

Патоморфоз рака предстательной железы при лечении высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком (HIFU)

Р.Н. Фомкин, Е.С. Воронина, В.М. Попков, Г.Н. Маслякова, Б.И. Блюмберг

ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России,

НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии, Саратов

Контакты: Роман Николаевич Фомкин rnfomkin@mail.ru

Цель исследования — оценка эффективности лечения рака предстательной железы (РПЖ) с использованием высокоинтенсивного сфокусированного ультразвука (HIFU) на основании морфометрического и иммуногистохимического (ИГХ) анализа послеоперационных биоптатов предстательной железы. Объектом исследования явились 40 пациентов с локализованным и местно-распространенным РПЖ. Морфологический анализ после лечения проводили на основании стандартной окраски срезов гематоксилин-эозином, морфометрического и ИГХ-исследования с помощью следующих антител: PCNA, Bcl-2, AMACR, E-кадгерин, ANDR (Dako). При гистологическом изучении материала до и после HIFU-терапии при стандартной окраске гематоксилин-эозином лечебный патоморфоз опухоли соответствовал III и IV степеням. Было выявлено, что в качестве дополнительного критерия эффективности лечения РПЖ после HIFU-абляции необходимо применение ИГХ-исследования. Пациенты с высоким уровнем AMACR, Bcl-2 и сниженной экспрессией E-кадгерина, несмотря на положительную динамику клинико-лабораторных, инструментальных и объективных показателей, могут рассматриваться как группа риска продолженного злокачественного роста либо развития рецидива РПЖ.

Ключевые слова: высокоинтенсивный сфокусированный ультразвук, рак предстательной железы, иммуногистохимический анализ

Pathomorphism of prostate cancer during high-intensity focused ultrasound treatment

R.N. Fomkin, E.S. Voronina, V.M. Popkov, G.N. Maslyakova, B.I. Blyumberg

V.I. Razumovsky Saratov State Medical University, Ministry of Health of Russia,

Research Institute of Fundamental and Clinical Urology, Saratov

The purpose of the study was to evaluate the efficiency of prostate cancer (PC) treatment using high-intensity focused ultrasound (HIFU) on the basis of morphometric and immunohistochemical (IHC) analyses of postoperative prostate biopsy specimens. The study subjects were 40 patients with localized and locally advanced PC. The postoperative morphological analysis was made on the basis of standard hematoxylin-eosin staining and morphometric and IHC studies using the following antibodies: PCNA, Bcl-2, AMACR, E-cadherin, and ANDR (Dako). Pre- and post-HIFU therapy histological examination of the routinely hematoxylin-eosin-stained specimens showed that the therapeutic pathomorphism of the tumor corresponded to grades III and IV. It was established that the IHC study should be used as an additional criterion for the efficiency of PC therapy after HIFU ablation. In spite of positive clinical, laboratory, instrumental, and objective changes, the patients with high AMACR and Bcl-2 levels and decreased E-cadherin expression may be considered as a group at risk for prolonged malignant growth or recurrent PC.

Key words: high-intensity focused ultrasound, prostate cancer, immunohistochemical analysis

Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) — одно из наиболее часто встречающихся злокачественных новообразований у мужчин среднего и пожилого возраста. За последние 3 десятилетия частота раковых заболеваний предстательной железы (ПЖ) почти удвоилась [1]. В настоящее время среди возможных вариантов лечения локализованных форм этой нозологии заметную роль играют малоинвазивные куративные методики, одной из которых является высокоинтенсивная сфокусированная ультразвуковая абляция ПЖ (HIFU — High Intensity Focused Ultrasound). Это современный, сравнительно безопасный и легко воспроизводимый вариант лечения РПЖ, с низким уровнем осложнений и смертности. В мировой периодической печати имеют-

ся публикации, в которых анализируется его эффективность, определяются показания к применению [2, 3].

Однако существующие на данный момент инструментальные и лабораторные методы исследования не позволяют точно диагностировать продолженный рост либо ранние местные рецидивы рака после HIFU-абляции ПЖ. Так, например, трансректальное ультразвуковое исследование (ТРУЗИ) выявляет значительное уменьшение объема ПЖ и утрату зональной анатомии с потерей границ опухолевого поражения, что затрудняет интерпретацию результатов. Применение магнитно-резонансной томографии (МРТ) с контрастированием позволяет определить ткань, подвергшуюся лечебному воздействию, но не позволяет четко дифференцировать среди гетерогенной зоны

тканевой деструкции резидуальные очаги злокачественной опухоли. Все это может стать причиной ошибки в оценке результатов лечения [4, 5].

