

Дифференциальная морфологическая диагностика гиперпластических и пренеопластических процессов предстательной железы с использованием биомолекулярных маркеров онкогенеза (АМАСР), клеточного цикла (циклин Д1 и топоизомераза II α) и трансформирующего фактора
УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Морфометрические параметры ядер, ядрышек, степени утраты базальных клеток и экспрессии биомолекулярных маркеров онкогенеза (АМАСР) и клеточного цикла (циклин Д1 и топоизомераза II альфа) увеличиваются, а ТФР β уменьшаются в направлении от гиперпластических к атрофическим, предраковым процессам и раку предстательной железы. Использование в дифференциальной диагностике патологии предстательной железы помимо цитологических признаков и степени утраты базальных клеток морфометрических параметров экспрессии молекулярно-биологических маркеров онкогенеза, клеточного цикла и ТФР β значительно повышает качество распознавания гиперпластических и предраковых процессов предстательной железы.

Ключевые слова: предстательная железа, АМАСР, циклин Д1, топоизомераза II α , ТФР β .

Морфологическая диагностика патологии предстательной железы (ПЖ) нередко представляет значительные трудности, поскольку целый ряд гиперпластических, атрофических процессов, реактивных изменений и нормальных анатомических структур ПЖ, могут имитировать как предраковые процессы, так рак ПЖ (РПЖ) [1,2]. Поэтому для морфологической диагностики патологии ПЖ большое практическое значение приобретает поиск новых и уточнение имеющихся морфологических и молекулярно-биологических критериев. По-прежнему остается недостаточно изученным биологический потенциал неопухолевых процессов ПЖ с переменными проявлениями цитологической атипии, что приводит к недостаточному объему обследования данной категорией пациентов и, вероятно,

может отрицательно влиять на частоту выявления минимального и локализованных форм РПЖ. Материал и методы: Исследование выполнено на безвыборочном архивном операционном (2000 г.) и текущем биопсийном материале ПЖ (2007 г.), в который включал 46 случаев аденоза, 19 случаев атипической мелкоацинарной пролиферации (АМАП), 54 случая предстательной интраэпителиальной неоплазии (ПИН), 70 случаев постатрофической гиперплазии (ПАГ) и 63 случая пролиферативной воспалительной атрофии (ПВА). В качестве групп сравнения использовалась доброкачественная эпителиальная гиперплазия (ДЭГ – 50 случаев) и высоко- и умеренно дифференцированный РПЖ (сумма Глисона 4-6 – 22 случая). Иммуногистохимический метод (ИГХМ) выполнялся по стандартной авидин-биотиновой пероксидазной методике с использованием моноклональных антител (ДАКО) к маркерам базальных клеток: высокомолекулярному цитокератину (клон 34 β -E12) и p63, онкогена (AMACR), клеточного цикла (циклину Д1 и топоизомеразе Па) и трансформирующему фактору роста β (ТФР β) (CHEMICON). Анализ характера экспрессии антител проводился с использованием программного обеспечения для анализа изображений WCIF ImageJ и морфометрии Aperio Image Scope, автоматически измеряющего интенсивность коричневой окраски (продуктов реакции ДАВ-хромогена), и разделяющая интенсивность окрашивания на 3 уровня. С целью определения наиболее информативных морфологических признаков патологии ПЖ была проведена оценка следующих критериев: степень утраты базальных клеток, наибольший диаметр, периметр и площадь ядер, наличие эпителиальных клеток с ядрышками, в том числе с наибольшим размером 1 мкм и более, позитивность и интенсивность экспрессии AMACR, циклина Д1 и ТФР β и доля топоПа-позитивных клеток. Статистический анализ данных проводился с использованием программного обеспечения STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., 2001г.). Сравнение средних групп признаков проводилось с использованием непараметрических критериев: 3-х и более групп – рангового Н-критерия Краскела-Уоллиса, а двух групп – непараметрического критерия Манна-Уитни (U-критерий). Чтобы избежать проблемы множественных сравнений, уровень значимости устанавливался с учетом поправки Бонферрони, рассчитываемой индивидуально в

