

Тканевая экспрессия аутофагического маркера LC3B как потенциальный биомаркер рецидива рака предстательной железы после лечения высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком (пилотное исследование)

Е.С. Воронина, Р.Н. Фомкин, А.Б. Бучарская, Т.В. Палатова, Г.Н. Маслякова, О.А. Фомкина

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России; Россия, 410012 Саратов, ул. Большая Казачья, 112

Контакты: Роман Николаевич Фомкин mfomkin@mail.ru

Введение. Роль маркеров аутофагии при рецидиве опухоли предстательной железы недостаточно исследована. Мы предположили, что активация аутофагии может являться одним из механизмов, с помощью которого клетки рака предстательной железы выживают после воздействия высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком (HIFU).

Цель исследования – сравнить тканевую экспрессию аутофагического маркера LC3B в биоптатах предстательной железы до и после лечения локализованного рака предстательной железы методом HIFU-абляции.

Материалы и методы. Обследованы 45 пациентов с локализованным раком предстательной железы, подтвержденным морфологически: 1-я группа – 25 пациентов (средний возраст $65,6 \pm 8,4$ года) без признаков рецидива или прогрессирования заболевания; 2-я группа – 20 пациентов (средний возраст $67,5 \pm 7,9$ года) с доказанным при морфологическом исследовании рецидивом опухоли. Иммуногистохимическое исследование проводили стрептавидин-биотиновым методом. Во всех случаях использовали антитело Anti-LC3B antibody ab48394. Результаты реакции подсчитывали по системе Histochemical score (Hs).

Результаты. До лечения у всех пациентов 1-й группы зафиксирована умеренная цитоплазматическая экспрессия (Hs = 111 [111; 115]) антител к LC3B в клетках аденокарциномы предстательной железы, у 5 % – слабая цитоплазматическая экспрессия в клетках мышечно-соединительнотканной стромы (Hs = 47 [43; 50]), у 10 % – слабая положительная реакция LC3B в стенке сосудов (Hs = 28 [20; 35]). После лечения экспрессия LC3B в клетках аденокарциномы стала отрицательной, в цитоплазме клеток мышечно-соединительнотканной стромы – слабой (Hs = 75 [67,5; 80,0]), в эндотелии сосудистой стенки – еще слабее (Hs = 55 [45,5; 60,0]) ($p < 0,001$).

До лечения во 2-й группе у 89 % пациентов выявлена умеренная экспрессия LC3B в опухолевой ткани (Hs = 151,5 [137,5; 160,0]), у 12 % – слабая экспрессия в клетках мышечно-соединительнотканной стромы (Hs = 44 [35; 51,5]), у 5 % – слабая экспрессия в стенке сосудов (Hs = 30 [25; 35]). После лечения экспрессия LC3B в клетках аденокарциномы стала выраженной (Hs = 260 [250; 285]), в клетках мышечно-соединительнотканной стромы – умеренной (Hs = 118 [100; 130]), в сосудистой стенке – слабой (Hs = 45 [30; 55]) ($p < 0,001$). Зафиксирована значимая ассоциация между рецидивом опухоли и гиперэкспрессией LC3B ($r = 0,51$; $p < 0,001$).

Заключение. Развитие рецидива рака предстательной железы связано с увеличением экспрессии аутофагического белка LC3B. Повышенная экспрессия LC3B, которая интерпретируется как свидетельство активации аутофагии и коррелирует с риском прогрессирования заболевания, используется опухолью как онкогенное преимущество.

Ключевые слова: рак предстательной железы, рецидив, экспрессия маркера аутофагии LC3B, высокоинтенсивный сфокусированный ультразвук

Для цитирования: Воронина Е.С., Фомкин Р.Н., Бучарская А.Б. и др. Тканевая экспрессия аутофагического маркера LC3B как потенциальный биомаркер рецидива рака предстательной железы после лечения высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком (пилотное исследование). Онкоурология 2023;19(2):47–55. DOI: 10.17650/1726-9776-2023-19-2-47-55

Tissue expression of LC3B autophagy marker as a potential biomarker of prostate cancer recurrence after treatment with high-intensity focused ultrasound (pilot study)

E.S. Voronina, R.N. Fomkin, A.B. Bucharskaya, T.V. Palatova, G.N. Maslyakova, O.A. Fomkina

Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Ministry of Health of Russia; 112 Bolshaya Kazachia St., Saratov, 410012 Russia

Contacts: Roman Nikolaevich Fomkin rnfomkin@mail.ru

Background. The role of autophagy markers in prostate tumor recurrence has not been sufficiently investigated. We hypothesized that autophagy activation may be one mechanism by which prostate cancer cells survive exposure to high-intensity focused ultrasound (HIFU).

Aim. To compare tissue expression of autophagic LC3B marker in prostate biopsies before and after treatment of localized prostate cancer by HIFU ablation.

Materials and methods. 45 patients with localized morphologically confirmed prostate cancer were examined: group 1 – 25 patients of 65.6 ± 8.4 years without signs of recurrence or progression of the disease; group 2 – 20 patients of 67.5 ± 7.9 years with tumor recurrence proven during morphological examination. Immunohistochemical examination was performed by streptavidin-biotin method. In all cases, Anti-LC3B antibody ab48394 was used. The reaction results were quantified using the Histochemical score (Hs) system.

Results. Prior to treatment, all patients of group 1 showed moderate cytoplasmic expression (Hs = 111 [111; 115]) of antibodies against LC3B in prostate adenocarcinoma cells, 5 % of patients – weak cytoplasmic expression in muscle connective stromal cells (Hs = 47 [43; 50]), 10 % of patients – weak positive LC3B reaction in the vessel wall (Hs = 28 [20; 35]). After treatment, the expression of LC3B in adenocarcinoma cells became negative, in the cytoplasm of muscle connective stromal cells weak (Hs = 75 [67.5; 80.0]), in the endothelium of the vascular wall even weaker (Hs = 55 [45.5; 60.0]) ($p < 0.001$).

