

Интраоперационная иммуноморфологическая оценка хирургических краев резекции при радикальной простатэктомии по поводу рака предстательной железы

А.В. Медведев¹, М.И. Коган², Л.А. Медведева³

¹Кафедра хирургических болезней № 1 Кубанского государственного медицинского университета, Краснодар; ²кафедра урологии и репродуктивного здоровья человека с курсом детской урологии-андрологии Ростовского государственного медицинского университета, Ростов-на-Дону; ³Краснодарская краевая клиническая больница № 1

Контакты: Александр Владимирович Медведев alexander.medvedev09@gmail.com

Работа посвящена изучению эффективности интраоперационной иммуногистохимической (ИГХ-) экспресс-диагностики криостатных срезов тканей, а также сравнительному анализу результатов ИГХ- и стандартного гистологического исследований, проведенных как во время, так и после радикальной простатэктомии.

Результаты исследования показали, что у 28,3% пациентов с морфологически «негативными» хирургическими краями резекции (ХКР) были обнаружены скопления клеток, продуцирующих простатспецифический антиген. У большинства (24,5%) из них была положительная реакция с белком p504S, а у части (3,7%) и с мутантным p53. Выявленные ИГХ-признаки малигнизации клеток характеризуют «позитивность» ХКР, и могут быть использованы для выявления в последних опухолевого роста. Таким образом, проведение интраоперационного ИГХ-экспресс-исследования целесообразно для оценки состояния ХКР с целью повышения достоверности диагностики и раннего прогнозирования биохимического рецидива.

Ключевые слова: радикальная простатэктомия, хирургические края резекции, интраоперационная морфологическая диагностика, иммуногистохимическая экспресс-диагностика

Intraoperative immunomorphological estimation of surgical resection margins at radical prostatectomy for prostate cancer

A.V. Medvedev¹, M.I. Kogan², L.A. Medvedeva³

¹Surgical Disease Department One, Kuban State Medical University, Krasnodar;

²Department of Urology and Human Reproductive Health with a Course of Pediatric Urology-Andrology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don;

³Krasnodar Territorial Clinical Hospital One

The paper deals with the study of the efficiency of rapid intraoperative immunohistochemical (IHC) diagnosis of cryostat tissue sections and with the comparative analysis of the results of IHC and standard histological studies conducted during and after radical prostatectomy.

The study indicated that there were clusters of prostate-specific antigen-producing cells in 28.3% with morphologically negative surgical resection margins (SRM). Most (24.55%) of them were found to have a positive reaction with p504S protein and some (3.7%) had that with the mutant p53 gene. The found IHC signs of cell malignization characterize the positiveness of SRM and may be used to detect tumor growth in the latter. Thus, it is expedient to perform a rapid intraoperative IHC study to estimate SRM in order to enhance the validity of diagnosis and early prediction of a biochemical recurrence.

Key words: radical prostatectomy, surgical resection margins, intraoperative morphological diagnosis, rapid immunohistochemical diagnosis

В настоящее время рекомендуемым методом лечения локализованного и в части случаев местнораспространенного РПЖ является радикальная простатэктомия (РПЭ) [1–4]. При этом онкологический результат – важнейший показатель клинической эффективности РПЭ, а одним из критериев радикальности операции служит оценка хирургических краев резекции (ХКР). По данным литературы, «позитивные» ХКР определяются в 5–43% случаев [5], а частота их выявления зависит от множества факторов: объема и локализации опухоли, стадии заболевания, техники хирургического вмешательства и др. [3, 5, 6]. Влияние «позитивных» ХКР на прогноз заболевания продолжает активно обсуждаться [5–9]. Так, по мнению одних исследователей, на-

личие «позитивных» ХКР существенно не влияет на частоту развития рецидивов, более того, в 7,9% случаев рецидивы наблюдаются и при «негативных» ХКР [10]. Однако большинство авторов определяют состояние ХКР после РПЭ как важный прогностический фактор, определяющий также риск местного и/или биохимического рецидива [11–13]. Более того, значение индекса Глисона в «позитивном» ХКР и общая длина «позитивного» ХКР служат независимыми прогностическими факторами риска развития биохимического рецидива [14]. Поэтому принято считать, что одна из главных задач послеоперационного морфологического исследования предстательной железы (ПЖ) – это оценка ХКР. Не менее значима и диагностика по криостатным тканевым срезам не-