каждом конкретном случае. Результаты и обсуждение. Степень утраты базальных клеток варьировала в зависимости от нозологической формы патологии ПЖ и, в соответствии с увеличением степени фрагментации слоя базальных клеток, изученные гиперпластические и пренеопластические процессы ПЖ условно можно объединить в следующие группы, $p < 0,001$: ПВА (0%) → ДЭГ (2,5%) + ПАГ (5,6%) → ПИН (26,9%) + АМАП (50,2%) → Аденоз (92,1%) → РПЖ (100%). При этом, степень фрагментации слоя базальных клеток в очагах гиперпластических, предраковых процессов и рака ПЖ увеличивалась с увеличением морфометрических параметров ядер, ядрышек и частоты выявления клеток с визуализируемыми ядрышками, в том числе размером 1 мкм и более, вплоть до полной утраты базальных клеток в группе РПЖ. Согласно результатам дискриминантного анализа, использование параметра степени утраты БК позволяет в 58% случаев правильно распознать форму патологии ПЖ в общей группе и в 69,8% и 70,5% – в группе патологии ПЖ с преобладанием мелкоацинарной или внутритротоковой пролиферации секреторного эпителия соответственно.

Морфометрические параметры ядер и их вариабельность были наибольшими в группе рака ПЖ (диаметр 7,3 мкм, периметр 25,5 мкм, площадь 40,1 мкм², выраженный полиморфизм) и значимо уменьшались ($p < 0,001$) в направлении постатрофической гиперплазии (диаметр 7,1 мкм, периметр 21,6 мкм, площадь 32,9 мкм², слабовыраженный полиморфизм), предраковых процессов (предстательной интраэпителиальной неоплазии / атипической мелкоацинарной пролиферации: диаметр 6,8/6,8 мкм, периметр 20,3/19,9 мкм, площадь 30/31,2 мкм², выраженный полиморфизм по диаметру и умеренно выраженный по периметру и площади/мономорфизм соответственно) и пролиферативной воспалительной атрофии (диаметр 6,3 мкм, периметр 18,8 мкм, площадь 28,7 мкм², слабовыраженный полиморфизм по диаметру и периметру и мономорфизм по площади) и были наименьшими в очагах гиперпластических процессов (доброкачественной эпителиальной гиперплазии: диаметр 6,2 мкм, периметр 17,3 мкм, площадь 23,8 мкм², СККГ: диаметр 6,2 мкм, периметр 18,1 мкм, площадь 25,8

мкм², аденоза: диаметр 6,2 мкм, периметр 17,7 мкм, площадь 25,1 мкм², мономорфизм во всех группах).

Частота случаев с видимыми и крупными ядрышками была наибольшей в группе атрофических, предраковых процессов и РПЖ (статистически значимые различия между которыми отсутствовали) и значимо уменьшалась при гиперпластических процессах ПЖ. Исключение составила частота выявления видимых ядрышек при постатрофической гиперплазии, которая была значимо большей, чем при пролиферативной воспалительной атрофии, и аденоз, который по доле случаев с крупными ядрышками не отличался как от пролиферативной воспалительной атрофии и РПЖ, так и доброкачественной эпителиальной гиперплазии ПЖ. Согласно увеличению доли случаев с визуализируемыми ядрышками изученные формы патологии ПЖ можно сгруппировать следующим образом: видимые ядрышки: ДЭГ (24%) + Аденоз (46%) → ПВА (71%) + РПЖ (86%) + ПИН (91%) + ПАГ (93%) + АМАП (100%), крупные ядрышки: ДЭГ (8%) → Аденоз (37%) → ПВА (67%) + РПЖ (77%) + ПАГ (83%) + ПИН (89%) + АМАП (95%).

