

УДК 616.65-006-018.2-037

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МЕТАСТАТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.К. Гриб, С.А. Лятиков, В.А. Басинский,  
С.Э. Савицкий

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

УЗО «Гродненская областная клиническая больница»

*Обнаружена тесная взаимосвязь между наличием отдаленных метастазов, степенью васкуляризации и лимфоидной инфильтрации опухолевой ткани, площадью, занимаемой гладкомышечным актином, экспрессией в цитоплазме эндотелиоцитов циклина B1, а также уровнем циклина D1 в цитоплазме опухолевых клеток. Связь интенсивности метастазирования с различными вариантами сочетаний уровня цитоплазматической экспрессии циклинов B1 и D1 отражает пролиферативную активность и антионкогенный потенциал опухолевой клетки.*

**Ключевые слова:** рак предстательной железы, циклины, гладкомышечный актин, метастазы.

*Close association between the presence of remote metastases, the degree of vascularization and lymphoid infiltration of the tumour tissue, the area of smooth muscles actin, cyclin B1 expression in endothelial cytoplasm, as well as the level of cyclin D1 in tumour cells cytoplasm has been revealed. The correlation of metastasis process intensity with different combinations of cyclins B1 and D1 cytoplasmic expression degree reflects the proliferative activity and antioncogenic potential of a tumour cell.*

**Key words:** prostate cancer, cyclins, unstriated actin, metastases.

### Актуальность исследования

Рак предстательной железы относится к числу наиболее частых онкоурологических заболеваний, встречающихся у мужчин пожилого возраста. Среди наиболее актуальных проблем новообразования остается поиск его прогностических критериев. Применяемый в настоящее время гистологический прогностический критерий рака с определением степени его дифференцировки по Глиссону не потерял своего значения, однако нуждается в совершенствовании, поскольку учитывает только микроскопическую структуру эпителиального компонента опухоли.

Цель исследования: на основании гистологического и иммуногистохимического исследования архивного операционного материала дать оценку метастатического потенциала рака предстательной железы с различным иммуногистохимическим профилем.

### Материал и методы исследования

Материалом данного исследования стали 111 наблюдений рака предстательной железы, полученные при трансуретральной резекции за период с 1996 по 2000 годы. Проведено гистологическое исследование наблюдений с определением дифференцировки опухоли по Глиссону и Грейду. В 47 наблюдениях иммуногистохимически определен уровень экспрессии CD31, гладкомышечного актина и циклинов B1 и D1. Полуколичественным методом проанализирована степень выраженности лимфоидно-клеточной инфильтрации стромы. Изуче-

ны данные канцер-регистра областного онкодиспансера, амбулаторные карты больных с оценкой характера метастазирования новообразования и продолжительности жизни больных. Статистическая обработка результатов производилась с использованием пакета прикладных статистических программ Statistica 6.0

### Результаты исследования

С помощью непараметрического корреляционного анализа (метод Spearman) установлено, что наличие отдаленных метастазов высоко достоверно положительно связано с показателями, характеризующими степень прорастания сосудов в опухолевую ткань (количество сосудов –  $r=0,47$ ;  $p=0,0009$ , суммарная площадь сосудов –  $r=0,48$ ;  $p=0,0006$ , суммарная длина окружностей сосудов  $r=0,43$ ;  $p=0,002$ ), и отрицательно – с площадью, занимаемой актином ( $r=-0,38$ ;  $p=0,008$ ) и средней толщиной сосудистой стенки ( $r=-0,39$ ;  $p=0,007$ ). Кроме того, существенные положительные корреляционные связи были обнаружены между наличием метастазов и экспрессией в цитоплазме эндотелиоцитов циклина B1 ( $r=0,35$ ;  $p=0,01$ ), а также уровнем циклина D1 в цитоплазме опухолевых клеток ( $r=0,29$ ;  $p=0,05$ ). Следует заметить, что величина и достоверность коэффициента корреляции увеличивалась при использовании скорректированного показателя экспрессии циклина D1 – разности, полученной при вычитании величины экспрессии этого циклина опухолевыми и стромальными клетками в одном и том же образце ( $r=0,35$ ;  $p=0,01$ ).