Неоспоримым методом оценки степени развития лечебного патоморфоза после воздействия на ткань ПЖ HIFU является гистологическое исследование. Известно, что морфологическими проявлениями патоморфоза служат повреждения паренхимы и стромы в виде дистрофии и некроза [6]. Однако нарушение метаболизма клеток может сочетаться с этими признаками и даже быть причиной указанных изменений, а не его проявлением. Поэтому доказательства наличия истинного лечебного патоморфоза в ткани следует искать с помощью соответствующих иммуногистохимических (ИГХ) методов [7].

Цель исследования — оценка эффективности лечения РПЖ с использованием HIFU на основании морфометрического и ИГХ-анализа послеоперационных биоптатов ПЖ.

Материалы и методы

Объектом исследования явились 40 пациентов с локализованным и местно-распространенным РПЖ, подтвержденным морфологически. Больные проходили лечение в клинике урологии КБ им. С.Р. Миротворцева СГМУ в период с февраля 2009 г. по март 2010 г., где им было проведено первичное оперативное лечение РПЖ методом HIFU-абляции на аппарате Ablatherm Integrated Imaging® (EDAP TMS, Франция). Средний возраст пациентов составил $66,3 \pm 5,83$ года; минимальный возраст — 52 года, максимальный — 84 года. В наиболее зрелом, социально активном возрасте (до 60 лет) находилось 17 (42,5 %) пациентов, пожилым и старческим возрасте — 23 (57,5 %). Группировка пациентов по возрасту проведена на основании периодизации, рекомендованной VII Всесоюзной научной конференцией по проблемам возрастной морфологии, физиологии и биохимии (табл. 1).

Критерии включения пациентов в исследование, показания:

- РПЖ локализованных стадий T1–T2N0M0 у пациентов с невозможностью выполнения радикальной простатэктомии (тяжелый интеркуррентный фон, возраст больного и т. п.) или в случае отказа больного от открытого оперативного вмешательства по тем или иным причинам;
- местно-распространенный РПЖ стадии T3aNxM0.

Доля больных с локализованной формой составила 77,5 % ($n = 31$), с местно-распространенной формой — 22,5 % ($n = 9$) (табл. 2).

Распределение пациентов по степени онкологического риска (по D'Amico, 2003) отражено в табл. 3.

Противопоказаниями к данному методу лечения являлись: утолщенная стенка прямой кишки (более

Таблица 1. Распределение больных по возрастным группам

Возрастная группа	Возраст, лет	Число больных	
		абс.	%
Второй период зрелого возраста	36—60	17	42,5
Пожилый возраст	61—74	20	50
Старческий возраст	75—95	3	7,5
Итого		40	100

Таблица 2. Распределение пациентов с РПЖ в зависимости от стадии опухолевого процесса

Распространенность РПЖ	Стадия (TNM)		Число больных	
			абс.	%
Локализованный	T1N0M0	T1aN0M0	1	2,5
		T1bN0M0	3	7,5
		T1cN0M0	2	5
	T2N0M0	T2aN0M0	3	7,5
		T2bN0M0	5	12,5
		T2cN0M0	17	42,5
Местно-распространенный	T3aNxM0		9	22,5
Всего	Все стадии		40	100

Таблица 3. Распределение пациентов с РПЖ в зависимости от степени онкологического риска

Распространенность РПЖ	Стадия (TNM)	Степень онкориска	Число больных	
			абс.	%
Локализованный	T1–2N0M0	Низкий риск (уровень ПСА < 10 нг/мл, индекс Глисона < 6)	6	15
		Умеренный риск (уровень ПСА 10–20 нг/мл, индекс Глисона 6–7)	21	52,5
		Высокий риск (уровень ПСА > 20 нг/мл, индекс Глисона > 8)	4	10
Местно-распространенный	T3aNxM0		9	22,5
Всего	Все стадии		40	100

8 мм при ТРУЗИ), наличие ректоуретральных фистул, прорастание опухоли стенки прямой кишки, наличие инородных тел между ПЖ и прямой кишкой (металлические клипсы и др.), объем ампулы прямой кишки менее 50 см³, отсутствие прямой кишки, наличие при ТРУЗИ гиперэхогенных образований с акустической дорожкой в ПЖ более 5 мм.

