
ПРОДУКЦИЯ ФАКТОРОВ РОСТА ПРИ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЯХ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.А. Костин¹, М.И. Андрюхин¹, И.И. Бабиченко²,
С.А. Пульбере¹, П.И. Мотин³, П.И. Тальбергер¹

¹Кафедра урологии и оперативной нефрологии с курсом онкоурологии
Медицинский институт
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

²Кафедра патологической анатомии
Медицинский институт
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

³Урологическое отделение
Городская клиническая больница № 29 им. Н.Э. Баумана
Департамента здравоохранения города Москвы
Госпитальная площадь, 2, Москва, Россия, 111020

Проведено иммуногистохимическое исследование локализации белков матриксной металлопротеиназы-9 и ингибитора матриксной металлопротеиназы-1 и пролиферативной активности клеток по экспрессии белка Ki-67 при доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ) и аденокарциноме (АК) различной градации по шкале Глисона. Установлена умеренная положительная корреляция между градацией по шкале Глисона и индексом пролиферации клеток по показателю Ki-67 ($r_s = 0,674$) и умеренная отрицательная корреляция градации по шкале Глисона с уровнем экспрессии матриксной металлопротеиназы-9 ($r_s = -0,660$). Слабая достоверная отрицательная корреляция установлена между уровнем пролиферативной активности клеток и экспрессией опухолевыми клетками MMP-9 ($r_s = -0,369$). Выявлено достоверное снижение уровня MMP-9 и TIMP-1 в АК различной градации. Инвазивные свойства опухолевых клеток, выражающиеся в разрушении коллагена IV базальной мембраны и соединительно-тканной стромы простаты, связаны с дисбалансом между MMP-9 и белком, блокирующим этот фермент — TIMP-1, экспрессия которого снижается в АК различной градации по сравнению с ДГПЖ.

Ключевые слова: аденокарцинома предстательной железы, MMP-9, TIMP-1, Ki-67, коллаген IV.

На сегодняшний день новообразованиям предстательной железы придается большое внимание, как одной из наиболее актуальных проблем современной онкологии. В США и ряде стран Европы РПЖ лидирует в структуре онкологической заболеваемости у мужчин. В России в 2014 г. зафиксировано более 29 тысяч новых случаев злокачественного новообразования предстательной железы, при этом прирост заболеваемости составил 8,68%. Несмотря на постоянные попытки улучшения диагностики данного новообразования и внедрение в обследование пациентов различных методов, выявление поздних стадий и смертность от рака предстательной железы в России остаются высокими [1]. Так, в 2013 г. от данного новообразования в Российской Федерации умерли около 11 тысяч больных, у большинства пациентов изначально диагностируют местнораспространенные (38,5%) и мета-

статические (23,2%) формы опухоли [2]. Таким образом, одной из приоритетных задач остается выявление этого новообразования на стадии локализованного процесса.

На сегодняшний день в клинической практике широко используется комплекс методов диагностики болезней предстательной железы, таких как трансректальное ультразвуковое исследование, пальцевое ректальное исследование, определение простат-специфического антигена (ПСА) сыворотки крови и его фракций, магнито-резонансная томография и, в конечном итоге, гистологическое исследование биоптатов предстательной железы. Однако частое сочетание доброкачественных, предраковых, воспалительных и злокачественных процессов в предстательной железе снижает чувствительность, специфичность и диагностическую точность рутинных методов обследования мужчин [3].

Разработка и применение различных методов иммуногистохимических (ИГХ) исследований дополняет общепринятые методы диагностики болезней предстательной железы новыми факторами, базирующимися на результатах мультифокальной биопсии предстательной железы. Продолжается поиск диагностически значимых молекулярных маркеров при аденокарциноме предстательной железы, обладающих высокой информативностью с целью уменьшения количества биопсий предстательной железы и, следовательно, уменьшения частоты осложнений после них, а также проводятся исследования, доказывающие развитие и прогрессирование рака предстательной железы при участии различных факторов роста [4].

