

УДК 616.65-006.6-008.94

ОЦЕНКА ПРОГНОСТИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ АНГИОГЕНЕЗА В РАКЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПО ДАНЫМ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО И МОРФОМЕТРИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

А.К. Гриб¹; А.В. Проворов²; В.А.Басинский¹, доцент, д.м.н.

¹ – УО «Гродненский государственный медицинский университет»

² – Гродненская областная клиническая больница

По данным иммуногистохимического и морфометрического исследования проанализированы показатели выраженности неоангиогенеза при раке предстательной железы. Показано влияние данного прогностического маркера на метастатический потенциал и клинический прогноз новообразования, а также независимость его от степени дифференцировки рака по Глиссону.

Ключевые слова: рак предстательной железы, неоангиогенез

The parameters of neoangiogenesis intensity in prostate cancer according to Gleason grading were analyzed. The influence of this prognostic marker on the metastatic potential and clinical prognosis of neoplasm as well as its independence on the degree of differentiation has been shown on the basis of immunohistochemical and morphometric data.

Key words: prostate cancer, neoangiogenesis.

Актуальность проблемы

Повсеместное внедрение методики определения уровня простатспецифического антигена (ПСА) привело к значительному улучшению диагностики карцином предстательной железы при скрининговых методах исследования. При этом, несомненно, возрастает и количество гистологических исследований рака предстательной железы как на операционном, так и биопсийном материале и требования к их качественному уровню.

Помимо верификации новообразования, одним из важнейших вопросов, стоящих перед патоморфологами и онкоурологами, стоит определение достоверного клинического прогноза рака предстательной железы с оценкой его метастатического потенциала и чувствительности к выбранным методам лечения.

По данным Stamey и др.[6], рецидив и метастазирование рака предстательной железы после радикальной простатэктомии может быть предсказан с высокой степенью вероятности на основании патогистологического исследования операционного материала. Именно поэтому полное и четкое заключение онкоморфолога по гистологическому материалу необходимо для выработки наиболее подходящей тактики лечения в каждом конкретном случае выявленного рака предстательной железы. При гистологическом исследовании карцином простаты основное внимание, как правило, уделяется факторам прогноза, рекомендованным Коллегией американских патологов (College of American Pathologists) [5]: гистологический тип опухоли, степень гистологической злокачественно-

сти по системе Gleason, объем опухоли в препарате тонкоигольной биопсии и в препарате после радикальной простатэктомии, а также распространенность процесса по системе TNM. Для этих факторов прогностическая значимость является клинически доказанной и рекомендована для выбора тактики лечения. Однако за последние годы описан еще ряд гистологических критериев, оказывающих влияние на поведение злокачественных новообразований разной локализации, но при раке предстательной железы они изучены недостаточно и пока не могут быть использованы в оценке его клинического прогноза. Среди таких факторов особая роль принадлежит опухолевому ангиогенезу с определением микрососудистой плотности, периневральной инвазии, выраженности иммунных и воспалительных реакций, кариометрическому индексу, онкогенам и генам супрессорам и др. Особый интерес, с нашей точки зрения, представляет роль микрососудистой плотности в раке предстательной железы в оценке его метастатического потенциала и клинического прогноза. Как известно, интенсивность опухолевого роста регулируется скоростью развития микрососудистого окружения. Считается, что в опухолевой ткани достоверно больше сосудов по сравнению с нормальной тканью органа. Это объясняется тем, что метаболизм опухоли выше, и для своего неустойчивого и быстрого роста требует больше кислорода и питательных веществ. Сама опухоль и окружающая ее ткань продуцируют факторы, способствующие ангиогенезу. К таким факторам относятся: VEGF-сосудистый эндотелиальный фактор роста, ангио-

позитивы 1 и 2 и др. Определение этих факторов и микрососудистой плотности является важным и с той позиции, что существуют химиотерапевтические препараты, на основе моноклональных антител, избирательно подавляющих ангиогенез, путем связывания вышеуказанных медиаторов роста сосудов, и, в случае отсутствия метастазов, это даже позволяет назначить адьювантную химиотерапию [1].