Частота выявления эпителиальных клеток с ядрышками в исследованном материале ПЖ, в том числе размером 1мкм и более, а также размер ядрышек были наибольшими в случаях предраковых процессов (предстательной интраэпителиальной неоплазии / атипической мелкоацинарной пролиферации: ядрышки 28,6% / 45%, крупные ядрышки 19,2% / 33,3%, размер ядрышек 1,5/1,2), статистически незначимо уменьшались в направлении РПЖ (ядрышки 21,4%, крупные ядрышки 15,4%, размер ядрышек 1,4) и атрофических процессов (постатрофической гиперплазии / пролиферативной воспалительной атрофии: ядрышки 37,3% / 33,8%, крупные ядрышки 14,3% / 12,7%, размер ядрышек 1,2/1,1), а в очагах гиперпластических процессов приближались к нулю.

Корреляционный анализ морфометрических параметров ядер и ядрышек и степени утраты базальных клеток выявил статистически значимую прямую умеренной силы взаимосвязь размера ядрышек с изученными параметрами ядер и долей клеток с крупными ядрышками в очагах РПЖ; наибольшим диаметром ядер в случаях предстательной интраэпителиальной неоплазии; наибольшим диаметром,

площадью ядер, частотой выявления клеток с видимыми и крупными ядрышками в очагах постатрофической гиперплазии; в случаях пролиферативной воспалительной атрофии выявлена прямая умеренная и сильная корреляционная связь между изученными параметрами ядер и степенью фрагментации слоя базальных клеток, долей эпителиальных клеток с видимыми и крупными ядрышками, а также между долей эпителиальных клеток с крупными ядрышками и их размером.

Экспрессия онкопротеина АМАСР выявлялась при всех изученных гиперпластических, предраковых процессах и РПЖ, однако степень выраженности ИГХ реакции варьировала в зависимости от нозологической формы патологии ПЖ. Площадь экспрессии онкопротеина АМАСР была наибольшей в очагах РПЖ (51% площади опухолевых очагов) и уменьшалась в направлении предраковых процессов (около 18% и 10% площади эпителиальных структур соответственно при предстательной интраэпителиальной неоплазии и атипической мелкоацинарной пролиферации, которые по данному параметру статистически значимо не различались), постатрофической и доброкачественной эпителиальной гиперплазии ПЖ (2,5% и 1,2% соответственно), а также пролиферативной воспалительной атрофии и аденоза, при которых площадь экспрессии АМАСР была наименьшей и не превышала 1%. При этом с ростом площади АМАСР-позитивных участков имело место увеличение степени цитологической атипии и утраты базальных клеток. Интенсивность экспрессии АМАСР также повышалась с увеличением степени фрагментации слоя базальных клеток и морфометрических параметров ядер и соответствовала умеренной степени при РПЖ и предраковых процессах, а в очагах доброкачественной эпителиальной гиперплазии, аденоза, постатрофической гиперплазии и пролиферативной воспалительной атрофии – слабой степени, однако статистически значимые различия в интенсивности экспрессии выявлены лишь в группах аденоза и атрофических процессов с РПЖ и в группе пролиферативной воспалительной атрофии с предстательной интраэпителиальной неоплазией.

Экспрессия циклина Д1 выявлялась в гистологических препаратах ПЖ при всех изученных патологических процессах ПЖ. Наибольшая площадь экспрессии циклина Д1 выявлена в очагах РПЖ и предраковых процессов, уменьшалась в

направлении атрофических и гиперпластических процессов ПЖ и имела прямую взаимосвязь умеренной силы с морфометрическими параметрами ядер. Интенсивность экспрессии циклина Д1 в иммунопозитивных участках соответствовала умеренной степени при полуколичественной оценке и была наибольшей в очагах РПЖ и доброкачественной эпителиальной гиперплазии, уменьшаясь в направлении предраковых, атрофических процессов и аденоза (при которых в очагах пролиферативной воспалительной атрофии и аденоза интенсивность расценивалась как слабая). Интенсивность экспрессии циклина Д1 в поле зрения также была наибольшей в случаях РПЖ и уменьшалась в направлении предраковых, атрофических процессов и доброкачественной эпителиальной гиперплазии (статистически значимые различия между которыми по данному параметру отсутствовали).