Коррекция величины экспрессии циклинов B1 и D1 проводилась с целью исключения влияния неспецифических ростовых факторов по формулам:

$$D1_{\text{коррект}} = D1_{\text{опухоль}} - D1_{\text{строма}}$$

$$B1_{\text{коррект}} = B1_{\text{опухоль}} - B1_{\text{строма}}$$

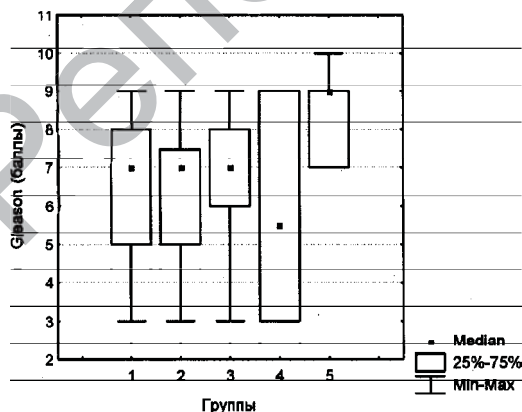
Для того, чтобы установить связь между сочетанной экспрессией циклинов и склонностью к метастазированию все случаи были распределены на 5 групп, в зависимости от величины скорректированного уровня цитоплазматических B1 и D1 (таблица 1).

**Таблица 1** – Распределение на группы в зависимости от величины скорректированной экспрессии циклинов B1 и D1 и частота выявления отдаленных метастазов в этих группах

Группы	1	2	3	4	5
Величина D1 <sub>коррект</sub>	1-3	1-3	1-3	4-6	4-6
Величина B1 <sub>коррект</sub>	1-2	3-4	5-6	1-2	5-6
Количество случаев	11	8	7	6	15
Частота выявления отдаленных метастазов, %	27,27	12,50	42,86	50,00	60,00
Достоверность при сравнении частот в группах	$p_{1-5} = 0,05$	$p_{2-5} = 0,02$ $p_{2-4} = 0,08$			

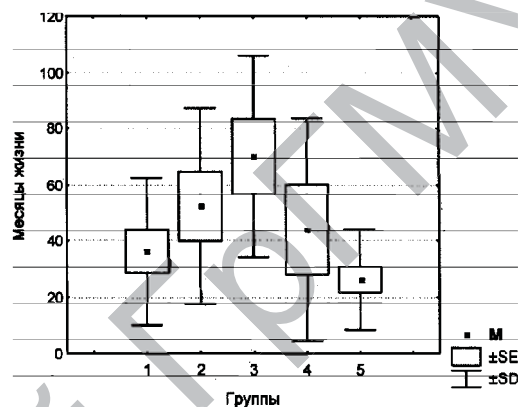
Оказалось, что наименьшая частота отдаленных метастазов определяется во 2-й и 1-й группах, характеризующихся низкой экспрессией циклина D1 и низкой и умеренной величиной B1<sub>коррект</sub>. Наиболее часто отдаленные метастазы определялись при высокой экспрессии обоих исследованных циклинов в цитоплазме опухолевых клеток.

Распределение степени злокачественности опухолей по Gleason также высоко достоверно связано с характером экспрессии циклинов D1 и B1 (Kruskal-Wallis test:  $H = 14,61$   $p = 0,006$ ). У 50% обследованных 2-й группы оценка по Gleason колебалась от 5 до 7,5, у половины больных 1-й группы – от 5 до 8, в 3-й группе – от 6 до 8 (25 и 75 перцентиль, соответственно), а в 5-й группе минимальная оценка составляла 7, и более чем у 50% равнялась, либо была больше 9 (рисунок 1).



**Рисунок 1** – Оценка опухоли по Gleason (в баллах) в зависимости от вариантов сочетаний величины скорректированной экспрессии циклинов B1 и D1

Наиболее низкая выживаемость наблюдалась как при высокой, так и при низкой экспрессии обоих циклинов (5-я группа:  $M = 26,27$  месяцев,  $SD = \pm 17,88$ , 1-я группа:  $M = 36,27$  месяцев,  $SD = \pm 26,18$ ), самая высокая продолжительность жизни имела место в 3-й группе при низкой экспрессии циклина D1 и высокой – B1 ( $M = 70,14$  месяцев,  $SD = \pm 35,84$ , по сравнению с 5-й группой  $p_{3,5} = 0,02$ , по сравнению с 1-й группой  $p_{3,1} = 0,04$ ) (рисунок 2).