На сегодняшний момент нет четких критериев, выявляющих злокачественные опухоли с высоким потенциалом к метастазированию, поскольку показатель инвазивного роста и метастазирования злокачественных клеток характеризуются их способностью деградировать составляющие межклеточного матрикса — базальные мембраны и межтканевую строму, состоящую из различных структурных белковых компонентов: коллагенов, эластинов и др. Разрушение базальной мембраны и продвижение по межклеточному матриксу связаны с секрецией протеолитических ферментов. Металлопротеиназы преимущественно секретируются клетками в форме не активных ферментов, в обычных условиях в тканях обнаруживаются незначительные количества этих факторов. В случае их активации происходит протеолитическое разложение окружающих клетку белков [5]. В физиологических условиях существуют различные биологические механизмы по предотвращению протеолиза тканей, вызванного активацией металлопротеаз, такие как секреция клетками стромы тканевых ингибиторов металлопротеаз или TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases). Это белки, способные опосредованно нековалентными комплексами со многими членами семейства матриксных металлопротеаз инактивировать их [4; 6].

Ki-67 относится к регуляторным белкам, его появление совпадает с вступлением клетки в митоз — фазу деления, что позволяет использовать его в качестве универсального маркера пролиферации при оценке роста злокачественных опухолей, в том числе и РПЖ. Индекс Ki-67 является независимым показателем прогноза рецидива и выживаемости у больных РПЖ [7].

В настоящее время описано 28 типов коллагена, которые кодируются более чем 40 генами. Они отличаются друг от друга по аминокислотной последовательности, а также по степени модификации — интенсивности гидроксирования или гликозилирования. Общим для всех коллагенов является присутствие их во внеклеточном матриксе. Коллаген IV является основным компонентом базальной мембраны эпителиальных клеток, он также встречается в стенке артериальных сосудов и собственном веществе соединительной ткани. Инвазивные свойства опухолевых клеток связаны с разрушением этого важного компонента соединительной ткани [8].

В настоящей работе с помощью ИГХ методик проведено исследование продукции матриксной металлопротеиназы 9 типа, ингибитора металлопротеиназы TIMP-1, маркера пролиферации Ki-67, и изучение распределения коллагена IV в неизмененных клетках секреторного эпителия при ДГПЖ и атипических клетках аденокарциномы простаты различных градаций по шкале Глисона с целью изучения молекулярных механизмов инвазивного роста рака предстательной железы.

Методы. Исследование проведено у 184 пациентов с заболеваниями предстательной железы в возрасте от 46 до 83 лет, средний возраст $68,2 \pm 2,17$ лет. При этом пациенты были разделены на 2 группы. Группу больных с ДГПЖ составили 65 пациентов, больные с диагностированным раком предстательной железы — 118 пациентов.

ИГХ исследование проводилось в соответствии со стандартным протоколом. В исследовании применялись следующие антитела к антигенам человека: моноклональные мышиные антитела к белку Ki-67 (MM1, Diagnostic Biosystems, 1 : 200); моноклональные мышиные антитела к коллагену IV (PHM-12, Thermo-scientific, 1 : 100); очищенные антитела кроличьей антисыворотки к матриксной металлопротеиназе-9 (Thermoscientific, 1:400); моноклональные кроличьи антитела к ингибитору TIMP-1 (EPR 1550, 1 : 100, EPITOMICS).

Для индикатора пролиферативной активности использовался индекс пролиферации Ki-67 (ИП Ki-67), который характеризуется долей интенсивно окрашенных ядер при учете 300 клеток, выраженной в процентах.

Распределение коллагена IV в базальной мембране желез предстательной железы и строме оценивали полуколичественным методом по следующим показателям: 0 — отсутствие коллагена вдоль базальной мембраны и стромы, 1 — наличие тонкой полоски коллагена, 2 — толстая полоска коллагена вдоль базальной мембраны, сравнимая по толщине и интенсивности окрашивания стенки сосудов.

Оценку интенсивности ИГХ реакции с металлопротеазами и их ингибиторами проводили по следующим показателям: 0 — отсутствие коричневых гранул в цитоплазме клеток, 1 — наличие отдельных мелких гранул в цитоплазме, 2 — распределение в отдельных клетках крупных гранул, 3 — наличие крупных гранул в цитоплазме большинства клеток.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы STATISTICA 10.0, с последующим математическим анализом полученных

материалов, включающим параметрические и непараметрические методы одномерной и многомерной статистики. Корреляционные взаимоотношения между числом Глисона опухоли, ПСА, индексом пролиферации клеток, выраженностью продукции оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (r_s).