посредственно в ходе оперативного вмешательства. Интраоперационная морфологическая диагностика и выявление опухолевого роста в ХКР при выполнении РПЭ даже для опытных специалистов представляют собой очень сложную задачу, обусловленную дефицитом времени (15–20 мин) и возможностью опираться исключительно на форму тканевых структур, размеры клеток и т. д., в связи с чем не исключены ошибки субъективного характера. В то же время от интраоперационного морфологического диагноза зависит тактика хирургического лечения и, в частности, определение пределов иссечения тканей, а также последующее лечение и прогноз заболевания.

Вышесказанное подтверждает необходимость оценки состояния ХКР и выявления в них опухолевых клеток непосредственно в ходе РПЭ.

Цель исследования – изучение эффективности интраоперационной иммуногистохимической (ИГХ-) экспресс-диагностики криостатных срезов тканей, а также сравнительный анализ результатов ИГХ- и стандартного гистологического исследований, проведенных во время и после РПЭ.

Материалы и методы

В исследование включены 65 пациентов, перенесших РПЭ без сохранения сосудисто-нервных пучков по поводу РПЖ в стадии сТ1–Т3а в 2009–2010 гг. Число пациентов со стадией сТ1 составило 11 (16,9%), сТ2 – 48 (73,8%), сТ3а – 5 (7,8%), сТх – 1 (1,5%). Средний возраст пациентов – 62 (47–76) года, среднее значение предоперационного простатспецифического антигена (ПСА) – 10 (1,9–40,0) нг/мл, среднее предоперационное значение индекса Глисона – 5 (3–10) баллов. Всем пациентам в ходе РПЭ были выполнены экспресс-гистологическое и экспресс-ИГХ-исследования криостатных срезов краев резекции перепончатой уретры и шейки мочевого пузыря. После морфологического экспресс-исследования тканевых срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, производили ИГХ-окрашивание по методике U. Kammerer [15] и P. Ruck [16] в нашей модификации [17], позволяющей получить результат исследования уже через 10–12 мин. Использовали антитела к ПСА (клон ER-PR8), цитокератинам, (клон AE1/AE3, 34βE12), alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR, p504S) (клон 13H4), p53 (клон DO-7) (ДАКО) и систему визуализации EnVision (ДАКО). Кроме того, после операции выполняли стандартное гистологическое исследование удаленных образцов тканей.

Результаты

При стандартном интраоперационном гистологическом исследовании тканей ХКР уретры и шейки мочевого пузыря опухолевый рост был обнаружен из 65 пациентов у 12 (18,5%) больных, составивших 1-ю

группу. У 53 (81,5%) наблюдаемых ХКР морфологически оценивались как «негативные» (2-я группа). Результаты послеоперационного морфологического исследования краев во всех случаях были идентичны таковым интраоперационного исследования. Онкологическая характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика пациентов

Параметр, среднее значение	1-я группа (n = 12)	2-я группа (n = 53)
Возраст	63,5 ± 9,3	61,7 ± 16,3; p > 0,5
ПСА	11,1 ± 6,4	9,9 ± 8,1; p > 0,5
сTNM, число пациентов (%)		
Tx	0	1 (1,5)
T1	0	0
T2	6 (50)	42 (79,2); p > 0,5
T2a	0	6 (11,3)
T2b	1 (8,3)	13 (24,5)
T2c	5 (41,6)	23 (43,3)
T3	6 (50)	10 (18,8); p < 0,5
T3N+	0	3 (5,7)
T3a	3 (25)	7 (13,2)
T3aN+	0	2 (3,7)
T3b	3 (25)	3 (5,7)
T3bN+	0	1 (1,8)
Индекс Глисона	6,5 ± 1,8	5,6 ± 2,2; p > 0,5

По возрасту, значению ПСА и индексу Глисона 1-я и 2-я группы достоверно не различались. Достоверные отличия в частоте «позитивных» ХКР были обнаружены при сравнении пациентов по стадиям заболевания: в группе с «позитивными» ХКР 50% пациентов имели стадию сТ3, тогда как в группе с «негативными» ХКР стадия сТ3 наблюдалась лишь у 18,8%.

