

УДК 616.65-006-018.2-037

**ОЦЕНКА ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ РОЛИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ
ГЛАДКОМЫШЕЧНОГО АКТИНА В РАКЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ****А. К. Гриб, В. А. Басинский****Гродненский государственный медицинский университет**

По данным иммуногистохимического и морфометрического исследования проанализирована экспрессия гладкомышечного актина в раке предстательной железы. Выявлено, что ее низкий уровень в строме новообразований и в стенках сосудов характерен для низкодифференцированных раков и опухолей с более высоким метастатическим потенциалом. При этом в низкодифференцированных раках обнаружено нарушение формирования гладкомышечного каркаса сосудов, снижение его толщины, появление прерывистости и дефектов гладкомышечного слоя, что отражает несовершенство неоангиогенеза и может являться одним из прогностических маркеров новообразования.

Ключевые слова: рак предстательной железы, иммуногистохимия, гладкомышечный актин, неоангиогенез.

**ASSESSMENT OF PROGNOSTIC VALUE OF SMOOTH MUSCLE ACTIN
EXPRESSIONS IN PROSTATE CANCER****A. K. Grib, V. A. Basinskii****Grodno State Medical University**

Based on the data yielded by immunohistochemical and morphometric research, expressions of smooth muscle actin in the prostate cancer were analysed. It was revealed, that its low expression in a stroma of neoplasms and in walls of vessels is more characteristic of low-grade cancers and tumours with higher metastatic potential. In addition, low-grade cancers featured disturbance of the formation of vessels' smooth muscle skeleton, decrease of its thickness, appearance of discontinuity and defects of smooth muscle layer, which reflect imperfection of neoangiogenesis and can be a prognostic marker of a neoplasm.

Key words: prostate cancer, immunohistochemistry, smooth muscle actin, neoangiogenesis.

Введение

Рак предстательной железы относится к числу наиболее тяжелых онкологических заболеваний мужской половой сферы, которое имеет склонность к быстрому метастазированию. В начале 70-х годов ежегодно в Беларуси раком предстательной железы заболевали около 200 мужчин. В последующие два десятилетия число новых случаев увеличивалось и в 1990 г. достигло 549 (увеличение в 2,2 раза). В целом за 36-летний период число ежегодно заболевающих раком предстательной железы увеличилось в 8,1 раза и достигло 1681 случая в 2005 году [2]. Приведенные данные позволяют предположить, что рост данной патологии будет продолжаться, а это требует, наряду с совершенствованием методов своевременной

диагностики, шире внедрять и методы прогнозирования выявленного рака предстательной железы. Одним из важнейших критериев прогноза карцином предстательной железы является оценка гистологической структуры новообразования по данным операционного и биопсийного материала. Данное исследование является высокоинформативным и позволяет не только верифицировать диагноз, но и предсказать его клиническое поведение. Основным гистологическим критерием прогноза рака предстательной железы остается оценка степени дифференцировки опухоли с использованием шкалы Глиссона [5], позволяющей прогнозировать выживаемость больных [1]. Однако данная система учитывает только морфологию эпителиального составляющего

рака предстательной железы и не всегда адекватно оценивает инвазивный и метастатический потенциал новообразования.

Вместе с тем известно, что значительную роль как в канцерогенезе, так и в прогрессировании новообразования играет стромальное микроокружение. При неопластических заболеваниях развивается нарушение стромально-эпителиальных взаимодействий, способных оказывать существенное влияние на поведение опухолевых клеток. Для многих эпителиальных злокачественных новообразований доказано возникновение характерной стромальной реакции в ответ на опухолевую прогрессию [3, 5]. Тем не менее к настоящему времени не изучены в достаточной степени механизмы стромально-эпителиальных взаимоотношений и их влияния на прогрессирование злокачественных новообразований. В тех опухолях, где наблюдается стромальная реакция, отмечено, что она заметно отличается от реакции при других патологических процессах, в которых также наблюдается нарушение стромально-паренхиматозных взаимоотношений. Так, при заживлении ран стромальная реакция сопровождается повышенной продукцией компонентов экстрацеллюлярного матрикса, факторов роста и ремоделирующих экстрацеллюлярный матрикс ферментов, которые и формируют поддерживающее рост паренхиматозных клеток стромальное микроокружение [8]. При злокачественных новообразованиях стромальная реакция, как правило, способствует опухолевому росту посредством стимулирования ангиогенеза, повышения выживаемости раковых клеток, пролиферации и инвазии.

