

А.А. Чекалова, В.Н. Григоренко, В.С. Сакало, С.В. Черемуха, А.М. Романенко

### Гистологические и иммуногистохимические параллели в прогнозе рака предстательной железы

ГУ «Институт урологии АМН Украины», г. Киев

**Ключевые слова:** рак предстательной железы, Bcl-2, p53 и Ki-67 протеины, участки PIN и PIA, шкала Gleason, биопсийный материал.

Использован биопсийный материал, полученный от 27 больных раком предстательной железы (РПЖ). Использовались методы гистологического исследования с определением градации РПЖ по шкале Gleason и иммуногистохимического анализа для выявления протеинов генов, регулирующих клеточный цикл и супрессоров опухолевого роста p53, p16<sup>INK4a</sup>, ингибитора апоптоза Bcl-2, а также маркера пролиферации Ki-67 в парафиновых срезах, толщиной 4 микрона. Иммуногистохимическое окрашивание проводилось стандартным методом с использованием авидин-биотинового пероксидазного комплекса (АВК) и мышиных моноклональных антител против p53, p16<sup>INK4a</sup>, Bcl-2 и Ki-67. Выявлена прямая коррелятивная зависимость между градацией по Gleason РПЖ и уровнем экспрессии протеинов генов p53, p16<sup>INK4a</sup>, Bcl-2 и особенно маркера пролиферации Ki-67, что еще раз подтверждает важное не только диагностическое, но и прогностическое значение градации по Gleason.

### Гістологічні та імуногістохімічні паралелі в прогнозі рака передміхурової залози

А.А. Чекалова, В.Н. Григоренко, В.С. Сакало, С.В. Черемуха, А.М. Романенко

У роботі використано біопсійний матеріал, отриманий від 27 хворих на рак передміхурової залози (РПЗ). Крім гістологічного дослідження з визначенням градациі за Gleason використовувалися методи імуногістохімічного аналізу для виявлення протеїнів генів, які регулюють клітинний цикл та супресорів пухлинного росту p53, p16<sup>INK4a</sup>, інгібітору апоптозу Bcl-2, а також маркера проліферації Ki-67. Імуногістохімічне фарбування проводилося стандартним методом з використанням авидин-біотинового пероксидазного комплексу (АВК) та мишачих моноклональних антитіл проти p53, p16<sup>INK4a</sup>, Bcl-2 і Ki-67. Виявлена пряма корелятивна залежність між градациєю за Gleason РПЗ та рівнем експресії протеїнів генів p53, p16<sup>INK4a</sup>, Bcl-2 та особливо маркера проліферації Ki-67, що підтверджує не тільки діагностичне, але й прогностичне значення градациі за Gleason.

**Ключові слова:** рак передміхурової залози, Bcl-2, p53 і Ki-67 протеїни, ділянки PIN і PIA, шкала Gleason, біопсійний матеріал.

*Патологія. – 2010. – Т.7., №1. – С. 8-11*

### Histological and immunohistochemical parallels in prognosis of prostate cancer

A.A. Chekalova, V.M. Grygorenko, V.S. Sakalo, S.V. Cheremuha, A.M. Romanenko

The biopsy material, received from 27 prostate cancer patients, was analyzed for the research. Simple histological examination, the immunohistochemical analysis methods were used in order to reveal geno-proteins, which control the cell cycle; and suppressors' p53, p16<sup>INK4a</sup> of tumour growth, apoptosis inhibitor Bcl-2, and also proliferation marker Ki-67 in paraffin sections. The direct correlation between prostate cancer Gleason scale and the expression level of geno-proteins p53, p16<sup>INK4a</sup>, Bcl-2 and particularly Ki-67 proliferation marker was shown. Due to the results of our research, chronic prostatitis, which goes with PIN and PIA locus, is proved to be favorable background for prostate cancer development.

**Key words:** prostate cancer, Bcl-2, p53 and Ki-67 proteins, PIN and PIA locus, Gleason scale, biopsy specimens.

*Pathologia. 2010; 7(1): 8-11*

**Р**ак предстательной железы (РПЖ) – одно из наиболее распространенных злокачественных новообразований мужчин пожилого и старческого возраста. Пик заболеваемости наблюдается после 70 лет. В структуре онкологической заболеваемости в Европейских странах РПЖ выходит на 2–3 место после рака легких и желудка, а в США – на 1 место. В Украине РПЖ занимает 3–4 место после рака легких, желудка и кожи. За последние 20 лет в Украине отмечается неуклонный рост заболеваемости РПЖ с 12,0 в 1989 году до 29,4 в 2008 году. Прогнозируется, что в течение последующих 30 лет распространенность РПЖ увеличится вдвое в связи со старением населения. Из числа впервые заболевших РПЖ в 2008 году только у 46% мужчин выявлены локализованные формы РПЖ (Т1-2) [1,2,3].