**Рисунок 2** – Средняя продолжительность жизни (месяцев) в зависимости от вариантов сочетаний величины скорректированной экспрессии циклинов B1 и D1

Здесь и в прочих рисунках: M – среднее значение, SE – ошибка средней, SD – среднее квадратическое отклонение.

Значимо различалась в указанных группах также суммарная площадь экспрессии актина в сосудистых стенках (Kruskal-Wallis test:  $H = 12,60$ ,  $p = 0,01$ ) и их толщина (Kruskal-Wallis test:  $H = 18,43$ ,  $p = 0,001$ ). Наибольшее количество актина было в стенках сосудов в образцах, полученных у представителей 1-й и 2-й групп, наименьшее – у больных 5-й группы (рисунок 3). Таким же образом различалась в группах толщина сосудистой стенки (рисунок 4).

С помощью медианного теста (Median Test) было установлено наличие достоверной связи между степенью лимфоидной инфильтрации опухоли и вариантами сочетаний исследованных циклинов (Chi-Square = 10,93,  $p = 0,03$ ). Оказалось, что наиболее высокая лимфоидная инфильтрация определяется в группах как с самой высокой, так и с самой низкой частотой выявления отдаленных метастазов (рисунок 5).

При группировании обследованных в зависимости от сочетания уровня экспрессии циклинов B1 и D1 клетками эндотелия было установлено, что достоверно чаще отдаленные метастазы выявлялись в тех случаях, когда концентрация этих белков в цитоплазме эндотелиоцитов максимальна (таблица 2).

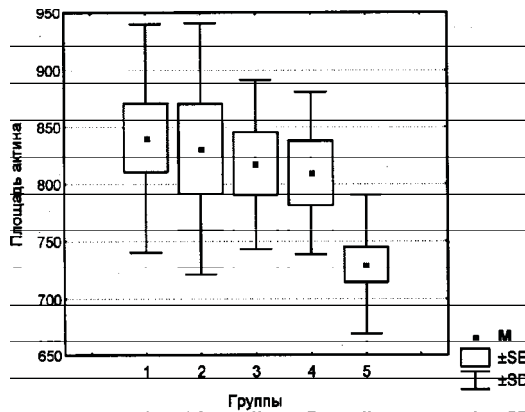


Рисунок 3 – Площадь экспрессии актина в стенках сосудов (в условных единицах) в зависимости от вариантов сочетаний величины скорректированной экспрессии циклинов B1 и D1

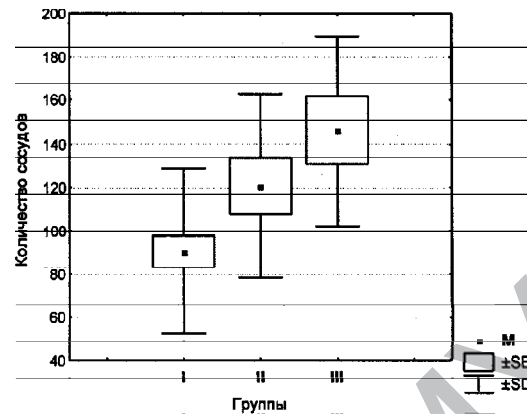


Рисунок 6 – Удельное количество сосудов в зависимости от вариантов сочетаний величины экспрессии циклинов B1 и D1 в эндотелиоцитах

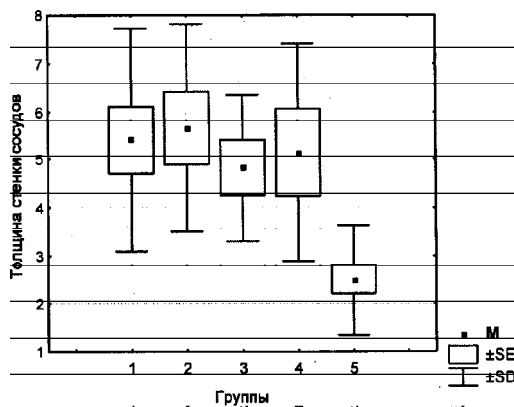


Рисунок 4 – Толщина сосудистой стенки (в условных единицах) в зависимости от вариантов сочетаний величины скорректированной экспрессии циклинов B1 и D1