Результаты и обсуждение. С увеличением возраста пациентов в неизмененных эпителиальных клетках предстательной железы несколько увеличивается продукция показателя клеточной пролиферации Ki-67 ($3,24 \pm 0,61$), но различия статистически недостоверны ($p > 0,05$). В биоптатах пациентов с ДГПЖ отдельные пролиферирующие клетки располагались только в базальном клеточном слое, пролиферативная активность клеток секреторного клеточного слоя не выявлена. Вместе с тем в аденокарциномах различных градаций в настоящем исследовании выявлен широкий спектр пролиферативной активности секреторных железистых клеток (рис. 1).

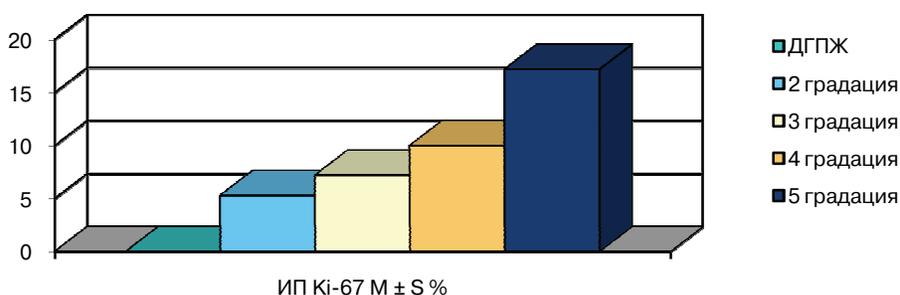


Рис. 1. Характеристика пролиферативной активности клеток при ДГПЖ и аденокарциноме простаты

В группе пациентов с опухолями 2-й градации по шкале Глисона пролиферативная активность секреторных опухолевых клеток (ИП Ki-67) составила $5,3 \pm 1,1\%$ ($p < 0,05$). Опухоли 3-й градации по шкале Глисона также характеризовались умеренной пролиферацией ($7,2 \pm 1,4\%$, $p < 0,05$). В высокоинвазивных аденокарциномах 4-й и 5-й градаций отмечено выраженное увеличение пролиферативной активности атипических клеток. Следовательно, пролиферативная активность анапластических клеток аденокарциномы различных градаций по шкале Глисона, является чувствительным методом для дифференциальной диагностики новообразований простаты.

При ИГХ исследовании коллаген IV выявляли в виде тонкой коричневой полоски различной интенсивности вдоль базальной мембраны железистых клеток. Коллаген IV мелких артериол соединительно-тканной стромы, как правило, окрашивает стенку сосудов в интенсивный коричневый цвет. В соединительно-тканной строме ДГПЖ определяются толстые коричневые полоски коллагена IV, распределяющиеся вдоль базальной мембраны желез (интенсивность 2 балла). Большое количество коллагена выявляется и в соединительно-тканной строме простаты (рис. 2).

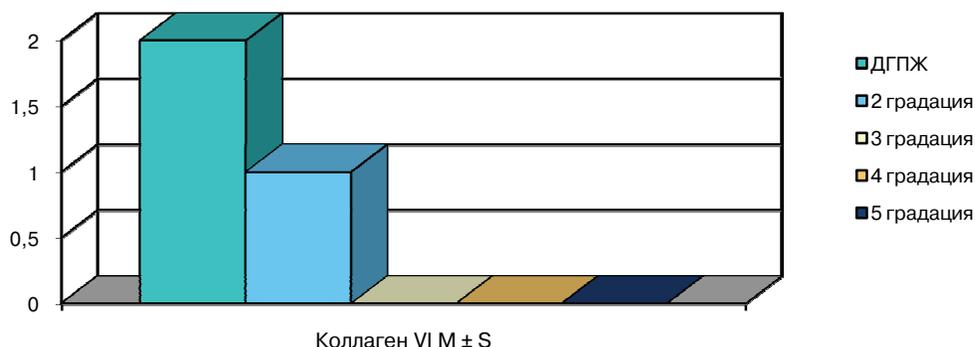


Рис. 2. Распределение коллагена IV при ДГПЖ и аденокарциноме простаты

В соединительно-тканной строме аденокарциномы предстательной железы 2-й градации по шкале Глисона интенсивность окраски менее выражена по сравнению с ДГПЖ и, соответствуя 1 баллу, однако, тонкие волокна коллагена окружают отдельные клеточные элементы. С увеличением числа Глисона более 3-й градации коллагеновые волокна полностью исчезают вокруг опухолевых клеток.