Одним из путей оптимизации ранней диагностики и

прогнозирования течения РПЖ является комплексное изучение ряда признанных на современном уровне гистологических и иммуногистохимических характеристик опухоли у каждого конкретного больного, которые влияют на ее рост, уровень дифференцировки и метастатическую активность.

С развитием молекулярной биологии стали известны некоторые механизмы контроля над клеточным делением и смертью клетки, передачи сигнала от цитоплазматических рецепторов в ядро. Оказалось, что структурные и функциональные изменения некоторых белков, которые принимают участие в этих процессах (онкопротеинов и супрессоров опухолевого роста), могут приводить к опухолевой трансформации клеток.

Вышеуказанные белки и гены получили название молекулярно-биологических маркеров опухоли. Все они принимают участие в регуляции клеточного цикла, про-

цессов апоптоза, дифференцировки и гистогенетической принадлежности клетки.

Центральным компонентом внутригеномной охранной системы, предотвращающей размножение и накопление аномальных клеток в организме, который поэтому называют «стражем генома», является супрессор опухолевого роста ген p53. Под влиянием различных изменений, таких как повреждение ДНК, недостаток пула нуклеотидов, оксидативный стресс, гипоксия, тепловой и холодовой шок, вирусные инфекции, экспрессия активированных онкогенов, разрушения цитоскелета, происходит стабилизация гена p53, изменение его конформации и активация. В результате это приводит либо к остановке клеточного цикла в G1 и G2 фазах, либо инициирует апоптоз. Мутации гена p53 могут способствовать развитию генетической нестабильности. Нарушения функции гена p53 являются наиболее универсальной молекулярной реакцией во многих новообразованиях человека. Эти изменения могут возникать в нормальной клетке, увеличивая, таким образом, вероятность образования из нее неопластического клона, либо происходят уже в опухолевых клетках, что способствует дальнейшей опухолевой прогрессии [4,5].

Как известно, протоонкоген Bcl-2 вместе с кодируемым им белком может задерживать апоптоз клеток предстательной железы, вызванный геном p53 и другими стимуляторами, в том числе, цитостатическими препаратами. В случае гиперэкспрессии он выступает в качестве онкогена, и, таким образом, может принимать участие в формировании андрогенрезистентного фенотипа и опухолевой резистентности к химиотерапевтическим препаратам [6,7].

Регуляция процессов пролиферации клеток контролируется путем последовательной активации циклинов и соответственных циклинзависимых киназ. Активность циклиновых киназ обуславливается уровнем экспрессии соответствующих циклинов и активностью специфических ингибиторов. Известно несколько семейств генов-ингибиторов циклиновых киназ. Одним из наиболее известных и практически важных является ген p16<sup>INK4a</sup>, который угнетает циклин-зависимые киназы D и, таким образом, препятствует прохождению фазы G1 клеточного цикла. Нарушения функции гена p16<sup>INK4a</sup> или его инактивация приводит к утрате контроля за делением клетки [6,7].

Следующим известным маркером клеточной пролиферации является протеин Ki-67, который принадлежит к регуляторным белкам. Он присутствует в клетке во время митоза и исчезает, когда клетка переходит в состояние покоя или во время репарации ДНК. Антитела к протеину Ki-67 используют для оценки пролиферативной активности многих новообразований, в том числе, РПЖ. Индекс Ki-67 является независимым и весьма распространенным показателем прогнозирования рецидивов и выживания больных РПЖ [7].

Таким образом, перечисленные опухолевые маркеры – это гены и их продукты, связанные с развитием зло-

качественных новообразований, они широко используются для ранней диагностики (скрининга), выявления латентных метастазов или рецидива заболевания, а также мониторинга эффективности химиотерапии и оценки метастатического потенциала опухоли.

**Цель исследования:** изучение особенностей канцерогенеза в предстательной железе с учетом роли процессов пролиферации и апоптоза в опухолевых клетках.