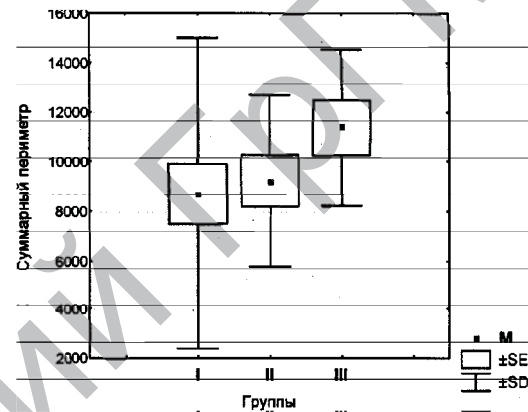


Рисунок 7 – Суммарный периметр сосудов (условные единицы) в зависимости от вариантов сочетаний величины экспрессии циклинов B1 и D1 в эндотелиоцитах

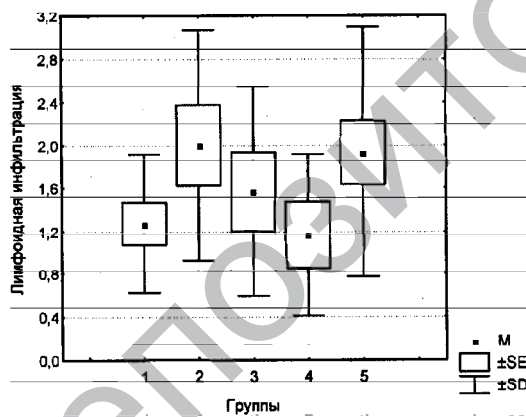


Рисунок 5 – Степень лимфоидной инфильтрации опухоли (в баллах) в зависимости от вариантов сочетаний величины скорректированной экспрессии циклинов B1 и D1

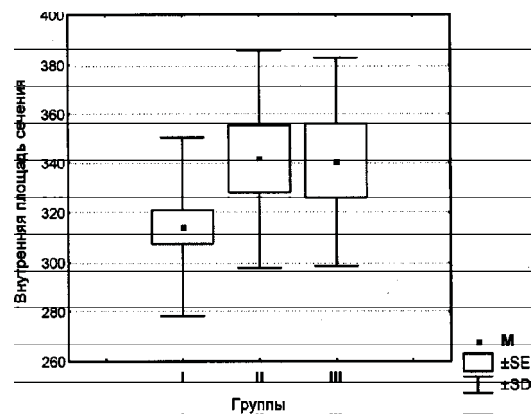


Рисунок 8 – Внутренняя площадь сечения сосудов (условные единицы) в зависимости от вариантов сочетаний величины экспрессии циклинов B1 и D1 в эндотелиоцитах

Таблица 2 – Частота выявления отдаленных метастазов в зависимости от величины экспрессии циклинов B1 и D1 эндотелиоцитами

Группы	I	II	III
Величина экспрессии D1 в эндотелии	1	1	2-3
Величина экспрессии B1 в эндотелии	1	2-3	2-3
Количество случаев	28	11	8
Частота выявления отдаленных метастазов	28,57%	45,45%	75,00%
Достоверность при сравнении частот в группах	$P_{1-3}=0,01$	$P_{2-3}=0,1$	

От характера сочетания циклинов в эндотелии высоко достоверно зависел целый ряд параметров, характеризующих васкуляризацию опухолей. При максимальной экспрессии B1 и D1 (группа I) определялось самое большое количество сосудов на единицу площади препарата (Kruskal-Wallis test:  $H=10,89$ ,  $p=0,004$ , рисунок 6), с наибольшим суммарным периметром сосудистой стенки (Kruskal-Wallis test:  $H=6,57$ ,  $p=0,04$ , рисунок 7) и внутренней

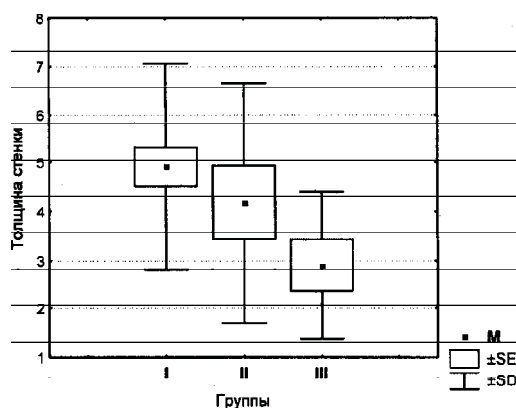


Рисунок 9 – Толщина стенок сосудов (условные единицы) в зависимости от вариантов сочетаний величины экспрессии циклинов B1 и D1 в эндотелиоцитах

площадью сечения (Kruskal-Wallis test:  $H=7,83$ ,  $p=0,02$ , рисунок 8), но с наименьшей толщиной стенок этих сосудов (Kruskal-Wallis test:  $H=7,59$ ,  $p=0,02$ , рисунок 9).

