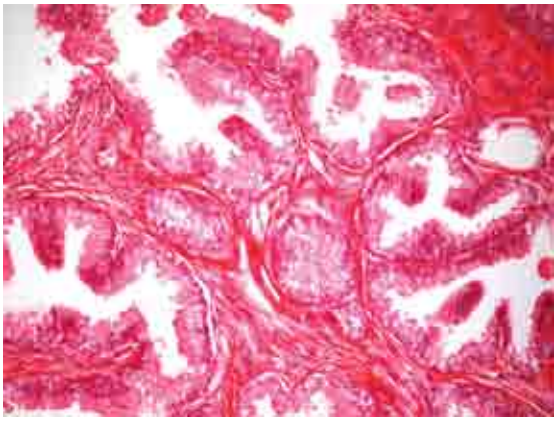

Рис. 1. ПІН низького ступеня. Забарвлення гематоксилін-еозином, × 200

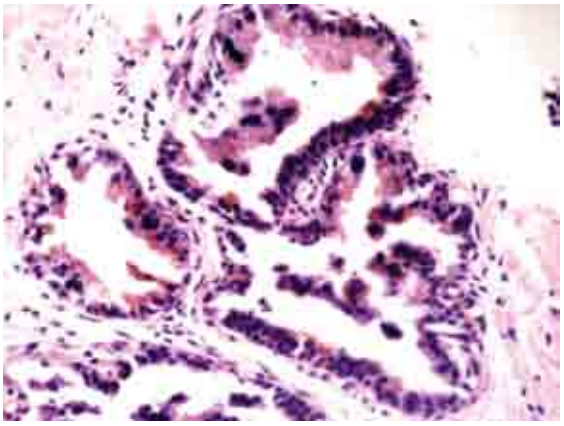

Рис. 2. ПІН високого ступеня. Забарвлення гематоксилін-еозином, × 400

Всі випадки ASAP (рис. 3) диференціювали з аденокарциномою за допомогою імуногістохімічного дослідження.

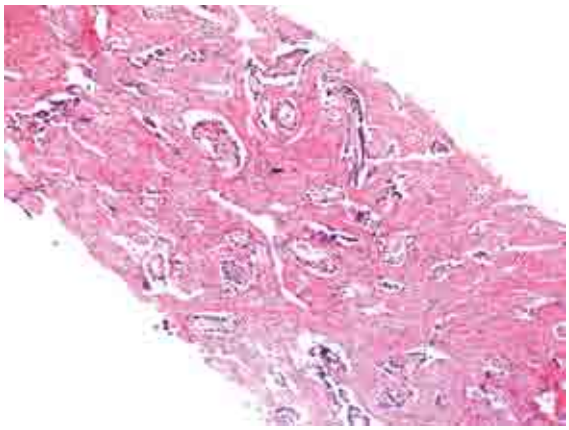

Рис. 3. ПЗ — ASAP.
Забарвлення гемактоксилін-еозином, × 100

При оцінці експресії імуногістохімічних маркерів встановлено, що у групі пацієнтів з передпухлинними захворюваннями ПЗ у 18 хворих (58,1%) експресія Кі-67 була відсутня, у 12 випадках (38,7 %) — слабка, у 1 (3,2%) випадку — помірна. У групі пацієнтів з РПЗ у 22 (29,7 %) хворих експресія Кі-67 була інтенсивною, у 30 (40,5 %) — помірною, у 22 (29,7 %) — слабкою (рис. 4). Експресія AMACR була відсутньою у пацієнтів з гіперплазією, слабкою у хворих з ПІН та інтенсивною у випадках РПЗ (рис. 5, 6). Експресія p63 не спостерігалася у хворих з аденокарциномою, в той час коли у випадках передпухлинних процесів та гіперплазії була інтенсивною (рис. 7).

Таким чином, експресія Кі-67 була більш вираженою у випадках РПЗ і мала меншу інтенсивність у пацієнтів з передпухлинними процесами, що характеризує рівень активності проліферативних процесів. Імуногістохімічний маркер p63 характеризує вираженість шару базальних клітин, його експресія відсутня при аденокарциномі. Експресія AMACR має більшу інтенсивність у випадках аденокарциноми і відсутня при гіперплазії, а при ПІН та ASAP є помірною.

