

Дуб А. А., Четер И. Р., Воропаев Д.Д.

Муцины и уровень экспрессии цитокератинов AE1/AE3 и D2-40 при AMACR-позитивном фенотипе атипической мелкоацинарной пролиферации и аденокарциноме предстательной железы

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

Dub A. A., Cheter I. R., Voropaev D.D.

Mucins and cytokeratins AE1/AE3 and D2-40 expression level in AMACR-positive phenotype of atypical small acinar proliferation and prostate carcinoma

Резюме

Изучено 540 биоптатов предстательной железы от 90 пациентов, сформировавших 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. Используются морфологические и статистические методы. Продукция кислых муцинов наименее выражена при атипической мелкоацинарной пролиферации. Наибольший уровень кислых муцинов обнаружен при аденокарциноме Grade group I. Самый высокий уровень экспрессии панцитокератина AE1/AE3 был при аденокарциноме Grade group II (3 балла), а достоверно наиболее низкий уровень – при Grade group V (1 балл). В результате исследования лимфатических сосудов с помощью маркера цитокератина D2-40 установлено, что общая объемная плотность лимфатических сосудов при атипической мелкоацинарной пролиферации достоверно выше, чем при аденокарциноме предстательной железы.

Ключевые слова: атипическая мелкоацинарная пролиферация предстательной железы, цитокератины, муцины, аденокарцинома

Summary

We took 540 prostate biopsy samples from 90 patients with atypical small acinar proliferation and prostate carcinoma. We divided the into six groups: the 1st group consisted of 15 patients with prostate carcinoma of a I Grade group; the 2nd group — 15 patients with prostate carcinoma of a II Grade group; the 3rd group — 15 patients with carcinoma of a III Grade group; 4th group — 15 patients with prostate carcinoma of a IV Grade group; 5th — 15 patients with prostate carcinoma of a V Grade group; 6th — 15 patients with atypical small acinar proliferation. We used morphological assay and statistical methods to provide comparative analysis of the groups. The lowest acid mucin expression level was observed in patients with atypical small acinar proliferation, whereas the highest level was observed in patients with prostate carcinoma of a I Grade group. The highest epithelium marker AE1/AE3 expression level was observed in patients with carcinoma of a II Grade group (3 scores); the lowest was observed in patients with carcinoma of a V Grade group (1 score). D2-40 marker expression level analysis revealed, that the total bulk density of limphatical vessels was the highest in atypical small acinar proliferation than in prostate carcinoma.

Key words: atypical small acinar proliferation of prostate, cytoceratins, mucins, adenocarcinoma.

Введение

На современном этапе в клинической практике широко используется комплекс различных методов диагностики болезней предстательной железы: инструментальные методы, определение простат-специфического антигена сыворотки крови и его фракций, гистологиче-

ское исследование биоптатов предстательной железы. Однако частое сочетание предраковых состояний, воспалительных, доброкачественных и злокачественных неопластических заболеваний в предстательной железе снижает чувствительность, специфичность и диагностическую точность рутинных методов обследования

мужчин [1]. До настоящего времени дифференциальная диагностика пренеопластических процессов и заболеваний предстательной железы и прежде всего атипичской мелкоацинарной пролиферации (АМАП) по-прежнему представляет большие сложности [2]. Следует отметить, что АМАП сама по себе не является предраковым состоянием, а выражает лишь неясность диагноза, тот самый момент, когда патологоанатом не может с уверенностью определиться, чему соответствует морфологическая картина – доброкачественному процессу или карциноме. Поэтому одной из актуальных проблем современной онкоурологии является поиск оптимальных молекулярно-генетических маркеров для дифференциальной диагностики пренеопластической патологии и карциномы предстательной железы [3]. Особый научно-практический интерес в связи с этим представляет исследование АМАСР-позитивного фенотипа АМАП, как наиболее часто встречающегося и имеющего наибольшее сходство и непосредственную связь с карциномой простаты [3,4].

