

БОЛЕЗНИ ХИРУРГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ

ЭКСПРЕССИЯ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-9 И БЕЛКА КИ-67 ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М.И. Андриухин, С.А. Пульбере, А.В. Локтев

Кафедра урологии и оперативной нефрологии
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

И.И. Бабиченко

Кафедра патологической анатомии
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

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

Ключевые слова: аденокарцинома предстательной железы, ММР-9, Ки-67.

Рак предстательной железы является причиной почти 10% смертей от онкологических осложнений у мужчин и одной из главных причин смерти мужчин в пожилом возрасте. Рак простаты является пятой наиболее часто встречающейся раковой опухолью в мире и стоит на втором месте по заболеваемости у мужчин.

Основными критериями аденокарциномы простаты являются наличие инфильтративного роста железистых структур в строму органа, отсутствие базального клеточного слоя и атипия клеточных ядер [4].

Матриксные металлопротеиназы (ММР) составляют семейство Zn-зависимых эндопептидаз, обладают способностью разрушать основные компоненты экстрацеллюлярного матрикса и играют важнейшую роль в процессах его регулируемой (физиологической) деградации, то есть в тканевом морфогенезе, репарации тканей, эмбриогенезе и ангиогенезе [3]. Ряд патологических состояний — ревматоидный

артрит, остеоартрит, периодонтит, язвенная болезнь, аутоиммунные заболевания, гипертония, а также опухолевая инвазия и метастазирование развиваются при участии ММР [1; 7].

ММР-9 разрушает основные компоненты внеклеточного матрикса: коллаген IV, фибронектин и ламинин, и обычно используется как маркер злокачественного фенотипа опухолей [2; 6].

Ki-67 является маркером пролиферативной активности клеток, экспрессию этого ядерного белка многие исследователи считают прогностическим фактором для большинства опухолей, включая и рак предстательной железы [5].

Целью настоящего исследования явилось изучение экспрессии факторов неоплазии — матриксной металлопротеиназы-9 и маркера пролиферации Ki-67 в клетках секреторного эпителия при доброкачественной гиперплазии предстательной железы и атипических клетках аденокарциномы предстательной железы различных градаций по шкале Глисона, с целью изучения молекулярных механизмов инвазивного роста опухолевых клеток в предстательной железе.

Материалы и методы исследования. В работе был использован операционный материал 53 пациентов с диагнозом «аденокарцинома предстательной железы» и 10 пациентов с диагнозом «доброкачественная гиперплазия предстательной железы». Средний возраст больных составил 67 лет, с интервалом от 52 до 83 лет.

У всех пациентов определялся уровень общего простатспецифического антигена (ПСА) в сыворотке крови. Гистологическая оценка новообразований выполнена с использованием баллов шкалы Глисона [5], которые соответствовали наиболее выраженным анапластическим изменениям клеток опухолевых желез, выявленных при биопсии у данного пациента.

Были выделены 4 группы пациентов по градациям шкалы Глисона: 2-я градация — 10 больных (средний уровень ПСА $9,2 \pm 8,4$ нг/мл), 3-я градация — 18 пациентов (ПСА $13,3 \pm 12,0$ нг/мл), 4-я градация — 20 человек (ПСА $10,7 \pm 5,3$ нг/мл) и 5-я градация — 5 пациентов (ПСА $16,3 \pm 6,2$ нг/мл).

Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине (рН 7,4), после проводки на гистопроцессоре заливали в парафин, с температурой плавления +54 °С. Для гистологического и иммуногистохимического исследования (ИГХ) серийные срезы толщиной 5 мкм монтировали на стекла, покрытые поли-L-лизинем. Выявление тканевых антигенов осуществляли с помощью очищенных антител кроличьей антисыворотки к матриксной металлопротеиназе-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 иммуногистохимической 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 Ki-67 (ИП Ki-67) определяли отношением количества иммунореактивных ядер клеток к общему числу ядер в %. Статистическую обра-

ботку 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 двух независимых групп осуществляли непараметрическим методом при помощи U -критерия Манна—Уитни. Достоверным считали различия средних при уровне статистической значимости $p < 0,05$. Корреляционные взаимоотношения между градацией опухоли по шкале Глисона, индексом пролиферации клеток, выраженностью экспрессии MMP-9 оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (r_s).