Всем больным проводилось клиническое обследование, включавшее: сбор анамнеза; исследование общих анализов крови и мочи, уровня сывороточного простатспецифического антигена (ПСА), биохимического анализа крови; исследование ПЖ (пальцевое, ТРУЗИ, МРТ), ультразвуковое (УЗ) исследование органов брюшной полости и забрюшинного пространства. Для определения распространенности опухолевого процесса и исключения отдаленного метастазирования проводили скинтиграфию скелета и рентгенографическое исследование легких. При необходимости выполнялась компьютерная томография или МРТ брюшной полости и/или малого таза.

Для верификации диагноза выполнялась трансректальная мультифокальная биопсия ПЖ. В ходе морфологического исследования биопсийного материала также проводилась оценка степени дифференцировки опухолевых клеток. Наиболее часто (82,5 %) встречались умеренно-дифференцированные опухоли (табл. 4).

Объем ПЖ до лечения составлял от 22,1 до 62,3 см³, в среднем 48,3 см³. Учет объема и размеров (особенно передне-заднего отдела) ПЖ проводили для обеспечения радикальности лечения, так как максимальная высота действия фокусированных УЗ-лучей составляет 26 мм. Перед лечением обязательно определяли толщину стенки прямой кишки. Одним из противопоказаний к проведению HIFU является толщина стенки прямой кишки более 0,8 см из-за высокого риска повреждения стенки прямой кишки. Дооперационный уровень ПСА у больных со стадией T1–T2 варьировал от 5,1 до 26,3 нг/мл, при местно-распространенном процессе колебался от 14,1 до 59 нг/мл.

Методика проведения HIFU-абляции ПЖ. Сущность оперативного пособия заключается в воздей-

ствии на ткань ПЖ сфокусированными УЗ-волнами частотой 3 МГц. Операцию выполняли в положении больного на правом боку под спинальной анестезией на специально оборудованном столе. Через прямую кишку устанавливали датчик, излучающий высокоинтенсивные, конвергирующие УЗ-волны. УЗ-волны, генерируемые трансдуктором, фокусировали на площади мишени, оказывая механическое (кавитация) и термическое (повышение локальной температуры от 85 до 100 °С) действия и не повреждая тканей вне зоны излучения. За счет термического воздействия на ткань (абляция) в течение нескольких секунд происходит коагуляционный некроз участка ткани с четкими границами. Зона разрушения при каждом воздействии составляет до 26 мм по высоте и 1,7 мм в диаметре. Контроль расстояния между датчиком и стенкой прямой кишки в реальном времени в комбинации с автоматической коррекцией расположения фокальной точки позволял обеспечить безопасное и точное позиционирование. Средняя частота воздействий — 628 ± 164 импульсов; средний объем тканей, подвергнутых воздействию, — 33,8 ± 8,3 см³ за 1 процедуру; объем тканей, подвергнутых воздействию HIFU — 132 % объема ПЖ; среднее время операции — 150 (от 90 до 200) мин. Практически всем больным (92,5 %) перед сеансом HIFU-терапии была выполнена трансуретральная резекция (ТУР) ПЖ, для уменьшения объема ПЖ, что делает последующую HIFU-терапию более радикальной. Непосредственно после сеанса HIFU из-за развития отека ткани ПЖ больным проводилось дренирование мочевого пузыря уретральным катетером для постоянного отведения мочи.

В целях оценки состояния ткани ПЖ и своевременной диагностики местного рецидива РПЖ спустя 12 ± 2 мес после лечения 22 пациентам выполнили контрольную биопсию ПЖ; 8 пациентов обратились в клинику с жалобами на затрудненное, вялой струей мочеиспускание, ночную поллакирию в сроки от 4 ± 1 мес до 2 лет после проведенного лечения. Этой группе больных была выполнена ТУР склеротической ткани в области шейки мочевого пузыря и контрольная биопсия резидуальной ткани ПЖ. Всем больным

Таблица 4. Распределение пациентов в зависимости от степени дифференцировки опухоли

Степень дифференцировки опухоли	Индекс Глисона	Стадия РПЖ						Итого	
		T1N0M0		T2N0M0		T3aNxM0			
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Высокодифференцированная	≤ 5	3	7,5	1	2,5	0	0	4	10
Умеренно-дифференцированная	6–7	3	7,5	24	6	6	15	33	82,5
Низкодифференцированная	> 7	0	0	0	0	3	7,5	3	7,5

были проведены также МРТ, ТРУЗИ, цветное доплеровское картирование, определяли уровень ПСА, однако в данной работе приводится только морфологическая оценка послеоперационных результатов лечения.