Цель исследования – определить содержание нейтральных и кислых муцинов и уровень экспрессии цитокератинов AE1/AE3 и D2-40 при АМАСР-позитивном фенотипе атипичской мелкоацинарной пролиферации и аденокарциноме предстательной железы различной степени градации.

Материалы и методы

Проанализирован биопсийный материал 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. Забор материала выполнен путём тонкоигольной трепан-биопсии из 6 точек. 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 в соответствии с рекомендациями руководства Bostwick D. G. и соавт. (2008), классификации опухолей ВОЗ (2016) [5,6]. Морфологическая оценка степени злокачественности осуществлялась по модифицированной шкале Глисона (2014) [7]. В результате 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 выполнены на кафедре Патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО «ЮУГМУ» Минздрава России (зав. кафедрой – профессор Е.Л. Казачков). Фрагменты тканей фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина 24 часа. Далее обезжировали, обезжирили и залива-

ли в парафин в гистологическом автомате по принятой методике. Окрашивали гематоксилином и эозином. Для выявления муцинов использовался гистохимический метод: ШИК-реакция с альциановым синим для обнаружения нейтральных и кислых муцинов в соответствии с рекомендациями по гистологической технике [8]. При иммуногистохимическом исследовании предварительно устанавливался АМАСР-позитивный либо АМАСР-негативный фенотип АМАП с помощью маркера онкогена АМАСР (P504S), затем применялись моноклональные антитела к панцитокератинам AE1/AE3 (цитокератинам широкого спектра), цитокератину D2-40 («SPRING bioscience», Canada). Оценка экспрессии производилась по балльной системе: 1 балл – до 25 % клеток и слабое окрашивание цитоплазмы, ограниченное распространение; 2 балла – 25-50 % клеток и умеренное окрашивание цитоплазмы, неравномерное распределение; 3 балла – 50-75 % клеток, интенсивное окрашивание цитоплазмы, широкое распространение; 4 балла – интенсивное окрашивание цитоплазмы в более чем 75 % клеток, широкое распространение. При морфометрическом исследовании использовался электронный аналог окулярной стереометрической сетки Г.Г. Автандилова, содержащий 100 тест-точек. Проводили подсчет по 50 полям зрения при увеличении $\times 400$. Статистическое исследование проводилось с использованием непараметрических методов: применяли медиану и интерквартильный размах, для вариационного анализа – критерий Манна-Уитни. Просмотр и фотографирование микропрепаратов осуществлялось на тринокулярном цифровом микроскопе Levenhuk D607T, 5,1 Мпикс (США). Для расчётов использовали 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

Гистохимическое исследование биоптатов предстательной железы заключалось в определении содержания кислых и нейтральных муцинов. В цитоплазме эпителиоцитов нейтральные муцины выявлялись преимущественно при АМАП. Кислые муцины были выявлены во всех 6 исследовательских группах. Реже и меньше всего кислые муцины регистрировались при АМАП (2 балла) [Me = 28 (16-34)] (Рис. 1 - *этой и другие рисунки к статье см. на специальной цветной вставке журнала - прим.ред.*). Достоверные различия содержания кислых муцинов были получены при сравнении АМАП с аденокарциномой: Grade group I [Me = 69 (25-82)] ($p=0,000003$), Grade group II [Me = 67 (39-82)] ($p=0,000003$), Grade group III [Me = 68 (39-82)] ($p=0,000003$), Grade group IV [Me = 65 (28-75)] ($p=0,000003$) и Grade group V [Me = 48 (32-80)] ($p=0,000003$).