Последующие исследования были направлены на изучение механизмов протеолитической активности аденокарциномы предстательной железы, характеризующих инвазивный опухолевый рост и во многом определяющих злокачественный опухолевый потенциал.

В железистых клетках при ДГПЖ, в большом количестве определяются крупные, средние и мелкие гранулы ММР 9 (интенсивность 3 балла). При изучении биоптатов аденокарциномы предстательной железы выявлено снижение интенсивности ИГХ окрашивания ММР-9 (рис. 3).

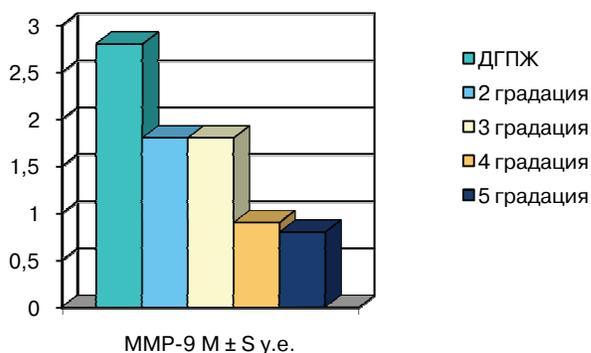


Рис. 3. Продукция ММР-9 при ДГПЖ и аденокарциноме различной градации по шкале Глисона

Сравнение показателей продукции ММР-9 при ДГПЖ и аденокарциноме различных градаций выявило следующую закономерность: оказалось, что продукция этого протеолитического фермента выше в тканях доброкачественных новообразований, где не происходит разрушения коллагена базальной мембраны, в отличие

от аденокарциномы, характеризующейся инфильтративным ростом и разрушением базальной мембраны опухолевых желез. Вместе с тем в полуколичественных исследованиях выявлено, что продукция ММР-9 в секреторных опухолевых клетках снижается по мере возрастания градации аденокарциномы, при этом в аденокарциномах 2-й и 3-й градаций уровень продукции этого фермента достоверно в 2 раза превышает этот показатель в аденокарциномах 4-й и 5-й градаций. Не выявлено достоверных различий в продукции ММР-9 между аденокарциномами 2-й и 3-й градаций, а также между 4-й и 5-й градаций.

Для дальнейшего изучения механизмов инвазии аденокарциномы были предприняты аналогичные исследования продукции в опухолевых клетках белка, ингибирующего активность ММР-9 в клетках — ТИМР-1. При аналогичном исследовании продукции ТИМР-1 в различных опухолевых образованиях предстательной железы от ДГПЖ до аденокарциномы различной градации в подавляющем большинстве исследуемого гистологического материала, кроме описанных выше патологических состояний железистого эпителия, отмечены отдельные неизменные железистые структуры, которые послужили контролем для последующих ИГХ исследований.

В железистых клетках при ДГПЖ выраженная ИГХ реакция: в секреторных клетках крупных желез в большом количестве определяются крупные, средние и мелкие гранулы ТИМР-1, отмечается интенсивная окраска желез (интенсивность 3 балла). При оценке распределения ТИМР-1 в аденокарциноме различной градации от -2 до -5 во всех случаях интенсивность окрашивания оказалась ниже, чем при ДГПЖ, и составила на фоне неизменных желез 0 или 1 балл (рис. 4).