### Обсуждение полученных результатов

Связь интенсивности метастазирования с различными вариантами сочетаний уровня цитоплазматической экспрессии циклинов B1 и D1 очевидно объясняется тем, что скорость продукции и величина накопления этих циклинов отражает пролиферативную активность и антионкогенный потенциал опухолевой клетки.

Одновременно низкая экспрессия циклинов B и D опухолевыми клетками (1-я группа), вероятно, является результатом нарушения функции антионкогенных белков, вследствие чего не происходит остановки клеточного цикла в контрольных точках (check points) и блокируется запуск апоптоза. Этот вариант сопровождается низкой продолжительностью жизни, но метастазы выявляются относительно редко вследствие низкой пролиферативной активности. Средняя и высокая цитоплазматическая экспрессия циклина B на фоне низкой экспрессии циклина D (соответственно, 2 и 3 группы) с большой вероятностью является свидетельством остановки клеточного цикла в контрольной точке G2. В этом случае циклин B не поступает в ядро. Секвестрирование комплекса циклин B-Cdc2 в цитоплазме может происходить под влиянием продукта гена 14-3-3-s, транскрипцию которого стимулирует продукт одного из важнейших антионкогенов – белок p53. Уровень циклина D при этом невысокий, так как пролиферативная активность умеренная, а, кроме того, контрольную точку G1 клетка проходит беспрепятственно. Чем эффективнее работает p53, тем ниже злокачественность опухоли, выше выживаемость и реже наблюдается метастазирование.

Высокая экспрессия циклина D в сочетании с низкой экспрессией циклина B (4-я группа) может быть обусловлена 2 причинами: 1-я – высокая пролиферативная активность опухоли как следствие высокой ее злокачественности, 2-я – остановка клеточного цикла в G1, что свидетельствует о наличии антионкогенной активности и, таким образом, более низкой злокачественности. Вероятно, в 3-ю группу вошли оба указанных варианта, поэтому продолжительность жизни представителей этой группы и оценка по Gleason имели самую большую по сравнению с остальными группами, вариабельность.

Высокая экспрессия обоих исследованных циклинов (5-я группа) определяется в опухолевых клетках, обладающих высокой злокачественностью и, очевидно, свидетельствует о высокой пролиферативной активности и недостаточной функции антионкогенов, поэтому данное сочетание является плохим прогностическим признаком в плане продолжительности жизни и появления отдаленных метастазов. Выраженная экспрессия обоих исследованных циклинов в цитоплазме эндотелиоцитов однозначно свидетельствует о высокой пролиферативной активности этих клеток. Ключевую роль в неоангиогенезе играет VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), который стимулирует размножение и миграцию эндотелиоцитов. Экспрессия VEGF повышается под воздействием некоторых онкогенов, а также при гипоксии вследствие активации транскрипционного фактора HIF-1 (Hypoxia Inducing Factor 1). Под влиянием опухолевой стимуляции ускоряется пролиферация эндотелия, увеличивается число и калибр сосудов в опухолевой ткани, но уменьшается толщина сосудистой стенки. Основным супрессором, подавляющим транскрипцию генов VEGF и HIF-1, является p53 [3, 4]. Кроме того, p53 может активировать гены тромбоспондина-1 и -2 – белков, вызывающих апоптоз эндотелиоцитов [1, 2]. Полученные результаты наглядно демонстрируют, что способность опухоли стимулировать рост сосудов прямо пропорциональна ее склонности к метастазированию и, вероятно, связана с функцией белка p53. Клетки с активированным p53 хуже переносят гипоксию, перестают секретировать VEGF и начинают производить ингибиторы ангиогенеза, что препятствует образованию новых сосудов.