Для некоторых локализаций опухоли, проведено достаточно большое количество исследований, которые подтвердили, что степень васкуляризации является фактором, который определяет клинический прогноз течения новообразования. Такие данные были получены для рака легкого [3], где выявлена связь между выраженностью ангиогенеза, гистологическим типом и пролиферативной активностью опухоли. Схожие результаты были получены при исследовании гепатоцеллюлярного и холангиоцеллюлярного рака [2], где найдена корреляция между безрецидивной выживаемостью и плотностью микрососудистого русла, а также особенностями ангиогенеза в различных гистологических вариантах рака печени, что может использоваться также в морфологической дифференциальной диагностике. При исследовании различных гистологических вариантов рака яичников выявлены достоверные различия в особенностях микрососудистого окружения в серозных и муцинозных опухолях [4]. Несколько иные данные получены Н.Н. Волченко и соавт. [1] при исследовании и анализе ангиогенеза в сосудах стромы инвазивного протокового рака молочной железы. По их данным обнаружена связь только между микрососудистой плотностью и размером опухоли.

Цель исследования: целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение ангиогенеза в раке предстательной железы при разной степени дифференцировки опухоли и сопоставление этих параметров с клиническим течением и исходом заболевания.

Материалы и методы

Материалом для данного исследования послужили 45 предстательных желез с верифицированным раком, полученные при трансуретральной резекции. Всем больным проведены сходные схемы лучевой и химиотерапии. Средний возраст больных составил $68,04 \pm 2,07$ года. При гистологическом исследовании во всех случаях выявлена аденокарцинома различной степени дифференцировки. Высокодифференцированные раки (Глиссон 2-5) составили 11 случаев, умереннодифференцированные (Глиссон 6-7) - 14 и низкодифференцированные (Глиссон 7-10) - 20 случаев. По клиническим данным, весь исследуемый материал был разделен на группу с выявленными регионарными или

отдаленными метастазами (16 случаев) и группу без выявленных метастазов (29 наблюдений). Также проведен сравнительный анализ наблюдений в зависимости от выживаемости больных. Количество больных, проживших менее года, составило 6 случаев, от 1 года до 5 лет - 27, более 5 лет - 12 наблюдений.

Для выявления сосудов микроциркуляторного русла и его особенностей использовали иммуногистохимическое окрашивание гистологических срезов с применением моноклональных мышечных антител фирмы «Dako»: CD 31, которые экспрессируются эндотелиальными клетками (клон JC70A). Для выявления гладкомышечного компонента сосудов использовали антитела к гладкомышечному актину (клон 1A4).

Из парафиновых блоков готовились срезы толщиной 5 микрон, переносились на предметные стекла, покрытые полисиланом, срезы в вертикальном положении высушивали 18 часов при комнатной температуре, далее помещали в термостат на 30 мин. при температуре 60°C . После этого проводилась депарафинация в ксилоле (в батарее из 3 емкостей по 3 минуты в каждой) и дегидратация в этиловом спирте (в батарее из 3 емкостей в спиртах восходящей крепости по 3 мин. в каждой). Предметные стекла со срезами переносились в цитратный буфер pH 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 диаминобензидином. Затем срезы промывали проточной водой, докрашивали гематоксилином и заключали в полистирол.

Для морфометрического исследования микропрепараты фотографировали в 5-7 случайных 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 в фоторедакторе Adobe Photoshop CS 8.0 при помощи инструмента «color range» выделяли характерную коричневую окраску, которую дают продукты реакции диаминобензидина, а окружающий фон удаляли при помощи инструмента «magic wand». Для восстановления непрерывности сосудистой стенки в местах артефактов окраски и накрытия равномерной окраской просвета сосудов, чтобы сделать материал пригодным для автоматического подсчета, использовали фильтр Gaussian blur с размытием в 6-8 пикселей. На участках полей зре-

ния, где вышеуказанная коррекция не приносила требуемого результата, использовался ручной подсчет. Снимки конвертировали в бинарный вид и проводили морфометрический просчет при помощи анализатора изображений WCIF ImageJ и Aperio Image Score.

Определение плотности микрососудистого русла по экспрессии CD 31 проводили следующими способами: в 6 полях зрения подсчитывали количество сосудов и число отдельных эндотелиоцитов. Принимая их за единицу измерения, подсчитывали сумму периметров сосудов и сумму площади их поперечного сечения. Также исследовалась фракция площади, занимаемая в опухоли сосудами.

Полученные данные обработаны при помощи табличного процессора Excel с использованием критерия Стьюдента.

Результаты исследования

Выявление микроциркуляторного русла с использованием иммуногистохимического маркера эндотелия CD 31 показало, что строма рака предстательной железы имеет достаточно развитую капиллярную сеть, которая при визуальном полуколичественном анализе в пределах одного микропрепарата значительно не изменяется (рис. 1). Данная окраска позволяет четко выявить наличие раковых эмболов в просвете сосудов и инвазию в стенку сосуда. Гладкомышечный актин также позволяет хорошо выявить сосудистую стенку и, кроме того, позволяет оценить ее толщину, которая, как известно, становится более тонкой в сосудах опухоли, вследствие несовершенности ангиогенеза в опухоли [4] (рис. 2).