Экспрессия топоII α выявлялась при всех нозологических формах изученной патологии ПЖ за исключением аденоза и коррелировала с морфометрическими параметрами ядер и частотой выявления клеток с видимыми ядрышками, в том числе размером 1 мкм и более. Однако число топоII α -позитивных эпителиальных клеток в гистологических препаратах ПЖ было крайне мало даже в случаях РПЖ и предраковых процессов ПЖ. Наибольшая доля топоII α -позитивных клеток имела место в очагах РПЖ и предраковых процессов, статистически незначимо уменьшалась при атрофических процессах с признаками пролиферации и практически отсутствовала в очагах доброкачественной эпителиальной гиперплазии ПЖ.

В исследованном материале экспрессия ТФР β выявлялась при всех гистологических формах патологии ПЖ. Наибольшая позитивность экспрессии ТФР β определялась в случаях доброкачественной эпителиальной гиперплазии (превосходя значения данного параметра других форм изученных гиперпластических, предраковых процессов и РПЖ), уменьшалась в направлении аденоза – постатрофической гиперплазии – предстательной интраэпителиальной неоплазии и была наименьшей при пролиферативной воспалительной атрофии, атипической мелкоацинарной пролиферации и РПЖ. При этом площадь экспрессии

ТФРβ в исследованном гистологическом материале ПЖ имела обратную взаимосвязь лишь с одним из признаков цитологической атипии, а именно площадью ядер. Интенсивность экспрессии ТФРβ соответствовала умеренной степени выраженности и не имела статистически значимых отличий при всех изученных формах патологии ПЖ. Исключение составила предстательная интраэпителиальная неоплазия, при которой интенсивность экспрессии ТФРβ в иммунопозитивных участках была значимо меньшей, чем при РПЖ, и доброкачественной эпителиальной гиперплазии (интенсивность экспрессии ТФРβ в поле зрения при которой была большей, чем при аденозе и РПЖ).

Анализ морфометрических параметров цитологической атипии и экспрессии молекулярно-биологических маркеров онкогенеза, клеточного цикла (циклина Д1 и топоIIα) и ТФРβ выявил прямую умеренной силы взаимосвязь позитивности и интенсивности экспрессии АМАСR, позитивности экспрессии циклина Д1 и доли топоIIα-позитивных клеток с морфометрическими параметрами ядер и обратную связь позитивности экспрессии ТФРβ с площадью ядер. При увеличении позитивности и интенсивности экспрессии АМАСR и циклина Д1 в поле зрения (связь слабой силы) и доли топоIIα-позитивных клеток (связь умеренной силы) имело место увеличение доли клеток с визуализируемыми ядрышками, в том числе размером 1 мкм и более, и размера ядрышек, с которым также была взаимосвязана интенсивность экспрессии АМАСR и ТФРβ в иммунопозитивных участках (связь слабой силы). Рост степени фрагментации слоя базальных клеток сопровождался увеличением площади и интенсивности экспрессии АМАСR (связь умеренной силы) и уменьшением позитивности (связь умеренной силы) и интенсивности экспрессии ТФРβ в поле зрения (связь слабой силы).

Анализ взаимосвязи параметров экспрессии молекулярно-биологических маркеров онкогенеза, клеточного цикла и ТФРβ выявил прямую связь слабой силы между позитивностью циклина Д1 и долей топоIIα-позитивных клеток, а также умеренной силы между позитивностью экспрессии АМАСR с площадью циклин Д1-позитивных участков и долей топоIIα-позитивных клеток и обратную связь слабой силы с позитивностью ТФРβ. Площадь экспрессии циклина Д1 не