#### Материалы и методы

В работе использован биопсийный материал, полученный от 27 больных РПЖ за период 2004–2006 гг., которые находились под амбулаторным наблюдением в ГУ «Институте урологии АМН Украины».

Возраст больных колебался от 58 до 82 лет, средний возраст – 70±2,02.

Биоптаты предстательной железы немедленно фиксировались в забуференном формалине (фосфатный буфер – pH 7,4) с последующим изготовлением парафиновых блоков. Помимо обычного гистологического исследования, использовались методы иммуногистохимического анализа для выявления протеинов генов, регулирующих клеточный цикл, и супрессоров опухолевого роста p53, p16<sup>INK4a</sup>, ингибитора апоптоза Bcl-2, а также маркера пролиферации Ki-67 в парафиновых срезах, толщиной 4 микрона. Иммуногистохимическое окрашивание проводилось стандартным методом с использованием авидин-биотинового пероксидазного комплекса (ABC) и мышинных моноклональных антител против p53 (DO-7 иммуноглобулин IgG2b, DAKO, Glostrup, Denmark) в разведении 1:100; против p16<sup>INK4a</sup> в разведении 1:200; Bcl-2 (DAKO Cytomation) в разведении 1:50; против Ki-67 (DAKO) в разведении 1:500. Гистологическая верификация опухоли проводилась согласно с последней Международной классификацией ВОЗ (2004) с определением суммарной градации РПЖ по шкале, разработанной D.F.Gleason.

Для подсчета уровня иммунореактивности исследуемых протеинов в ткани использовался полуколичественный метод с определением процентного содержания окрашенных клеток при подсчете на 1000 клеток в одном препарате. При этом «0» соответствовал отсутствию окрашенных клеток; «1» – < 10%; «2» – > 10 < 50%; «3» – > 50% окрашенных клеток.

Все наблюдения, в соответствии с градацией РПЖ по Gleason, были разделены на три группы: группа I объединяла 13 опухолей с градацией по Gleason < 5; группа II включала 8 наблюдений с градацией по Gleason > 5 и < 8; группа III – 6 наблюдений, которые характеризовались наиболее высокой градацией по Gleason > 8.

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью критерия  $\chi^2$  Пирсона. Различия между показателями считали статистически значимыми при достоверности не менее 95% (p < 0,05).

#### Результаты и их обсуждение

При гистологическом исследовании биоптатов предстательной железы из группы I в 6 из 13 (46%) наблюдений, преимущественно мелкоацинарный рак

развивался на фоне хронического простатита с очагами PIA (proliferative inflammatory atrophy – пролиферирующая воспалительная атрофия), часто в сочетании с зонами простатической интраэпителиальной неоплазии (PIN), которые принято оценивать как предраковые состояния при канцерогенезе предстательной железы (рис. 1 А, Б, цв. вкладка 1).

При этом, именно в очагах PIA в небольших (менее 10% клеток) и более обширных (>10, но <50%) группах часто гиперхромных эпителиальных клеток, выстилающих атрофичные расширенные железы, выявлялась ядерная экспрессия протеинов p53, Ki-67 и особенно высокая (>50% окрашенных клеток) цитоплазматическая экспрессия Bcl-2 (рис. 1 В, Г, цв. вкладка 1). Экспрессия протеина p16<sup>INK4a</sup> была низкой либо вообще отсутствовала.

Очаги предрака в виде PIN и PIA в биоптатах группы II были выявлены в 2 из 8 (25%) наблюдений крупноили мелкоацинарной аденокарциномы с формированием криброзных, реже солидных структур. В новообразованиях этой группы уровень экспрессии протеинов p53, p16<sup>INK4a</sup>, Bcl-2 и особенно Ki-67 достоверно возрастал (p<0,05) в сравнении с опухолями группы I (рис. 2 А, Б, цв. вкладка 2).

РПЖ с преобладанием солидных структур либо скирра, в наблюдениях группы III со стадией по Gleason выше 8, характеризовался наиболее высокой ядерной экспрессией p53, p16<sup>INK4a</sup> и Ki-67 (p<0,05), а также цитоплазматической гиперэкспрессией Bcl-2, что свидетельствует о наиболее высокой пролиферативной активности раковых клеток таких новообразований, вследствие альтерации генов Bcl-2 и ядерной гиперэкспрессии Ki-67, регулирующих апоптоз (Рис. 2 В, Г, цв. вкладка 2).

