

Экспрессия матриксной металлопротеиназы-9 в аденокарциноме предстательной железы

М.И. Андрюхин¹, С.А. Пульбере¹, А.В. Локтев¹, И.И. Бабиченко²

¹Кафедра урологии и оперативной нефрологии;

²кафедра патологической анатомии РУДН, Москва

Контакты: Артем Валерьевич Локтев doklok@mail.ru

В статье представлены результаты сравнительного иммуногистохимического исследования пролиферативной активности клеток, оцениваемой по экспрессии белка Ki-67, и локализации белка матриксной металлопротеиназы-9 (ММР-9) при доброкачественной гиперплазии предстательной железы и аденокарциноме различной градации по шкале Глисона. Выявлено достоверное снижение уровня ММР-9 в аденокарциноме различной градации. Установлена умеренная положительная корреляция между градацией по шкале Глисона и индексом пролиферации клеток по показателю Ki-67 ($r_s = 0,674$) и умеренная отрицательная корреляция градации по шкале Глисона с уровнем экспрессии ММР-9 ($r_s = -0,660$).

Ключевые слова: аденокарцинома предстательной железы, доброкачественная гиперплазия предстательной железы, пролиферативная активность, матриксная металлопротеиназа-9, Ki-67

Expression of matrix metalloproteinase-9 in adenocarcinoma of prostate

M.I. Andrushin¹, S.A. Pulbere¹, A.V. Loktev¹, I.I. Babichenko²

¹Department of Urology and Operative Nephrology;

²Department of Pathological Anatomy, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

Immunohistochemical study of cells proliferative activity by Ki-67 protein and localization of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) has been carried out at benign prostatic hyperplasia and adenocarcinoma of different gradations by the Gleason score. A significant decrease of the MMP-9 levels in the adenocarcinoma of different gradations have been found. A moderate positive correlation between the Gleason score and cell proliferation Ki-67 index ($r_s = 0.674$) and a moderate negative correlation with the level of such score and expression of MMP-9 ($r_s = -0.660$) were detected.

Key words: adenocarcinoma of the prostate, benign prostatic hyperplasia, proliferative activity, matrix metalloproteinase-9, Ki-67

Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) является 5-й из наиболее часто встречающихся раковых опухолей в мире и занимает 2-е место по заболеваемости у мужчин. Основными критериями аденокарциномы предстательной железы (ПЖ) считаются наличие инфильтративного роста железистых структур в строу органа, отсутствие базального клеточного слоя и атипизма клеточных ядер [1].

Матриксные металлопротеиназы (ММР) — ферменты, разрушающие внеклеточный матрикс, играют ведущую роль в эмбриогенезе, восстановлении тканей после повреждения при воспалении и ангиогенезе [2]. В условиях онкопатологии ММР обеспечивают инвазию раковых клеток и процессы метастазирования [3, 4].

ММР-9 разрушает основные компоненты внеклеточного матрикса: коллаген IV, фибронектин и ламинин, и обычно используется как маркер злокачественного фенотипа опухолей [5, 6].

Цель исследования — изучение экспрессии маркера пролиферации Ki-67 и ММР-9 в неизмененных клетках секреторного эпителия при доброкачествен-

ной гиперплазии ПЖ (ДГПЖ) и атипических клетках аденокарциномы ПЖ различных градаций по шкале Глисона для определения молекулярных механизмов инвазивного роста опухолевых клеток в ПЖ.

Материалы и методы

В работе был использован операционный материал от 53 пациентов с аденокарциномой ПЖ. Средний возраст больных составил 67 (от 52 до 83) лет. В качестве контроля изучали биопсийный материал от 10 пациентов той же возрастной группы с диагнозом ДГПЖ.

Гистологическая оценка новообразований выполнена с использованием суммы баллов по шкале Глисона [7], которые соответствовали наиболее выраженным анапластическим изменениям клеток опухолевых желез, выявленным при биопсии у данного пациента. У всех пациентов также определяли уровень общего простатспецифического антигена (ПСА) в сыворотке крови. Были выделены 4 группы пациентов по градациям шкалы Глисона: 2-я градация — средний уровень ПСА $9,2 \pm 8,4$ нг/мл ($n = 10$), 3-я градация — $13,3 \pm 12,0$

нг/мл ($n = 18$), 4-я градация — $10,7 \pm 5,3$ нг/мл ($n = 20$) и 5-я градация — $16,3 \pm 6,2$ нг/мл ($n = 5$).