коррелировала с аналогичным параметром ТФРβ. В свою очередь позитивность ТФРβ уменьшалась при увеличении доли клеток в S-G2 фазе клеточного цикла (обратная взаимосвязь слабой силы). Интенсивность ИГХ реакции с моноклональными антителами к АМАСR увеличивалась как при увеличении интенсивности экспрессии циклина Д1 и доли топоIIα-позитивных клеток, так и интенсивности экспрессии ТФРβ в иммунопозитивных участках, однако сила взаимосвязи была слабая. Исключение составила интенсивность экспрессии АМАСR в поле зрения, которая имела прямую связь умеренной силы с интенсивностью экспрессии циклина Д1 в поле зрения и долей топоIIα-позитивных клеток. Кроме того, увеличение интенсивности экспрессии АМАСR наблюдалось при увеличении площади циклин Д1-позитивных участков и уменьшении позитивности ТФРβ (взаимосвязь умеренной и слабой силы соответственно). А интенсивность экспрессии циклина Д1 имела прямую взаимосвязь слабой силы с интенсивностью экспрессии ТФРβ в иммунопозитивных участках.

Использование в дифференциальной диагностике как общей группы патологии ПЖ, так и в группах патологических процессов ПЖ с преобладанием ацинарной или внутрипротоковой пролиферации помимо степени фрагментации слоя БК (качество распознавания 57,78%; 69,77%; 70,51% соответственно) морфометрических параметров ядер, ядрышек (71,79%; 90,68%; 77,5% соответственно) (таблица 1) и экспрессии молекулярно-биологических маркеров онкогенеза (76,26%; 93,16%; 79,83% соответственно), клеточного цикла (77,53%; 93,46%; 81,5% соответственно) и ТФРβ (76,1%; 94%; 82% соответственно) (таблица 1) значительно повышает качество распознавания нозологических форм патологии ПЖ.

Таблица 1 – Дискриминантный анализ патологии ПЖ с преобладанием мелкоацинарной или внутрипротоковой пролиферации по степени утраты базальных клеток, морфометрическим параметрам ядер и ядрышек (1) и характеру экспрессии АМАСR, циклина Д1, топоIIα и ТФРβ (2)

	Качество распознавания,%			Качество распознавания,%	
	морфометрия	ИГХ		морфометрия	ИГХ
ДЭГ	100	100	ДЭГ	0	80
Аденоз	90,48	100	ПАГ	78,13	73,08
АМАП	57,89	77,78	ПВА	63,83	80,85
РПЖ	98,63	96,43	ПИН	64,71	72,55
			РПЖ	100	100
Среднее качество распознавания					
	90,68	94		77,5	81,99

Таблица 2 – Значимые признаки для дифференциальной диагностики патологических процессов ПЖ с преобладанием мелкоацинарной или внутрис протоковой пролиферации

	Мелкоацинарная пролиферация				Внутрис протоковая пролиферация			
	F	p	F	p	F	p	F	p
	морфометрия		ИГХ		морфометрия		ИГХ	
Степень утраты БК*	130,63	0,0000	41,68	0,0000	427,6	0,0000	168,1	0,0000
Размер ядер	2,60	0,0556	0,61	0,6124	7,22	0,0000	6,62	0,0001
Периметр ядер*	11,91	0,0000	4,13	0,0089	5,07	0,0006	3,65	0,0068
Площадь ядер*	9,63	0,0000	3,59	0,0173	4,58	0,0014	3,31	0,012
Размер ядрышек	0,57	0,6390	0,21	0,8907	4,67	0,0012	3,77	0,0056
Доля видимых ядрышек*	3,60	0,0158	2,97	0,0369	1,79	0,1319	1,10	0,3556
Доля крупных ядрышек*	12,66	0,0000	6,22	0,0008	2,94	0,0214	1,71	0,1487
Позитивность АМАСР*			7,41	0,0002			4,61	0,0014
Индекс интенсивности экспрессии АМАСР								
в иммунопозитивных участках			2,13	0,1033			1,77	0,1372
в поле зрения			1,39	0,2509			4,41	0,002
Позитивность циклина Д1			1,55	0,2082			0,90	0,4663

Индекс интенсивности экспрессии циклина Д1							
в иммунопозитивных участках			2,07	0,1104		3,60	0,0074
в поле зрения			0,49	0,6891		1,56	0,1865
Доля топоПальфа-позитивных клеток			0,09	0,9641		0,94	0,4409
Позитивность ТФРβ*			29,36	0,0000		21,19	0,0000
Индекс интенсивности экспрессии ТФРβ							
в иммунопозитивных участках			1,66	0,1826		2,13	0,0792
в поле зрения			0,21	0,889		1,20	0,3119