Наши данные подтверждают существующее мнение о гистогенетической взаимосвязи между PIN и аденокарциномой, так как они четко проявляют фенотипическое сходство. При этом, как известно, наличие PIN при РПЖ указывает на повышенную агрессию и на склонность к инвазивному росту опухоли [8,9].

По данным различных авторов, при исследовании фрагментов ткани гиперэкспрессия мутантного гена p53 в 75% случаев указывает на гормонорезистентную форму РПЖ [10]. Анализ метастазов гормонорезистентного РПЖ в костях показал наличие в них гиперэкспрессии мутантного гена p53 в 80% случаев [5].

По существующим данным литературы, гиперэкспрессия Bcl-2 выявляется в 65% случаев гормонорезистентного РПЖ и 25% случаев РПЖ, когда гормонотерапия не проводилась [6].

Как упоминалось выше, индекс Ki-67 является независимым показателем прогнозирования для появления рецидивов и определения срока выживания больных РПЖ [7]. Существует прямая коррелятивная зависимость между количеством опухолевых клеток, которые экспрессируют Ki-67, и стадией РПЖ [11,12]. Отмечена

также прямая зависимость между индексом пролиферации Ki-67 и градацией по Gleason, инфильтрацией опухолью семенных пузырьков, размером опухоли, наличием очагов PIN и уровнем общего PSA в сыворотке крови [6].

Мутации гена p16<sup>INK4a</sup> в локализованных карциномах предстательной железы встречаются редко, значительно чаще они выявляются при метастатическом процессе [6,7,12].

### Выводы

Полученные результаты выявили прямую коррелятивную зависимость между градацией по Gleason рака предстательной железы и уровнем экспрессии протеинов генов p53, p16<sup>INK4a</sup>, Bcl-2 и особенно маркера пролиферации Ki-67, что еще раз подтверждает важное не только диагностическое, но и прогностическое значение градации по Gleason.

Как показали наши исследования, хронический простатит, сочетающийся с участками PIN и PIA, является благоприятным фоном для развития РЛЖ. При этом, в очагах PIA и, в меньшей степени, PIN в первую очередь выявляется высокая экспрессия протеина Bcl-2, что свидетельствует о наиболее ранней альтерации гена Bcl-2, ингибирующего апоптоз. Это явление можно рассматривать как один из первых и самых ранних проявлений молекулярных повреждений процессов апоптоза в патогенезе РПЖ, что можно использовать, как прогностический иммуногистохимический тест в диагностике наиболее ранних доклинических стадий канцерогенеза в предстательной железе при анализе материала биопсии.

### Литература

1. Воробьев А.В. Скрининг мужского населения, стандартное обследование пациентов, классификация рака предстательной железы / А.В.Воробьев // Практическая онкология. – 2001. – № 2(6). – С.8-16
2. Федоренко З.П. Рак в Україні 2007–2008. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби / З.П.Федоренко, А.В.Гайсенко, Л.О.Гулак [та ін.] // Бюл. нац. Канцер-реєстру. — К., 2009. — № 10. — С. 58–59.
3. Greenle R.T. Cancer statistics 2001 / R.T.Greenle, M.B.Hill-Harmon, T.Murray [et al.] // Cancer J. Clin. – 2001. – V.51. – С.15-36.
4. Чумак П.М. Белок p53 и его универсальные функции в клеточном организме / П.М.Чумак // Успехи биологической химии. – 2007. – № 47. – С.3–52.
5. Bauer J.J. p53 nuclear protein expression is an independent prognostic marker in clinically localized prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy / J.J.Bauer, I.A.Sesterhenn, K.F.Mostofi [et al.] // Clinical Cancer Research. – V.1, Issue 11. – P.1295-1300.
6. Повелица Э.А. Молекулярно-биологические маркеры рака предстательной железы (обзор литературы) [Электронный ресурс] / О.Г.Суконко, А.И.Ролевич. – Режим доступа: <http://www.urweb.ru/news/955.html>.
7. Дорохова О.В. Експресія К67, p16 та p53 як показник онкогенної трансформації та ймовірності прогресії цервікальних інтраепітеліальних неоплазій / О.В.Дорохова