Prior to treatment in group 2, LC3B expression in tumor tissue was moderate in 89 % of patients (Hs = 151.5 [137.5; 160.0]), weak in muscle connective stromal cells in 12 % of patients (Hs = 44 [35; 51.5]), and weak in the vascular wall in 5 % of patients (Hs = 30 [25; 35]). After treatment, LC3B expression in adenocarcinoma cells became pronounced (Hs = 260 [250; 285]), in muscle connective stromal cells – moderate (Hs = 118 [100; 130]), in the vascular wall – weak (Hs = 45 [30; 55]) ($p < 0.001$). There was a significant correlation between tumor recurrence and LC3B overexpression ($r = 0.51$; $p < 0.001$).

Conclusion. The development of prostate cancer recurrence is associated with increased expression of autophagic LC3B protein. Increased LC3B expression, which is interpreted as evidence of autophagy activation and correlates with the risk of disease progression, is used by the tumor as an oncogenic advantage.

Keywords: prostate cancer, cancer recurrence, LC3B autophagy marker expression, high-intensity focused ultrasound

For citation: Voronina E.S., Fomkin R.N., Bucharskaya A.B. et al. Tissue expression of LC3B autophagy marker as a potential biomarker of prostate cancer recurrence after treatment with high-intensity focused ultrasound (pilot study). *Onkourologiya = Cancer Urology* 2023;19(2):47–55. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9776-2023-19-2-47-55

Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее распространенных злокачественных заболеваний у мужчин. Ежегодно в мире диагностируют около 1,6 млн случаев РПЖ, 366 тыс. мужчин погибают от этого заболевания. Диагностике и лечению данной патологии в последнее время уделяется все больше внимания как в России, так и за рубежом [1]. Стабильно высокий уровень заболеваемости РПЖ в трудоспособном возрасте позволяет отнести разработку технологий его диагностики и лечения к числу наиболее актуальных задач онкоурологии [2].

Несмотря на имеющийся «золотой стандарт» в виде радикальной простатэктомии, нельзя отрицать появление новых эффективных методов лечения РПЖ. Наряду с хирургией, лучевой терапией, активным

наблюдением [3, 4] появилась группа альтернативных, относящихся к разряду экспериментальных методов, среди которых особого внимания заслуживает абляция предстательной железы высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком (HIFU) [5, 6]. Несмотря на то что мировая история применения данного метода лечения РПЖ насчитывает практически два десятилетия, до настоящего времени окончательно не определены рамки его использования. Имеется относительно небольшое число рандомизированных исследований, касающихся клинического эффекта, возможных осложнений и отдаленных результатов применения HIFU-терапии при РПЖ. Также до конца не определены критерии оценки этих результатов. В силу этого HIFU в руководствах Европейской ассоциации урологов до настоящего времени представлен как экспериментальный метод лечения.

Поэтому всесторонняя и многоцентровая оценка клинической эффективности и переносимости этого метода пациентами позволяет приблизить тот момент, когда будет окончательно определено место HIFU-абляции в лечении больных РПЖ [7].

Данные литературы свидетельствуют о достаточно высокой эффективности этого метода лечения. После применения HIFU 5-летняя выживаемость без прогрессирования составляет около 69–78 % [8]. Это сопоставимо с выживаемостью пациентов с локализованной формой РПЖ после использования радикальных методов лечения, таких как радикальная простатэктомия (76–84 %) и дистанционная лучевая терапия (55–65 %) [9]. Однако, как и после любого другого метода лечения РПЖ, после HIFU-абляции возможен рецидив заболевания [10]. Поэтому важными задачами остаются поиск ранних предикторов и причин, приводящих к развитию рецидива после лечения, и более четкая стратификация пациентов по риску прогрессирования и прогноза дальнейшего течения заболевания [5, 11–14].

В литературе широко обсуждаются исследования, которые демонстрируют, что степень выраженности иммуноэкспрессии связанных с аутофагией белков в опухолевой ткани может быть потенциальным прогностическим маркером рецидива и прогрессии опухоли после различных вариантов лечения [15]. Аутофагия представляет собой катаболический клеточный механизм, включающий деградацию ненужных или дисфункциональных клеточных компонентов посредством аутофагосом [16].

Процесс аутофагии регулируется связанными с ней белками (ATG) [17]. Одним из ключевых элементов, необходимых для образования аутофагосомы, является микротрубочко-ассоциированный белок LC3-II (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 phosphatidylethanolamine conjugate) – компонент мембраны аутофагосомы, которая «запаковывает» в себя поврежденный белок и в дальнейшем сливается с лизосомой [18, 19]. В клетках млекопитающих обнаружены 3 типа белка LC3 – А, В и С, при этом экспрессия LC3В является наиболее достоверным маркером образования аутофагосом [20].

В норме аутофагия обеспечивает клеточный гомеостаз. Некоторые авторы указывают, что клетки опухоли даже в большей степени зависят от аутофагии, чем клетки нормальных тканей [21, 22]. В литературе есть единичные работы, в которых в прогностическом аспекте изучалась роль маркеров аутофагии при злокачественном поражении предстательной железы, однако их значение при рецидиве опухоли остается недостаточно исследованным [23].

В настоящей работе мы предположили, что активация аутофагии может являться одним из механизмов, с помощью которого клетки РПЖ выживают после воздействия HIFU.