Таким образом, «позитивные» ХКР при стандартном гистологическом исследовании значительно чаще выявляются при стадии заболевания сТ3.

При ИГХ-исследовании ХКР у всех 12 пациентов 1-й группы (табл. 2) было подтверждено наличие опухолевых желез, клетки которых показывали положительную реакцию с панцитокератинами (клон AE1/AE3) и отрицательную – с высокомолекулярными цитокератинами (клон 34βE12) (рис. 1).

У 7 (58,45%) из 12 пациентов клетки опухолевых желез в ХКР демонстрировали экспрессию ПСА, вместе с тем в 41,6% случаев опухолевые железы показывали отрицательную реакцию с ПСА. Возможно, это свидетельствует о низкой секреторной способности опухолевых клеток. У 50% пациентов была выявлена экспрессия клетками опухоли p504S и лишь в 2

Таблица 2. Результаты интраоперационного ИГХ-исследования «позитивных» ХКР пациентов 1-й группы

ИГХ-маркер малигнизации	ИГХ-реакция	Число пациентов (n=12)	
		Абс.	%
ПСА	+	7	58,4
p504S	+	6	50,0
p53	+	2	16,6
Цитокератин AE1/AE3	+	12	100,0
Цитокератин 34βE12	–	12	100,0

Примечание. Здесь и в табл. 2: «+» – положительная ИГХ-реакция; «–» – отрицательная ИГХ-реакция.

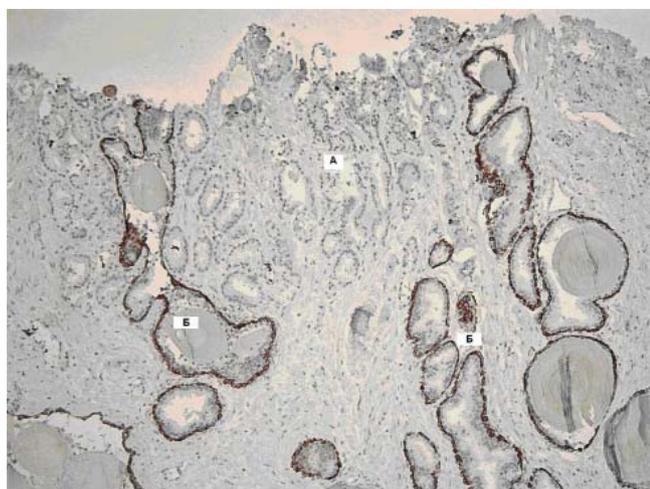


Рис. 1. Ткань гистологически «позитивного» ХКР уретры: А – группа опухолевых желез, отрицательная реакция с антителами к высокомолекулярным цитокератинам демонстрирует отсутствие базальноклеточного слоя; Б – не опухолевые железы, положительная мембранная реакция с антителами к высокомолекулярным цитокератинам в базальноклеточном слое. ИГХ-окрашивание с антителами к высокомолекулярным цитокератинам (клон 34–E12), ×10

случаях (16,6%) клетки опухоли давали положительную реакцию с мутантным p53 (рис. 2). При анализе экспрессии ПСА и p504S у этих пациентов оказалось,

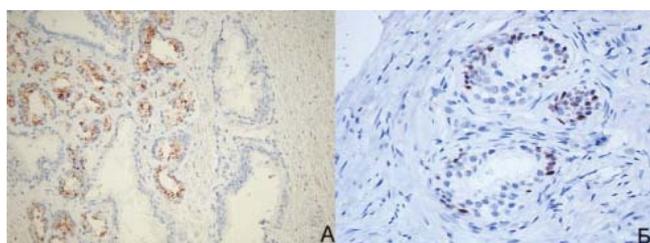


Рис. 2. Ткань гистологически «позитивного» ХКР уретры: А – цитоплазматическая гранулярная экспрессия p504S в очаге опухолевых желез; Б – ядерная экспрессия мутантного p53 в очаге опухолевых желез. ИГХ-окрашивание с антителами к p504S (клон 13H4), ×20, и p53 (клон DO-7), ×40

что в 4 из 5 случаев, когда не было реакции клеток опухолевых желез с ПСА, отмечена положительная реакция с p504S.