В группе опухолей с выявленными метастазами среднее количество сосудов составило $142,56 \pm 10,59$ на единицу исследуемой площади. Сумма периметров сосудов составила $11361,75 \pm 757,49$ мкм, сумму площадей поперечного сечения $38531,13 \pm 3378,15$ мкм². Фракция площади, занимаемая сосудами микроциркуляторного русла составила $7,42 \pm 0,65\%$. Средняя площадь, занимаемая одним сосудом, составила $302,55 \pm 36,41$ мкм².

Несколько иные данные получены при анализе в группе опухолей без метастазов. Выявлено следующее количество сосудов $88,14 \pm 6,55$, сумма периметров- $8075,62 \pm 1139,89$ мкм, сумма площадей поперечного сечения $22063,83 \pm 2124,42$ мкм², средняя площадь одного сосуда составила $282,66 \pm 36,07$ мкм².

При статистическом анализе полученных данных с использованием критерия Стьюдента достоверные различия были получены при анализе количества сосудов ($t=4,698$, $p=0,0001$), схожие показатели оказались при анализе суммарной площа-

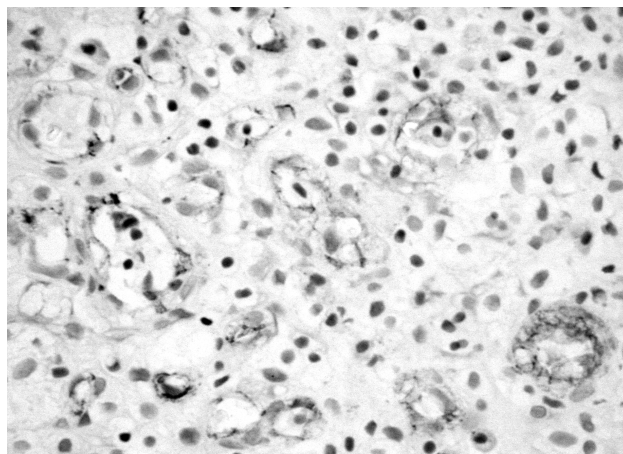


Рис. 1. Развитая капиллярная сеть в раке предстательной железы. Иммуногистохимическая окраска CD31. Увеличение 150

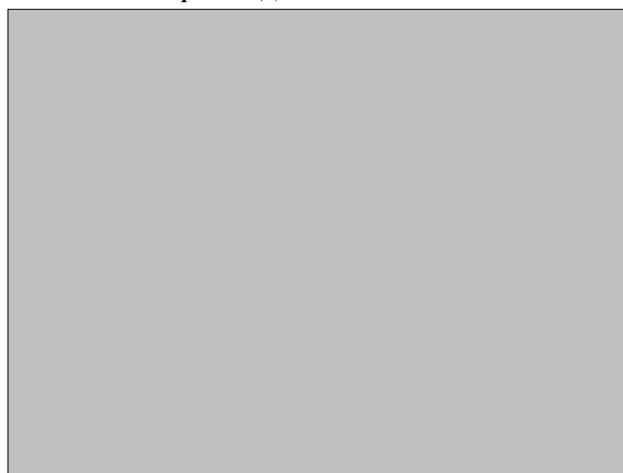


Рис. 2. Кровеносные сосуды в опухоли. Иммуногистохимическая окраска с гладкомышечным актином. Увеличение 100

ди поперечного сечения ($t = 4,333$, $p=0,0001$) и сумме периметров сосудов ($t = 2,004$, $p=0,05$). Не выявлено статистической зависимости при сравнении средней площади одного сосуда ($t = 0,360$, $p = 0,2$).

При анализе выраженности неоангиогенеза в зависимости от степени злокачественности опухоли получены следующие результаты. Среднее количество сосудов в группе высокодифференцированных опухолей равнялось $109,09 \pm 12,09$, сумма площадей поперечного сечения $26176,73 \pm 4727,12$ мкм², сумма периметров сосудов равнялась $8399,09 \pm 1085,3$ мкм, средняя площадь одного сосуда- $275,68 \pm 79,03$ мкм².

В группе опухолей средней степени злокачественности были получены сходные данные: среднее количество сосудов составило $111 \pm 12,95$, сумма площадей сосудов $31250,93 \pm 4104,46$ мкм², сумма периметров сосудов- $9514,21 \pm 1179,17$ мкм, средняя площадь одного сосуда $296,96 \pm 28,81$ мкм².