Цель исследования – сравнить тканевую экспрессию аутофагического маркера LC3В в биоптатах предстательной железы до и после лечения локализованного РПЖ методом HIFU-абляции.

Материалы и методы

Объектом исследования явились пациенты с локализованным, подтвержденным морфологически РПЖ, находившиеся на лечении в клинике урологии Университетской клинической больницы № 1 им. С.П. Миротворцева Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского. Всем больным проведено первичное оперативное лечение РПЖ методом HIFU-абляции на роботизированном аппарате Ablatherm Integrated Imaging® (EDAP TMS, Франция) с предшествующей трансуретральной резекцией предстательной железы.

Критерий включения: РПЖ локализованных стадий T1–T2N0M0 у пациентов с невозможностью выполнения радикальной простатэктомии (тяжелый интеркуррентный фон, возраст больного и др.) или в случае отказа больного от органосохраняющего оперативного вмешательства по тем или иным причинам. Следует отметить, что в исследование не включали пациентов групп высокого и очень высокого риска по классификациям Европейской ассоциации урологов и Национальной сети по борьбе с раком. Все пациенты, участвующие в исследовании, были осведомлены о предписанных клиническими рекомендациями стандартных вариантах лечения РПЖ и подписали добровольное информированное согласие на выполнение HIFU-абляции предстательной железы.

Для оценки степени морфологической дифференцировки РПЖ использовали шкалу Глисона и гистологическую прогностическую классификацию РПЖ Международного общества урологических патологов (International Society of Urological Pathology, ISUP), 2016 г.

Общая когорта пациентов ($n = 45$) подразделена на 2 группы. В 1-ю группу ($n = 25$) включены пациенты в возрасте 59–83 лет (средний возраст $65,6 \pm 8,4$ года), у которых за период мониторинга не выявлено достоверных признаков рецидива или прогрессирования заболевания. Во 2-ю группу ($n = 20$) включены пациенты в возрасте 57–84 лет (средний возраст $67,5 \pm 7,9$ года) с рецидивом опухоли, доказанным при морфологическом исследовании биоптатов резидуальной ткани предстательной железы после HIFU-абляции.

У 12 (60 %) пациентов 2-й группы рецидив РПЖ диагностирован через 12–18 мес, у 8 (40 %) – через 24–36 мес после HIFU-абляции предстательной железы. При этом соблюдалось достижение сопоставимости групп по характеристикам, способным влиять на изучаемый результат исследования (табл. 1).

Для сравнительной оценки 2 групп учитывали данные клинического, инструментального, лабораторного и морфологического обследований.

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов исследуемых групп

Table 1. Clinical characteristics of the patients in the study groups

Характеристика Characteristic	Всего Total	1-я группа Group 1	2-я группа Group 2
Число пациентов Number of patients	45	25	20
Средний возраст, лет Mean age, years	66,5 ± 8,1	65,6 ± 8,4	67,5 ± 7,9
Средний дооперационный уровень ПСА, нг/мл Median preoperative PSA level, ng/mL	8,35 ± 4,0	7,4 ± 3,9	9,3 ± 4,1
Медиана надира ПСА, нг/мл Median PSA nadir, ng/mL	1,74 ± 0,3	0,34 ± 0,1	1,4 ± 0,2
Медиана срока достижения надира ПСА, мес Median time to reach PSA nadir, months	6,2	6,1	6,3
Средний объем предстательной железы, мл Mean prostate volume, mL	24 ± 7,9	21,7 ± 6,2	28,4 ± 9,9
Клиническая стадия, n (%): Clinical stage, n (%):			
T1a	2 (4,4)	2	0
T1b	4 (8,9)	4	0
T1c	5 (11,1)	3	2
T2a	12 (26,6)	7	5
T2b	22 (49,0)	9	13

Примечание. ПСА – простатический специфический антиген.
 Note. PSA – prostate specific antigen.

Иммуногистохимическое исследование проводили с помощью стрептавидин-биотинового метода с использованием системы LSAB2 System, HRP (K0675) фирмы Daco, в качестве хромогена – диаминобензидин (Daco). Во всех случаях использовали антитело Anti-LC3B antibody ab48394 (Rabbit polyclonal to LC3B, фирмы Abcam). В результатах учитывали точечную окраску в цитоплазме и ядре клеток. Результаты реакции подсчитывали с учетом количества прореагировавших клеток и интенсивности окраски по системе Histochemical score (Hs). Для подсчета применяли формулу: $Hs = \sum P(i) \times i$, где i – интенсивность окрашивания, выраженная в баллах от 0 до 3; $P(i)$ – процент окрашенных клеток. Окончательный результат определяли по следующим критериям: 0 – отсутствие окрашивания (или экспрессия менее чем в 10 % опухолевых клеток); 1 – слабое (экспрессия в ≥ 10 % опухолевых клеток); 2 – умеренное (экспрессия в 10–50 % опухолевых клеток); 3 – выраженное (экспрессия в ≥ 50 % опухолевых клеток). Для точечного окрашивания LC3B оценки 0 и 1 классифицировали как низкие, а оценки 2 и 3 – как высокие. Морфометрическую оценку иммуногистохимических препаратов проводили с использованием системы анализа цифровых изображений медицинского микровизора μ Vizo-103. Каждое иммуногистохимическое исследование выполняли с постановкой

отрицательного и положительного контроля для исключения вероятности получения ложноотрицательных и ложноположительных результатов.