- // Морфология. – 2007. – Т. 1, №1.
8. *Забарко Л.Д.* Доброкачественная гиперплазия предстательной железы, простатическая интраэпителиальная неоплазия, рак предстательной железы. [Электронный ресурс] / Л.Д. Забарко. – Режим доступа: [http://www.peryodnogami.narod.ru/practice\\_literatur](http://www.peryodnogami.narod.ru/practice_literatur).
9. *Bostwick D.G.* High-grade prostatic intraepithelial neoplasia / D.G.Bostwick, J.Qian // *Modern Pathology*. – 2004. – V.17. – P.360-370.
10. *McDonnell T.J.* Biomarker expression patterns that correlate with high grade features in treatment naive, organ-confined prostate cancer *BMC Med Genomics* / T.J.McDonnell, N.S.Chari, J.H.Cho-Vega [et al.] – 2008. – V.1. – P. 1.
11. *Шацева Т.А.* Антиген Ki-67 в оценке опухолевой пролиферации: его структура и функции / Т.А.Шацева, М.С.Мухина // *Вопр. онкол.* – 2004. – Т.50, № 2. – С.157-164.
12. *Eble J.N.* World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs/ J.N.Eble, G.Sauter, J.I.Epstein, Sesterhenn I.A. (Eds.)/ IARC Press: Lyon 2004. – 354 p.

**Сведения об авторах:**

Чекалова А.А., врач патологоанатом лаборатории патоморфологии Института урологии АМН Украины.

Григоренко В.Н., канд.мед.наук, ведущий научный сотрудник отдела онкоурологии, ГУ «Институт урологии АМН Украины».

Сакало В.С., зав. отделом онкоурологии института урологии АМН Украины.

Черемуха С.В., врач патологоанатом лаборатории патоморфологии Института урологии АМН Украины.

**Адрес для переписки:** Григоренко Вячеслав Николаевич. 04053, Киев, ул. Юрия Коцюбинского, 9а. Тел.: (044) 486-67-31; 424-13-29; факс (044) 424-21-28 e-mail: grygorenkosl@gala.net

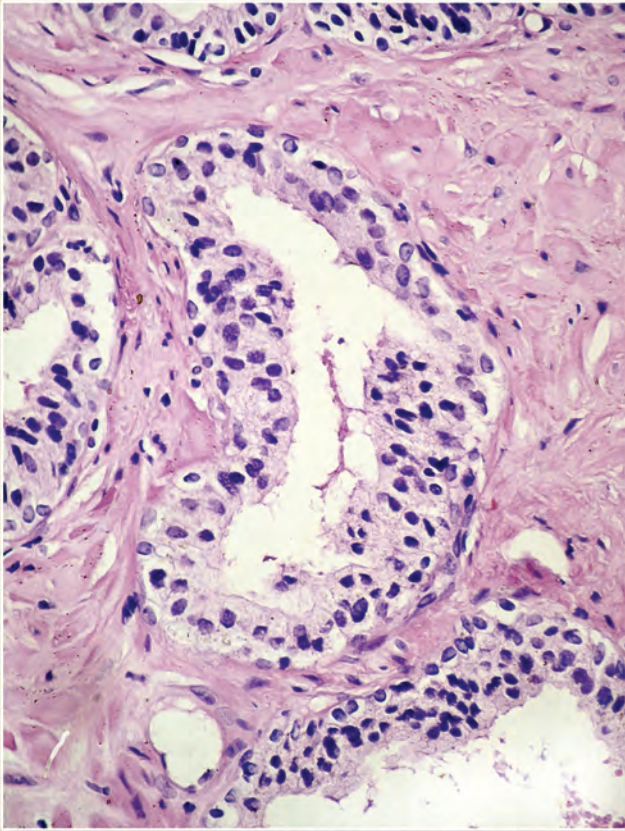


Рис. 1.А.