Гистологическое исследование. Для приготовления гистологических препаратов биопсийный и послеоперационный материал ПЖ фиксировали в 10 % забуференном нейтральном формалине и заключали в парафин. Толщина гистологических срезов составила 4 мкм. Морфологический анализ после лечения проводили на основании стандартной окраски срезов гематоксилин-эозином, морфометрического и ИГХ-исследования с помощью следующих антител: PCNA, Bcl-2, AMACR, E-кадгерин, ANDR (Dako). В качестве системы визуализации использовался набор LSAB2 (Dako Cytomation) в соответствии с рекомендациями производителя. Отрицательный ответ получали путем исключения первичных антител. Результаты ИГХ-исследования (PCNA, ANDR-ядерная экспрессия) оценивались полуколичественным способом при помощи гистосчета по формуле $Hs = \sum P \times I$, где: I – интенсивность окрашивания, P – процент окрашенных клеток). При реакции с Bcl-2, AMACR и E-кадгерином (цитоплазматическая экспрессия) использовалась только качественная оценка.

Результаты

При стандартной окраске гематоксилин-эозином в гистологических препаратах ПЖ независимо от срока после лечения преобладали склеротические изменения. Фиброз занимал 70–90 % всей площади материала. Среди фиброзной ткани определялись фрагменты железистой ткани. Железы имели округлую форму и средний размер 80–130 мкм. В просвете

желез содержалось небольшое количество розового, гомогенного секрета. При сроке больше года после лечения в просвете желез обнаруживались кальцинаты. Эпителий желез был высоким, с неровным апикальным краем и дистрофическими изменениями в цитоплазме. Ядра эпителиальных клеток имели многогранное расположение. Гиперхромные ядра обнаруживались в единичных случаях, чаще на ранних сроках. Ядра имели округлую форму. Размер ядер в ранние сроки после терапии (1,5–5 мес) составлял 12–14 мкм, хроматин их имел рыхлую структуру. В более поздние сроки хроматин приобретал более компактную структуру, а размер ядер уменьшался до 7–10 мкм.

Количество сосудов варьировало от 7 до 15 в 4 полях зрения ($\times 100$), что является благоприятным прогностическим фактором. В ранние сроки после лечения сосуды были полнокровны, в более поздние сроки – практически пусты. По истечении 3 мес после HIFU-терапии в ПЖ стала обнаруживаться лимфоидная инфильтрация, которая в 70 % носила очаговый характер и в 30 % – диффузный (рис. 1, 2).

ИГХ-исследование со специальным протеином α -метилацил-коэнзим А рацемазы (AMACR), представляющим собой первый ИГХ-маркер злокачественной трансформации клеток ПЖ [8], показало, что до лечения выраженная экспрессия наблюдалась у 31 % больных (рис. 3), умеренная – в 69 % случаев, отрицательной реакции не было. После HIFU-терапии у 30 % пациентов сохранялась выраженная экспрессия, в 46 % – умеренная и слабо выраженная (рис. 4); у 23 % больных реакция была отрицательной.

Для оценки пролиферативной активности опухолевых клеток до и после лечения применяли маркер антигена пролиферирующего клеточного ядра (PCNA),