Таким образом, при иммуноморфологическом исследовании ХКР пациентов 1-й группы были выявлены отдельные железы или группы мелких желез, «позитивные» в реакции с цитокератинами, не имеющие слоя базальных клеток (отрицательная реакция с высокомолекулярными цитокератинами) и в большинстве случаев «позитивные» в реакциях с ПСА и p504S. У части пациентов этой группы в ХКР наряду с опухолевыми железами были также обнаружены отдельные гистологически и иммунофенотипически нормальные простатические и парауретральные железы.

Во 2-й группе при ИГХ-исследовании ХКР из 53 пациентов у 15 (28,3%) были обнаружены клетки, экспрессирующие ПСА (табл. 3). Последние определялись фокально в виде отдельных скоплений или единичных клеток и гистологически при окрашке гематоксилином и эозином не верифицировались среди элементов стромы как клетки железистого эпителия ПЖ (рис. 3).

Таблица 3. Результаты интраоперационного ИГХ-исследования «негативных» ХКР пациентов 2-й группы

ИГХ-маркер малигнизации	ИГХ-реакция	Число пациентов (n=12)	
		Абс.	%
ПСА	+	15	28,3
p504S	+	13	24,5
p53	+	2	3,7
Цитокератин AE1/AE3	+	15	28,3
Цитокератин 34βE12	–	53	100,0

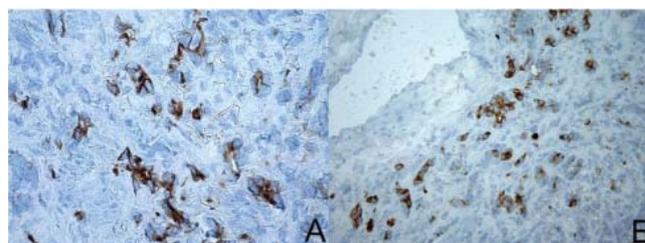


Рис. 3. Ткань гистологически «негативного» ХКР уретры. Цитоплазматическая экспрессия ПСА в отдельных клетках и скоплениях эпителиальных клеток. ИГХ-окрашивание с антителами к ПСА (клон ER-PR8), ×40 (А) и ×20 (Б)

У 13 (24,5%) пациентов из 53 была положительная реакция с p504S, а у 2 (3,7%) выявлена экспрессия мутантного p53 (рис. 4). Кроме того, у части пациентов были обнаружены отдельные гистологи-

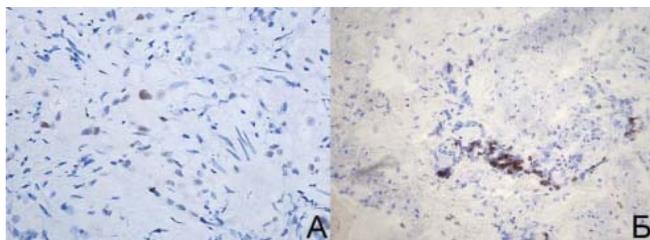


Рис. 4. Ткань гистологически «негативного» ХКР шейки мочевого пузыря: А – ядерная экспрессия мутантного p53 в опухолевых клетках; Б – цитоплазматическая гранулярная экспрессия p504S в скоплениях опухолевых клеток. ИГХ-окрашивание с антителами к p53 (клон DO-7), × 40, и p504S (клон 13H4), × 20

чески и иммунофенотипически нормальные простатические и парауретральные железы.

Анализ онкологической характеристики пациентов с ИГХ-«положительными» и ИГХ-«негативными» ХКР во 2-й группе не выявил достоверных различий между подгруппами по возрасту, значениям ПСА, индексу Глисона, стадии процесса. Таким образом, прогнозировать «положительность» ХКР, определяемую только данными ИГХ-исследования, по вышеперечисленным показателям не представляется возможным.

В настоящее время за всеми 65 пациентами ведется всестороннее наблюдение с целью раннего выявления вероятного биохимического рецидива.

Обсуждение

Таким образом, у 28,3% пациентов с морфологически «негативными» ХКР были обнаружены скопления клеток, продуцирующих ПСА. У большинства (24,5%) из них была положительная реакция с белком p504S, а у части (3,7%) и с мутантным p53. В настоящее время хорошо известно, что экспрессия таких маркеров, как p53 и p504S, свидетельствует о процессе малигнизации [18–21]. В связи с этим логично предположить, что выявленные ИГХ-признаки также

характеризуют «положительность» ХКР. При суммировании данных гистологического и ИГХ-исследований количество случаев «положительных» ХКР увеличилось на 23,1%, а суммарный процент «положительных» ХКР стал равным 41,6%.