Материал фиксировали в 10 % нейтральном формалине (рН 7,4), после проводки на гистопроцессоре заливали в парафин с температурой плавления $+54^\circ\text{C}$. Для гистологического и иммуногистохимического (ИГХ) исследования серийные срезы толщиной 5 мкм монтировали на стекла, покрытые поли-L-лизинном. Выявление тканевых антигенов осуществляли с помощью очищенных антител кроличьей антисыворотки к ММР-9 (Thermoscientific) 1:400 и Ki-67 (MM1, Diagnostic Biosystems) 1:100. Выявление иммунных комплексов проводили при помощи безбиотиновой системы детекции на основе пероксидазы хрена (N-Histofine, Япония), срезы докрашивали гематоксилином Майера.

Оценку интенсивности ИГХ-реакции с ММР-9 осуществляли по следующим параметрам: 0 — отсутствие коричневых гранул в цитоплазме клеток, 1 — наличие отдельных мелких гранул в цитоплазме, 2 — распределение в отдельных клетках крупных гранул, 3 — наличие крупных гранул в цитоплазме большинства клеток. Индекс пролиферации (ИП) Ki-67 определяли отношением количества иммунореактивных ядер клеток к общему числу ядер в процентах. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 стандартными методами с определением средней арифметической (M) и среднего квадратического отклонения (σ). Учитывая ненормальное распределение отдельных статистических показателей, сравнение 2 независимых групп осуществляли непараметрическим методом при помощи U-критерия Манна–Уитни. Достоверными считали различия средних при уровне статистической значимости $p < 0,05$. Корреляционные взаимосвязи между градациями опухоли по шкале Глисона, ИП клеток, выраженностью экспрессии ММР-9 оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (r_s).

Результаты и обсуждение

ИГХ-исследование ткани ПЖ выявило особенности экспрессии белков, характеризующих пролиферативные процессы ММР-9, в зависимости от градаций опухолей по шкале Глисона.

При изучении пролиферативной активности клеток в контрольном материале — ДГПЖ — отдельные клетки, окрашенные антителами к белку Ki-67, располагались только в базальном клеточном слое, пролиферативная активность клеток секреторного клеточного слоя не отмечалась. В аденокарциноме различных градаций выявлен широкий спектр пролиферативной активности секреторных железистых клеток (табл. 1). В высокоинвазивных аденокарциномах 4-й и 5-й градаций нами отмечено увеличение пролиферативной активности атипических клеток.

Таким образом, пролиферативная активность анапластических клеток аденокарциномы различных градаций по шкале Глисона является чувствительным тестом для дифференциальной диагностики этих новообразований.

Экспрессия ММР-9 выявлялась в цитоплазме опухолевых клеток в виде мелких или крупных гранул, при этом отмечалась различная интенсивность окрашивания продуктами диаминобензидиновой реакции. При ДГПЖ отмечается выраженная ИГХ-реакция, в секреторных клетках в большом количестве видны крупные, средние и мелкие гранулы ММР-9.

При изучении аденокарциномы мы выявили снижение интенсивности ИГХ-окрашивания ММР-9. При исследовании ИГХ-реакции в аденокарциноме ПЖ (2-й и 4-й градаций по шкале Глисона) в цитоплазме секреторных клеток отмечаются отдельные мелкие гранулы ММР-9. Следует отметить, что в аденокарциномах различных градаций интенсивность окрашивания была ниже, чем при ДГПЖ.

Как видно из представленных данных, уровень экспрессии ММР-9 снижается в опухолевых клетках по мере нарастания в них анапластических изменений,

Таблица 1. Характеристика экспрессии ИП Ki-67 и ММР-9 в ПЖ при ДГПЖ и аденокарциноме различных градаций по шкале Глисона

ДГПЖ/аденокарцинома, шкала Глисона	Число пациентов	ИП Ki-67, $M \pm S$, %	ММР-9, $M \pm S$, у. е.
ДГПЖ (контроль)	10	0	3,0
2-я градация (2 балла)	10	$5,3 \pm 1,1$	$1,8 \pm 0,4$
3-я градация (3 балла)	18	$7,2 \pm 1,4^*$	$1,8 \pm 0,5$
4-я градация (4 балла)	20	$10,0 \pm 3,9^{*,**}$	$0,9 \pm 0,4^{\#}, \#\#$
5-я градация (5 баллов)	5	$17,2 \pm 9,4^{*,**}$	$0,8 \pm 0,4^{\#}, \#\#$
Всего	63	—	—

* Достоверные различия между 2-й и 3-й, 2-й и 4-й, 2-й и 5-й градациями; ** достоверные различия между 3-й и 4-й, 3-й и 5-й градациями;

достоверные различия между 2-й и 4-й, 2-й и 5-й градациями; ## достоверные различия между 3-й и 4-й, 3-й и 5-й градациями.