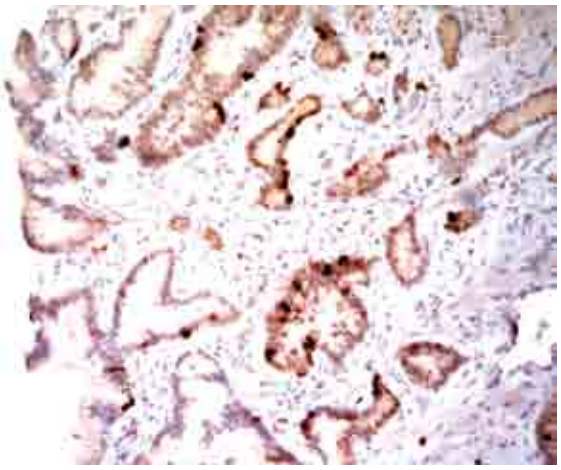

Рис. 4. ПЗ — аденокарцинома, слабка експресія Кі-67 в пухлині, × 200

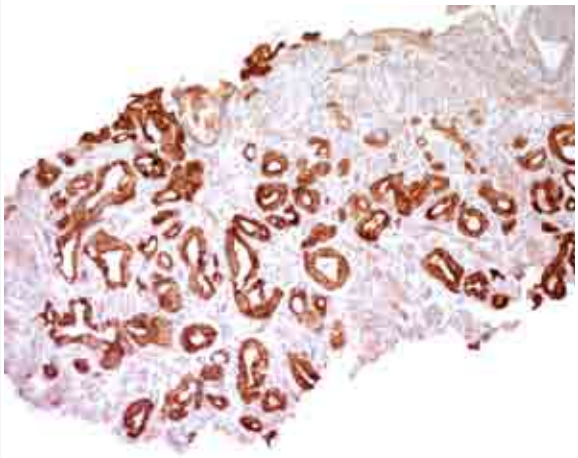

Рис. 5. ПЗ — аденокарцинома, експресія AMACR в пухлинних залозах, × 100

Рис. 6. ПЗ — аденокарцинома, експресія AMACR в пухлинних залозах, × 400

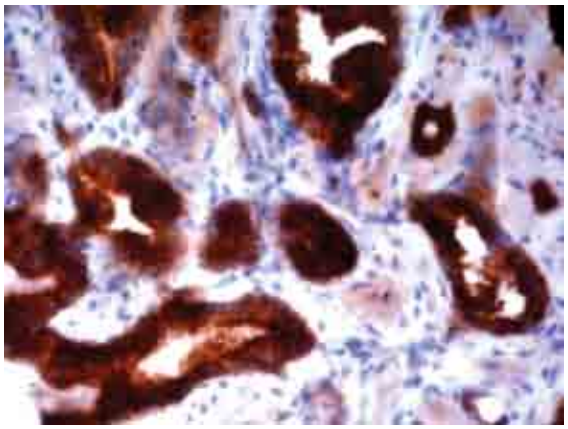

Рис. 7. ПЗ — ASAP, експресія p63 в базальних клітинах, × 200

Висновки

1. Імуногістохімічне визначення експресії маркерів AMACR, p63 і Ki-67 в біоптатах простати дозволяє диференціювати рак і передракові процеси — ПІН і ASAP.

2. Для діагностики передракових процесів і РПЗ важливим є комплексне використання маркерів, що дозволить ґрунтовніше характеризувати патологічний процес, розробити оптимальну тактику лікування і визначити прогноз.

3. Перспективою подальших досліджень є розробка схем використання більшої кількості необхідних маркерів з метою як диференційної діагностики раку та передракових процесів, так і вивчення пато- і морфогенезу цих захворювань.