Заключение

Противоречивость мнений по поводу значения оценки состояния ХКР в прогнозе возникновения местного и биохимического рецидивов не только определяет актуальность клинического анализа, но и свидетельствует о необходимости анализа существующих морфологических критериев оценки тканей ХКР. К сожалению, при обычном гистологическом исследовании верификация отдельных опухолевых клеток в ткани ХКР часто затруднительна и даже невозможна. Кроме того, для оценки биологической агрессивности обнаруженных клеток опухоли, ее инвазивности и прогноза также недостаточно лишь рутинного гистологического исследования. Очевидно, что для оценки состояния ХКР необходимо проведение интраоперационного ИГХ-экспресс-исследования с целью обнаружения опухолевых клеток и повышения достоверности диагностики «положительных» краев резекции.

Вполне вероятно, что иммунофенотипические признаки малигнизации выявляются значительно раньше, чем общепринятые гистологические признаки РПЖ, что может быть использовано для более достоверного выявления опухолевого роста в ХКР и прогнозирования биохимического рецидива.

Таким образом, полученные нами данные могут свидетельствовать о высоком риске развития рецидива заболевания после РПЭ у пациентов с ИГХ-признаками малигнизации и позволяют объяснить возникновение рецидивов у пациентов с гистологически «негативными» ХКР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Велиев Е.И., Петров С.Б. Рак предстательной железы: диагностика и результаты хирургического лечения локализованных и местно-распространенных форм. РМЖ 2001;9(13–14):564–7.
2. Петров С.Б., Ракул С.А., Привалов Д.В. Отдаленные последствия и качество жизни пациентов после радикальной простатэктомии по поводу рака предстательной железы. Здоровоохранение Башкортостана 2003;(3):98–9.
3. Медведев В.Л. Сравнительный анализ открытой и лапароскопической радикальной простатэктомии в лечении локализованного рака предстательной железы. Дис. ... д-ра мед. наук. Ростов-н/Дону, 2004.
4. Коган М.И., Лоран О.Б., Петров С.Б. Радикальная хирургия рака предстательной железы. М.: Гэотар-Медиа, 2006.
5. Vis A.N., Schröder F.H., van der Kwast T.N. The actual value of the surgical margin status as a predictor of disease progression in men with early prostate cancer. Eur Urol 2006;50:258–65.
6. Graefen Markus. The positive surgical margin after radical prostatectomy – why do we still not really know what it means? Eur Urol 2006;50:199–201.
7. Wieder J.A., Soloway M.S. Incidence, etiology, location, prevention and treatment of positive margins after radical prostatectomy for prostate cancer. J Urol 1998;160:299–315.
8. Noldus J. Die radicale Prostatectomie beim klinisch localisierten Prostatakarzinom. Urology 2002;41:55–9.
9. Noldus J., Palisaar J., Huland H. Treatment of prostate cancer – the clinical use of radical prostatectomy. EAU Update Series 2003;1:16–22.
10. Ohori M., Wheeler T.M., Kattan M.W. et al. Prognostic significance of positive surgical margins in radical prostatectomy specimens. J Urol 1999;154:1818–24.