Наряду с этим, белок p53 прямо активирует транскрипцию гена KAI1 [5] – трансмембранного белка, ингибирующего метастатические процессы [8, 9]. По данным литературы, потеря экспрессии белка KAI1 обнаруживается в 60-90% случаев рака предстательной, поджелудочной и молочной

желез, мелкоклеточного рака легкого, гепатоцеллюлярного рака и др. на поздних стадиях заболевания и закономерно сопровождается появлением отдаленных метастазов [6, 7]. Косвенно роль p53 подтверждается выраженностью экспрессии актина, мощным стимулятором синтеза которого сам p53 и является. Как было нами установлено, в образцах, полученных у больных 5-й группы, характеризующейся наибольшей частотой метастазирования, в стенках сосудов опухолей содержится меньше всего актина, вследствие чего эти сосуды имеют наиболее тонкие стенки.

Еще одним фактором, лимитирующим возникновение отдаленных метастазов, является иммунная система. Лимфоциты, прежде всего, естественные киллеры и цитотоксические Т-лимфоциты, инфильтрируют опухоль, сдерживая ее рост и препятствуя миграции атипичных клеток. Имеются данные, что антигеном, позволяющим иммунным клеткам распознавать опухолевые клетки, может являться циклин В1. С этих позиций можно объяснить, почему склонность к метастазированию повышается при низком содержании циклина В в малигнизированных клетках – Т-киллеры плохо распознают эти клетки и не могут эффективно препятствовать их распространению.

Таким образом, чем выше экспрессия циклина В, тем эффективнее работает иммунная система и, следовательно, меньше опасность появления отдаленных метастазов. По нашим данным, частота метастазирования во второй группе действительно ниже, чем в первой. Однако максимальная экспрессия циклина В сопровождается повышением частоты выявления метастазов. Наиболее часто они обнаруживались у больных в 5-й группе. Одним из механизмов ухода опухоли от иммунного возмездия является синтез цитокиноподобных факторов, индуцирующих толерантность лимфоцитов по отношению к опухолевым клеткам, очевидно, что опухоли, обладающие такими способностями, будут обладать большей злокачественнос-

тью. Именно такой механизм, вероятно, имел место у представителей 5-й группы. Можно предположить, что высокая лимфоцитарная инфильтрация у них обусловлена хемокиновыми свойствами опухолевых цитокинов, но супрессорные эффекты последних делают иммунный ответ неэффективным. Все это обуславливает склонность к метастазированию, низкую продолжительность жизни и высокую злокачественность, что подтверждается оценкой по Gleason и катamnестическими наблюдениями. Напротив, у представителей 2-й группы лимфоцитарная инфильтрация является отражением сохранности (по крайней мере, частичной) адекватного иммунного ответа, препятствующего распространению метастазов.

#### Литература

1. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1 / K.M. Dameron [et al.] // Science. – 1994. – Vol. 265. – P. 1582-1584.
2. Adolf, K.W. Analysis of the promoter and transcription start sites of the human thrombospondin 2 gene / K.W. Adolf, D.J. Liska, P. Bornstein // Gene. – 1997. – Vol. 193. – P. 5-11.
3. Enhanced expression of multiple forms of VEGF is associated with spontaneous immortalization of murine fibroblasts / T. Sugihara [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 1994. – Vol. 1224. – P. 365-370.
4. Mukhopadhyay, D. Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression / D. Mukhopadhyay, L. Tsiokas, V.P. Sukhatme, // Cancer Res. – 1995. – Vol. 55. – P. 6161-6165.
5. The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by p53 / T. Mashimo [et al.] // Proc.Natl.Acad.Sci.USA.- 1998.- Vol. 95.-P.11307-11311.
6. Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/ CD82 expression with recurrences in breast cancer patients / C.I. Huang [et al.] // Am. J. Pathol. – 1998. – Vol. 153. – P. 973-983.
7. KAI1/CD82 expression in nonsmall cell lung carcinoma is a novel, favourable prognostic factor / M. Higashiyama [et al.] // Cancer. – 1998. – Vol. 83. – P. 466-474.
8. Suppression of invasive properties of colon cancer cells by a metastasis suppressor KAI1 gene / A. Takaoka [et al.] // Oncogene. – 1998. – Vol. 16. – P. 1443-1453.
9. Reduced invasive and metastatic potentials of KAI1-transfected melanoma cells / A. Takaoka [et al.] // Jpn. J. Cancer Res. – 1998. – Vol. 89. – P. 397-404.

Поступила 28.08.07