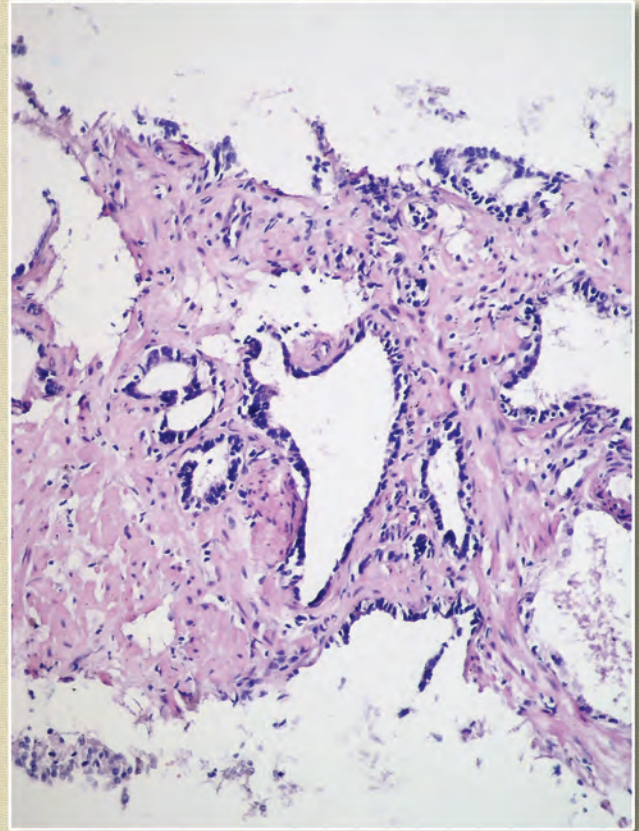


Рис. 1.Б.

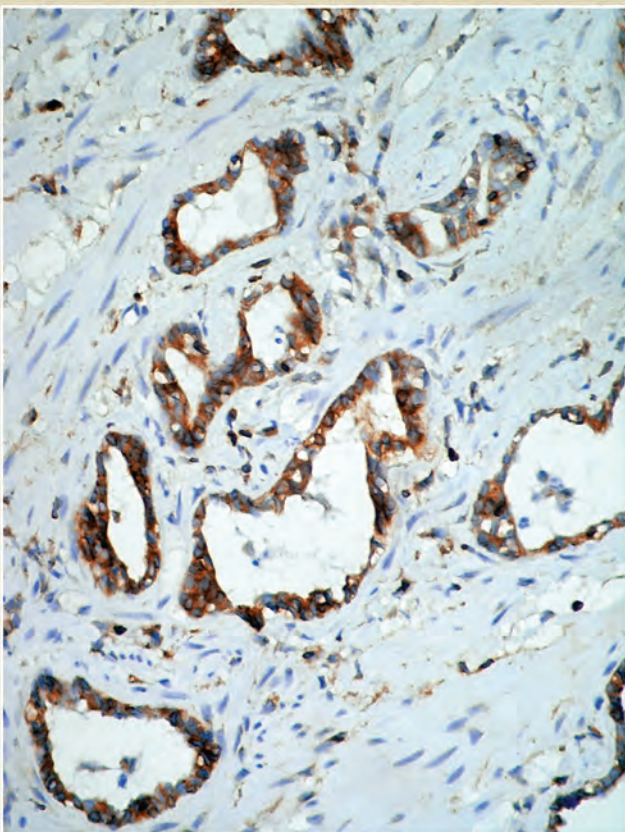


Рис. 1.В.

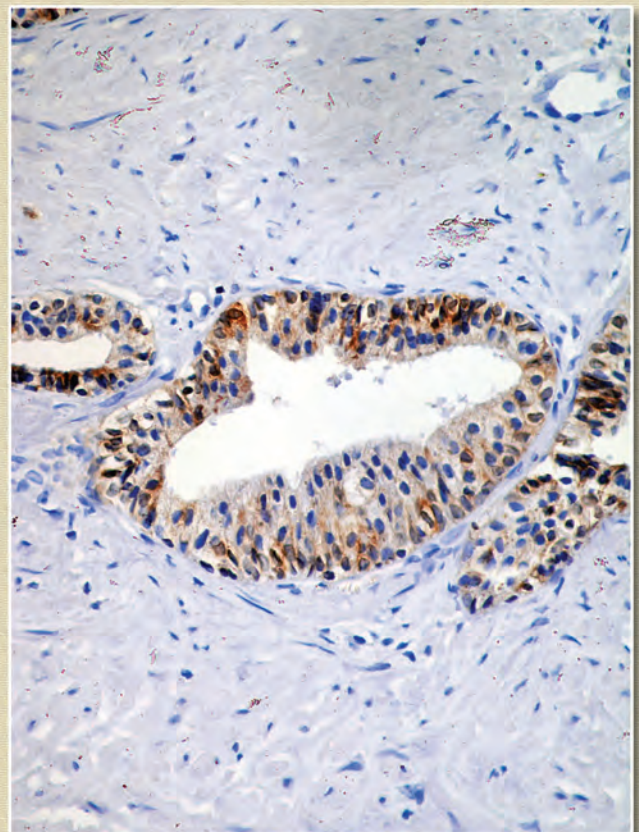


Рис. 1.Г.