Таблица 2. Корреляционные взаимосвязи между клиническими, морфологическими и ИГХ-характеристиками аденокарциномы ПЖ

Параметр	Показатели	Возраст	ПСА	Градация по шкале Глисона	ИП Ki-67	Экспрессия MMP-9
Возраст	r_s p	—	0,290* 0,034	0,164 0,239	0,065 0,642	—0,009 0,948
ПСА	r_s p	—	—	0,276* 0,046	0,1313 0,348	0,022 0,875
Градация по шкале Глисона	r_s p	—	—	—	0,674* 0,0001	—0,660* 0,0001
ИП Ki-67	r_s p	—	—	—	—	—0,369* 0,006
Экспрессия MMP-9	r_s p	—	—	—	—	—

* Достоверные показатели.

при этом в аденокарциномах 2-й и 3-й градаций уровень экспрессии этого фермента достоверно в 2 раза превышает этот показатель в аденокарциномах 4-й и 5-й градаций. Нами не выявлено достоверных различий в экспрессии MMP-9 между аденокарциномами 2-й и 3-й градаций, а также 4-й и 5-й градаций. По уровню экспрессии MMP-9 эти группы опухолей оказались идентичны.

Изучение молекулярных особенностей онкогенеза открывает новые возможности диагностики и лечения опухолей ПЖ, помогает раскрыть механизмы их биологического потенциала и инвазивных свойств. В настоящее время показано прогностическое значение при аденокарциномах ПЖ таких показателей, как градация по шкале Глисона, уровень общего ПСА в сыворотке крови; многие авторы указывают, что важным показателем является уровень пролиферативной активности опухолевых клеток. В табл. 2 представлены взаимосвязи между клиническими, морфологическими характеристиками опухолей ПЖ, пролиферацией клеток и экспрессией MMP-9. Как видно из представленных данных, наблюдается умеренная положитель-

ная корреляционная связь между градацией по шкале Глисона и ИП клеток по показателю Ki-67 ($r_s = 0,674$) и умеренная отрицательная корреляционная связь градации опухолей с уровнем экспрессии MMP-9 ($r_s = -0,660$). Слабая достоверная отрицательная корреляция существует между уровнем пролиферативной активности клеток и экспрессией секреторными опухолевыми клетками MMP-9 ($r_s = -0,369$).

Заключение

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что по мере увеличения градации по шкале Глисона и повышения пролиферативной активности секреторных клеток аденокарциномы ПЖ происходит снижение выработки MMP-9. При этом инвазивные свойства опухолевых клеток можно объяснить нарушением структуры желез при аденокарциноме, в результате чего фермент не выводится из ацинусов по протокам, а накапливается в них и разрушает базальную мембрану и окружающую соединительнотканную строму, характеризуя инфильтрирующий рост опухоли и развитие отдаленных метастазов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Humphrey P.A. Diagnosis of adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue. J Clin Pathol 2007;60:35–42.
2. Castellano G., Malaponte G., Mazzarino M.C. et al. Activation of the osteopontine/matrix metalloproteinase-9 pathway correlates with prostate cancer progression. Clin Cancer Res 2008;14:7470–80.
3. Авдошин В.П., Бабиченко И.И., Котельникова Е.В. Прогностическое значение экспрессии иммуногистохимических маркеров Ki-67, MMP-9 и коллагена IV у больных папиллярным уротелиальным раком мочевого пузыря. Онкоурология 2011;(3):66–70.
4. Vargas R., Jacobus S., Leitzel K. et al. Elevated plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels predict decreased survival in castration-resistant prostate cancer patients. Cancer 2011;117:517–25.
5. Авдошин В.П., Котельникова Е.В., Бабиченко И.И. Диагностическая и прогностическая значимость экспрессии иммуногистохимических маркеров Ki-67, MMP-9 и коллагена IV у больных папиллярным уротелиальным раком мочевого пузыря. Вестник РУДН. Серия «Медицина» 2011;4:80–6.
6. Roy R., Louis G., Loughlin K.R. et al. Tumor-specific urinary MMP fingerprinting: identification of high molecular weight urinary MMP species. Clin Cancer Res 2008;14:6610–7.
7. Murphy G.P., Busch C., Abrahamsson P.A. et al. Histopathology of localized prostate cancer. Consensus Conference on Diagnosis and Prognostic Parameters in Localized Prostate Cancer. Scand J Urol Nephrol Suppl 1993;162:7–42.