*- признак значим для дискриминации групп патологии ПЖ

При этом наиболее информативными для дискриминации групп являются в порядке уменьшения значимости (таблица 2): степень утраты БК и позитивность экспрессии ТФРβ, а также в общей группе патологии ПЖ – позитивность экспрессии АМАСР, морфометрические параметры ядер, доля крупных ядрышек, интенсивность экспрессии АМАСР в поле зрения и размер ядрышек; в группе патологических процессов ПЖ мелкоацинарного строения – позитивность экспрессии АМАСР, доля крупных ядрышек, периметр и площадь ядер, доля видимых ядрышек; в группе патологических процессов ПЖ с признаками внутрипротоковой пролиферации – морфометрические параметры ядер, позитивность и интенсивность экспрессии АМАСР в поле зрения, размер ядрышек и интенсивность экспрессии циклина Д1 в иммунопозитивных участках. На рисунках 1 и 2 представлена дискриминация групп патологии ПЖ с преобладанием мелкоацинарной (рисунок 1) или внутрипротоковой пролиферации (рисунок 2) при использовании для дифференциальной диагностики цитологических и гистоархитектонических признаков в сравнении с дополнением вышеназванных параметров особенностями экспрессии биомолекулярных маркеров онкогенеза, клеточного цикла и ТФРβ. Согласно рисунку 1 (правая часть) имеет место более компактное расположение и лучшая дискриминация в сравнении с рисунком 1 (левая часть) случаев рака ПЖ (слева внизу) от атипичной мелкоацинарной пролиферации (в центре) корнем 1 и от аденоза (слева вверху) корнем 2. На рисунке 2 (правая часть) также имеет место более компактное расположение групп

предстательной интраэпителиальной неоплазии (в центре), рака ПЖ (слева) и пролиферативной воспалительной атрофии (справа сверху). Это позволяет корню 2 лучше в сравнении с рисунком 2 (левая часть) дискриминировать доброкачественную эпителиальную гиперплазию (справа внизу) от рака ПЖ, предстательной интраэпителиальной неоплазии и пролиферативной воспалительной атрофии, а корню 1 – предстательную интраэпителиальную неоплазию от рака ПЖ и пролиферативной воспалительной атрофии.