Рис. 1. Зоны предрака в предстательной железе:

1.А – простатическая интраэпителиальная неоплазия (PIN), окраска гематоксилином и эозином x 200;

1.Б – пролиферирующая поствоспалительная атрофия (PIA), окраска гематоксилином и эозином x 200;

1.В – экспрессия Vcl-2 в зоне PIA x 200; 1.Г – экспрессия Vcl-2 в зоне PIN x 200

(Рис. 1.А, 1.Б, 1.В, 1.Г к статье А.А.Чекаловой и соавт. «Гистологические и иммуногистохимические параллели в прогнозе рака предстательной железы», С. 8-11)

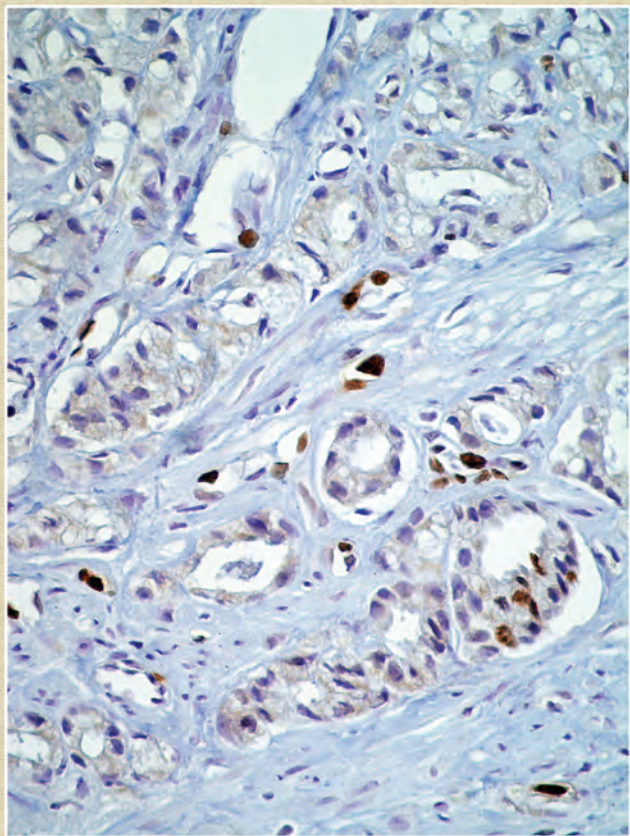


Рис. 2.А.

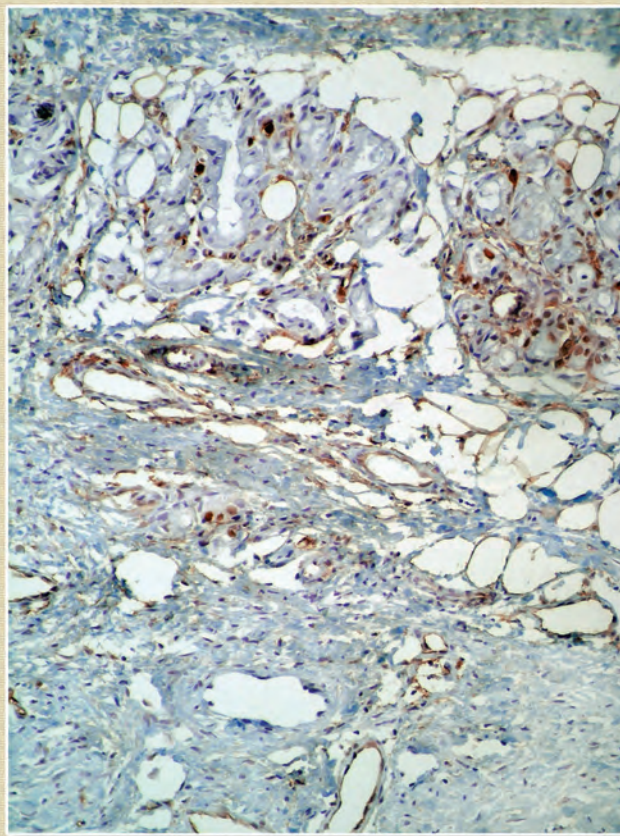


Рис. 2.Б.