Список літератури

1. Алексеев Б. Я. Рекомендации Европейской ассоциации урологов по диагностике и лечению рака предстательной железы / Б. Я. Алексеев, К. М. Нюшко // Онкоурология. — 2007. — № 4. — С.41–44.
2. Горбань Н. А. Современные представления о системе градации Глисона / Н. А. Горбань, А. Г. Кудайбергенова // Онкоурология. — 2010. — № 1. — С. 69–75.
3. Григор'єва Ю. В. Використання імуногістохімічних маркерів в клініко-морфологічній діагностиці захворювань передміхурової залози / Ю. В. Григор'єва // Морфологія. — 2010. — Т. IV, № 3. — С. 18–22.
4. Ефремов Г. Д. Роль иммуногистохимии в диагностике рака предстательной железы / Г. Д. Ефремов // Экспериментальная и клиническая урология. — 2011. — № 1. — С. 50–55.
5. Левицький Е. О. Сучасні алгоритми діагностики пухлин передміхурової залози / Е. О. Левицький. — Житомир : Полісся, 2007. — 316 с.
6. Медведев А. В. Интраоперационная иммуноморфологическая оценка хирургических краев резекции при радикальной простатэктомии по поводу рака предстательной железы / А. В. Медведев, М. И. Коган, Л. А. Медведева // Онкоурология. — 2011. — № 2. — С. 60–63.
7. Повторная трансректальная биопсия предстательной железы у пациентов с простатической интраэпителиальной неоплазией высокой степени: сроки и особенности проведения / М. А. Курджиев, А. В. Говоров, Д. Ю. Пушкарь, М. В. Ковылина // Онкоурология. — 2008. — № 4. — С. 30–33.
8. Прогностическая и диагностическая ценность повторной сатурационной биопсии предстательной железы / М. А. Курджиев, В. Д. Говоров, М. В. Ковылина, Д. Ю. Пушкарь // Онкоурология. — 2009. — № 2. — С. 61–63.
9. Прокоп'юк О. В. Імуногістохімічна характеристика нейроендокринного компоненту аденокарцином передміхурової залози / О. В. Прокоп'юк, О. Г. Курик, М. Д. Андрєєв // Морфологія. — 2010. — Т. IV, № 3. — С. 39–43.
10. Простатическая интраэпителиальная неоплазия: гистологические ассоциации / Е. Н. Горбунова, В. Н. Крупин, Д. А. Давыдова, А. А. Артифексова // Онкоурология. — 2009. — № 3. — С. 25–29.
11. Рак в Україні, 2009–2010: захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби : Бюлетень національного канцер-реєстру України / [гол. ред. І. Б. Щепотін]. — 2011. — № 12. — 100 с.
12. Cancer statistics, 2009 / A. Jemal, R. Siegel, E. Ward [et al.] // CA Cancer J. Clin. — 2009. — Vol. 59, N 4. — P. 225–249.
13. Epstein J. I. Prostate needle biopsies containing prostatic intraepithelial neoplasia or atypical foci suspicious for carcinoma: implications for patient care / J. I. Epstein, M. Herawi // J. Urol. — 2006. — Vol. 175, 3 Pt 1. — P. 820–834.
14. Epstein J. I. An update of the Gleason grading system / J. I. Epstein // J. Urol. — 2010. — Vol. 183, N 2. — P. 433–440.
15. The incidence of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and atypical glands suspicious for carcinoma on first-time saturation needle biopsy, and the subsequent risk of cancer / L. Schoenfield, J. S. Jones , C. D. Zippe [et al.] // BJU Int. — 2007. — Vol. 99, N 4. — P. 770–774.
16. The use of immunohistochemistry for diagnosis of prostate cancer / K. R. Leite, M. Srougi, A. Sanudo [et al.] // Urol. Brazil. — 2010. — Vol. 36, N 5. — P. 583–590.
17. Zynger D. L. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia of the prostate: the precursor lesion of prostate cancer / D. L. Zynger, X. Yang // Int. J. Clin. Exp. Pathol. — 2009. — Vol. 4, N 2. — P. 327–338.

Резюме

Імуногістохімічна діагностика передракових захворювань і раку передміхурової залози

І. П. Семенів,
О. В. Каленська,
О. Г. Курик

У статті представлено огляд імуногістохімічних маркерів, які можливо використовувати для діагностики передракових захворювань і раку передміхурової залози, наведено дані власних досліджень. Представлені морфологічні критерії оцінки таких передпухлинних процесів, як простатична інтраепітеліальна неоплазія і атипова дрібноацинарна проліферація. Встановлено, що імуногістохімічне визначення експресії маркерів AMACR, p63 і Ki-67 в біоптатах простати дозволяє диференціювати рак і передракові процеси — простатичну інтраепітеліальну неоплазію і атипову дрібноацинарну проліферацію.

Ключові слова: імуногістохімічне дослідження, рак передміхурової залози, простатична інтраепітеліальна неоплазія, атипова дрібноацинарна проліферація.

Summary

Immunohistochemical Study of Precancerous Lesions of the Prostate and Prostate Cancer

I. P. Semeniv,
O. V. Kalenska,
O. G. Kurik

The article presents a review of immunohistochemical markers used for diagnostics of precancerous lesions of the prostate and prostate cancer, results of own researches. Morphological criteria for such precancerous lesions of the prostate as prostatic intraepithelial neoplasia and atypical small acinar proliferation are presented. It was established that immunohistochemical assessment of expression of such markers as AMACR, p63 and Ki-67 took possibility to differentiate cancer and precancerous conditions: prostatic intraepithelial neoplasia and atypical small acinar proliferation.

Key words: immunohistochemical study, prostate cancer, prostatic intraepithelial neoplasia, atypical small acinar proliferation.

Иммуногистохимическое исследование предраковых заболеваний и рака предстательной железы

И. П. Семенив,
О. В. Каленская,
Е. Г. Курик

В статье представлен обзор иммуногистохимических маркеров, которые используются для диагностики предраковых заболеваний и рака предстательной железы, результаты собственных исследований. Представлены морфологические критерии таких предраковых заболеваний, как простатическая интраэпителиальная неоплазия и атипичная мелкоацинарная пролиферация. Установлено, что иммуногистохимическое определение экспресии маркеров AMACR, p63 и Ki-67 позволяет дифференцировать рак и предраковые процессы — простатическую интраэпителиальную неоплазию и атипичную мелкоацинарную пролиферацию.

Ключевые слова: иммуногистохимическое исследование, рак предстательной железы, простатическая интраэпителиальная неоплазия, атипическая мелкоацинарная пролиферация.