Факторы роста, вырабатываемые эпителиальными и стромальными клетками при раке простаты, задействованы в еще более сложных взаимоотношениях, становясь участниками гормональной регуляции клеточного роста, индуцируя лиганднезависимую активацию или супрессию андрогеновых рецепторов [6]. Потеря баланса между факторами, стимулирующими и ингибирующими пролиферацию, может индуцировать простатическую стромальную гиперплазию, наблюдаемую при доброкачественных формах, или гиперпластическую реакцию эпителия, наблюдаемую при раке [4]. При исследовании стромально-паренхиматозных взаимоотношений с ис-

пользованием клеточных культур рака предстательной железы были выявлены значительные изменения в составе стромального микроокружения рака предстательной железы по сравнению с доброкачественной гиперплазией и простатической интраэпителиальной неоплазией: увеличение количества миофибробластов и уменьшение зрелых гладкомышечных клеток, увеличение количества гиалуроновой кислоты, матриксных металлопротеаз и тенасцина [7, 8, 10]. Замещение полноценных гладкомышечных клеток миофибробластами ведет к несовершенному ангиогенезу с формированием неполноценных сосудов микроциркуляторного русла с низкой экспрессией гладкомышечного актина. Таким образом, резюмируя приведенные выше литературные данные, можно предположить, что при раке предстательной железы стромальный компонент значительно видоизменяется и формирует так называемое реактивное стромальное микроокружение, которое, с одной стороны, стимулирует опухолевый рост, а с другой стороны, может ему препятствовать.

Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение экспрессии одного из компонентов стромального микроокружения — гладкомышечного актина в строме рака предстательной железы и в стенке сосудов микроциркуляторного русла в зависимости от степени дифференцировки опухоли и сопоставление выраженности экспрессии с клиническим течением и исходом заболевания.

Материалы и методы

Материалом данного исследования стали 47 наблюдений рака предстательной железы, полученные при трансуретральной резекции за период с 1996 по 2000 год. Всем больным применялась сходная схема комбинированной терапии новообразования. При первичном гистологическом исследовании все они являлись аденокарциномами различной степени дифференцировки: высокодифференцированные раки (Глиссон 2–5) составили 12 случаев, умереннодифференцированные (Глиссон 6–7) — 15 и низкодифференцированные (Глиссон 7–10) — 20 случаев. При анализе клинических данных весь исследуемый материал был разделен на клинические группы с выявленными регионарными или отдаленными метастазами (17 случаев) и без выяв-

ленных метастазов (30 наблюдений). Кроме этого, анализируемый материал исследовался в зависимости от выживаемости больных. Больных, проживших менее года, выявлено 7, от 1 года до 5 лет — 29, более 5 лет — 12 человек. Для выявления гладкомышечного актина в строме опухолей и стенке сосудов использовали иммуногистохимическое окрашивание с применением моноклональных мышечных антител фирмы «Dako», клон 1A4 в стандартном разведении. Из парафиновых блоков готовились срезы толщиной 5 микрон, переносились на предметные стекла, покрытые полисиланом, срезы в вертикальном положении высушивали 18 часов при комнатной температуре и помещали в термостат на 30 мин при температуре 60°C. Депарафинация проводилась в ксилоле (в батарее из 3 емкостей по 3 минуты в каждой), дегидратация в этиловом спирте (в батарее из 3 емкостей в спиртах восходящей крепости по 3 мин в каждой). В последующем предметные стекла со срезами переносились в цитратный буфер РН 6.0 и помещались в водяную баню при температуре 98°C на 30 мин. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы обрабатывались 3% перекисью водорода в течение 5 минут, и наносились первичные антитела в стандартном разведении. Срезы инкубировались в течение 30 минут при комнатной температуре. В качестве визуализирующей системы использовали комплекс вторичных антител EnVision фирмы «Dako» с диамибензидином. Затем срезы промывали проточной водой, докрашивали гематоксилином и заключали в полистерол.

Для морфометрической оценки экспрессии гладкомышечного актина микропрепараты фотографировали в 6 полях зрения (объектив 20) с разрешением 1600 на 1200 пикселей при помощи микроскопа AxioStar и цифровой камеры Canon A620. Для более тонкой визуализации иммуногистохимической реакции, устранения артефактов окрашивания и фоновой реакции в фоторедакторе Adobe Photoshop CS 8.0 при помощи инструмента «color range» выделяли характерную коричневую окраску, которую дают продукты реакции диамибензидина, а окружающий фон удаляли при помощи инструмента «magic wand». Для количественного подсчета экспрессии гладкомышечного актина использовали анали-

затор изображений Aperio Image Scope, который подсчитывает количество позитивных пикселей (пиксели, имеющие коричневую окраску). Изучены следующие морфометрические параметры: общая площадь, занимаемая гладкомышечным актином, количество отдельных гладкомышечных волокон и средний размер гладкомышечного волокна. Для морфометрического исследования экспрессии гладкомышечного актина в стенке сосудов микропрепараты фотографировались с использованием объектива 40, выбирались сосуды, которые имели четкий поперечный срез и диаметр 40–50 мкм. Толщина стенки измерялась в 4-х взаимно перпендикулярных точках сосудистой стенки. Изучены следующие параметры: толщина гладкомышечного составляющего стенки сосуда, площадь стенки и просвета сосуда. Подсчет вышеуказанных параметров производили с использованием анализатора изображений WCIF ImageJ.