Группа низкодифференцированных опухолей характеризовалась следующими количественными данными: среднее количество сосудов $103,3 \pm 10,77$

мкм, сумма площадей сосудов $26544,6 \pm 3012,65$ мкм², сумма периметров сосудов $9519,6 \pm 1548,45$ мкм, средняя площадь одного сосуда $292,4 \pm 37,61$ мкм².

При сравнении полученных данных по вышеописанным количественным признакам не было выявлено статистически значимых различий ($p > 0,05$). Таким образом, можно сделать вывод о том, что степень дифференцировки рака предстательной железы не оказывает существенного влияния на плотность васкуляризации опухоли.

При сопоставлении выраженности микрососудистого русла с общей выживаемостью больных были получены следующие данные.

В группе больных, проживших менее 1 года, общее количество сосудов составило $138,5 \pm 27,29$, суммарная площадь микрососудистого русла $32990,5 \pm 5066,48$ мкм², сумма периметров сосудов $11487,67 \pm 1713,21$ мкм, средняя площадь одного сосуда составила $297,37 \pm 78,43$ мкм².

В группе больных, проживших от года до 5 лет, общее среднее количество сосудов составило $105,7037 \pm 8,22$ мкм, площадь микрососудистого русла $31015,44 \pm 2896,26$ мкм², суммарный периметр всех сосудов составил $8761,78 \pm 625,98$ мкм, средняя площадь одного сосуда $327,6874 \pm 37,18$ мкм². В группе больных, проживших более 5 лет, количество сосудов составило $94,66 \pm 10,14$, площадь микрососудистого окружения $18415,75 \pm 2812,33$ мкм², суммарный периметр сосудов $9207,25 \pm 2617,71$ мкм, средняя площадь одного сосуда составила $200,52 \pm 25,98$ мкм².

При статистическом анализе достоверные результаты были получены в крайних группах с выживаемостью менее года и более 5 лет. Однако результаты были достоверными только по одному количественному признаку - общая площадь поперечного сечения сосудов ($p = 0,015$), что согласуется с литературными данными по опухолям других локализаций [3].

Выводы

Рак предстательной железы характеризуется хорошо развитой, равномерно распределенной сосудистой сетью, что может быть использовано для полуколичественной оценки степени неопластического ангиогенеза в практической онкоморфологии. Выраженность микроциркуляторного русла, определенная с использованием иммуногистохимического маркера CD 31 и гладкомышечного актина, с подсчетом общего количества сосудов, их периметра, площади служит достоверным прогностическим признаком для оценки вероятности метастазирования рака предстательной железы и продолжительности жизни больного. Не было выявлено статистически достоверной разницы при оценке степени дифференцировки опухоли и выраженности в ней ангиогенеза, что свидетельствует о том, что он является независимым прогностическим признаком.

Литература

1. Волченко Н.Н., Завалишина Л.Э, Петров А.Н., Лебедев Э.А. Сосуды стромы инвазивного протокового рака молочной железы // Архив патологии № 3.- 1999. -с.35-38.
2. Д. А. Гранов, В. П. Тен, А. К. Расказов, К. М. Пожариский. Особенности ангиогенеза в раке печени и их прогностическое значение. // Архив патологии № 6.- 2006. -с.6-10.
3. Е. А. Коган, С. И. Швец, В. Л. Коваленко, Ю. В. Соболева. Соотношение процессов пролиферации, апоптоза, ангиогенеза и метастазирования в различных гистологических типах рака легкого (иммуногистохимическое исследование). // Архив патологии № 6.- 2004.-с.33-38.
4. Л. М. Михалева, Е. А. Мороз, Т. Г. Бархина, А. Л. Черняев, М. В. Самсонова, А. А. Соломатина. Морфофункциональная характеристика микроциркуляторного русла в серозных опухолях яичника. // Архив патологии № 6.- 2005. -с.28-31.
5. Bostwick D.G., Grignon D.J., Hammond E.H., Amin M.B., Cohen M., Crawford D., et al. Prognostic factors in prostate cancer. College of American Pathologists consensus statement 1999 // Arch. Pathol. Lab. Med. - 2000. - Vol. 124. -P. 995-1000.
6. Stamey T.A., Yemoto C.M., McNeal J.E., Sigal B.M., Johnstone I.M. Prostate cancer is highly predictable: a prognostic equation based on all morphological variables in radical prostatectomy specimens // J. Urol.- 2000. - Vol. 163. -P. 1155-1160.

Поступила 24.04.07