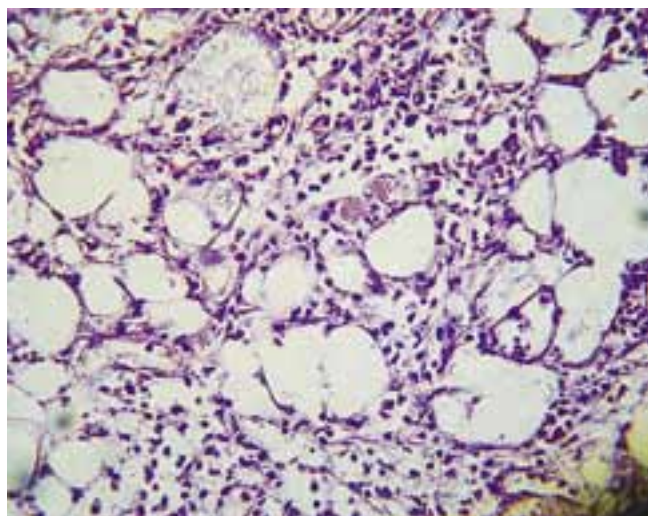


Рис. 1. Диффузная лимфоцитарная инфильтрация в строме ПЖ через 3 мес после HIFU-абляции. Окраска гематоксилин-эозином, $\times 400$

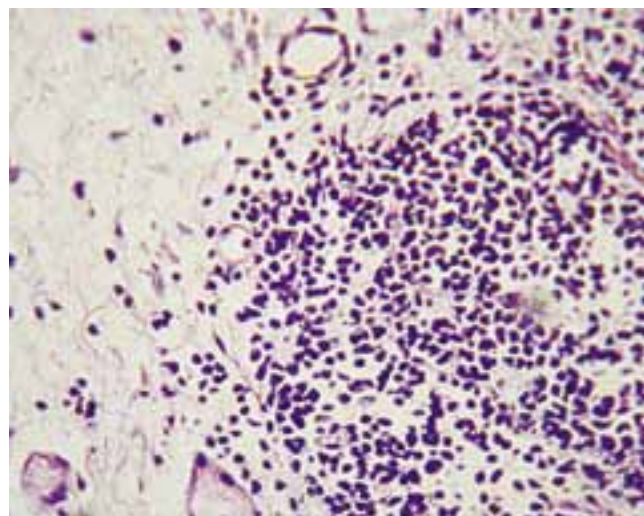


Рис. 2. Очаговые лимфоцитарные инфильтраты в строме ПЖ через 3 мес после HIFU-абляции. Окраска гематоксилин-эозином, $\times 400$

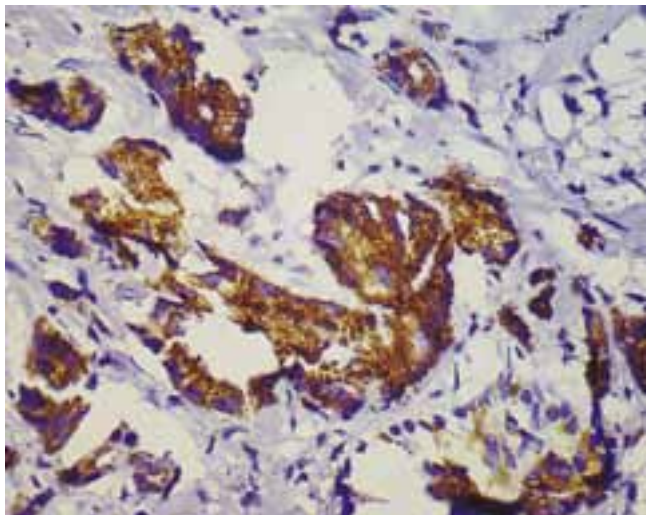


Рис. 3. Выраженная экспрессия AMACR в эпителии ПЖ у пациентов до лечения. Окраска: иммуногистохимия с антителом AMACR, $\times 400$

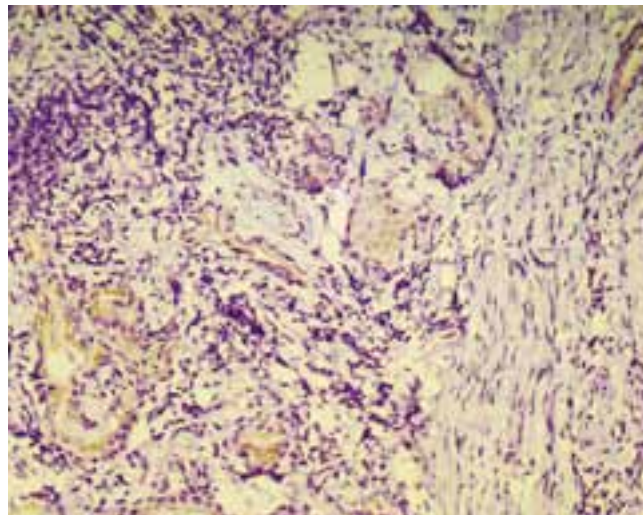


Рис. 4. Слабо выраженная экспрессия AMACR в эпителии ПЖ у пациентов после лечения. Окраска: иммуногистохимия с антителом AMACR, $\times 400$