Статистический анализ данных проводили в программе Statistica (версия 10). Предварительно выборка проверена на вариант распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Распределение отличалось от нормального. В связи с этим применяли непараметрическую статистику. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона [Q_{25} ; Q_{75}]. Связь исследуемых данных клинического обследования и послеоперационного морфологического исследования с частотой развития рецидива РПЖ после HIFU-абляции предстательной железы определяли с помощью корреляционного анализа (рассчитывали непараметрический критерий Спирмена). Патоклинические признаки и иммуногистохимические показатели были классифицированы как низкие или высокие для каждого образца окрашивания в соответствии с прогностическим влиянием отдельных показателей. Корреляцию считали слабой при $r < 0,5$; средней – при $0,5 < r < 0,7$; высокой – при $r > 0,7$.

Для оценки значимости различий использовали t-критерий Вилкоксона. Различия считали значимыми при $t \leq 0,01$.

Результаты

До лечения в 1-й группе пациентов экспрессия антител к LC3B в клетках аденокарциномы предстательной железы была умеренной (Hs = 111 [111; 115]). Она наблюдалась у 100 % пациентов в виде цитоплазматической экспрессии в опухолевых клетках, преимущественно в области клеточной мембраны. Клетки с положительной экспрессией систематизировали как центральные клетки опухоли (от центра до середины радиуса опухоли), периферические клетки опухоли (от середины радиуса опухоли до края опухоли) или клетки вне опухоли (нормальные клетки за пределами опухоли). У 5 % пациентов этой группы отмечалась слабая ядерная реакция в клетках аденокарциномы и слабая цитоплазматическая экспрессия в клетках мышечно-соединительнотканной стромы (Hs = 47 [43; 50]). У 10 % пациентов наблюдалась слабая положительная реакция LC3B в стенке сосудов, преимущественно в области эндотелия (Hs = 28 [20; 35]) (табл. 2). Плотность LC3B была одинаковой в периферических и центральных областях опухоли ($p = 0,905$), но значительно ниже во внеопухолевой области ($p < 0,001$). Ткань из центра опухоли и ее периферии показала значительно более высокое количество точечного LC3B по сравнению с нормальной неопухолевой тканью предстательной железы ($p < 0,001$). Значимой внутриопухолевой гетерогенности при сопоставимых картинах окрашивания всех маркеров в центре опухоли и на ее периферии не выявлено.

После проведения HIFU-абляции в 1-й группе экспрессия LC3B в клетках аденокарциномы стала отрицательной, в цитоплазме клеток мышечно-соединительнотканной стромы – слабой (Hs = 75 [67,5; 80,0]), в эндотелии сосудистой стенки – еще слабее (Hs = 55 [45,5; 60,0]) (см. табл. 2). В данной группе пациентов обращала на себя внимание интенсивная

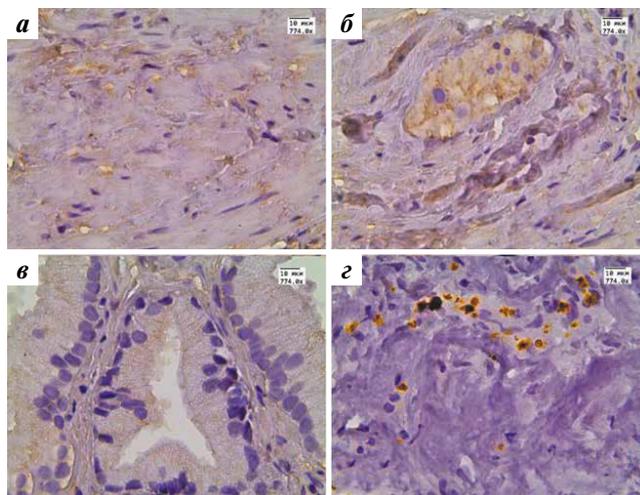


Рис. 1. Экспрессия LC3B в биоптатах предстательной железы у пациентов 1-й группы после лечения ($\times 774$): а – в мышечно-соединительнотканной строме; б – в цитоплазме эпителиальных клеток и клетках мышечно-соединительнотканной стромы; в – в цитоплазме эпителиальных клеток; г – в мышечно-соединительнотканной строме

Fig. 1. LC3B expression in prostate biopsies from patients of group 1 after treatment ($\times 774$): а – in the muscle connective stroma; б – in the cytoplasm of epithelial cells and muscle connective stromal cells; в – in the cytoplasm of epithelial cells; г – in the muscle connective stroma

внеклеточная экспрессия в мышечно-соединительнотканной строме в контрольных биоптатах на поздних сроках (через 24 мес) после HIFU-абляции (рис. 1).

Анализ результатов иммуногистохимической экспрессии до и после лечения у пациентов 1-й группы показал статистически значимые различия в экспрессии LC3B как в клетках опухоли ($p < 0,001$), так и в цитоплазме клеток мышечно-соединительнотканной стромы ($p < 0,001$) и эндотелии сосудистой стенки ($p < 0,001$).

До лечения во 2-й группе пациентов с рецидивом РПЖ экспрессия LC3B в опухолевой ткани была

Таблица 2. Экспрессия маркера аутофагии LC3B в группах пациентов с рецидивом и без рецидива рака предстательной железы, Me [Q_{25} ; Q_{75}]
Table 2. Autophagy marker LC3B expression in groups of patients with and without prostate cancer recurrence, Me [Q_{25} ; Q_{75}]

Показатель Characteristic	1-я группа Group 1		2-я группа Group 2	
	до лечения before treatment	после лечения after treatment	до лечения before treatment	после лечения after treatment
Экспрессия LC3B в клетках аденокарциномы Expression of LC3B in adenocarcinoma cells	111 [111; 115]*	0*	151,5 [137,5; 160,0]*	260 [250; 285]*
Экспрессия LC3B в мышечно-соединительнотканной строме Expression of LC3B in muscle-connective stroma	47 [43; 50]*	75 [67,5; 80,0]*	44 [35; 51,5]*	118 [100; 130]*
Экспрессия LC3B в сосудистой стенке Expression of LC3B in the vascular wall	28 [20; 35]*	55 [45,5; 60,0]*	30 [25; 35]	45 [30; 55]

*Различия статистически значимы ($p < 0,001$).