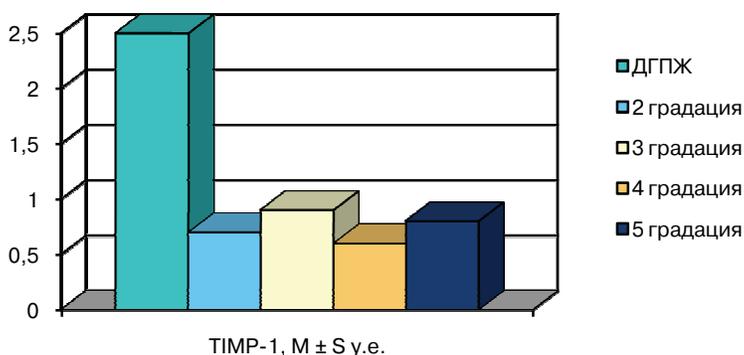


Рис. 4. Характеристика продукции ТИМР-1 в аденокарциноме различной градации по шкале Глисона

По мере увеличения градации по шкале Глисона и повышения пролиферативной активности секреторных клеток аденокарциномы простаты происходит снижение выработки матриксной ММР-9. При этом инвазивные свойства опухолевых клеток, выражающиеся в разрушении коллагена IV — белка базальной мембраны и соединительнотканной стромы простаты, можно объяснить нарушением баланса между ММР-9 и ТИМР-1 — белком, блокирующим этот фермент, продукция которого существенно снижается в аденокарциномах различной градации. Обнаруже-

но, что уровень продукции TIMP-1 снижается в опухолях по мере нарастания в них анапластических изменений, при этом в аденокарциномах всех градаций его уровень более чем в 3 раза меньше, чем в клетках при ДГПЖ либо в неизмененных железах. Кроме того, не выявлено достоверных различий в уровне продукции TIMP-1 между аденокарциномами различных градаций.

Полученные данные свидетельствуют, что при ДГПЖ высокая продукция MMP-9 блокируется высоким содержанием TIMP-1. В аденокарциномах продукция MMP-9 значительно снижается, но данная протеаза разрушает коллаген IV базальной мембраны железистых структур за счет отсутствия или слабой продукции TIMP-1, блокирующего протеолитическое действие данного фермента на коллаген соединительной ткани. Низкой продукцией ингибитора TIMP-1 в аденокарциномах можно объяснить и инвазивные свойства этих опухолей.

В ходе исследования выявлена положительная корреляционная связь между градацией по шкале Глисона и индексом пролиферации клеток по показателю Ki-67 ($r_s = 0,674$) и отрицательная корреляционная связь этой градации с уровнем продукции MMP-9 ($r_s = -0,660$). Достоверная отрицательная корреляция существует между уровнем пролиферативной активности клеток и продукции секреторными опухолевыми клетками MMP-9 ($r_s = -0,369$). Отсутствие корреляционной взаимосвязи между продукцией TIMP-1 и другими клиническими, морфологическими и ИГХ показателями свидетельствует о том, что уровень этого белка в секреторных клетках аденокарциномы снижен.

Таким образом, в рамках проведенного исследования доказана диагностическая ценность ИГХ факторов, таких как пролиферативной активности белка Ki-67; распределения коллагеновых волокон вокруг клеток; уровня продукции металлопротеиназы 9 типа и ингибитора TIMP-1. Внедрение в клиническую урологию на основе алгоритмированного подхода вышеуказанных методов позволяет увеличить точность дифференциальной диагностики болезней предстательной железы и выявляемость РПЖ на стадии локализованного процесса и сократить количество необоснованных повторных биопсий.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Аполихин О.И., Сивков А.В., Москалева Н.Г. и др. Анализ уронефрологической заболеваемости и смертности в Российской Федерации за десятилетний период (2002—2012 гг.) по данным официальной статистики // Экспериментальная и клиническая урология. 2014. № 2. С. 4—12.
- [2] Злокачественные новообразования в России в 2012 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, В. Петровой. М., 2014. С. 10—26, 55—67, 100—125.
- [3] Пушкарь Д.Ю. Простат-специфический антиген и биопсия предстательной железы. М.: «МЕДпресс-информ», 2003.
- [4] Кушлинский Н.Е. Молекулярные и клеточные маркеры пролиферации, дифференцировки, метастазирования и неопластического при раке предстательной железы // Избранные главы гериатрической урологии / Под ред. Л.М. Горилковского. М.: Ньюдиамед, 2000. С. 227—273.
- [5] Березин А.Е. Регуляторы активности матриксных металлопротеиназ как новые биологические маркеры кардиоваскулярного ремоделирования: обзор литературы // Украинский медицинский часопис. 2011. № 1. С. 36—43.