11. Karakiewicz P.I., Eastham J.A., Graefen M. et al. Prognostic impact of positive surgical margins in surgically treated prostate cancer: multi-institutional assessment of 5831 patients. *Urology* 2005;66:1245–50.
12. Pettus J.A., Weight C.J., Thompson C.J. et al. Biochemical failure in men following radical retropubic prostatectomy: impact of surgical margin status and location. *J Urol* 2004;172:129–32.
13. Connolly S.S., O'Toole G.C., O'Malley K.J. et al. Positive apical surgical margins after radical prostatectomy, truth or artifact. *Scand J Urol Nephrol* 2004;38:26–31.
14. Brimo F., Partin A.W., Epstein J.I. Tumour grade at margins of resection in radical prostatectomy specimens is an independent predictor of prognosis. *Urology* 2010;76:1206–11.
15. Kammerer U., Kapp M., Gassel A.M. et al. A new rapid immunohistochemical staining technique using the EnVision antibody complex. *J Histochem Cytochem* 2001;49:623–30.
16. Ruck P. EnVision™ for rapid immunostaining in intraoperative frozen section diagnosis. *Dako facts* 2001;1(2):6–9.
17. Медведева Л.А., Медведев А.В. Способ быстрого иммуногистохимического окрашивания криостатных срезов тканей в условиях интраоперационной диагностики. *Кубанск науч мед вестн* 2010;7:111–4.
18. Erbersdobler A., Fritz H., Schnoger S., Graefen M. Tumour grade, proliferation, apoptosis, microvessel density, p53, and Bcl-2 in prostate cancer: differences between tumours located in the transition zone and in the peripheral zone. *Eur Urol* 2002;41;(1):40–6.
19. Merseburger A., Kuczyk M., Moul J. et al. Limitations of tissue microarrays in the evaluation of Bcl-2 and p53 expression in whole mount derived prostate tissues. *Eur Urol* 2003;2;(1):59;abstr. 225.
20. Luo J., Zha S., Gage W. et al. {alpha}-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Res* 2002;62(8):2220–6.
21. Rubin M. A., Bismar T. A., Andren O. et al. Decreased {alpha}-methylacyl CoA racemase expression in localized prostate cancer is associated with an increased rate of biochemical recurrence and cancer-specific death. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(6):1424–32.

Динамика восстановления удержания мочи у пациентов после радикальной позадилоной нервосберегающей простатэктомии

Е.И. Велиев, Е.Н. Голубцова, С.В. Котов

Кафедра урологии и хирургической андрологии РМАПО, Москва

Контакты: Евгений Ибадович Велиев veliev@urotop.ru

Цель исследования — оценка значения нервосберегающей техники в восстановлении удержания мочи после радикальной позадилоной простатэктомии (РПЭ).

Материалы и методы. В исследование включены 173 пациента с клинически локализованной формой рака предстательной железы, перенесших РПЭ в клинике урологии и хирургической андрологии РМАПО в период с 2007 по 2010 г. Пациенты были разделены на 2 группы. В 1-й группе ($n=92$, средний возраст $58,8 \pm 7,1$ года, медиана концентрации простатспецифического антигена (ПСА) $7,3$ нг/мл) больным была выполнена РПЭ с использованием уни- или билатеральной нервосберегающей техники. Во 2-й группе ($n=81$, средний возраст $61,5 \pm 7,6$ года, медиана ПСА $11,6$ нг/мл) нервосберегающая техника не применялась. Полное удержание мочи было определено как отсутствие подтекания мочи в покое или при физической нагрузке с возможным использованием 1 прокладки в качестве страховочной. Легкая степень недержания предполагала использование 1–2 прокладок в день, средняя — 3, тяжелая — более 3 прокладок в день.

Результаты. В 1-й группе через год после операции полностью удерживали мочу 97,3% пациентов, во 2-й группе — 89,4%. Недержание легкой степени отмечено у 2,7 и 10,6% пациентов соответственно. Инконтиненция средней и тяжелой степени не выявлена.

Выводы. Частота инконтиненции ниже в группе пациентов, которым выполнялась РПЭ с нервосберегающей техникой. Следовательно, последнюю целесообразно применять в случаях, не противоречащих онкологическим принципам РПЭ.

Ключевые слова: удержание мочи, радикальная простатэктомия, нервосберегающая методика

Urinary continence recovery in patients after nerve-sparing radical retropubic prostatectomy

E.I. Veliev, E.N. Golubtsova, S.V. Kotov

Department of Urology and Surgical Andrology, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow

Objective: to estimate the value of a nerve-sparing procedure in the recovery of urinary continence after radical retropubic prostatectomy (RRPE).

Materials and methods. The study considered the data of 173 patients with clinically localized prostate cancer (PC) who had undergone RPE at the Clinic of Urology and Surgical Andrology, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, during the period 2007 to 2010. The patients were divided into 2 groups: 1) RRPE using the uni- or bilateral nerve-sparing techniques ($n=92$; mean age 58.8 ± 7.1 years; median prostate-specific antigen (PSA) concentration 7.3 ng/ml); 2) RRPE without these techniques ($n=81$; mean age 61.5 ± 7.6 years, median PSA 11.6 ng/ml). Complete urinary