*Differences are statistically significant ($p < 0.001$).

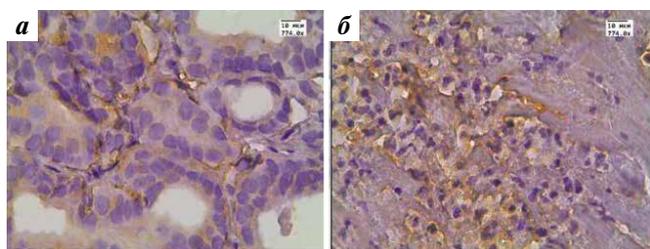


Рис. 2. Экспрессия LC3B в биоптатах предстательной железы у пациентов 2-й группы до лечения ($\times 774$): а – в цитоплазме клеток аденокарциномы; б – в цитоплазме клеток аденокарциномы и мышечно-соединительнотканной строме предстательной железы

Fig. 2. Expression of LC3B in prostate biopsies from patients of group 2 before treatment ($\times 774$): а – in the cytoplasm of adenocarcinoma cells; б – in the cytoplasm of adenocarcinoma cells and in the prostatic muscle connective stroma

умеренной ($H_s = 151,5 [137,5; 160,0]$). Она наблюдалась у 89 % пациентов, была точечной цитоплазматической и локализовалась преимущественно в области клеточной мембраны (рис. 2, а). У 7 % пациентов в клетках аденокарциномы отмечалась слабая ядерная экспрессия данного маркера. В клетках мышечно-соединительнотканной стромы экспрессия была слабой ($H_s = 44 [35; 51,5]$) (рис. 2, б) и наблюдалась у 12 % пациентов. В стенке сосудов экспрессия LC3B с локализацией преимущественно в области эндотелия тоже была слабой ($H_s = 30 [25; 35]$) и наблюдалась у 5 % пациентов (см. табл. 2).

После лечения методом HIFU-абляции во 2-й группе экспрессия LC3B в клетках аденокарциномы стала выраженной ($H_s = 260 [250; 285]$) и локализовалась во всех случаях в цитоплазме, а у 70 % пациентов – еще и в ядре. В клетках мышечно-соединительнотканной стромы экспрессия была умеренной, в сосудистой стенке – слабой ($H_s = 118 [100; 130]$ и $H_s = 45 [30; 55]$ соответственно) (см. табл. 2, рис. 3).

Анализ результатов иммуногистохимической экспрессии у пациентов 2-й группы до и после лечения показал статистически значимые различия в экспрессии LC3B в клетках опухоли ($p < 0,001$) и клетках мышечно-соединительнотканной стромы ($p < 0,001$) (табл. 2). Корреляционный анализ показал достоверную ассоциацию между рецидивом опухоли и гиперэкспрессией LC3B ($r = 0,51; p < 0,001$).

У всех пациентов 1-й группы исходно диагностирована мелкоацинарная аденокарцинома предстательной железы различной степени дифференцировки. Сумма баллов по шкале Глисона и прогностические группы по классификации ISUP (2016) распределились в следующем процентном соотношении: в 57,5 % случаев – 6 (3 + 3) баллов (ISUP 1), в 17,9 % – 7 (3 + 4) баллов (ISUP 2), в 12,8 % – 5 (2 + 3) баллов (ISUP 1), в 11,8 % – 8 (4 + 4) баллов (ISUP 4). В 59 % случаев аденокарцинома сочеталась с доброкачественной гиперплазией и простатической интраэпителиальной неоплазией высокой

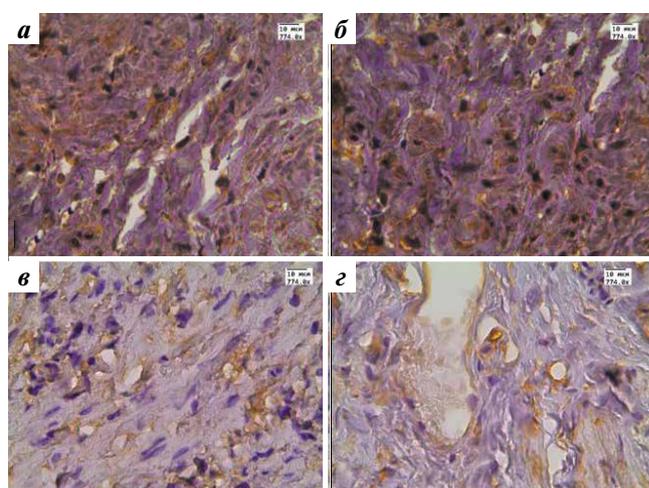


Рис. 3. Экспрессия LC3B в биоптатах предстательной железы у пациентов 2-й группы после лечения ($\times 774$): а – в клетках аденокарциномы; б – в клетках аденокарциномы и мышечно-соединительнотканной строме; в, г – в клетках мышечно-соединительнотканной стромы и сосудах

Fig. 3. LC3B expression in prostate biopsies from patients of group 2 after treatment ($\times 774$): а – in adenocarcinoma cells; б – in adenocarcinoma cells and muscle connective stroma; в, г – in muscle connective stromal cells and vessels

и низкой степени. Относительный объем злокачественного поражения биоптата составил $43,1 \pm 1,1$ %.