Полученные данные были обработаны при помощи табличного процессора Excel из пакета MS Office 2003 с модулем статистического анализа «AtteStat 3.4», использовался t-критерий Стьюдента.

Результаты исследования

Окраска микропрепаратов рака предстательной железы с использованием антител к гладкомышечному актину позволила четко выявить гладкомышечную составляющую стромы и мышечную стенку сосудов микроциркуляторного русла. Количественная оценка степени экспрессии гладкомышечного актина показала, что в группе опухолей с выявленными метастазами общая площадь, занимаемая гладкомышечным составляющим стромы, составила: $29594,93 \pm 1803,27$ мкм² на единицу исследуемой площади. При исследовании сосудов толщина гладкомышечного слоя сосудов микроциркуляторного русла составила $3,10 \pm 0,4$ мкм. Средняя площадь гладкомышечного компонента сосудистой стенки составила $778,44 \pm 15,36$ мкм², а средняя площадь просвета сосуда — $340,41 \pm 12,76$ мкм².

В группе опухолей без выявленных метастазов средняя площадь, занимаемая экспрессией гладкомышечного актина, составила $36912,93 \pm 1472,9$ мкм², толщина гладкомышечной составляющей стенки сосуда — $5,07 \pm 0,42$ мкм, площадь экспрессии гладкомышечного актина в стенке — $801,63 \pm$

20,01, средняя площадь просвета сосуда — $320 \pm 5,1$ мкм². При статистическом сравнении данных групп больных с использованием t-критерия Стьюдента достоверные различия получены при сравнении площади, занимаемой экспрессией гладкомышечного актина ($t = 2,79$, $p = 0,0077$), толщины гладкомышечного компонента сосудистой стенки ($t = 2,933817$, $p = 0,0053$), площади экспрессии гладкомышечного актина в сосудистой стенке ($t = 2,677304$, $p = 0,012$).

Анализ материала в зависимости от степени злокачественности опухоли показал, что среднее значение площади экспрессии гладкомышечного актина составило в группе высокодифференцированных опухолей $43715,18 \pm 1589,07$ мкм², в группе умеренно дифференцированных опухолей — $34969,29 \pm 1262,54$ мкм², низкодифференцированных — $29270,84 \pm 1443,36$ мкм². При статистическом анализе вышеуказанного параметра выявлены достоверные различия между всеми исследуемыми группами ($P < 0,05$). Толщина сосудистой стенки и площадь экспрессии гладкомышечного актина в стенке сосуда в опухолях с высокой степенью дифференцировки составили, соответственно, $7,19 \pm 0,29$ мкм и $910,74 \pm 13,99$ мкм²; в группе умереннодифференцированных опухолей толщина гладкомышечного компонента стенки сосуда — $4,65 \pm 0,32$ мкм, площадь экспрессии гладкомышечного актина сосудистой стенки — $829,68 \pm 9,99$ мкм². Группа низкодифференцированных опухолей характеризовалась следующими морфометрическими данными: толщина гладкомышечного слоя — $2,47 \pm 0,22$ мкм, площадь экспрессии гладкомышечного актина — $706,62 \pm 5,74$ мкм. При статистическом анализе с использованием критерия Стьюдента статистически достоверные различия ($p < 0,05$) получены между всеми исследуемыми группами и по всем исследуемым признакам. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что с уменьшением степени дифференцировки рака предстательной железы уменьшается и гладкомышечная составляющая стромы. Кроме этого, при микроскопическом исследовании, выявлены значительные изменения созревания сосудов, участвующих в неоангиогенезе: стенка сосудов низкодифференцированных опухолей характеризовалась потерей и наруше-

нием структуры гладкомышечного слоя, уменьшением толщины сосудистой стенки и увеличением просвета сосудов. Все вышеуказанные морфометрические показатели согласуются с данными, полученными в группах с выявленными метастазами и без них.

При сопоставлении морфометрических параметров экспрессии гладкомышечного актина стромы и сосудистой стенки с общей выживаемостью больных были получены следующие данные.