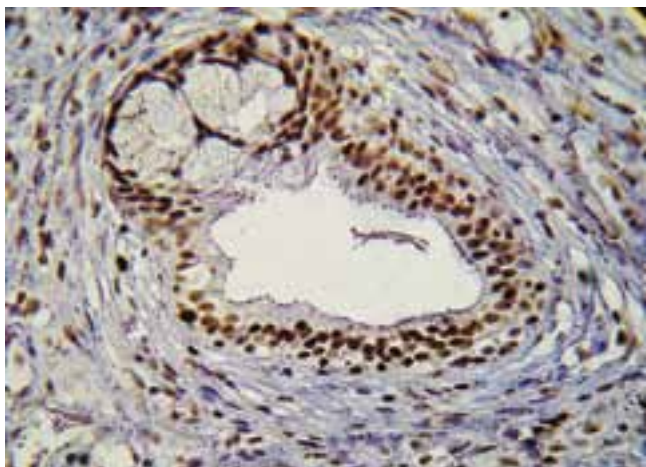


Рис. 5. Выраженная экспрессия PCNA в ядрах эпителии ПЖ у пациентов до лечения. Окраска: иммуногистохимия с антителом PCNA, $\times 400$

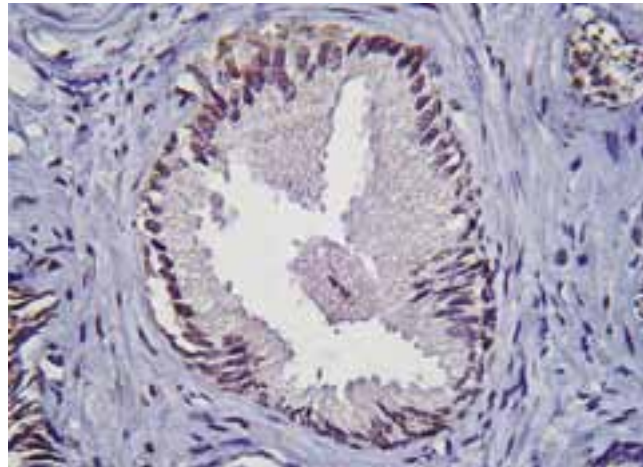


Рис. 6. Слабовыраженная экспрессия PCNA в ядрах эпителии ПЖ у пациентов после лечения. Окраска: иммуногистохимия с антителом PCNA, $\times 400$

учитывая, что пролиферация является кардинальным признаком злокачественных опухолей [9]. Установлено, что у 45 % больных ядерная экспрессия данного маркера оставалась на одном уровне как до, так и после лечения ($H_s = 70-110$) (рис. 5), у 55 % экспрессия данного маркера снижалась ($H_s = 90-60$ — до лечения; $H_s = 30-60$ — после лечения) (рис. 6).

Известно, что онкопротеин Bcl-2 является блокатором апоптоза. Некоторые авторы предлагают использовать данный маркер для оценки агрессивности опухоли. В нашей работе данный показатель значительно возрос после проведенного лечения независимо от сроков. Установлено, что до лечения выраженная экспрессия данного маркера наблюдалась у 30 % пациентов, у 54 % больных экспрессия была умеренной и у 15 % — отрицательной. После лечения у 76,9 % пациентов экспрессия была выраженной и у 23 % — умеренной (рис. 7).

Количество рецепторов к андрогенам оставалось на одном уровне как до, так и после лечения независимо от сроков, что можно расценить как благоприятный прогностический признак.

Кадгерины являются мембранными гликопротеидами и играют важную роль в кальцийзависимой межклеточной адгезии. Считается, что утрата межклеточных «мостиков» и связи с соседними эпителиальными клетками относятся к прогностическим признакам развития метастазов. В нашей работе независимо от сроков после HIFU-терапии отмечается некоторое снижение экспрессии E-кадгерина. До лечения выраженная (рис. 8) и умеренная экспрессия обнаруживалась у 88 % больных (рис. 9), отрицательная реакция — у 12 %; после лечения у 85 % пациентов экспрессия антитела была положительной, а у 15 % — отрицательная.