- [6] Авдошин В.П., Бабиченко И.И., Котельникова Е.В. Прогностическое значение экспрессии иммуногистохимических маркеров Ki-67, MMP-9 и коллагена IV у больных папиллярным уротелиальным раком мочевого пузыря // Онкоурология. 2011. № 3. С. 66—70.
- [7] 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 clinico-pathological features, in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *In vivo* 2003; 17: 469—78.
- [8] Gouyer V., Conti M., Devos P. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is an independent predictor of prognosis in patients with non-small cell lung carcinoma who undergo resection with curative intent // *Cancer*. 2005. Vol. 103. P. 1676—1684.

PRODUCTION OF GROWTH FACTORS IN BENIGN AND MALIGNANT PROSTATIC DISEASES

A.A. Kostin¹, M.I. Andriukhin¹, I.I. Babichenko²,
S.A. Pul'bere¹, P.I. Motin³, P.I. Tal'berg¹

¹Department of Urology and operative Nephrology
with the course of oncurology
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

²Department of Pathological Anatomy
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

³Urology Department, Moscow City Clinical Hospital № 29
Hospital square, 2, Moscow, Russia, 111020

Immunohistochemical study of localization of matrix metalloproteinase-9 and inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and cells proliferative activity by Ki-67 protein has been carried out in benign prostatic hyperplasia (BPH) and adenocarcinoma (AC) of different grades by the Gleason score. A moderate positive correlation between the Gleason score and cell proliferation Ki-67 index ($r_s = 0,674$) and a moderate negative correlation with the level of such score and expression of matrix metalloproteinase-9 ($r_s = -0,660$) were detected. A weak significant negative correlation exists also between the level of proliferative activity of secretory cells and the expression of MMP-9 by tumor cell ($r_s = -0,369$). A significant decrease of the MMP-9 and TIMP-1 levels in the AC of different gradations have been found. The invasive properties of tumor cells, which are expressed in the destruction of collagen IV of basement membrane and connective tissue stroma of the prostate, associated with an imbalance between MMP-9 and protein blocking this enzyme — TIMP-1, expression of which decreases in AC compared to BPH.

Key words: adenocarcinoma of the prostate, MMP-9, TIMP-1, Ki-67, IV collagen.

REFERENCES

- [1] Apolikhin O.I., Sivkov A.V., Moskalyova N.G. et al. The analysis of urological morbidity and mortality in Russian Federation for the ten-year period (2002—2012) according to official statistics. *Experimental and clinical urology*. 2014. № 2. P. 4—12.
- [2] Malignant diseases in Russia in 2012 (incidence and mortality). Ed. A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, V. Petrova. Moscow, 2014. P. 10—26, 55—67, 100—125.

- [3] *Pushkar' D.Yu.* A prostates-specific antigen and biopsy of a prostate gland. Moscow: MED-press inform, 2003.
- [4] *Kushlinsky N.E.* Molecular and cellular markers of proliferation, differentiation, metastasis and neoangiogenesis in prostate cancer // Selected chapters of geriatric urology / Ed. L.M. Gorilovsky. Moscow: Newuiamed, 2000.
- [5] *Berezin A.E.* Activity regulators of matrix metalloproteinases as new biological markers of cardiovascular remodeling: review of literature. *Ukrain. Med. J.* 2011. No. 1. P. 36—43.
- [6] *Avdoshin V.P., Babichenko I.I., Kotel'nikova E.V.* Predictive value of immunohistochemical markers of Ki-67, MMP-9 expression and collagen IV in patients with a papillary urotelial bladder cancer. *Oncourology.* 2011. № 3. P. 66—70.
- [7] *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 with — erb-B2, sex steroid hormone receptors and other clinico-pathological features, in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *In vivo*, 2003; 17: 469—78.
- [8] *Gouyer V., Conti M., Devos P. et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is an independent predictor of prognosis in patients with non-small cell lung carcinoma who undergo resection with curative intent. *Cancer.* 2005. Vol. 103. P. 1676—1684.