У пациентов 2-й группы в 98 % случаев преобладала мелкоацинарная аденокарцинома, в единичных случаях наблюдалась криброзная форма. Сумма баллов по шкале Глисона и прогностические группы по классификации ISUP (2016) распределились в следующем процентном соотношении: в 53,1 % случаев – 6 (3 + 3) баллов (ISUP 1), в 16,4 % – 7 (3 + 4) баллов (ISUP 2), в 17,8 % – 5 (2 + 3) баллов (ISUP 1), в 6,4 % – 8 (4 + 4) баллов (ISUP 4), в 6,3 % – 9 (4 + 5) баллов (ISUP 5). Сочетание аденокарциномы с доброкачественной гиперплазией и простатической интраэпителиальной неоплазией высокой и низкой степени отмечено в 15,8 % наблюдений. Относительный объем злокачественного поражения биоптата составил $59,2 \pm 1,0$ %. Выявлена слабая корреляция гиперэкспрессии LC3B с суммой баллов по шкале Глисона и группой риска по классификации ISUP ($r = 0,42; p = 0,023$). Корреляция гиперэкспрессии LC3B со стадией заболевания и возрастом очень слабая (отсутствует) ($r = 0,2; p = 0,845$).

Зависимость частоты развития рецидива РПЖ от доли положительных биопсийных столбиков. К параметрам, коррелирующим с объемом злокачественного поражения при игольных биопсиях, относятся число положительных (с наличием опухоли) биопсийных столбиков и протяженность каждого положительного биопсийного столбика. В нашей работе мы исследовали показатель относительной доли положительных биопсийных столбиков вместо их абсолютного числа, так как больным при выполнении биопсии осуществлялся забор разного количества столбиков.

В 1-й группе показатель доли положительных биопсийных столбиков был равен в среднем $0,25 \pm 0,05$, при минимальном значении признака, равном 0, при максимальном — 1. В 50 % случаев в данной группе этот показатель находился в промежутке 0,17–0,4. Во 2-й группе показатель доли положительных биопсийных столбиков был равен в среднем $0,55 \pm 0,07$, при минимальном значении признака, равном 0,07, при максимальном — 1. В 50 % случаев в данной группе этот показатель находился в промежутке 0,2–0,68.

Нами установлено, что доля рецидивов у больных с показателем доли положительных биопсийных столбиков в диапазоне $<0,2$ составляет $0,17 \pm 0,09$, с долей положительных биопсийных столбиков в интервале 0,21–0,5 — $0,24 \pm 0,10$, с долей положительных биопсийных столбиков $>0,5$ — $0,59 \pm 0,20$. Данные свидетельствуют, что риск возникновения рецидива РПЖ после HIFU-абляции существенно возрастает, когда положительные столбики составляют более половины от общего числа.

Обсуждение

Определение экспрессии маркера аутофагии LC3B — один из наиболее широко используемых методов оценки аутофагии в доброкачественных и злокачественных тканях [20]. LC3B обнаружен в нескольких опухолях, включая РПЖ [24]. Все больше данных свидетельствуют о том, что аутофагия связана с развитием и прогрессией опухоли [15]. В литературе мы не нашли публикаций об изучении влияния аутофагии на рецидив аденокарциномы предстательной железы после лечения, однако есть работы, указывающие на роль аутофагии в выживании клеток аденокарциномы после лечения рака других локализаций [25].

В проведенном нами исследовании до лечения у всех пациентов была умеренная цитоплазматическая экспрессия маркера аутофагии LC3B в клетках аденокарциномы. Полученные результаты соответствуют данным ряда авторов, которые изучали роль аутофагии как механизма ускользания РПЖ от воздействия противоопухолевых агентов, андрогенной депривации и лучевой терапии [26–28].

После лечения в группе пациентов без рецидива экспрессия маркера аутофагии была отрицательной в опухолевой ткани, но увеличивалась в цитоплазме клеток мышечно-соединительнотканной стромы

и в эндотелии, что говорит о процессах регенерации в строме предстательной железы. В группе пациентов с рецидивом после лечения мы наблюдали значимое увеличение экспрессии антитела к LC3B как в клетках аденокарциномы, так и в клетках мышечно-соединительнотканной стромы. Следует отметить, что во 2-й группе ядерная экспрессия маркера наблюдалась у 70 % пациентов. Интересно, что при сравнении центра опухоли и ее периферии не наблюдалось значительной внутриопухолевой гетерогенности в отношении экспрессии LC3B. Существенное увеличение экспрессии LC3B в опухолевых клетках в группе пациентов с рецидивом и отсутствие данного маркера у пациентов без рецидива, вероятнее всего, связано с тем, что аутофагия является одним из механизмов выживания опухолевых клеток после лечения. Увеличение диаметра опухоли, по-видимому, сопряжено с повышением уровня LC3B в опухолевых клетках, что, в свою очередь, вызывает аутофагическую рециркуляцию, обеспечивая жизнедеятельность опухолевых клеток, и способствует пролиферации опухоли.

Заключение

В настоящей работе продемонстрированы первичные данные о биологическом и потенциально прогностическом значении связанного с аутофагией маркера LC3B. Это пилотное исследование проведено для получения предварительных данных, важных для планирования дальнейших этапов исследования (определение возможности проведения исследования у большего числа пациентов, размера выборки, необходимой мощности исследования). Результаты исследования показали, что развитие рецидива РПЖ после проведенного лечения, возможно, ассоциировано с увеличением экспрессии аутофагического белка LC3B. Вероятно, что повышенная экспрессия LC3B, которая интерпретируется как свидетельство активации аутофагии и коррелирует с риском прогрессирования заболевания, используется опухолью как онкогенное преимущество.