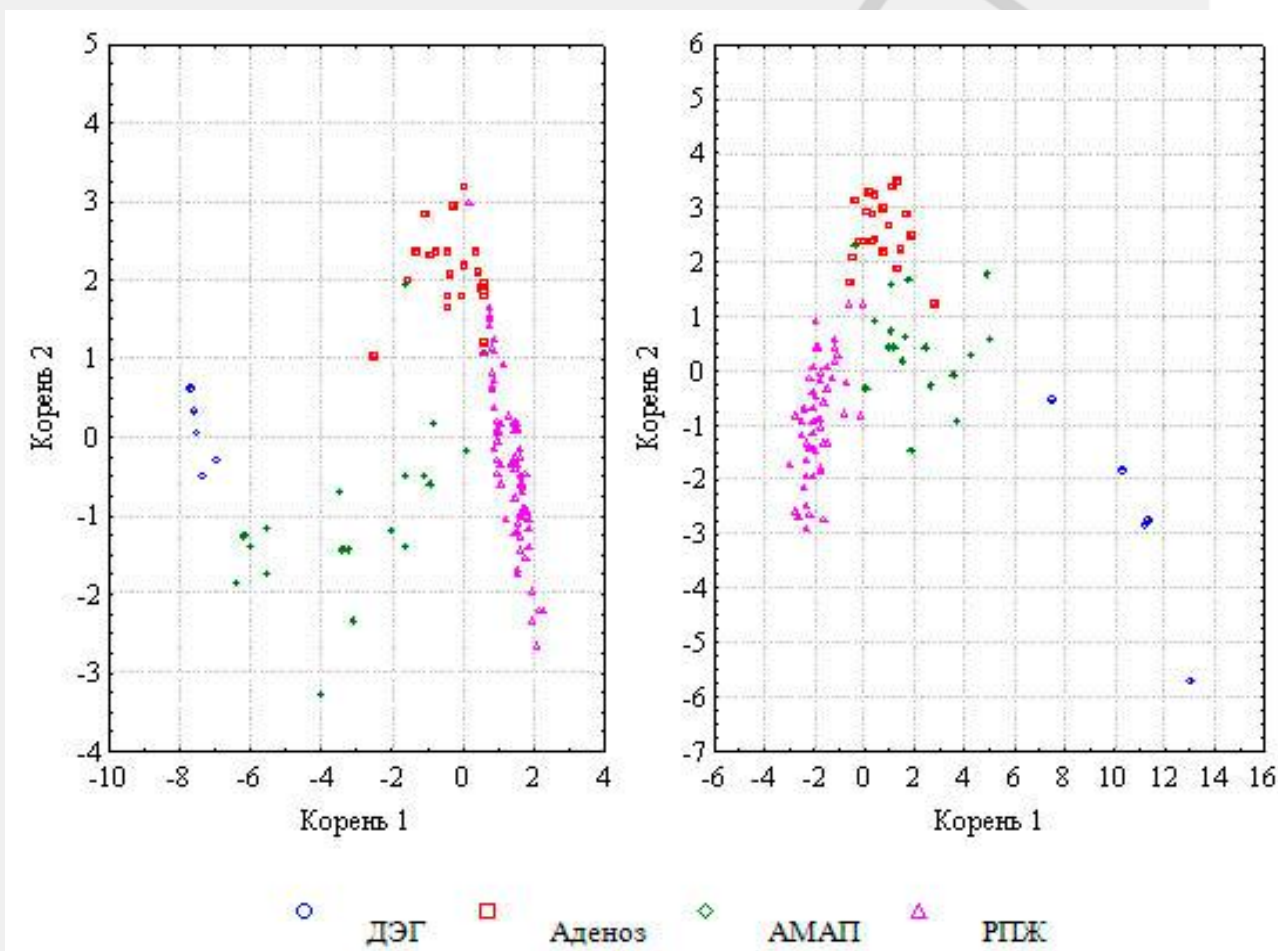


Рисунок 1 – Дискриминантный анализ по морфометрическим параметрам ядер и ядрышек, степени утраты БК (слева) и экспрессии биомолекулярных маркеров онкогенеза, клеточного цикла и ТФРβ (справа) патологии ПЖ с преобладанием ацинарной пролиферации