Результаты исследования и их обсуждение. Иммуногистохимическое (ИГХ) изучение ткани предстательной железы выявило особенности экспрессии белков, характеризующих пролиферативные процессы матриксной металлопротеиназы-9 и Ki-67 в зависимости от градации опухолей по шкале Глисона.

При изучении пролиферативной активности клеток в доброкачественной гиперплазии предстательной железы 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. В высоко инвазивных аденокарциномах 4-й и 5-й градаций нами отмечено увеличение пролиферативной активности атипичических клеток.

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

Экспрессия матриксной металлопротеиназы-9 выявлялась в цитоплазме опухолевых клеток в виде мелких или крупных гранул, при этом отмечалась различная интенсивность окрашивания продуктами ДАБ-реакции. При доброкачественной гиперплазии предстательной железы отмечается выраженная иммуногистохимическая реакция, в секреторных клетках в большом количестве видны крупные, средние и мелкие гранулы MMP-9.

При изучении аденокарциномы мы выявили снижение интенсивности иммуногистохимического окрашивания MMP-9. При исследовании иммуногистохимической реакции в аденокарциноме предстательной железы (2-й и 4-й градации по шкале Глисона), в цитоплазме секреторных клеток отмечаются отдельные мелкие гранулы MMP-9. Следует отметить, что в аденокарциномах различных градаций интенсивность окрашивания была ниже, чем при доброкачественной гиперплазии предстательной железы (см. табл. 1).

Как видно из представленных данных, уровень экспрессии MMP-9 снижается в опухолевых клетках по мере нарастания в них анапластических изменений, 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 градациями. Нами не выявлено достоверных различий в экспрессии MMP-9 между аденокарциномами 2-й и 3-й градаций, а также между 4-й и 5-й градациями. По уровню экспрессии MMP-9 эти группы опухолей оказались идентичны.

Таблица 1

Характеристика экспрессии ИП Ki-67 и MMP-9 в предстательной железе при доброкачественной гиперплазии и аденокарциноме различной градации по шкале Глисона

№	ДГПЖ/аденокарцинома шкала Глисона	Кол-во пациентов	ИП Ki-67 M ± S, %	MMP-9 M ± S, у. е.
1.	ДГПЖ	10	0	3,0
2.	2-я градация (2 балла)	10	5,3 ± 1,1	1,8 ± 0,4
3.	3-я градация (3 балла)	18	7,2 ± 1,4*	1,8 ± 0,5
4.	4-я градация (4 балла)	20	10,0 ± 3,9***	0,9 ± 0,4 ^{#,##}
5.	5-я градация (5 баллов)	5	17,2 ± 9,4***	0,8 ± 0,4 ^{#,##}
	Всего:	63		

* достоверные различия между 2—3, 2—4, 2—5; ** достоверные различия между 3—4, 3—5.

достоверные различия между 2—4, 2—5; ## достоверные различия между 3—4, 3—5.

Таблица 2

Корреляционные взаимоотношения между клиническими, морфологическими и иммуногистохимическими характеристиками аденокарциномы предстательной железы

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

* достоверные показатели.

В настоящее время показано прогностическое значение при аденокарциномах простаты таких показателей, как градация шкалы Глисона, уровня общего ПСА в сыворотке крови, многие авторы указывают, что важным показателем является уровень пролиферативной активности опухолевых клеток. В таблице 2 представлены корреляционные взаимоотношения между клиническими, морфологическими характеристиками опухолей предстательной железы, пролиферацией клеток и экспрессией MMP-9.

Как видно из представленных данных, наблюдается умеренная положительная корреляционная связь между градацией по шкале Глисона и индексом пролиферации клеток по показателю Ki-67 ($r_s = 0,674$) и умеренная отрицательная корреляционная связь градации опухолей с уровнем экспрессии матричной металлопротеиназы-9 ($r_s = -0,660$). Слабая достоверная отрицательная корреляция существует между уровнем пролиферативной активности клеток и экспрессией секреторными опухолевыми клетками MMP-9 ($r_s = -0,369$).