Наибольшее количество кислых муцинов обнаружено при аденокарциноме Grade group I [Me = 69 (25-82)] (Рис. 2). Достоверные различия установлены и между аденокарциномой Grade group II ($p=0,0009$), Grade group IV ($p=0,000003$) и Grade group V ($p=0,000003$). При аде-

нокарциномах Grade group II и Grade group III количество кислых муцинов было примерно одинаковым: Me = 67 (39-82) и Me = 68 (39-82) соответственно, но существенно превышало данный параметр при аденокарциномах Grade group IV-V ($p=0,0007$, $p=0,000007$ $p=0,000003$ $p=0,000003$, соответственно). Аденокарциномы Grade group IV [Me = 65 (28-75)] и Grade group V [Me = 48 (32-80)] также имели различия по данному параметру ($p=0,00004$). Таким образом, увеличение содержания кислых муцинов в цитоплазме эпителиоцитов отмечается от АМАП к аденокарциноме Grade group I. Затем, начиная с Grade group IV к Grade group V, напротив, происходит достаточно выраженное снижение содержания кислых муцинов при отсутствии нейтральных, однако при этом значения кислых муцинов при Grade group V всё-таки остаются более чем в 1,5 раза выше таковых при АМАП. Обращал на себя внимание тот факт, что при аденокарциноме Grade group I, II муцинозный секрет голубого цвета, более соответствующий содержанию слабосульфатированных кислых муцинов, определялся лишь в апикальной части цитоплазмы эпителиоцитов, по мере снижения дифференцировки аденокарциномы муцин занимал всю цитоплазму клетки.

Иммуногистохимическое исследование биопсийного материала предстательной железы с применением моноклональных антител к панцитокератинам AE1/AE3 позволило установить, что наибольшее количество меченых эпителиоцитов регистрировалось при аденокарциноме Grade group II (Рис. 3) (3 балла) [Me=67% (61-69)] в сравнение с АМАП (2 балла) [Me=42% (37-47)], ($p=0,000003$), аденокарциномой Grade group I (2 балла) [Me=38% (35-41)], ($p=0,000003$), Grade group III (2 балла) [Me=36% (13-66)], ($p=0,000003$), Grade group IV (2 балла) [Me=25% (7-41)], ($p=0,000003$) и Grade group V (1 балл) [Me=24% (5-41)], ($p=0,000003$). Самый низкий уровень экспрессии панцитокератина AE1/AE3 отмечен при аденокарциноме Grade group V (Рис. 4) в сравнение с АМАП ($p=0,000003$), аденокарциномой Grade group I ($p=0,000003$), Grade group II ($p=0,000003$), Grade group III ($p=0,000007$).

Использование маркера цитокератина D2-40 для оценки лимфатических сосудов дало возможность определить, что общая объемная плотность лимфатических сосудов при АМАП [Me = 10 (5 - 16)] была выше, чем при аденокарциномах предстательной железы [Me = 6 (3 - 20)] ($p=0,01$). Значительно большее количество лимфатических сосудов с суженным просветом регистрировалось при аденокарциноме Grade group I [Me = 19 (16 - 20)] (Рис. 5), чем при АМАП [Me = 10 (5 - 16)] ($p=0,000004$), Grade group II [Me = 7 (7-9)] ($p=0,000003$), Grade group III [Me = 5,5 (5 - 7)] ($p=0,00008$), Grade group IV [Me = 4 (3 - 5)] ($p=0,000005$), Grade group V [Me = 6 (6 - 6)] ($p=0,0001$). Наименьшее количество лимфатических сосудов с суженным просветом отмечалось при аденокарциноме Grade group IV [Me = 4 (3 - 5)] (Рис. 6), в сравнение с АМАП ($p=0,000005$) и с аденокарциномой простаты других градаций: Grade group I ($p=0,000003$), Grade group II ($p=0,000003$), Grade group III ($p=0,000003$),

Grade group V ($p=0,000003$).