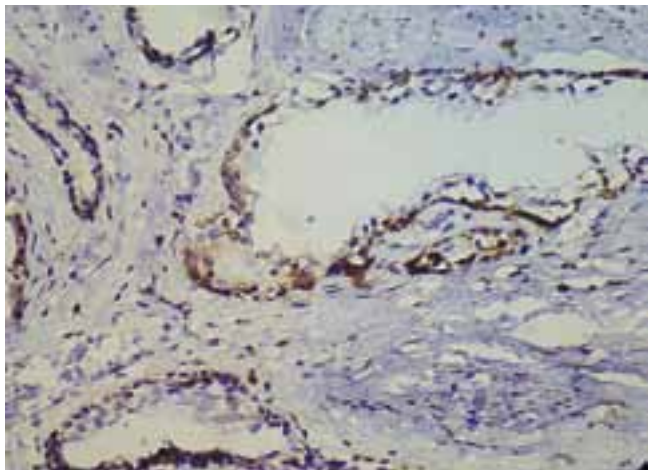


Рис. 7. Умеренно выраженная экспрессия Bcl-2 в ядрах резервного эпителия ПЖ у пациентов после лечения. Окраска: иммуногистохимия с антителом Bcl-2, $\times 400$

Заключение

Таким образом, при гистологическом изучении биопсийного и послеоперационного материала до и после HIFU-терапии при стандартной окраске гематоксилин-эозином лечебный патоморфоз опухоли соответствовал III и IV степеням.

Однако при ИГХ-исследовании, несмотря на некоторое снижение пролиферативной активности у 55 % больных, ИГХ-маркер злокачественной трансформации клеток ПЖ (AMACR) оставался на высоком уровне у 30 % мужчин. Блокатор апоптоза (Bcl-2), который некоторые авторы предлагают использовать как маркер для оценки агрессивности опухоли, возростал (у 76,9 % больных наблюдалась выраженная экспрессия).

Считают, что снижение экспрессии E-кадгерина при РПЖ коррелирует с выживаемостью, клинической и морфологической стадией заболевания [10]. В нашем исследовании его экспрессия несколько снижалась, что также является неблагоприятным показателем (чувствительность прогноза — 77,5 %, специфичность — 98,4 %).

Таким образом, проведенное исследование показало, что положительный патоморфоз РПЖ, выявляемый при рутинных гистологических методах окраски, не дает достоверной информации об эффективности данного метода лечения. В качестве дополнительного критерия эффективности лечения РПЖ после HIFU-абляции необходимо применение ИГХ-методов исследования. Пациенты с высоким уровнем AMACR, Bcl-2 и сниженной экспрессией E-кадгерина, несмотря на положительную динамику клинико-лабораторных, инструментальных и объективных данных, могут рассматриваться как группа риска продолженного злокачественного роста либо развития рецидива РПЖ.

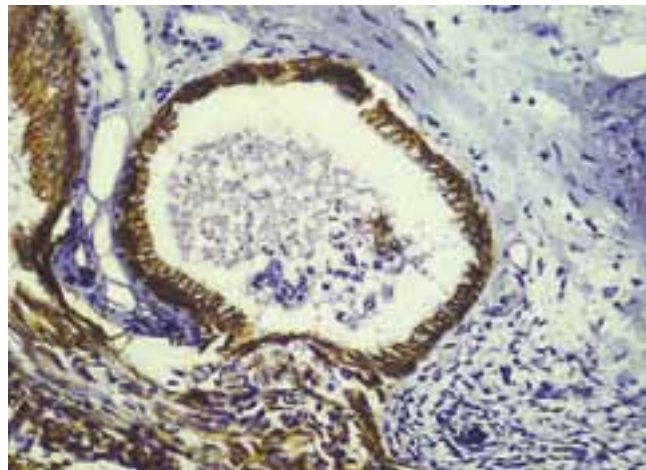


Рис. 8. Выраженная экспрессия E-кадгерина в клетках (мембранозная) ПЖ у пациентов до лечения. Окраска: иммуногистохимия с антителом E-кадгерин, $\times 400$