В группе больных, проживших более 5 лет, выявлены следующие морфометрические показатели экспрессии гладкомышечного актина: площадь его экспрессии в строме составила $37957,91 \pm 2570,62$ мкм², толщина гладкомышечного компонента сосудистой стенки — $5,66 \pm 0,53$ мкм, площадь экспрессии гладкомышечного актина в стенке сосудов — $827,15 \pm 23,69$ мкм², площадь просвета сосудов — $289,94 \pm 8,36$ мкм². В группе больных, проживших от 1 года до 5 лет, были получены следующие результаты: экспрессия актина в строме — $33844,85 \pm 1382,91$ мкм², толщина гладкомышечной основы стенки сосудов — $4,05 \pm 0,41$ мкм, площадь экспрессии в сосудистой стенке — $793,29 \pm 19,46$ мкм², средняя площадь просвета сосудов — $329,12 \pm 7,7$ мкм². В группе больных, проживших менее 1 года, выявлена следующая характеристика экспрессии гладкомышечного актина: площадь экспрессии в строме — $27976 \pm 3043,57$ мкм², толщина гладкомышечного слоя — $3,62 \pm 1,12$ мкм, площадь экспрессии в сосудистой стенке — $752,44 \pm 25,39$ мкм², площадь просвета сосуда — $359,68 \pm 8,68$ мкм². Статистически достоверная разница по всем перечисленным параметрам ($p < 0,05$) была получена в крайних группах, т. е. в группах больных, проживших более 5 лет и менее 1 года.

Выводы

Таким образом, экспрессия гладкомышечного актина в строме рака предстательной железы значительно варьирует в зависимости от степени дифференцировки злокачественного новообразования, что наряду с оценкой эпителиального компонента по Глиссону должно учитываться в оценке прогноза опухоли. При этом количество гладкомышечного актина значительно больше в опухолях более высокой дифференцировки и низкого метастатиче-

ского потенциала. Обнаруженные в низкодифференцированных раках нарушения формирования гладкомышечного каркаса сосудов со снижением его толщины, появлением прерывистости и дефектов гладкомышечного слоя отражают несовершенство неоангиогенеза и могут являться одним из прогностических маркеров новообразования.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Первичная культура аденокарциномы простаты: модель для изучения стромально-эпителиальных взаимодействий / О. П. Гладских [и др.] // Архив патологии. — 2002. — Вып. 6. — С. 40-43.
2. Эпидемиология рака предстательной железы в Республике Беларусь // Актуальные вопросы диагностики и лечения рака предстательной железы: материалы международной научно-практической конференции / И. В. Залуцкий, Ю. И. Аверкин. — Минск, 27–28 октября, 2006 г. — С. 5–12.
3. Морфологическая характеристика микроциркуляторного русла в серозных опухолях яичника / Л. М. Михалева [и др.] // Архив патологии. — 2005. — Вып. 6. — С. 28–31.
4. Dvorak, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing / H. F. Dvorak // N. Engl. J. Med. — 1986. — Vol. 315. — P. 1650–1659.
5. Gleason, D. F. Classification of prostatic carcinomas / D. F. Gleason // Cancer Chemother. Rep. — 1966. — Vol. 50. — P. 125–128.
6. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling / A. Jennifer [et al.] // Clinical Cancer Research — 2002. — Vol. 8. — P. 2912–2923.
7. Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer / V. B. Lokeshwar [et al.] // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276. — P. 11922–11932.
8. Murphy, W. M. Prognostic factors in the pathological assessment of prostate cancer / W. M. Murphy // Hum. Pathol. — 1998. — Vol. 29. — P. 427–430.
9. Elevated levels of versican but not decorin predict disease progression in early-stage prostate cancer / C. Ricciardelli [et al.] // Clin. Cancer Res. — 1998. — Vol. 4. — P. 963–971.
10. In situ hybridization studies of metalloproteinases 2 and 9 and TIMP-1 and TIMP-2 expression in human prostate cancer / M. Wood [et al.] // Clin. Exp. Metastasis. — Vol. 15. — P. 246–258.

Поступила 17.05.2007

УДК 616.72-002-092.9)

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРОЗА

В. И. Николаев, О. А. Голубев

Гомельский государственный медицинский университет

На примере белых лабораторных крыс рассматриваются патоморфологические характеристики экспериментального остеоартроза в различные сроки развития патологического процесса. В оригинальном исследовании предложен способ формирования патологических изменений в суставе и методы морфологической оценки тканевых изменений, которые позволяют дать объективную характеристику морфогенетических процессов.

Ключевые слова: патоморфологические характеристики, экспериментальный остеоартроз, эксперимент.

PATHOMORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC EXPERIMENTAL OSTEOARTROZIS

V. I. Nikolaev, O. A. Golubev

Gomel State Medical University

By the example of white laboratory rats are considered pathomorphological characteristics experimental osteoartrozis in various terms of development of pathological process. In original research the way of formation of pathological changes in a joint and methods of a morphological estimation of fabric changes which allow to give the objective characteristic morphogenetic processes is offered.

Key words: pathomorphological characteristics, experimental osteoartrozis, experiment.