Известно, что нейтральные муцины, выявляемые гистохимически с помощью ШИК-реакции, выполняют протективную роль [9]. Хроническое воспаление предстательной железы сочетается с нарастающей дисрегуляцией, нарушением темпов клеточного обновления, а это приводит к нарушению дифференцировки клеток и абберантному синтезу муцинов [10]. Сульфатированные кислые муцины не всегда обладают большими протективными свойствами, чем нейтральные, а их наличие объясняется компенсаторной реакцией на персистирующую вторичную альтерацию [9]. Существуют также данные о том, что присутствие кислых сульфатированных муцинов свидетельствует об интенсификации сиалирования и образования «незрелого» муцина, который выявляется и в эпителии некоторых карцином предстательной железы [11]. Проведенное гистохимическое исследование биоптатов предстательной железы показало, что только кислые муцины выявляются как при АМАП, так и при аденокарциноме. Наличие одновременно нейтральных и кислых муцинов в цитоплазме эпителиоцитов при АМАП, вероятно, указывает на этап переключения с продукции нейтральных муцинов на сиалированные или лишь на частичное сульфатирование муцина из-за персистирующей альтерации эпителия. Присутствие кислого мукополисахарида в бокаловидных клетках эпителия желудка некоторые авторы однозначно расценивают как основной признак кишечной метаплазии [9]. Данных о подобной интерпретации характеристик муцина при АМАП в доступных источниках нами не было обнаружено. Ввиду того, что АМАП находится в дифференциально-диагностическом плане на «распутье» между таким пренеопластическим состоянием, как простатическая интраэпителиальная неоплазия и карциномой, содержание «незрелого» муцина в железистом эпителии при АМАП можно сопоставить с данными S. Sentinelli, который отмечал прогрессивное увеличение содержания кислых муцинов в эпителиоцитах предстательной железы при простатической интраэпителиальной неоплазии II (25%), при простатической интраэпителиальной неоплазии III (35%) и карциноме предстательной железы (70%), в то время, как в неизменной ткани органа кислые муцины полностью отсутствовали [12].

В литературе имеются данные об использовании панцитокератина AE1/AE3 с целью выявления групп риска по скорости метастазирования и наличию метастазов в лимфатических узлах при аденокарциноме Grade I group II-V, а также для выявления occultных метастазов в органы малого таза при уротелиальной аденокарциноме мочевого пузыря [13]. Также известно о зависимости интенсивности экспрессии панцитокератина AE1/AE3 и прогноза заболевания от степени дифференцировки аденокарциномы [14]. В нашем исследовании также подтверждается тенденция к снижению экспрессии данного маркера по мере снижения дифференцировки опухоли и её прогрессии.

Несмотря на то, что моноклональные антитела к цитокератинам D2-40 обладают свойством метить ба-

зальные клетки протоков молочной и слюнных желез, фибробластов и миоэпителиальных клеток, в основном данный маркер нашёл своё применение для оценки лимфоангиогенеза как одного из признаков прогрессирующей опухоли [15]. Есть научные данные о возможном усилении лимфоангиогенеза при хронических воспалительных процессах в тканях [16]. Возможно, этим и объясняется большая общая объемная плотность лимфатических сосудов при АМАП, чем при аденокарциноме. Вместе с тем, достоверно большее количество суженных лимфатических сосудов при аденокарциноме Grade group I в сравнение с другими исследовательскими группами, скорее всего, связано с формированием опухолевого процесса, стимулирующего лимфоангиогенез. Преобладание же именно суженных лимфатических сосудов объясняется в литературе феноменом повышения гидростатического давления при увеличении опухоли в объеме и механическом сдавлении лимфатических сосудов [17]. Существуют данные о том, что лимфоангиогенез у больных аденокарциномой предстательной железы необходимо оценивать для выявления контингента больных с более высоким риском агрессивного развития опухоли и с целью проведения ранней андрогенной терапии [18].