Таким образом, дальнейшее выяснение роли аутофагии при РПЖ, в том числе до и после различных вариантов лечения, безусловно, представляет интерес в аспекте разработки новых терапевтических стратегий и в предиктивном выявлении пациентов с высоким риском рецидива заболевания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Каприн А.Д., Алексеев Б.Я., Матвеев В.Б. и др. Рак предстательной железы. Клинические рекомендации. Современная онкология 2021;23(2):211–47. DOI: 10.26442/18151434.2021.2.200959
Kaprin A.D., Alekseev B.Ya., Matveev V.B. et al. Prostate cancer. Clinical recommendations. *Sovremennaya onkologiya = Journal of Modern Oncology* 2021;23(2):211–47. (In Russ.). DOI: 10.26442/18151434.2021.2.200959
- Авраамова С.Т. Дооперационная и интраоперационная диагностика рака предстательной железы с использованием раман-люминесцентной спектроскопии. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2021. 24 с.
Avraamova S.T. Preoperative and intraoperative diagnosis of prostate cancer using Raman luminescence spectroscopy. Dis. ... candidate of medical sciences. Moscow, 2021. 24 p. (In Russ.).
- Попков В.М., Фомкин Р.Н., Блюмберг Б.И. Возможности прогнозирования рецидива рака предстательной железы после HIFU-абляции с помощью математического моделирования. Саратовский научно-медицинский журнал 2013;9(2):314–20.
Popkov V.M., Fomkin R.N., Blyumberg B.I. Possibilities of predicting prostate cancer recurrence after HIFU ablation using mathematical modeling. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research* 2013;9(2):314–20. (In Russ.).
- Лепор Г. Есть ли место для минимально инвазивных технологий лечения рака предстательной железы? Экспериментальная и клиническая урология 2011;(2–3):12–4.
Lepor G. Is there a place for minimally invasive prostate cancer treatment technologies? *Ekspierimetal'naya i klinicheskaya urologiya = Experimental and Clinical Urology* 2011;(2–3):12–4. (In Russ.).
- Лёвин В.П. Клинико-морфологическая и иммуногистохимическая характеристика аденокарциномы предстательной железы в условиях HIFU-терапии. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2019. 23 с.
Lyovin V.P. Clinical, morphological and immunohistochemical characteristics of prostate adenocarcinoma under HIFU therapy. Dis. ... candidate of medical sciences. Moscow, 2019. 23 p. (In Russ.).
- Фомкин Р.Н., Глыбочко П.В., Попков В.М. и др. Лечение рака предстательной железы у больных пожилого и старческого возраста высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком. Клиническая геронтология 2011;17(9–10):27–33.
Fomkin R.N., Glybochko P.V., Popkov V.M. et al. Treatment of prostate cancer in elderly and senile patients with high-intensity focused ultrasound. *Klinicheskaya gerontologiya = Clinical Gerontology* 2011;17(9–10):27–33. (In Russ.).
- Поздняков К.В., Базаев В.В., Дутов В.В. Оптимизация HIFU-монотерапии рака предстательной железы. Вестник урологии 2022;10(1):42–51. DOI: 10.21886/2308-6424-2022-10-1-42-51
Pozdnyakov K.V., Bazaev V.V., Dutov V.V. Optimization of HIFU monotherapy for prostate cancer. *Vestnik urologii = Bulletin of Urology* 2022;10(1):42–51. (In Russ.). DOI: 10.21886/2308-6424-2022-10-1-42-51
- Попков В.М., Фомкин Р.Н., Блюмберг Б.И. Прогностические факторы в оценке эффективности результатов лечения больных локализованным раком предстательной железы с помощью HIFU-абляции. Саратовский научно-медицинский журнал 2013;9(1):116–21.
Popkov V.M., Fomkin R.N., Blyumberg B.I. Prognostic factors in evaluating the effectiveness of treatment outcomes in patients with localized prostate cancer using HIFU ablation. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research* 2013;9(1):116–21. (In Russ.).
- Фомкин Р.Н., Крупинов Г.Е., Чураков А.А. и др. Корреляция уровня ПСА-надир и биохимического рецидива после тотальной HIFU-абляции у пациентов с локализованным раком предстательной железы. Урология 2020;(4):79–83. DOI: 10.18565/UROLOGY.2020.4.79-83
Fomkin R.N., Krupinov G.E., Churakov A.A. et al. Correlation of PSAnadir level and biochemical recurrence after total HIFU ablation in patients with localized prostate cancer. *Urologiya = Urology* 2020;(4):79–83. (In Russ.). DOI: 10.18565/UROLOGY.2020.4.79-83
- Попков В.М., Фомкин Р.Н., Блюмберг Б.И. Постоперационный мониторинг простатоспецифического антигена (PSA) после лечения высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком (HIFU). Саратовский научно-медицинский журнал 2012;8(4):1001–7.
Popkov V.M., Fomkin R.N., Blyumberg B.I. Postoperative prostate specific antigen (PSA) monitoring following high intensity focused ultrasound (HIFU) treatment. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research* 2012;8(4):1001–7. (In Russ.).
- Kobelyatskaya A.A., Pudova E.A., Snezhkina A.V. et al. Impact TMPRSS2–ERG molecular subtype on prostate cancer recurrence. *Life* 2021;11(6):588. DOI: 10.3390/life11060588
- Kobelyatskaya A., Pudova E., Krasnov G. et al. Differentially methylated CPG sites as potential prognostic markers in prostate cancer. *J Integrat Bioinform* 2020;17(4):20200031. DOI: 10.1515/jib-2020-0031
- Kharitonov S., Kudryavtseva A., Nyushko K. et al. Potential prognostic markers for localized prostate cancer. *FEBS Open Bio* 2018;8(S1):341.
- Кудрявцева А.В., Жикривецкая С.О., Ньюшко К.М. и др. Новые эпигенетические маркеры прогрессии и агрессивности рака предстательной железы. Мир современной науки 2017;3(43):94–100.
Kudryavtseva A.V., Zhikrivetskaya S.O., Nushko K.M. et al. New epigenetic markers of prostate cancer progression and aggressiveness. *Mir sovremennoy nauki = World of Modern Science* 2017;3(43):94–100. (In Russ.).
- Lv C., Zhang Z., Zhao T. et al. The anti-tumour effect of Mel and its role in autophagy in human hepatocellular carcinoma cells. *Am J Transl Res* 2019;11(2):931–41.
- Mizushima N., Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011;147(4):728–41. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.026
- Levine B., Klionsky D.J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004;6(4):463–77. DOI: 10.1016/s1534-5807(04)00099-1
- Schlafli A.M., Berezowska S., Adams O. et al. Reliable LC3 and p62 autophagy marker detection in formalin fixed paraffin embedded human tissue by immunohistochemistry. *Eur J Histochem* 2015;59(2):2481. DOI: 10.4081/ejh.2015.2481
- Yang Z., Klionsky D.J. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 2010;12(9):814–22. DOI: 10.1038/ncb0910-814
- Miracco C., Cevenini G., Franchi A. et al. Beclin 1 and LC3 autophagic gene expression in cutaneous melanocytic lesions. *Hum Pathol* 2010;41(4):503–12. DOI: 10.1016/j.humpath.2009.09.004
- White E., Mehnert J.M., Chan C.S. Autophagy, metabolism, and cancer. *Cancer Res* 2015;21(22):5037–46. DOI: 10.1158/1078-0432
- Niklaus M., Adams O., Berezowska S. et al. Tschan and Rupert Langer Expression analysis of LC3B and p62 indicates intact activated autophagy is associated with an unfavorable prognosis in colon cancer. *Oncotarget* 2017;8(33):54604–15. DOI: 10.18632/oncotarget.17554
- Zhang S., Li J., Zhou G. et al. Aurora-A regulates autophagy through the Akt pathway in human prostate cancer. *Cancer Biomark* 2017;19(1):27–34. DOI: 10.3233/CBM-160238
- Hashimoto D., Bläuer M., Hirota M. et al. Autophagy is needed for the growth of pancreatic adenocarcinoma and has a cytoprotective effect against anticancer drugs. *Eur J Cancer* 2014;50(7):1382–90. DOI: 10.1016/j.ejca.2014.01.011