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что при доброкачественной гиперплазии предстательной железы отмечается высокий уровень экспрессии ММР-9; в аденокарциноме предстательной железы происходит снижение экспрессии ММР-9, причем по мере увеличения градации по шкале Глисона выявлено уменьшение количества данного фермента в секреторных опухолевых клетках.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Авдошин В.П., Бабиченко И.И., Котельникова Е.В.* Прогностическое значение экспрессии иммуногистохимических маркеров Ki 67, ММР 9 и коллагена IV у больных папиллярным уротелиальным раком мочевого пузыря // *Онкоурология*. — 2011. — № 3. — С. 66—70.
- [2] *Авдошин В.П., Котельникова Е.В., Бабиченко И.И.* Диагностическая и прогностическая значимость экспрессии иммуногистохимических маркеров Ki 67, ММР 9 и коллагена IV у больных папиллярным уротелиальным раком мочевого пузыря // *Вестник РУДН. Серия «Медицина»*. — 2011. — № 4. — С. 80—86.
- [3] *Castellano G., Malaponte G., Mazzarino M.C., Figini M., Marchese F., Gangemi P. et al.* Activation of the osteopontine/matrix metalloproteinase-9 pathway correlates with prostate cancer progression // *Clin. Cancer Res.* — 2008. — Vol. 14. — P. 7470—7480.
- [4] *Humphrey P.A.* Diagnosis of adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue // *J. Clin. Pathol.* — 2007. — Vol. 60. — P. 35—42.
- [5] *Murphy G.P., Busch C., Abrahamsson P.A., Epstein J.I., McNeal J.E., Miller G.J. et al.* Histopathology of localized prostate cancer. Consensus Conference on Diagnosis and Prognostic Parameters in Localized Prostate Cancer // *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* — 1993. — Vol. 162. — P. 7—42.
- [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. — Vol. 14. — P. 6610—6617.
- [7] *Vargas R., Jacobus S., Leitzel K., Regan M.M., Hamer P., Pierce K. et al.* Elevated plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels predict decreased survival in castration-resistant prostate cancer patients // *Cancer*. — 2011. — Vol. 117. — P. 517—525.

REFERENCES

- [1] *Avdoshyn V.P., Babichenko I.I., Kotelnikova E.V.* Prognostic significance of expression of immunohistochemical markers Ki 67, MMP 9 and collagen IV in patients with papillary urothelial bladder cancer // *Oncourology*. — 2011. — № 3. — P. 66—70.
- [2] *Avdoshyn V.P., Kotelnikova E.V., Babichenko I.I.* Diagnostic and prognostic significance of expression of immunohistochemical markers Ki 67, MMP 9 and collagen IV in patients with papillary urothelial carcinoma of the bladder // *Bulletin of Peoples' Friendship University of Russia. Series "Medicine"*. — 2011. — № 4. — P. 80—86.
- [3] *Castellano G., Malaponte G., Mazzarino MC, Figini M., Marchese F., Gangemi P. et al.* Activation of the osteopontine / matrix metalloproteinase-9 pathway correlates with prostate cancer progression // *Clin. Cancer Res.* — 2008. — Vol. 14. — P. 7470—7480.
- [4] *Humphrey P.A.* Diagnosis of adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue // *J. Clin. Pathol.* — 2007. — Vol. 60. — P. 35—42.
- [5] *Murphy G.P., Busch C., Abrahamsson P.A., Epstein J.I., McNeal J.E., Miller G.J. et al.* Histopathology of localized prostate cancer. Consensus Conference on Diagnosis and Prognostic Parameters in Localized Prostate Cancer // *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* — 1993. — Vol. 162. — P. 7—42.

- [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. — Vol. 14. — P. 6610—6617.
- [7] Vargas R., Jacobus S., Leitzel K., Regan M. M., Hamer P., Pierce K. et al. Elevated plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels predict decreased survival in castration-resistant prostate cancer patients // *Cancer.* — 2011. — Vol. 117. — P. 517—525.

EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-9 AND PROTEIN KI-67 AT PROSTATE TUMORS

M.I. Andrukhin, S.A. Pul'bere,

A.V. Loktev

Department of Urology
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

I.I. Babichenko

Department of Pathological Anatomy
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

Immunohistochemical study of cells proliferative activity by Ki-67 protein and localization of matrix metalloproteinase-9 has been carried out at benign prostatic hyperplasia (BPH) and adenocarcinoma (AC) of different gradations by the Gleason score. A significant decrease of the MMP-9 levels in the AC 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 matrix metalloproteinase-9 ($r_s = -0,660$) were detected. A weak significant negative correlation exists also between the level of proliferative activity of secretory cells and the expression of MMP-9 by tumor cell ($r_s = -0,369$).

Key words: adenocarcinoma of the prostate, MMP-9, Ki-67.