Заключение

В заключение можно отметить, что гистохимическое исследование на муцины и молекулярно-биологическое исследование цитокератинов AE1/AE3, D2-40 могут быть применимы комплексно в качестве вспомогательных методов в сложных дифференциально-диа-

гностических случаях при АМАСР-положительном фенотипе АМАП и аденокарциноме предстательной железы Grade group I-V. При комплексной оценке морфологических методов исследования необходимо учитывать, что АМАСР-позитивный фенотип АМАП предстательной железы характеризуется низким содержанием кислых муцинов наряду с высоким содержанием нейтральных муцинов в цитоплазме эпителиоцитов, что отличает её от аденокарцином различных Grade group, для которых характерно высокое содержание кислых секреторных муцинов и отсутствие нейтральных муцинов. Следует иметь в виду, что зачастую наиболее высокий уровень экспрессии панцитокератина AE1/AE3 регистрируется при аденокарциноме Grade group II (3 балла), умеренный уровень – при АМАП, Grade group I, III и IV (2 балла), а достоверно наиболее низкий уровень – при Grade group V (1 балл). Требуется обращать внимание при АМАСР-позитивной АМАП предстательной железы на общую объемную плотность лимфатических сосудов, определяемую с помощью маркера цитокератина D2-40: этот параметр, как правило, имеет большие значения, чем при аденокарциноме предстательной железы. ■

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

Литература:

1. Костин А. А., Андрюхин М. И., Бабиченко И. И., Пульбере С. А., Мотин П. И., Тальберег П. И. Продукция факторов роста при доброкачественных и злокачественных болезнях предстательной железы. Вестник РУДН. Серия: Медицина. 2015; 3:75-83.
2. Федорина Т. А., Поletaева С. В. Особенности диагностики рака простаты по биопсийному материалу. Саратовский науч.-мед. журн. 2013; 9(4):632-636.
3. Андреева Ю.Ю., Франк Г.А., редакторы. Опухоли предстательной железы морфологическая диагностика и генетика. М: Практическая медицина; 2012. 4. Cheong H.F., Tan P.H., Iczkowski K.A. Pathology of Atypical Small Acinar Proliferation. Medscape: Treatment & Drugs, updated: Jan 10, 2016. [Electronic version] <https://emedicine.medscape.com/article/1611859-overview>
5. Bostwick D. G., Meiers I. Neoplasma of the prostate. In: Bostwick D. G., Cheng L., editors. Urologic Surgical Pathology. 2nd ed. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier 2008; 462-8.
6. Moch H., Humphrey P. A., Ulbright T. M., Reuter V. E., eds. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. vol. 8 4th ed. WHO Press; 2016. ISBN-13 (Print Book) 978-92-832-2437-2.
7. Epstein J. I., Egevad L., Amin M. B., Delahunt B., Srigley J. R., Humphrey P. A.; Grading Committee. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostate Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. Am J Surg Pathol. 2016; 40 (2): 244-252.
8. Лилли Р. Д. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М: Мир; 1969.
9. Никитин С. В. Нарушение зонального распределения муцинов в эпителии слизистой оболочки желудка у пациентов с хроническим гастритом. Пермский медицинский журнал. 2012; XXIX(2): 106-111.
10. Поморгайло Е. Г., Мозговой С. И., Кононов А. В. Оценка клеточного обновления и муцинпродуцирующей активности эпителия слизистой оболочки желудка при инвазии *Helicobacter pylori*. Медицинская наука и образование Урала. 2011; 3-1:49-51.
11. Золотова Н. А., Макарова О. В. Барьерная роль муцинов толстой кишки в норме и при язвенном колите. Клиническая и экспериментальная морфология. 2016; 3:69-74.
12. Sentinelli S., Mucins in prostatic intra-epithelial