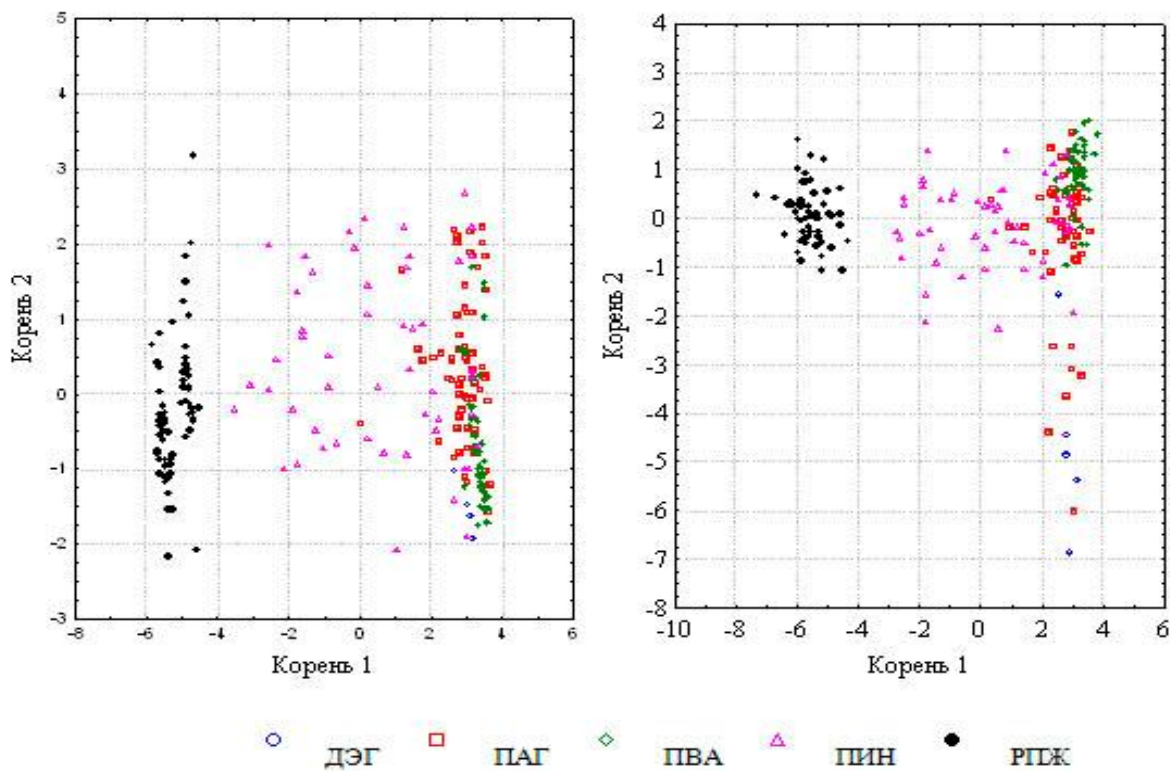


Рисунок 2 – Дискриминантный анализ по морфометрическим параметрам ядер и ядрышек, степени утраты БК (А) и экспрессии биомолекулярных маркеров онкогенеза, клеточного цикла и ТФРβ (Б) патологии ПЖ с преобладанием внутрипротоковой пролиферации

Выводы. 1. Морфометрические параметры ядер, степени утраты базальных клеток и экспрессии биомолекулярных маркеров онкогенеза и клеточного цикла увеличиваются, а ТФРβ уменьшаются в направлении от гиперпластических процессов к постатрофической гиперплазии и пролиферативной воспалительной атрофии, предраковым процессам и РПЖ.

2. Постатрофическая гиперплазия и пролиферативная воспалительная атрофия ПЖ по цитологическим признакам и особенностям экспрессии циклина Д1, топоIIα и ТФРβ значительно отличаются от доброкачественной эпителиальной гиперплазии и приближаются к предраковым процессам и РПЖ. Аденоз по вышеназванным признакам подобен доброкачественной эпителиальной гиперплазии за исключением степени утраты базальных клеток, которая приближается к таковой РПЖ.

3. Использование в дифференциальной диагностике патологии ПЖ маркеров онкогенеза, клеточного цикла и ТФРβ повышает качество распознавания патологии

ПЖ. Наиболее значимыми морфологическими признаками являются степень утраты БК и позитивность экспрессии ТФРβ, а также в группе процессов ПЖ с мелкоацинарной пролиферацией – позитивность экспрессии АМАСР, доля клеток с крупными ядрышками, периметр и площадь ядер и доля клеток с видимыми ядрышками; в группе процессов с внутрипротоковой пролиферацией – диаметр, периметр, площадь ядер, позитивность и интенсивность экспрессии АМАСР в поле зрения, размер ядрышек и интенсивность экспрессии циклина Д1 в иммунопозитивных участках.

Литература

1. Cheville, J. C. [Postatrophic hyperplasia of the prostate. A histologic mimic of prostatic adenocarcinoma](#) / J. C. Cheville, D. G. Bostwick // Am J Surg Pathol. 1995; 19:1068–1076.
2. Bostwick, D. G. [Atypical adenomatous hyperplasia of the prostate: morphologic criteria for its distinction from well-differentiated carcinoma \[see comments\]](#) / D. G. Bostwick [et al.] // Hum Pathol. 1993; 24:819–832.