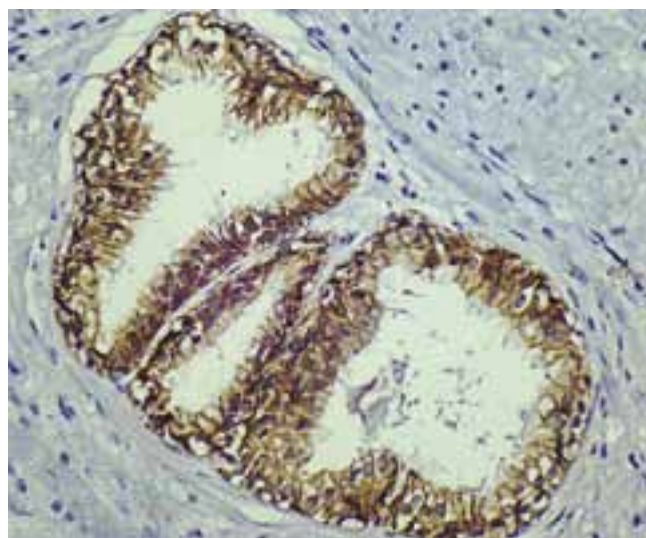


Рис. 9. Умеренная экспрессия E-кадгерина в клетках (мембранозная) ПЖ у пациентов до лечения. Окраска: иммуногистохимия с антителом E-кадгерин, $\times 400$

Выводы

- Для достоверной и объективной оценки лечебного патоморфоза РПЖ после HIFU-абляции ПЖ наряду с использованием стандартных методов гистологического исследования необходимо проведение ИГХ-анализа.

- Показатели пролиферативной активности, блокаторов апоптоза и клеточной адгезии не зависят от срока после проведенного лечения методом HIFU-абляции, что позволяет при необходимости делать контрольную биопсию до появления у больного жалоб.

- Пациенты с высоким уровнем AMACR, Bcl-2 и сниженной экспрессией E-кадгерина, несмотря на

положительную динамику клинико-лабораторных, инструментальных и объективных показателей, могут рассматриваться как группа риска продолженного

злокачественного роста либо развития рецидива РПЖ, что не исключает назначения им в послеоперационном периоде дополнительного лечения.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Пушкарь Д.Ю., Раснер П.И., Говоров А.В., Колонтарев К.Б. Роботическая радикальная простатэктомия: российский опыт. Экспер и клин урол 2011;(2–3):74.
2. Chen L., Rivens I., Haar G.R. et al. Histological changes in rat liver tumours treated with high-intensity focused ultrasound. Ultrasound Med Biol 2011;19: 67–74.
3. Глыбочко П.В., Фомкин Р.Н., Понукалин А.Н. и др. Первый опыт применения высокоинтенсивной фокусированной ультразвуковой абляции (HIFU) в лечении рака простаты. Саратовск науч мед журн 2009;5(4):599–603.
4. Blana A., Walter B., Rogenhofer S. et al. High-intensity focused ultrasound for the treatment of localized prostate cancer: 5-year experience. Urology 2004;63(2):297–300.
5. Chaussy C., Thuroff S. The status of high-intensity focused ultrasound in the treatment of localized prostate cancer and the impact of a combined resection. Curr Urol Rep 2003;4(3):248–52.
6. Biermann K., Montironi R., Lopez-Beltran A. et al. Histopathological findings after treatment of prostate cancer using high-intensity focused ultrasound (HIFU). Prostate 2010 Aug;70(11):1196–200.
7. Madersbacher S., Pedevilla M., lingers L. et al. Effect of high-intensity focused ultrasound on human prostate cancer *in vivo*. Cancer Res 2008;55(15):3346–51.
8. Пожарисский К.М., Леенман Е.Е., Арзуманов А.А. Успехи в морфологической диагностике рака предстательной железы: α -метилацил-коэнзим А рацемиза — новый маркер злокачественной трансформации клеток. Арх пат 2005;67(5):15–9.
9. Тарасова М.В., Пожарисский К.М., Тен В.П. и др. Проллиферативные свойства и регуляторы фаз митотического цикла аденокарциномы предстательной железы. Арх пат 2009;71(6):20–3.
10. Ефремов Г.Д. Роль иммуногистохимии в диагностике рака предстательной железы. Экспер и клин урол 2011;(1):50–6.