- neoplasia and prostatic carcinoma. Histopathology.* 1993; 22(3):271-4.
13. Gordetsky J., Gibson B., Stevens T. M., Ellenburg J. L., Grizzle W., Rais-Bahrami S. *Occult Metastases in Pelvic Lymphadenectomy Specimens From Patients With Urothelial Carcinoma of the Bladder. Urology.* 2016; 94:161-6.
 14. Engvad B., Poulsen M. H., Staun P. W. *Histological step sectioning of pelvic lymph nodes increases the number of identified lymph node metastases. Virchows Arch* 2014; 464 (1): 45-52.
 15. Kuroda N., Katto K., Tamura M. et al. *Immunohistochemical application of D2-40 as basal cell marker in evaluating atypical small acinar proliferation of initial routine prostatic needle biopsy materials. The Japanese Society for Clinical Molecular Morphology.* 2010; 43:165-169.
 16. Зербино Д. Д. *Общая патология лимфатической системы.* Киев: Здоров'я. 1974; 160.
 17. Shayan R., Achen M. G., Stacker S. A. *Lymphatic vessels in cancer metastasis: bridging the gaps. Carcinogenesis.* 2006; 27(9):1729-38.
 18. Ambrosio M. R., Rocca B. J., Barone A., Ginori A., Crivelli F., Pirtoli L. *Lymphatic Vascularization in Prostate Adenocarcinoma: Correlation with Tumor Grade. Androgen Withdrawal and Prognosis. Anticancer Res.* 2015; 35(10):5595-600.

Муцины и уровень экспрессии цитокератинов AE1/AE3 и D2-40 при AMACR-положительном фенотипе атипичной мелкоацинарной пролиферации и аденокарциноме предстательной железы

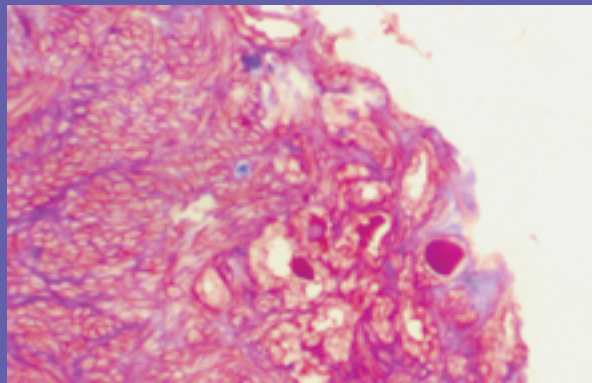


Рис. 1. Секреторные нейтральные муцины в атипичном эпителии при атипичной мелкоацинарной пролиферации предстательной железы. В цитоплазме атипичного железистого эпителия прослеживаются гранулы красного-фиолетового цвета. Окраска ШИК-реакция и альциановый синий. x 400

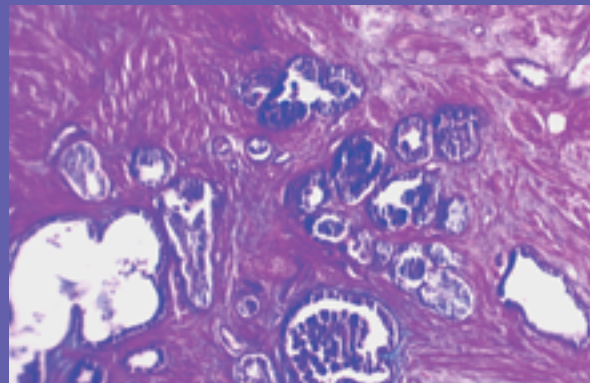


Рис. 2. Секреторные муцины при аденокарциноме предстательной железы Grade Group I. Цитоплазма атипичных эпителиоцитов содержит гранулы фиолетово-синего цвета, наличие в просвете желез секрета фиолетового оттенка. Окраска ШИК-реакция и альциановый синий. x 400

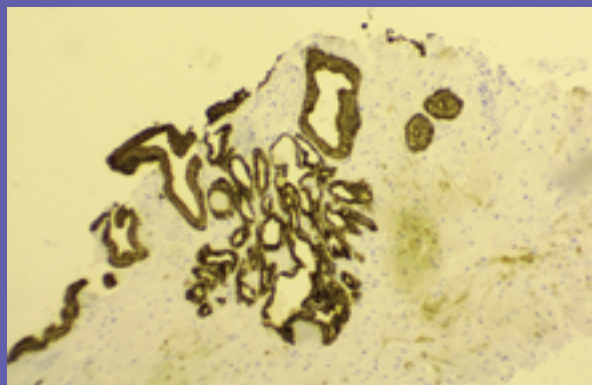


Рис. 3. Экспрессия AE1/AE3 при аденокарциноме предстательной железы Grade Group II. Высокий уровень экспрессии цитокератинов широкого спектра AE1/AE3 (3 балла) в цитоплазме железистого эпителия. Окраска: иммуногистохимический метод – моноклональные антитела к панцитокератину AE1/AE3. x 200