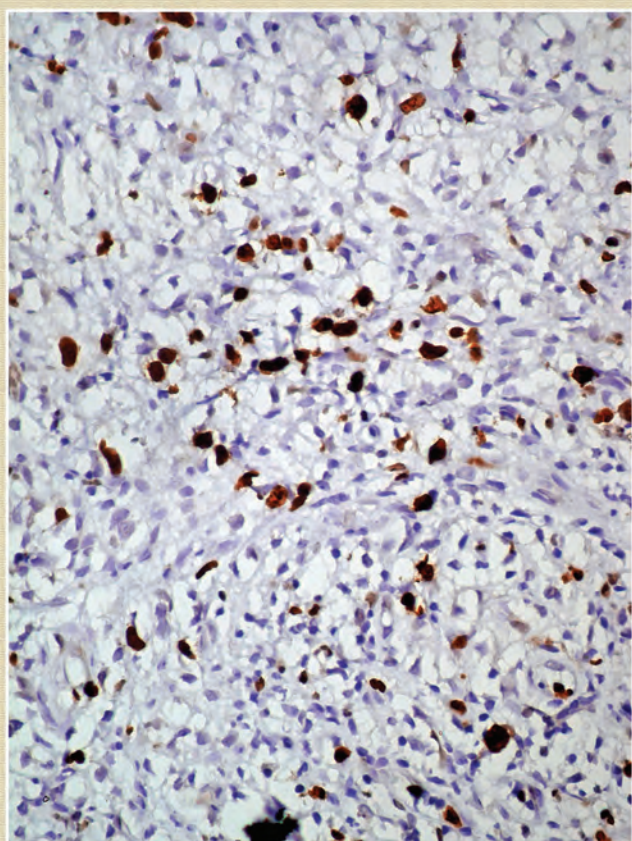


Рис. 2.В.

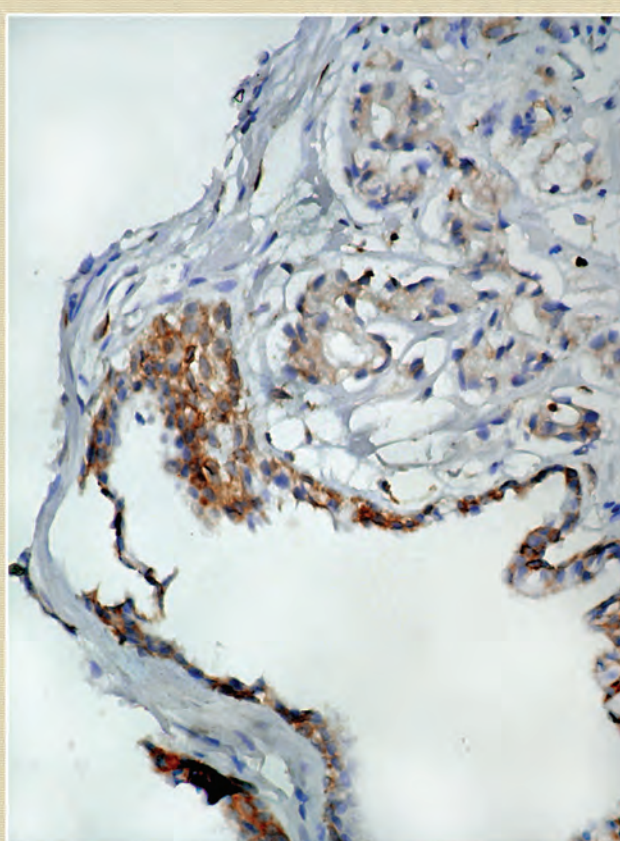


Рис. 2.Г.

Рис 2. Рак предстательной железы:

2.А – экспрессия Ki-67, аденокарцинома, стадия по Gleason 2+3=5 x 400;

2.Б – экспрессия p53, аденокарцинома, стадия по Gleason 4+4=8 x 400;

2.В – экспрессия Ki-67, аденокарцинома, стадия по Gleason 4+4=8 x 400;

2.Г – экспрессия Vcl-2, аденокарцинома, стадия по Gleason 2+3=5 x 400.

(Рис. 2.А, 2.Б, 2.В, 2.Г к статье А.А.Чекаловой и соавт. «Гистологические и иммуногистохимические параллели в прогнозе рака предстательной железы», С. 8-11)