25. Ziparo E., Petrunaro S., Marini E.S. et al. Autophagy in prostate cancer and androgen suppression therapy. *Int J Mol Sci* 2013;14(6):12090–106. DOI: 10.3390/ijms140612090
26. Farrow J.M., Yang J.C., Evans C.P. Autophagy as a modulator and target in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 2014;11(9):508–16. DOI: 10.1038/nrurol.2014.196
27. Koukourakis M.I., Kalamida D., Mitrakas A. et al. Intensified autophagy compromises the efficacy of radiotherapy against prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;461(2):268–74. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.04.014
28. Попков В.М., Чеснокова Н.П., Барсуков В.Ю. и др. Канцерогенез, цитокины и иммунитет: патогенетическая взаимосвязь в динамике развития неоплазий. Саратов, 2014. 328 с. Popkov V.M., Chesnokova N.P., Barsukov V.Yu. et al. Carcinogenesis, cytokines and immunity: pathogenetic relationship in the dynamics of neoplasia development. *Saratov*, 2014. 328 p. (In Russ.).

Вклад авторов

Е.С. Воронина: обработка материала, оценка результатов иммуногистохимического исследования, написание текста статьи, анализ и интерпретация данных;

Р.Н. Фомкин: ведение и оперативное лечение пациентов, сбор материала исследования, написание текста статьи, анализ и интерпретация данных;

А.Б. Бучарская: проведение иммуногистохимического исследования;

Т.В. Палатова: обзор публикаций по теме статьи, техническое редактирование, оформление библиографии;

Г.Н. Маслякова: разработка дизайна исследования;

О.А. Фомкина: статистический анализ, научное редактирование.

Authors' contributions

E.S. Voronina: material processing, evaluation of immunohistochemical results, article writing, data analysis and interpretation;

R.N. Fomkin: patient management and surgical treatment, study material collection, article writing, data analysis and interpretation;

A.B. Bucharskaya: immunohistochemical examination;

T.V. Palatova: reviewing of publications of the article's theme, technical editing, organization of references;

G.N. Maslyakova: developing the research design;

O.A. Fomkina: statistical analysis, scientific editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.С. Воронина / E.S. Voronina: <https://orcid.org/0000-0002-4954-4784>

Р.Н. Фомкин / R.N. Fomkin: <https://orcid.org/0000-0001-6895-6445>

А.Б. Бучарская / A.B. Bucharskaya: <https://orcid.org/0000-0003-0503-6486>

Т.В. Палатова / T.V. Palatova: <https://orcid.org/0000-0002-3889-5052>

Г.Н. Маслякова / G.N. Maslyakova: <https://orcid.org/0000-0001-8834-1536>

О.А. Фомкина / O.A. Fomkina: <https://orcid.org/0000-0002-1516-0504>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России. Протокол № 4 от 14.04.2021.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Ministry of Health of Russia. Protocol No. 4 dated 14.04.2021.

All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 08.12.2022. Принята к публикации: 08.06.2023.

Article submitted: 08.12.2022. Accepted for publication: 08.06.2023.