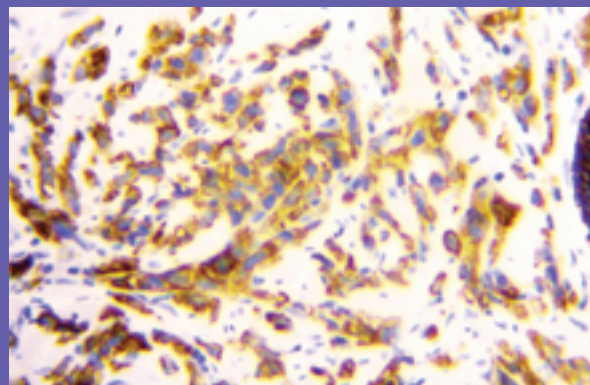


Рис. 4. Экспрессия цитокератинов широкого спектра AE1/AE3 при аденокарциноме предстательной железы Grade Group V. Низкий уровень экспрессии высокомолекулярного панцитокератина AE1/AE3 (1 балл) в цитоплазме железистого эпителия. Окраска: иммуногистохимический метод – моноклональные антитела к панцитокератину AE1/AE3. x 400

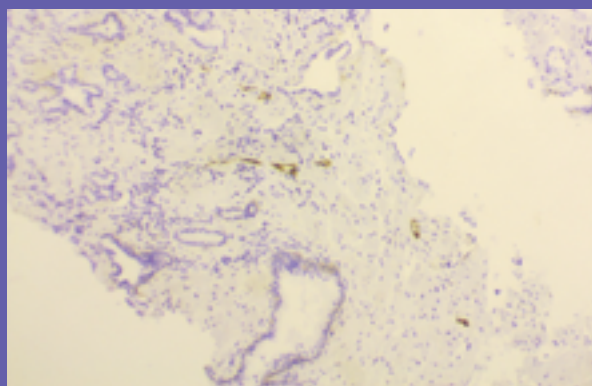


Рис. 5. Экспрессия D2-40 при аденокарциноме предстательной железы Grade Group I. Между железистыми атипичными структурами видны тяжи лимфатических сосудов, эндотелий которых содержит метку данного маркера, коричневого цвета. Окраска: иммуногистохимический метод – моноклональные антитела к панцитокератину D2-40. x 200

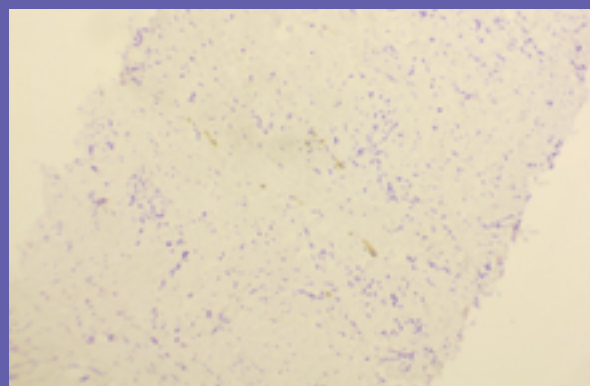


Рис. 6. Экспрессия D2-40 при аденокарциноме предстательной железы Grade Group IV. Между железистыми атипичными структурами видны тяжи лимфатических сосудов, эндотелий которых содержит метку данного маркера, коричневого цвета. Окраска: иммуногистохимический метод – моноклональные антитела к панцитокератину D2-40. x 200